

内閣府食品安全委員会事務局
平成23年度食品安全確保総合調査

ポジティブリスト制度施行に伴う暫定基準の設定された

農薬、動物用医薬品及び飼料添加物に係る

食品健康影響評価に関する調査報告書

ジブチルヒドロキシトルエン

平成24年1月

株式会社三菱化学テクノロジー

はじめに

食品安全委員会では、ポジティブリスト制度導入に伴い、暫定基準の設定された農薬、動物用医薬品及び飼料添加物(以下「農薬等」という。)について、海外のリスク評価機関等で実施された評価結果を活用し、順次食品健康影響評価を行っているところである。

本報告書はこの内、ジブチルヒドロキシトルエンについて、FAO/WHO 合同添加物専門家会議(以下「JECFA」という。)と国際がん研究機構(以下「IARC」という。)の評価書の翻訳を行うとともに、評価に必要な情報について整理し、取りまとめたものである。

平成 24 年 1 月

株式会社三菱化学テクノロジーサーチ

目 次

ジブチルヒドロキシトルエン

1. 調査の目的	5
2. 作業の概要	5
2.1. 調査対象物質	5
2.2. 評価書の翻訳.....	7
2.2.1. 評価書.....	7
2.3. 翻訳の整理	7
3. 評価書と訳.....	7
3.1 JECFA(1964 年)	9
3.2 JECFA(1965 年)	25
3.3 JECFA(1973 年)	37
3.4 JECFA(1976 年)	57
3.5 JECFA(1980 年)	85
3.6 JECFA(1983 年)	103
3.7 JECFA(1986 年)	121
3.8 JECFA(1990 年)	143
3.9 JECFA(1995 年)	171
3.10 JECFA(1999 年)	281
3.11 IARC(1986 年)	295

海外のリスク評価機関における農薬の評価結果に関する調査 報告書

ジブチルヒドロキシトルエン

1. 調査の目的

食品衛生法の一部を改正する法律(平成15年法律第55号)の施行に伴い、いわゆるポジティブリスト制度が、平成18年5月29日に導入された。本施行に伴い、農薬、動物用医薬品及び飼料添加物(以下「農薬等」という。)758物質に暫定基準が設定され、食品安全委員会では、これらの物質について、海外のリスク評価機関等で実施された評価結果を活用し、順次食品健康影響評価を行っているところである。

本調査は、国際的な評価機関である JMPR (FAO/WHO 合同残留農薬専門家会議) 及び JECFA (FAO/WHO 合同残留添加物専門家会議) と最新の評価を行っている EFSA (欧州食品安全委員会) の評価書が、我が国での評価を行う上で有益性が高いため、今後評価を行うべき農薬のうち、JMPR 及び JECFA 及び EFSA の双方の評価を比較できるものについて、双方の評価書の翻訳を行うとともに評価に必要な情報について整理し、評価書ごとに毒性試験及びその結果の概要を一覧表に取りまとめたものである。

2. 作業の概要

本調査では JMPR 及び JECFA 及び EFSA における評価書の翻訳及び整理を以下のように実施した。

2.1. 調査対象物質

本調査全体では、ポジティブリスト制度施行に伴う暫定基準が設定された農薬等の 758 物質のうち、表1に示した 38 物質を調査対象とした。本報告書では、これらのうちジブチルヒドロキシトルエンの調査について報告した。

表1 調査対象の農薬等

番号	物質名	主な用途
1	5-プロピルスルホニル-1H-ベンズイミダゾール-2-アミン (アルベンダゾール)	動物薬・寄生虫駆除剤
2	イソメタミジウム	動物薬・寄生虫駆除剤
3	エトキシキン	農薬/飼料添加物・成長調整剤・抗酸化剤
4	オイゲノール	動物薬・麻酔薬
5	オルトフェニルフェノール	農薬・殺菌剤
6	カルバドックス(キノキサリン-2-カルボン酸含む)	動物薬・合成抗菌剤
7	キントゼン(PCNB)	農薬・殺菌剤
8	クロサンテル	動物薬・寄生虫駆除剤
9	クロルプロマジン	動物薬・鎮静剤
10	酢酸トレンボロン	動物薬・ホルモン剤
11	サラフロキサシン	動物薬・合成抗菌剤
12	ジェチルスチルベストロール(DES)	動物薬・ホルモン剤
13	ジクラズリル	動物薬・寄生虫駆除剤
14	シクロキシジム	農薬・除草剤
15	ジブチルヒドロキシトルエン	飼料添加物・抗酸化剤
16	ジメトリダゾール	動物薬・寄生虫駆除・抗原虫剤
17	スペクチノマイシン	動物薬・抗生物質
18	スルファジミジン	動物薬・合成抗菌剤
19	ゼラノール	動物薬・ホルモン剤
20	デキサメタゾン	動物薬・ホルモン剤
21	テクナゼン	農薬・殺菌剤・成長調整剤
22	ドジン	農薬・殺菌剤

番号	物質名	主な用途
23	トリクラベンダゾール	動物薬・寄生虫駆除剤
24	トリベヌロンメチル	農薬・除草剤
25	ナイカルバジン	動物薬/飼料添加物・合成抗菌剤・寄生虫駆除剤
26	ネオマイシン	動物薬・抗生物質
27	バシトラシン	動物薬/飼料添加物・抗生物質
28	ビオレスメトリン	農薬・殺虫剤
29	ピペロニルブトキシド	農薬/動物薬・共力剤
30	ブチルヒドロキシアニソール	飼料添加物・抗酸化剤
31	フルアズロン	動物薬・ダニ駆除剤
32	フルメトリン	農薬/動物薬・殺虫剤
33	ブロモプロピレート	農薬・ダニ駆除剤
34	ポリミキシン B	動物薬・抗生物質
35	マレイン酸ヒドラジン	農薬・除草剤・成長調整剤
36	メトロニダゾール	動物薬・寄生虫駆除剤・抗原虫剤
37	モキシデクチン	動物薬・寄生虫駆除剤
38	ロニダゾール	動物薬・寄生虫駆除剤・抗原虫剤

2.2. 評価書の翻訳

2.2.1. 評価書

ジブチルヒドロキシトルエンに関して、これまでに食品安全委員会にて収集を行っている JECFA と IARC における評価書の指定部分の翻訳を行った。各評価書等を表 2 に示した。

表 2 調査対象の評価書

機関	発行年	タイトル
JECFA	1964	FAS 24.65/NMRS 38A-JECFA 8/13, 1964
JECFA	1965	FAS 67.29/NMRS 40A,B,C-JECFA 9/28, 1965
JECFA	1973	FAS 5/NMRS 53A-JECFA 17/156, 1973
JECFA	1976	FAS 10-JECFA 20/17, 1976
JECFA	1980	FAS 15-JECFA 24/106, 1980
JECFA	1983	FAS 18-JECFA 27/50, 1983
JECFA	1986	FAS 21-JECFA 30/25, 1986
JECFA	1990	FAS 28-JECFA 37/3, 1990
JECFA	1995	FAS 35-JECFA 44/3, 1995
JECFA	1999	FAS42, 1999
IARC	1986	BUTYLATED HYDROXYTOLUENE (BHT), Summaries & Evaluations, vol. 40, 1986

2.3. 翻訳の整理

評価書の翻訳について、評価書ごとに以下のように整理した。

- ・評価書ごとに見出しを整理し、原文の目次を作成した。
- ・翻訳の見出し部分に原文の該当ページを記載した。
- ・評価書ごとに毒性試験及びその結果の概要を一覧表に取りまとめた。

3. 評価書訳

以下に評価書の指定箇所の全訳を、評価書ごとに掲載した。

ブチルヒドロキシトルエン 評価書と訳と情報整理

JECFA 1964

ウェブサイト: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v38aje02.htm>

FAS* 24.65/NMRS 38A-JECFA 8/13

ブチルヒドロキシトルエン 評価書和訳と情報整理 JECFA (1964) 目次

ブチルヒドロキシトルエン (原文 P.1)	15
化学名 (原文 P.1).....	15
別名 (原文 P.1)	15
実験式 (原文 P.1).....	15
構造式 (原文 P.1).....	15
分子量 (原文 P.1).....	15
定義 (原文 P.1)	15
説明 (原文 P.1)	15
用途 (原文 P.1)	16
生物学的データ (原文 P.2)	16
生化学的側面 (原文 P.2).....	16
急性毒性 (原文 P.2)	17
短期試験 (原文 P.2)	17
マウス (原文 P.2)	17
ラット (原文 P.3)	17
ウサギ (原文 P.4)	18
イヌ (原文 P.4)	18
鶏 (原文 P.4)	19
ラット (原文 P.4)	19
報告されている実験的試験についてのコメント (原文 P.4)	19
評価 (原文 P.4)	19
ラットにおいて有意な毒性影響を生じない濃度 (原文 P.5).....	19
ヒトの推定一日摂取許容量 (原文 P.5)	20
望ましいと考えられる更なる試験 (原文 P.5)	20
ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要 (評価書:JMPR 1964)	21
略称.....	22

原文 目次

原文ページ

ブチルヒドロキシトルエン	1
化学名	1
別名	1
実験式	1
構造式	1
分子量	1
定義	1
説明	1
用途	1
生物学的データ	2
生化学的側面	2
急性毒性	2
短期試験	2
マウス	2
ラット	3
ウサギ	4
鶏	4
長期試験	4
ラット	4
報告されている実験的試験についてのコメント	4
評価	4
ラットにおいて有意な毒性作用を生じない濃度	5
ヒトの推定一日摂取許容量	5
望ましいと考えられる更なる試験	5
引用文献	5

BUTYLATED HYDROXYTOLUENE	1
CHEMICAL NAMES	1
SYNONYM	1
EMPIRICAL FORMULA	1
STRUCTURAL FORMULA	1
MOLECULAR WEIGHT	1
DEFINITION	1
DESCRIPTION	1

USE	1
Biological Data	2
Biochemical aspects	2
Acute toxicity	2
Short-term studies	2
Mouse	2
Rat	3
Rabbit	4
Dog	4
Fowl	4
Long-term studies	4
Rat	4
Comment on experimental studies reported	4
Evaluation	4
Level causing no significant toxicological effect in the rat	5
Estimate of acceptable daily intake for man	5
Further Work Considered Desirable	5
References	5

WHO/食品添加物/24.65

FAO 栄養会議

レポートシリーズ 38A 号

一部の抗菌物質及び抗酸化剤の識別及び純度ならびに毒性評価の詳細

本文書の内容は、1965 年 12 月 8 日～17 日に開かれた FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議の審議結果である a

a 第八回 FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議報告、世界保健機構テクニカルレポートシリーズ、1965 年、309 号; FAO 栄養会議レポートシリーズ 1965 年、38 号。

ブチルヒドロキシトルエン (原文 p.1)

化学名 (原文 p.1)

2:6-ジ-tert.-ブチル-p-クレゾール;

4-メチル-2:6-ジターシャリー-ブチルフェノール

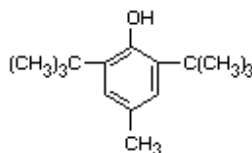
別名 (原文 p.1)

BHT

実験式 (原文 p.1)

$C_{15}H_{24}O$

構造式 (原文 p.1)



分子量 (原文 p.1)

220.36

定義 (原文 p.1)

ブチルオキシトルエンは、少なくとも 99.0%の $C_{15}H_{24}O$ を含まなければならない。

説明 (原文 p.1)

白色、結晶、無臭固体。不水溶性だが脂溶性で、1 g が 4 mL のエタノールに溶解する。

用途 (原文 p.1)

油脂の抗酸化剤又は脂肪含有食品のパッケージ材として使用される。他の抗酸化剤及び共力剤と組み合わせて活性が増強される。

生物学的データ (原文 p.2)

生化学的側面 (原文 p.2)

BHT は吸収され易い。ラットに高用量を投与した後の脂肪組織への沈着が報告されており*、これにより、抽出した会陰部脂肪の安定性が高まりうる。¹ ヒドロキシル両側のブチル基の存在が、BHT の代謝を複雑にしている。抱合が生じる前に予め修飾される必要がある。これは、ブチル基の片方の2-ヒドロキシ-2:2-ジメチル-2-エチル基の酸化、又はメチル基のカルボキシン酸への酸化のいずれかの形をとる。前者はグルクロニド抱合体を生じ、後者はグルクロン酸又はグリシンに抱合される。酸化物質の一部は、抱合されずに排泄される。^{2,3}

*原文中”bee been described”とあるのは、”has been described”の誤記であると考えられる。

ウサギに 400~800 mg/kg 体重の BHT を単回又は反復投与した。投与量の約 16%がエーテルグルクロニドとして、19%がエステルグルクロニドとして排泄された。非抱合型フェノール(8%)、エーテル硫酸(8%)及びグリシン抱合体(2%)も排泄された。化合物投与から 3~4 日後に全ての検出可能な代謝物の排泄がほぼ終了し、投与量の約 54%が同定された代謝物であった。⁴

ラットに ³H 標識 BHT 100 µg を腹膜内投与し、放射能の尿中排泄率を 4 日間連続して測定した。投与から 4 日後に、投与した放射能の 34.5%が尿中に回収された。⁵ ラットに同用量の ¹⁴C 標識 BHT(100 µg)を投与すると、最初の 4 日で放射能の 34%が尿中排泄され、粉碎 BHT*を用いた過去の結果とほぼ一致した。⁶

*原文中”tritiated BHT”とあるのは、”trituated BHT”の誤記であると考えられる。

0.5%BHTを含む飼料で 35 日間混餌投与したラットの肝臓及び体脂肪を分析した。肝臓の BHT 濃度は、常に雄が 5 ppm 以下、雌が 1.5 ppm 以下であった。体脂肪では雄が 30 ppm、雌が 45 ppm 付近で変動した。通常の飼料に戻したラットの脂肪には BHT 濃度の段階的低下がみられ、半減期は約 7~10 日であった。¹⁴C で標識した BHT(12 mg/kg 体重)を経口投与した*ラットにおいて、放射能の尿中及び糞中排泄を毎日検査した。投与後 6 日目までに投与量の約 70%が回収され、排泄はごくわずかとなった。1%未満が呼気中に二酸化炭素として排泄された。放射能の約 50%が、経口投与後 24 時間の期間中に胆汁中に排泄された。⁷

*原文中”given an oral done”とあるのは、”given an oral dose”の誤記ですので、「経口投与した」と訳した。

急性毒性 (原文 p.2)

動物	経路	LD ₅₀ (mg/kg 体重)	概略致死量 (mg/kg 体重)	引用文献
ラット	経口	1700-1970	-	8
ネコ	経口	-	940-2100	8
ウサギ	経口	-	2100-3200	8
モルモット	経口	-	10 700	8

短期試験 (原文 p.2)

マウス (原文 p.2)

妊娠マウスに、750 mg/kg 体重/日の BHT を 18 日間投与した。別の群に、同用量を 18 日間の妊娠期間を含む合計 50~64 日間投与した。胎児異常は観察されなかった。⁹

雌マウス 144 匹を用いた統計的に計画された試験では、母動物の生殖寿命中に産まれた 7765 匹の児動物を代表する 1162 匹の同腹児のいずれにも失明は観察されなかった。¹⁰

ラット (原文 p.3)

45 対の雄離乳児ラットに対し、0.001%、0.1%又は 0.5%BHT を加えた 0、10 及び 20%ラードを添加した飼料により 5~8 週間混餌投与試験を実施した。0.001%では、検査した血清成分のいずれの変化も生じなかった。0.5%では、5 週間以内に血清コレステロール値の増加が生じた。0.1%BHT を加えた 10%ラードを添加した飼料を 8 ヶ月間与えた雌ラット*には、血清コレステロール値の増加がみられたが、その他の有意な変化はみられなかった。雌ラットに 10%及び 20%ラードに溶かした 0.5%BHT を同じ期間与えると、血清コレステロール、リン脂質及びムコタンパク質の値が増加した。¹¹

*原文中"rate"とあるのは、"rats"の誤記として訳した。

ビタミン E 欠乏飼料を 5 週間投与した妊娠ラットに 0.3%BHT を含む飼料を与えても、毒性症状は生じなかった。1.55%では、体重の激減及び胎児死亡が生じた。¹²

一群 12 匹のラットに、20%ラード添加とともに 0.1%BHT を含む飼料で 7 週間混餌投与すると、雄ラットの初期成長速度及び成熟時体重が有意に減少した。10%ラードの添加では、雌ラットにも雄ラットにも影響は認められなかった。ペア混餌投与試験から、この成長阻害が BHT の直接的毒作用によるものであり、飼料の味の低下によっては説明できないことが示された。この BHT 濃度は、絶対肝重量及び体重に対する相対重量の両方の有意な増加をもたらした。高ストレス下のラットには、頭頂部の有意な脱毛がみられた。飼料中の脂肪量を増加させると、BHT の毒性作用が増加した。同腹児の 10%に無眼球が生じた。¹³

6 匹の離乳児ラット(一群雄 3 匹及び雌 3 匹)に、20%ラードに溶解した BHT を 0%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4% 及び 0.5%濃度で 6 週間混餌投与した。BHT により特に雄の成長速度が低下し、0.3%投与群で影響は有意で

あるように見えた。肝絶対重量及び肝重量対体重比も両性で増加し、後者の影響は0.2%濃度で有意になるように見えた。BHT 投与により、雄ラットの左副腎重量対体重比が増加したが、雌では一貫した影響はなかった。副腎に投与に起因する組織学的変化はみられなかった。全投与群において BHT により血清コレステロールが増加し、コレステロール濃度は BHT 濃度に正比例した。副腎コレステロール濃度にも有意な増加がみられた。BHT 投与により、肝臓総コレステロール濃度又はエステル型コレステロールの割合、総肝脂質又は肝臓の多価不飽和脂肪酸の総濃度に有意な変化は生じなかった。¹⁴

ラットに 250 mg/kg 体重の BHT を 68~82 日間投与した結果、体重増加の割合の低下及び肝臓の脂肪浸潤が生じた。¹⁵

ラットの 20 日及び 90 日間飼料試験から、0.5%又は 1%BHT を含む飼料の味を好まないことが分かった。しかし、これらの濃度を徐々に達成すれば、ラットが投与飼料を摂取しやすくなる。一群 5 匹又は 10 匹のラットを用いた 25 日間ペアフィーディング試験では、0.8%及び 1%BHT を含む飼料により 1 日の摂餌量が対照値以下に減少することが示された。飼料中 1%濃度で体重増加が遅延した。⁸

(進行中の試験) ラットに、100 mg/kg 体重/日の BHT を交配前の 7 週間、及び妊娠期間中を通して投与、又は妊娠 20 日目に剖検した。これらの動物のいずれにも胎児異常の所見はなかったが、ビタミン A で処置した陽性対照群の児動物に異常が生じた。⁹

(進行中の試験) 別のグループが 1964 年 5 月に三世代生殖試験を開始した。このグループも、16 匹の雄ラット及び 16 匹の雌ラットの群に 20%脂肪を含む飼料中 0.03%、0.1%及び 0.3%濃度の BHT を 10 週間投与した。16 匹の雄及び 16 匹の雌のラットをそれぞれ含む二つの群を対照群とした。いずれの投与群でも雌の体重への明確な影響は観察されず、0.3%投与群で雄にわずかな低下がみられたのみであった。10 週間投与後には、いずれの BHT 濃度においても、雌雄どちらも血中コレステロール濃度への有意な影響はみられなかった。0.3%投与群の雄のうち 4 匹、0.1%投与群の 2 匹が、試験中に死亡した。0.3%投与群の雌 2 匹が死亡した。両対照群では雄ラット1匹のみが死亡した。¹⁶

(進行中の試験) ラット一群雄 20 匹及び雌 20 匹に、飼料中 1%BHT を 10 週間投与した際は、動物を通常食に戻した後数週間以内に肝重量対体重比及び肝細胞の形態学的外観の両方の回復がみられた。¹⁷

ウサギ (原文 p.4)

BHT 500~700 mg/kg 体重 (飼料中約2%)投与後も、BHA の大量投与において報告されるものと同様の電解質排泄への急性影響が示された。より低い投与群では、そのような影響は観察されなかった。¹⁸

イヌ (原文 p.4)

イヌ一群 4 匹に、1.4~4.7 g/kg 体重の用量を 2~4 日毎に 4 週間投与した試験では、軽度から中程度の重症度の下痢が誘発された。剖検では、有意な肉眼的病理学的変化は認められなかった。0.17~0.94 g/kg 体重の用量を週 5 日、12 ヶ月間投与したイヌにおいては、中毒兆候及び肉眼的又は組織病理学的変化は観察されなかった。⁸

鶏 (原文 p.4)

一群 10 羽の若鶏に 0.125%BHT を 34 週間投与した場合、同様の対照群と比較して、生殖能、卵の孵化率又はひなの健康に差はみられなかった。抗酸化剤を投与した鳥の卵には、対照の卵より多くのカロチノイド及びビタミン A が含まれていた。¹⁹

ラット (原文 p.4)

ラット一群雄 15 匹及び雌 15 匹に、1%ラード及び 0.2%、0.5%又は 0.8%BHT を含む飼料を 24 ヶ月間投与した試験では、中毒の特徴的兆候はみられず、顕微鏡による病理学検査は陰性であった。0.5%BHT を含む飼料を投与した試験では、BHT をラードに溶解して 150 °C で 30 分間加熱した後、飼料に入れ込んだ。体重増加又は血液成分への影響はなく、主要臓器の顕微鏡による病理学検査は陰性であった。1%BHT を投与した後には、雄及び雌ラットの両方において正常以下の体重増加、体重に対する脳及び肝臓ならびにいくつかの他の臓器の重量増加が生じた。顕微鏡による病理学検査はこの群でも陰性であった。これらの濃度の BHT は、赤血球及び白血球の数、又は末梢血中のヘモグロビン濃度に特に影響しなかった。雌雄両方の多数のラットが本試験中に死亡したが、投与した BHT 濃度とは無関係であったため、死因はこの物質の投与と無関係であると思われる。顕微鏡による病理学検査は、この観察を支持する。⁸

飼料中 0.5%BHT はラットの生殖サイクル、脾臓、腎臓、肝臓及び皮膚の組織、又は、心臓、脾臓もしくは腎臓の重量に影響しなかった。0.1%BHT 及び 10%水素化ヤン油を含む飼料を 2 年間混餌投与したラットには、死亡率の有意な増加はみられなかった。体重増加への影響は、既に記載されている。¹³

報告されている実験的試験についてのコメント (原文 p.4)

数種の予備試験が行われている。しかし、初期の観察者と最近の観察者による結果の間にはいくつかの重要な矛盾がある。ラットでの短期試験及び長期試験ならびに代謝試験につき、評価の項で後述する。

評価 (原文 p.4)

ラットにおいて有意な毒性影響を生じない濃度 (原文 p.5)

一つの広範な一連の試験⁸から、ラットに有意な有害影響を生じない BHT 濃度が、1%ラード含有飼料中 0.8%であることが示されている。しかし、二つの短期試験^{11,13}では、20%ラード飼料中 0.1%BHT により、血中の様々な脂質成分の増加及び体重増加の有意な減少が生じたことが報告されている。より最近に同様の傾向の結果が得られたが、0.3%濃度まで影響は明確にならなかった。¹⁴別の試験では、20%脂肪食中 0.1%BHT は、雌雄いずれの離乳児ラットの成長速度にも影響しないことが分かり、0.1%又は 0.3%濃度で血中コレステロール濃度に影響はなかった。¹⁶ ラットによる 10%ラードを含む飼料中 0.5%BHT を投与した長期試験では、対照との有意差は観察されなかった。¹³

飼料への 10%又は 20%ラードの添加により*、いくつかの試験で BHT の有害作用が増強されることが分かった。

20%ラードを添加した場合には脂肪がカロリー摂取量の約 33%を占めたが、ヒトの食事にはこのレベルの脂肪が含まれることが多い。従って、このようなレベルの飼料脂肪が BHT 毒性に与える影響は、BHT を食品添加物として使用する上で重要である。いくつかの試験により、BHT が体重に対する肝臓重量の増加を引き起こすことが示されている。しかし、飼料中 1%BHT を 10 週間投与したラットにおいてさえ、通常の飼料に戻して 2、3 週間以内に肝臓対体重比及び肝細胞の形態学的外観が回復した。¹⁷

*段落を移動した。

BHT の化学構造から、代謝が多少遅延する可能性が示唆される。標識 BHT の排泄についての試験結果^{5,6,7}は、使用した用量レベル及び投与経路が異なるために比較が困難であり、したがって、起こりうる代謝遅延の重要性の評価は困難である。

化合物を投与した母動物の同腹児の一部に無眼球が生じたことから、BHT に催奇形作用がある可能性が示唆された。¹³ 現在完了した又は進行中の広範な生殖試験からは、その可能性は低い。^{9,10,16}

0.1%濃度がラットにおいて有意な毒性影響を生じないレベルとして認められるためには、一部の研究者により報告されている体重増加への影響、さらに血中脂質への影響を無視する必要がある。

現在進行中の試験結果の評価が提出されるまで、これらの観察を退けることは勧められない。試験した次に低い用量は、ラット 26 匹の飼料中 0.01%(=100 ppm)であり、5 mg/kg 体重/日に等しい。

ヒトの推定一日摂取許容量（原文 p.5）

	<u>mg/kg 体重</u>
条件付採録	0~0.5

望ましいと考えられる更なる試験（原文 p.5）

1. BHT の脂質代謝への影響及び飼料脂肪量と毒性との関係に特に関連した更なる長期試験。
2. ヒト被験者における代謝試験。

ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要（評価書:JMPR 1964）

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
急性毒性	急性毒性(原文 p.2) の表参照		
18日間短期毒性	マウス	750 mg/kg 体重/日	胎仔異常は観察されなかった。
短期毒性	雌マウス	記載なし	母動物の生殖寿命を通して産まれた 7765 匹の児動物を代表する 1162 匹の同腹児のいずれにも失明は観察されなかった。
5週間短期毒性	ラット	0.3%BHT	ビタミン E 欠乏食を与えた妊娠ラットに混餌投与しても、毒性症状は生じなかった。1.55%では、体重の激減及び胎児死亡が生じた。
7週間短期毒性	ラット	0.1%	20%ラード添加とともに雄ラットの初期成長速度及び成熟時体重が有意に減少した。10%ラード添加では、雌ラットにも雄ラットにも影響は認められなかった。ペアフィーディング試験から、この成長障害が BHT の直接的毒作用によるものであり、飼料の味の低下によっては説明できないことが示された。この濃度の BHT は、肝臓の絶対重量及び体重に対する相対重量の両方の有意な増加をもたらした。高ストレス下のラットには、頭頂部の有意な脱毛がみられた。飼料中の脂肪量を増加させると、BHT の毒作用が大きくなった。同腹児の 10%に無眼球が生じた。
6週間短期毒性	ラット	20%ラード添加とともに BHT を 0%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4% 及び 0.5%	BHTにより特に雄の成長速度が低下し、影響は0.3%で有意。肝臓絶対重量及び肝臓重量対体重比も雌雄両方で増加し、後者の影響は 0.2%で有意になるように見えた。BHTにより、雄ラットの左副腎重量対体重比が増加したが、雌では一貫した影響はなかった。全ての飼料濃度の BHT により血清コレステロールが増加し、コレステロール濃度は BHT の濃度に正比例した。副腎コレステロールの濃度にも有意な増加あった。BHTにより、肝臓総コレステロール濃度又はエステル型コレステロールの割合、総肝臓脂質又は肝臓の多価不飽和脂肪酸の総濃度に有意な変化は生じなかった。
68~82 日間短期毒性	ラット	250 mg/kg 体重	体重増加速度の低下及び肝臓の脂肪浸潤が生じた。
20 日及び 90 日間短期毒性	ラット	0.5%又は 1%BHT	BHT を含む餌の味を好まないことが分かった。
25 日間のペアフィーディング試験		0.8%及び 1%	1 日摂餌量が対照値以下に減少した。飼料中 1%投与群で体重増加が遅延した。
発生毒性	ラット	100 mg/kg 体重/日	胎児異常の所見はなかったが、ビタミン A で処置した陽性対照群の児動物に異常が生じた。

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
三世代生殖試験	ラット	20%脂肪を含む飼料中 0.03%、0.1% 及び 0.3%	いずれの投与群でも雌の体重への明確な影響は観察されず、0.3%投与群で雄にわずかな低下がみられただけであった。どの濃度の BHT を 10 週間与えた後でも、雌雄どちらも血中コレステロール濃度への有意な影響はなかった。0.3%投与群で雄のうち 4 匹、0.1%投与群で 2 匹が、試験中に死んだ。0.3%で雌の中の 2 匹が死んだ。両対照群では雄ラット1匹だけが死んだ。
10 週間短期毒性	ラット	1%	普通食に戻した後数週間以内で肝臓重量対体重比及び肝細胞の形態学的外観の両方の回復がみられた。
	ウサギ	500~700 mg/kg 体重	BHA の大量投与に報告されるものと同様の電解質排泄への急性影響が得られた。より低い投与群では、かかる影響は観察されなかった。
4 週間短期毒性	イヌ	1.4~4.7 g/kg 体重	軽度から中程度の重症度の下痢が誘発された。死体解剖では、有意な肉眼的病理学的変化は認められなかった。0.17~0.94 g/kg 体重の用量を週 5 日、12 ヶ月間の期間与えたイヌにおいては、中毒兆候及び肉眼的又は組織病理学的変化は観察されなかった。
34 週間短期毒性	鶏	0.125%	対照群と比較して、生殖力、卵の孵化率又はひなの健康に差はみられなかった。抗酸化剤で処置した鳥の卵には、対照の卵より多くのカロチノイド及びビタミン A が含まれていた。
短期毒性	ラット	1% ラード 及び 0.2%、0.5% 又は 0.8%、1%BHT	中毒の特徴的兆候なし。1%BHT で、雄及び雌ラットに正常以下の体重増加、体重に対する脳及び肝臓ならびにくつかの他の臓器の重量増加が生じた
短期毒性	ラット	0.5%、	生殖サイクル、脾臓、腎臓、肝臓及び皮膚の組織、又は、心臓、脾臓もしくは腎臓の重量に影響なし。
2 年間長期試験		0.1%、10%水素化ヤシ油	死亡率の有意な増加はなかった。体重増加への影響は、既に記載されている。
その他			ADI:0~0.5 mg/kg 体重

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
WHO	World Health Organization	世界保健機関
FAO	Food and Agriculture Organization	国連食糧農業機関
BHT	Butylated Hydroxytoluene	ブチルヒドロキシトルエン
LD ₅₀	50% Lethal Dose	半数致死量
BHA	Butylated Hydroxyanisole	ブチルヒドロキシアニソール

ブチルヒドロキシトルエン 評価書和訳と情報整理

JECFA 1965

ウェブサイト:<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/40abcj07.htm>
FAS 67.29/NMRS 40A,B,C-JECFA 9/28, 1965

ブチルヒドロキシトルエン 評価書和訳と情報整理 JECFA (1965) 目次

ブチルヒドロキシトルエン (原文 P.1).....	27
生物学的データ (原文 P.2).....	27
生化学的側面 (原文 P.2).....	28
排泄及び分布 (原文 P.2).....	28
肝臓ミクロソームプロセッシング酵素の刺激 (原文 P.3).....	29
特殊試験 (原文 P.3).....	29
急性毒性 (原文 P.3).....	29
短期試験 (原文 P.4).....	29
ラット (原文 P.4).....	30
多世代試験 (原文 P.4).....	30
コメント (原文 P.4).....	30
評価 (原文 P.5).....	31
毒性的影響を引き起こさない濃度 (原文 P.5).....	31
ヒトに対する推定一日摂取許容量 (原文 P.5).....	31
ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要 (評価書:JMPR 1965).....	32
略称.....	32

原文 目次

原文ページ

ブチルヒドロキシトルエン	1
生物学的データ	2
生化学的側面	2
排泄及び分布	2
肝臓ミクロソームプロセッシング酵素の刺激	3
特殊試験	3
急性毒性	3
短期試験	4
多世代試験	4
コメント	4
評価	5
引用文献	5

BUTYLATED HYDROXYTOLUENE	1
BIOLOGICAL DATA	2
Biochemical aspects	2
Excretion and tissue distribution	2
Stimulation of liver microsomal processing enzyme	3
Special studies	3
Acute toxicity	3
Short-term studies	4
Multigeneration study	4
Comments	4
Evaluation	5
REFERENCES	5

国際連合食糧農業機関(FAO)栄養学会議

報告書シリーズNo.40A,B,C

WHO/食品添加物/67.29

抗菌剤、抗酸化剤、乳化剤、安定剤、小麦粉処理剤、酸と塩基の

毒性学的評価

この文書内容は、1965年12月13日～20日にローマで¹、1966年10月11日～18日にジュネーブで²開かれたFAO/WHO合同食品添加物専門家会議の審議の結果である。

¹ FAO/WHO合同食品添加物専門家会議第9報告書、FAO栄養学会議報告書シリーズ、1966年No.40; WHO科学技術報告書シリーズ、1966年、339

² FAO/WHO合同食品添加物専門家会議第10報告書、FAO栄養学会議報告書シリーズ、1967年(印刷中 in press)

国際連合食糧農業機関

世界保健機関

1967 年

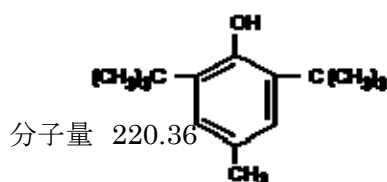
ブチルヒドロキシトルエン (原文 p.1)

別名 BHT

化学名 2,6-ジテルチアリブチル-p-クレゾール;
4-, メチル-2,6-ジテルチアリブチルフェノール

試験式 $C_{15}H_{24}O$

構造式



定義 ブチルヒドロキシトルエンは $C_{15}H_{24}O$ を少なくとも99%含む。

説明 ブチルヒドロキシトルエンは、白色の結晶質又は片状個体で、特有の弱い芳香を持つ。

使用 抗酸化剤として

生物学的データ (原文 p.2)

「一部抗菌剤及び抗酸化剤の同一性と純度及び毒性学的評価に関する詳細」と題された文書 (FAO/WHO、1965)は、BHTに関して1964年終了時点で利用可能なデータを要約したモノグラフを含んでいた。それ以降かなりの量の新情報が検討のために入手された。これらのデータ及び他のデータは、本モノグラフにまとめられている。

生化学的側面 (原文 p.2)

排泄及び分布 (原文 p.2)

ウサギにブチルヒドロキシトルエン(BHT) 500 mg/kg体重の単回経口投与による代謝試験を実施した。代謝物、2,6-di-tert-butyl-4-hydroxymethylphenol (BHT-alc)、3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoic acid (BHT-acid) 及び 4,4'-ethylene-bis-(2,6-di-tert-butylphenol)が同定された。BHTの尿中代謝物は37.5%がグルクロニドとして、16.7%がエーテル硫酸として、及び6.8%が遊離したフェノールとして構成されていた。無変化のBHTは糞中のみに存在した(Agaki & Aoki、1962a); 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzaldehyde(BHT-ald)は、ウサギの尿から単離された(Aoki、1962)。BHT-alcをウサギに投与し、尿中のBHT-ald、BHT-acid、エチレン-ビス誘導体と無変化BHT-alcを単離することにより主要代謝経路が確認された(Akagi&Aoki、1962b)。

¹⁴C-標識したBHTの体内運命が明らかにされた。比較的遅いBHTの排泄はおそらく、組織保持(tissue retention)よりもむしろ腸肝循環(enterohepatic circulation)に起因している。BHT-¹⁴Cをラットに単回経口投与(1~100 mg/ラット)したところ、投与量の約80~90%が4日で尿中及び糞中で回収された。総放射能のうち、40%が雌の尿中に、25%が雄の尿中に現れた。4日後には、投与量の約3.8%が主に消化管で保持された。放射能のかかなりの部分が2匹のラット(雌雄各1匹)から採取した胆汁中に40時間にわたって発見された (Daniel & Gage、1965)。

2匹のラット(一群雌雄各1匹)に44 mg/kg体重のBHTを1~5回の経口投与で交互に与え、各群を最終投与の24時間後にと殺した。総投与量の範囲は雄で92~103.5%、雌で92.6~98.6%になった。排泄経路で性差が示され、雌が尿中に19~43%放射能を排泄したが、雄は3~15%に過ぎなかった。5回投与の8日後には、放射能の92%が雄により排泄され、97%が雌により排泄されていた。雌に段階的用量のBHTを皮下投与すると相当な糞便排泄を示したが、用量増加とともに排泄率は減少した。反復経口投与の条件下では体内にBHT-¹⁴Cの蓄積の証拠はなかった(Tyeら、1965)。

35及び50日間までの期間、それぞれ0.5%及び1.0%BHTを含む飼料を与えたラットの脂肪及び肝臓のBHT含有量は:0.5%BHT含有飼料で、脂肪中では雄で約30 ppmの濃度、雌で45 ppmの濃度に達し、肝臓中では約1~3 ppmであった。一方1.0%BHT含有飼料で、脂肪中では雄で50 ppmの濃度、雌で30 ppmの濃度であった。投与中止すると、脂肪中のBHT濃度は下降し、半減期は7~10日であった (Daniel & Gage、1965)。脂肪中のBHT濃度は、挿管経由で500 mg/kg体重を毎日与えた場合、3~4日後に約100 ppmでプラトーとなった;200 mg/kg体重/日を1週間与えると約50 ppmの濃度を産出した(Gilbert & Golberg、1965)。

500 ppm BHT含有飼料を産卵雌鳥に与えると、20 ppmが卵の脂肪描分で見つかった;飼料中100 ppmは5 ppm未満の残留物に帰結した。ブロイラー鶏において、21週間以上にわたり、体脂肪中での残留物は500

ppm飼料で55 ppmで、100 ppm飼料で5 ppm未満であった(Van Stratum & Vos, 1965)。

1日齢のヒナに¹⁴C-BHTを200 ppm濃度で10週間混餌投与した。ブロイラー齢で、食用部分には1~3 ppmにのぼるBHT及び代謝物の残留物があった。同様の餌を産卵雌鳥に与えると、7日後の卵の中に2 ppmの残留物があり、その後の濃度は一定であった(Frawleyら、1965a)。

肝臓ミクロソームプロセシング酵素の刺激 (原文 p.3)

BHTを毎日挿管で与えたラットはいくつかの肝臓ミクロソーム酵素活性の上昇を示した。酵素活性の刺激は、相対的肝臓重量の増加と関連し、雌ラットでのこれら酵素活性の変化のしきい値は25~75 mgBHT/kg体重/日以下であった。脂肪中のBHT貯蔵は、プロセシング酵素活性に影響を受けるように思われた。毎日500 mg/kg体重を与えたラットで、BHTの脂肪中濃度は、2日目までに雌で230 ppm、雄で162 ppmという値に達し、その時までには相対的肝臓重量及びプロセシング酵素活性は上昇していた。それ以後肝臓重量及び酵素活性は上昇し続けたが、両性とも脂肪のBHT含有量は約100 ppmのプラトーに下降した(Gilbert & Golberg, 1965)。

ラットの更なる研究において、尿中へのアスコルビン酸排出増加はBHA又はBHTが誘発する肝臓膨大と、発症、程度、持続時間において並行し、BHAに関しては急速だが一時的で、BHTに関しては発症はゆっくりだが長期であることがわかった(Gauntら、1965a)。BHTに起因するプロセシング酵素活性刺激、尿中のアスコルビン酸排出の増加、そして肝臓の相対的体重増加の並行性は、14日間の飼料制限により影響を受けず、肝臓重量を除くこれらの変化全ては通常食での14日間の回復期で可逆的であった(Gauntら、1965b)。

特殊試験 (原文 p.3)

0.1又は0.5%BHT含有飼料を2種類の食中濃度のラード(10及び20%)と共にマウスに与えた。0.5%濃度BHTはわずかだが有意に12日齢の平均的児動物体重と一腹総体重を減少させた。1.0%濃度BHTはそのような影響を与えなかった。144匹の母動物のうち12匹は確実な無眼球症の系統から選択したにもかかわらず、誕生した7,754匹のマウスのうち無眼球症(anophthalmia)を示したマウスはなかった(Johnson, 1965)。

BHTの胎児毒性に関する試験で、3つの投与スケジュールを採用した： 特定の妊娠日に単回投与(1,000 mg/kg体重)、交配から妊娠中を通して連日反復投与(250~500 mg/kg体重)、交配前7~10週間、交配中と妊娠中も継続してと殺するまで連日投与(マウスには250~500 mg/kg体重、ラットには500及び700 mg/kg体重)。完全に成長した胎児の骨格及び軟組織の検査では、他の基準と同様、有意な胎児毒性的影響は観察されなかった。生殖と生後の発達もまた、影響はされなかった(Clegg, 1965)。

急性毒性 (原文 p.3)

動物	経路	LD ₅₀ (mg/kg体重)	参照
ラット	経口	2,450	Karplyuk, 1959
マウス	経口	2,000	Karplyuk, 1959

短期試験 (原文 p.4)

ラット (原文 p.4)

BHT(2,000 ppm)を組み込んだ、19.9%カゼイン含有飼料を8匹の若いラットの一群に8週間投与した。別の8匹の一群を対照群とした。16.6%カゼイン含有飼料で、さらに別の一群で4週間、さらに9.6%カゼイン(コリン添加無しで)7週間試験を繰り返した。これら3例全てにおいて、BHTは成長刺激を引き起こし、タンパク質効率を向上させた。肝臓のN含有量は、しかしながら、BHT投与した動物においては、大幅に減少し、その例外はBHTの濃度を200 ppmまで抑えた場合であった。2,000 ppm BHT投与のラットにおいては、絶食(詳細不明)後の肝臓タンパク質の回復も阻害された。肝臓脂質含有量は、2,000 ppmで増加したが、200 ppmでは増加しなかった。2,000 ppmのBHTの食中用量はまた、副腎重量とアスコルビン酸含有量を増加させたが、腺(gland)の重量に基づいて再計算した場合は有意な差はなかった。副腎のアスコルビン酸増加は、BHTが生体に課したストレスを示していると解釈される(Sporn & Schöbesch, 1961)。

48匹の離乳ラット(各性24匹)の群に1,000 ppmのBHT含有飼料を最高16週まで投与した。48匹のラットの一群を対照群とした。成長率と摂餌量の測定、剖検時の臓器の重量と顕微鏡的病理検査では、未投与のラットとの違いはなかった。しかしながら、相対肝重量及び副腎重量の増加は、損傷の病理組織学的証拠無しに引き起こされた。肝臓グルコースホスファターゼ及びグルコース6-ホスファターゼリン酸脱水素酵素活性の、生化学的測定及び組織化学的評価では、対照群との差は明らかにならなかった(Gauntら、1965a)。

多世代試験 (原文 p.4)

離乳ラット(各性16匹)に20%ラード及びBHT 0、300、1,000、又は3,000 ppm含有飼料を与え、100日齢(試験上79日)で交配した。最初の同腹児の離乳の10日後、第二の児動物を産むため再び交配した。同腹児(16匹の雌と8匹の雄)を100日齢で交配した。数多くの機能及び臨床試験(血清コレステロールと脂質を含む)を親動物と第一世代の児動物(first filial)対して最大28週まで実施し、肉眼的及び顕微鏡的検査を42週で行った。3,000 ppmの食中濃度で、10~20%成長率の抑制が親動物と児動物で観察された。血清コレステロール値の20%上昇が28日後で観察されたが、10日後ではコレステロール上昇はなかった。試験42週でと殺した際には、10~20%相対肝重量増加もまた観察された。3,000 ppmでのその他全ての観察、及び1,000 ppmと300 ppmでの全ての観察は対照動物と同等であった。全ての生殖基準は正常であった。催奇形性影響はみとめられなかった(Frawleyら、1965b)。親世代と子の第一世代で得られた結果に類似した結果が子の第二世代でも得られた。後者の100日齢での2つの同腹児の検査では3,000 ppm投与群で平均体重の減少以外の影響は明らかでなかった。児動物の検査項目は:同腹児数、平均体重、死産の発生、生存率、肉眼的及び顕微鏡的病変であった(Kennedyら、1966)

コメント (原文 p.4)

単回及び反復経口投与の後、4日間でBHTはほぼ完全に尿中及び糞中に排泄される。BHAに比べて比較的緩慢な排泄速度は腸肝循環に因る可能性がある。ラット組織の分析の結果、無変化のBHTは体内に蓄積する傾向にはないことがわかった。

ラットのある品種で報告された頭髪のブラウニング、非薄化、及び喪失は他の品種では再現されなかった。ラット及びマウスのいくつかの品種で実施された生殖試験では、別のラットの品種で初期に報告された児動

物の無眼球症を明らかにすることは出来なかった。

20%ラード及び1,000 ppm BHT含有飼料は、血清コレステロール及び脂質濃度、肝臓及び他の臓器の相対重量、肝臓脂質及び成長率に対し何ら影響を及ぼさない。

ヒトでの代謝試験が望ましい。

評価 (原文 p.5)

毒性的影響を引き起こさない濃度 (原文 p.5)

ラット: 飼料中1,000 ppm、50 mg/kg体重/日相当

ヒトに対する推定一日摂取許容量 (原文 p.5)

	mg/kg体重 ¹
無条件許容	0~0.5
条件付許容	0.5~2

¹BHAとBHTの合計として

ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要（評価書:JMPR 1965）

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
急性毒性	急性毒性(原文 p.) の表参照		
8 週間短期試験	ラット	200 ppm 、2,000 ppm	BHTは成長刺激を引き起こし、タンパク質効率を向上させた。肝臓の投与動物の N 含有量は大幅に減少し、その例外はBHT200 ppmまで抑えた場合であった。絶食後の肝臓タンパク質の回復阻害。肝臓脂質含有量は、2,000 ppm で増加したが、200 ppm では増加しなかった。2,000 ppm の BHT の食中用量はまた、副腎重量とアスコルビン酸含有量を増加させたが、腺(gland)の重量に基づいて再計算した場合は有意な差はなかった。副腎のアスコルビン酸増加は、BHT が生体に課したストレスを示していると解釈される。
16 週発達毒性	ラット	1,000 ppm	相対肝重量及び副腎重量の増加が、損傷の病理組織学的証拠無しに引き起こされた。
多世代試験	ラット	20% ラード 及び BHT 0、300、1,000、又は 3,000 ppm	3,000 ppm 投与で、10~20%の成長率の抑制が親動物と児動物で観察された。血清コレステロール値の 20%上昇が 28 日後で観察されたが、10 日後ではコレステロール上昇はなかった。試験 42 週でと殺した際には、10~20%の相対肝重量増加も観察された。全ての生殖基準は正常であった。催奇形性影響なし。子動物の第二世代でも得られた。後者の 100 日齢での 2 つの同腹児検査では 3,000 ppm レベルで平均体重の減少以外の影響は明らかでなかった。
その他			ADI: 無条件許容 0~0.5 mg/kg 体重 条件付許容 0.5~2 mg/kg 体重 毒性的影響を引き起こさないレベル(ラット): 1,000 ppm (50 mg/kg 体重/日に相当)

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
FAO	Food and Agriculture Organization	国連食糧農業機関
WHO	World Health Organization	世界保健機関
JMPR	Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues	FAO/WHO 合同残留農薬専門家会議
LD ₅₀	50% Lethal Dose	半数致死量

ブチルヒドロキシトルエン 評価書と訳と情報整理

JECFA 1973

ウェブサイト: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v05je23.htm>
FAS 5/NMRS 53A-JECFA 17/156, 1973

ブチルヒドロキシトルエン 評価書和訳と情報整理 JECFA (1973) 目次

ブチルヒドロキシトルエン (原文 P.1)	37
説明 (原文 P.1)	37
生物学的データ (原文 P.1)	37
生化学的側面 (原文 P.1)	37
排泄と分布 (原文 P.1)	37
酵素及び他の生化学的パラメータに対する影響 (原文 P.3)	39
代謝 (原文 P.3)	39
毒性学的試験 (原文 P.4)	39
肝臓代謝に関する特殊試験 (原文 P.4)	39
<i>IN VIVO</i> での防御効果に関する特殊試験 (原文 P.4)	40
生殖に関する特殊試験 (原文 P.4)	40
胎児毒性に関する特殊試験 (原文 P.5)	41
急性毒性 (原文 P.5)	41
短期試験 (原文 P.5)	41
マウス (原文 P.5)	41
ラット (原文 P.6)	41
ウサギ (原文 P.7)	43
イヌ (原文 P.7)	43
家禽 (原文 P.7)	43
長期試験 (原文 P.8)	44
ラット (原文 P.8)	44
ヒトにおける観察 (原文 P.8)	44
コメント (原文 P.8)	44
評価 (原文 P.9)	45
毒性的影響を引き起こさない濃度 (原文 P.9)	45
ヒトに対する推定一日摂取許容量 (原文 P.9)	45
さらなる研究又は情報 (原文 P.9)	45
ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要 (評価書: JMPR 1973)	46
略称	48

原文 目次

原文ページ

ブチルヒドロキシトルエン	1
説明	1
生物学的データ	1
生化学的側面	1
排泄と分布	1
酵素及び他の生化学的パラメータに対する影響	3
代謝	3
毒性学的試験	4
肝臓代謝に関する特殊試験	4
in vivo での防御効果に関する特殊試験	4
生殖に関する特殊試験	4
胎児毒性に関する特殊試験	5
急性毒性	5
短期試験	5
長期試験	8
ヒトにおける観察	8
コメント	8
評価	9
引用文献	10
 BUTYLATED HYDROXYTOLUENE	 1
Explanation	1
BIOLOGICAL DATA	1
BIOCHEMICAL ASPECTS	1
Excretion and distribution	1
Effects on enzymes and other biochemical parameters	3
Metabolism	3
TOXICOLOGICAL STUDIES	4
Special studies on liver metabolism	4
Special studies on the protective effect in vivo	4
Special studies on reproduction	4
Special studies on embryotoxicity	5
Acute toxicity	5
Short-term studies	5
Long-term studies	8
OBSERVATIONS IN MAN	8
Comments:	8
EVALUATION	9
REFERENCES	10

固化防止剤、増粘剤、酸化防止剤、界面活性剤、及び増ちょう剤を含む
食品添加物の毒性学的評価

WHO 食品添加物シリーズ 5

この資料に含まれる評価は、1973 年 6 月 25 日～7 月 4 日 1 ジュネーブで開かれた食品添加物に関する
FAO/WHO 合同専門家会議によって作成された。

世界保健機関(WHO)

ジュネーブ

1974 年

1 食品添加物に関する FAO/WHO 合同専門家会議第 17 回レポート、ジュネーブ、1976 年
WHO 科学技術レポートシリーズ、1974 年、No.539;
FAO 食品と栄養シリーズ、1974 年、No.53

ブチルヒドロキシトルエン (原文 p.1)

説明 (原文 p.1)

ブチルヒドロキシトルエンは1961、1964、及び1965年に食品添加物に関するFAO/WHO合同専門家会議により、ヒトに対する一日摂取許容量を評価されてきた(付録 I、参照No.6、No.8、及びNo.13)。

過去の評価試験以来、追加的データが得られ、以下の各条で要約され論じられている。公表済基準書は展開され、完全な形で以下に再現されている。

生物学的データ (原文 p.1)

生化学的側面 (原文 p.1)

排泄と分布 (原文 p.1)

500 mg/kg体重の用量でウサギに単回経口投与したブチルヒドロキシトルエン(BHT)の代謝を試験した。代謝物、2,6-di-tert-butyl-4-hydroxymethylphenol (BHT-alc)、3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoic acid (BHT-acid) 及び 4,4'-ethylene-bis-(2,6-di-tert-butylphenol)が同定された。BHTの尿中代謝物は37.5%がグルクロニドとして、16.7%がエーテル硫酸として、及び6.8%が遊離したフェノールとして構成されていた。無変化のBHTは糞中だけに存在した(Agaki & Aoki, 1962a); 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzaldehyde(BHT-ald)は、ウサギの尿から単離された(Aoki, 1962)。主要な代謝経路はBHT-alcをウサギに投与し、尿中のBHT-ald、BHT-acid、エチレン-ビス誘導体と無変化BHT-alcを単離することにより確認された(Akagi & Aoki, 1962b)。

14c-標識したBHTの体内運命が明らかにされた。比較的遅いBHTの排泄はおそらく、組織保持(tissue

retention)よりもむしろ腸肝循環(enterohepatic circulation)に起因している。BHT-¹⁴Cをラットに単回経口投与(1~100 mg/ラット)し、投与量の約80~90%が4日で尿中及び糞中で回収された。総放射能のうち、40%が雌の尿中に、25%が雄の尿中に現れた。4日後には、投与量の約3.8%が主に消化管で保持された。放射能のかかなりの部分が2匹のラット(雌雄各1匹)から採取した胆汁中に40時間にわたって発見された(Daniel & Gage, 1965)。

2匹のラット(雌雄各1匹)の群に1~5回の経口投与で44 mg/kg体重/日のBHTを交互に与え、各群を最終投与の24時間後にと殺した。総投与量の範囲は雄で92~103.5%、雌で92.6~98.6%になった。排泄経路で性差が示され、雌が尿中に19~43%の放射能を排泄したが、雄は3~15%に過ぎなかった。5回投与の8日後には、放射能の92%が雄により排泄され、97%が雌により排泄されていた。雌に段階的用量のBHTを皮下投与すると相当な糞便排泄を示したが、用量増加とともに排泄率は減少した。反復経口投与の条件下では体内にBHT-¹⁴Cの蓄積の証拠はなかった(Tyeら、1965)。

35及び50日間までの期間、それぞれ0.5%及び1.0%BHTを含む飼料を与えたラットの脂肪及び肝臓のBHT含有量は:0.5%BHT含有飼料で、脂肪中では雄で約30 ppm(0.003%)の濃度、雌で45 ppm(0.0045%)の濃度に達し、肝臓中では約1~3 ppm(0.0001~0.0003%)であった。一方1.0%BHT含有飼料で、脂肪中では雄で50 ppm(0.005%)の濃度、雌で30 ppm(0.003%)の濃度であった。投与中止すると、脂肪中のBHT濃度は下降し、半減期は7~10日であった(Daniel & Gage, 1965)。脂肪中のBHT濃度は、挿管経由で500 mg/kg体重を毎日与えた場合、3~4日後に約100 ppm(0.01%)でプラトーとなった;200 mg/kg体重/日を1週間与えると約50 ppm(0.005%)の濃度を産出した(Gilbert & Golberg, 1965)。

500 ppm(0.05%)BHT含有飼料を産卵雌鳥に与えると、20 ppm(0.002%)が卵の脂肪描分で見つかった;飼料中100 ppm(0.01%)は5 ppm(0.0005%)未満の残留物に帰結した。ブロイラー鶏において、21週間以上にわたり、体脂肪中での残留物は500 ppm(0.05%)飼料で55 ppm(0.0055%)で、100 ppm(0.01%)飼料で5 ppm(0.0005%)未満であった(Van Stratum & Vos, 1965)。

1日齢のヒナに¹⁴C-BHTを200 ppm(0.02%)濃度で餌に混ぜ10週間与えた。ブロイラー齢で、食用部分には1~3 ppm(0.0001~0.0003%)にのぼるBHT及び代謝物の残留物があった。同様の飼料を産卵雌鳥に投与すると、7日後の卵中に2 ppm(0.0002%)の残留物があり、その後の濃度は一定であった(Frawleyら、1965a)。

ウサギに400~800 mg/kg体重の範囲でBHTを単回又は反復投与した。投与量の約16%がエステルグルクロニドとして、19%がエーテルグルクロニドとして排泄された。非抱合フェノール(8%)、エーテル^{*}硫酸(8%)、及びグリシン抱合体(2%)もまた排泄された。すべての検出可能な代謝物の排泄は化合物投与の3~4日後には基本的に完了し、投与量の約54%は同定された代謝物として説明がついた(Dacre, 1961)。

※原文ではethorealとなっていたがetherealの間違いと考えられた。

ラットに³H標識BHT 100 µg用量を腹腔内投与し、放射能の尿中への排出を4日間連続で測定した。投与4日後、注入した放射能の34.5%が尿中で回収された(Ladomeryら、1963)。

ラットに同用量(100 µg)の¹⁴C標識BHTを投与すると、最初の4日で放射能の34%が尿中に排泄され、それはトリチウム(tritiated)BHTを使用した以前の結果と近しく一致していた(Ladomeryら、1967a)。

0.5%BHTを35日間混餌投与したラットの肝臓と体脂肪を分析した。肝臓におけるBHTの濃度は雄においては5 ppm(0.0005%)、雌においては1.5 ppm(0.00015%)以上には一度も上昇しなかった。体脂肪においては、濃度は雄では30 ppm(0.003%)、雌では45 ppm(0.0045%)あたりを変動した。通常食に戻したラットの脂肪ではBHT濃度が進行的に減少し、半減期は約7~10日であった。¹⁴C-標識BHT(12 mg/kg体重)を経口投与したラットにおける尿及び糞中への放射能の毎日の排泄を試験した。排泄は投与後6日までには微量となり、その時には注入量の約70%は回収されていた。1%未満が二酸化炭素として呼気中に排泄された。経口投与後24時間の間、放射能の約50%が胆汁中に排泄された(Daniel & Gage, 1965)。

酵素及び他の生化学的パラメータに対する影響 (原文 p.3)

BHTを毎日挿管で与えたラットはいくつかの肝臓ミクロソーム酵素活性の上昇を示した。酵素活性の刺激は、相対的肝臓重量の増加と相関し、雌ラットでのこれら酵素活性の変化のしきい値は25~75 mgBHT/kg体重/日以下であった。脂肪中のBHT貯蔵は、プロセシング酵素活性に影響を受けるように思われた。毎日500 mg/kg体重を与えたラットで、BHTの脂肪中濃度は、2日目までに雌で230 ppm(0.023%)、雄で162 ppm(0.0162%)に達し、その時までには相対的肝臓重量及びプロセシング酵素活性は上昇していた。それ以後肝臓重量及び酵素活性は上昇し続けたが、両性とも脂肪のBHT含有量は約100 ppm(0.01%)のプラトーに下降した(Gilbert & Golberg, 1965)。

代謝 (原文 p.3)

親化合物¹⁴C BHTの単回投与(100 µg)後、ラットは4日間で放射能の32~35%を尿中に排泄し、33~37%を糞中に排泄した。腸の内容物は腸壁と共に残存能のほとんどを含有していた。胆汁への排泄は急速で、胆汁中の放射性物質は腸から容易に吸収されたが、それは腸肝循環が迅速であることを示唆している(Ladomeryら、1967a)。少量¹⁴C-BHTの静脈内及び腹腔内投与による胆汁代謝を調べると、4つの主要代謝物の存在がみられた。胆汁中の¹⁴C標識の34~53%は3-5-di-*t*-butyl-4-hydroxy-benzoic acidとして同定され、それはおそらくエステルグルクロニドとして存在していた。別の存在していた代謝物は、3,5-di-*t*-butyl-4-hydroxybenzaldehyde、3-5-di-*t*-butyl-4-hydroxybenzyl alcohol、及び 1,2-bis (3,5-di-*t*-butyl-4-hydroxyphenyl)ethane であった。(Ladomery ら、1967b)。

ラットに¹⁴C-BHTを単回投与し、48~96時間の範囲で尿と胆汁を採集した。糞もまた同じ時間回収した。この期間中に放射能の19~58.5%が尿中に現れ、25.7~36%が胆汁中に現れた。尿中の主要代謝物は3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoic acidで、両方とも遊離型(投与量の9%)、またグルクロニド(15%)及びS-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzyl)-N-acetylcysteineであった。エステルグルクロニド及びmercaptic酸もまたラットの胆汁中の主要な代謝物であった。遊離型の3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxybenzoic acidは糞中の主要な代謝物であった(Danielら、1968)。

毒性学的試験 (原文 p.4)

肝臓代謝に関する特殊試験 (原文 p.4)

20%ラードが添加され、0.2、0.3、0.4、又は0.5%(乾燥重量)BHTを6週間混餌投与したラットは、飼料中BHTの量に直接的に相関する血清コレステロールの上昇を示した。BHTは雄の副腎の相対重量を増加させ、

さらに雌と比較した雄の成長率を有意に減少させた。試験動物で増加した肝臓重量は、肝臓の脂質含有の絶対値増加と並行した(Johnson & Hewgill, 1961)。別の試験では、ラットを0.5%BHT含有飼料(20%ラードを補充する場合／しない場合)で維持したが、食中ラードの存在の有無に関わらず、BHTは基礎代謝率、体コレステロール濃度、及び体と肝臓コレステロール合成率(the rate of synthesis)を上昇させ、体の総脂肪酸含有量を減少させた。ラード無しでBHTを与えた動物では、BHTは体の合成及び回転率、肝臓脂肪酸を増加させ、成長率を抑制した。ラードと共にBHTを与えた動物では、体の合成率と肝臓脂肪酸を減少させ、成長率を減少させたが、その程度は食中ラード無しの動物よりもさらに大きかった(Johnson & Holdsworth, 1968)。

450 mg/kg体重の用量で最大7日間連日BHTを投与したラットの肝臓からのミクロソーム製剤は、対照動物からの製剤と比較すると、標識されたアミノ酸の取り込み能力が増大していた。BHTはまた、*in vivo*でのアミノ酸の、主に小抱体のタンパク質への取り込みを刺激した(Nievel, 1969)。0.01~0.5%BHT含有飼料を12日間与えたラットは肝臓膨大とともに、肝臓ミクロソームビフェニール-4-ヒドロキシラーゼ活性の増大を示し、それは最低用量0.01%以外の全用量でみられた。1日間投与した0.5%BHTは酵素活性を有意に変化させることはなかった(Creavenら, 1966)。

in vivo での防御効果に関する特殊試験 (原文 p.4)

各群60匹のFAF雄マウスを、BHT含有0、0.25、又は0.5%半合成飼料で維持した。試験動物の平均寿命は対照動物と比較して有意に長く、0.25%又は0.5%BHTに対してそれぞれ 17.0 ± 5.0 及び 20.9 ± 4.7 月で、それに対し対照動物は 14.5 ± 4.6 月であった(Harman, 1968)。各群雌雄20匹のCharles Riverラットを(雄は24週間、雌は36週間)BHT及び／又は発がん物質(N-2-fluorenylacacetamide又はN-hydroxy-N-2-fluorenylacacetamide)モル比30:1、6,600 ppm(0.66%)BHT相当量含有試験飼料で維持し、その後12週間対照食で維持した。N-2-fluorenylacacetamide単独では雄の70%に肝細胞癌、雌の20%に乳腺癌を引き起こす結果となった。N-hydroxy-N-2-fluorenylacacetamideでは雄の60%が肝細胞癌を、雌の70%が乳腺癌になった。発がん物質がN-2-fluorenylacacetamideの場合、BHTは雄の肝細胞癌の発生頻度を20%まで減少させ、N-hydroxy-N-2-fluorenylacacetamideが試験化合物であった場合は、15%まで(雄の肝細胞癌を)減少させた。Fischer系統ラットについても同様の結果が得られた。24週間の飲料水中のジエチルニトロソアミン(55 ppm 0.0055%)による肝臓及び食道の腫瘍発生はBHTにより影響を受けなかった(Ullandら, 1973)。

生殖に関する特殊試験 (原文 p.4)

離乳ラット(各性16匹)に20%ラード及びBHT0、300、1,000、又は3,000 ppm(0、0.03、0.1、又は0.3%)含有飼料を与え、100日齢(試験上79日)で交配した。最初の同腹児の離乳の10日後、第二の児動物を産むため再び交配した。同腹児(16匹の雌と8匹の雄)を100日齢で交配した。数多くの機能及び臨床試験(血清コレステロールと脂質を含む)を親動物と第一世代の児動物に対して最大28週まで実施し、肉眼的及び顕微鏡的検査を42週で行った。3,000 ppm(0.3%)投与群で、10~20%の成長率の抑制が親動物と児動物で観察された。血清コレステロール値の20%上昇が28日後で観察されたが、10日後ではコレステロール上昇はみられなかった。試験42週でと殺した際には、10~20%の相対肝重量増加もまた観察された。3,000 ppm(0.3%)でのその他全ての観察、及び1,000 ppm(0.1%)と300 ppm(0.03%)での全ての観察は対照動物と同等であった。全ての生殖基準は正常であった。催奇形性影響はみとめられなかった(Frawleyら, 1965b)。親世代と子の第一世代で得られた結果に類似した結果が子の第二世代でも得られた。後者の100日齢での2つの同腹児の検査では3,000 ppm(0.3%)投与群で平均体重の減少以外の影響は明らかでなかった。児動物の検査項目は:同腹児

数、平均体重、死産の発生、生存率、肉眼的及び顕微鏡的病変であった(Kennedyら、1966)。

胎児毒性に関する特殊試験 (原文 p.5)

BHTの胎児毒性に関する試験で、3つの投与スケジュールを採用した：特定の妊娠日に単回投与(1,000 mg/kg体重)、交配から妊娠中を通して連日反復投与(750 mg/kg体重)、交配前7~10週間、交配中と妊娠中も継続してと殺するまで(マウスには250~500 mg/kg体重、ラットには500及び700 mg/kg体重)。完全に成長した胎児の骨格及び軟組織の検査では、他の基準と同様、有意な胎児毒性的影響は観察されなかった。生殖と生後の発達もまた、影響はされなかった(Clegg、1965)。

マウスに0.1又は0.5%BHT含有飼料を2種類の食中濃度のラード(10及び20%)と共に与えた。0.5%投与群はわずかだが有意に12日齢の平均的児動物体重と一腹総体重を減少させた。1.0%投与群はそのような影響を与えなかった。144匹の母動物のうち12匹は確実な無眼球症の系統から選択したにもかかわらず、誕生した7,754匹のマウスのうち無眼球症(anophthalmia)を示したマウスはなかった(Johnson、1965)。

急性毒性 (原文 p.5)

動物	経路	LD ₅₀ (mg/kg体重)	致死量概数 (mg/kg体重)	参照
ラット	経口	1,700~1,970		Deichmann ら、 1955
ネコ	経口		940~2,100	Deichmann ら、 1955
ウサギ	経口		2,100~3,200	Deichmann ら、 1955
モルモット	経口		10,700	Deichmann ら、 1955
ラット	経口	2,450		Karplyuk、1959
マウス	経口	2,000		Karplyuk、1959

短期試験 (原文 p.5)

マウス (原文 p.5)

妊娠したマウスにBHTを18日間750 mg/kg体重の用量で毎日投与した。別の群には18日間の妊娠期間を含み合計50~64日間同じ用量を与えた。胎児の異常は観察されなかった(Clegg、1965)。

144匹の雌マウスを用いて統計学的に計画した試験で、母動物の繁殖年齢期間を通して生まれた7,765匹を代表する1,162の同腹児で盲目の例はなかった(Johnson、1965)。

ラット (原文 p.6)

45組の離乳した雄ラットに5~8週間投餌試験を実施し、0.001、0.1、又は0.5%BHTを加えたラード(0、10、及び20%)を補充した飼料を与えた。0.001%では、試験した血清成分のどれにも変化は起きなかった。0.5%は5週以内に血清コレステロール値の上昇を引き起こした。8ヶ月間、10%ラードを補充し0.1%BHTを加えた飼料を与えた雌ラットは血清コレステロール値上昇を示したが、その他の有意な変化はなかった。同じ期間、10%及び20%ラード補充した飼料に0.5%BHTを加えたものを与えた雌ラットでは、血清コレステロール、リン脂質、及びムコタンパクの値が上昇した(Dayら、1959)。

5週間ビタミンEの欠乏した飼料で飼育した妊娠ラットに0.3%BHTを混餌投与すると、毒性学的症状は示さなかった。1.55%用量は体重の大幅な減少と胎児の死亡を引き起こした(Amesら、1956)。

一群12匹のラットに、0.1%の食中用量で20%ラード補充と併せて7週間投与したBHTは、雄ラットの初期成長率と成年重量を有意に減少させた。10%ラード補充では、雄雌のラットで何ら影響はみとめられなかった。ペア飼育試験では、この成長阻害はBHTの直接的な毒性的影響であり、飼料の美味しさ減少で説明することはできなかった。この用量のBHTは、絶対及び相対肝臓重量を有意に増加した。ストレス増加下に置かれたラットは、頭頂の毛が有意に欠落した。飼料中の脂肪負荷を増すと、BHTの毒性的影響は増大した。同腹児の10%に無眼球症(anophthalmia)が発生した(Brownら、1959)。

一群6匹の離乳ラット(雌雄3匹ずつ)に、20%ラード補充と併せてBHTを0、0.1、0.2、0.3、0.4及び0.5%を6週間混餌投与した。BHTは、特に雄において成長率を減少させたが、その影響は0.3%用量で有意になると思われた。BHTはまた、両性において、絶対肝臓重量と体重に対する相対重量比を増加させ、後者影響は0.2%用量で有意になった。BHTは雄ラットにおいて左の副腎の体重に対する相対重量比を増加させたが、雌では一貫性のある影響はなかった。副腎において、投与に起因する組織学的変化はなかった。全てのBHT投与群で、血清コレステロールが上昇し、コレステロールの濃度はBHT用量に直接的に比例した。副腎コレステロールの濃度の有意な増加もあった。BHTは、肝臓中の総エステル型(esterified)肝臓コレステロールの濃度又は比率、総肝脂質、総多価不飽和脂肪酸の濃度においては有意な変化を引き起こさなかった(Johnson & Hewgill、1961)。

250 mg/kg体重のBHTを68~82日間ラットに投与すると、**重量※**増加率と肝臓の脂肪浸潤を減少させた(Karplyuk、1959)。**※体重のことか肝臓の重量か不明、原文の確認必要と思われる**

20日及び90日それぞれ投餌試験を実施すると、ラットは0.5又は1%BHT含有飼料を美味しいと感じていないことがわかった。しかしながら、これらの濃度を徐々に達成した場合は、動物はそうように投与した餌を、より容易に摂取する。5又は10匹のラットの群の25日間ペア飼育試験では、0.8及び1%含有飼料が対照動物の値を下回って毎日の摂餌量を減少させることがわかった。飼料中1%用量は体重増加を遅らせた(Deichmann、1955)。

BHT(2,000 ppm(0.2%))を組み込んだ、19.9%カゼイン含有飼料を8匹の若いラットの一群に8週間投与した。別の8匹の一群を対照群とした。16.6%カゼイン含有飼料で、さらに別の一群で4週間、さらに9.6%カゼイン(コリン添加無しで)7週間試験を繰り返した。これら3例全てにおいて、BHTは成長刺激を引き起こし、タンパク質効率を向上させた。肝臓のN含有量は、しかしながら、BHT投与した動物においては、大幅に減少し、その例外はBHT濃度を200 ppm(0.02%)まで抑えた場合であった。2,000 ppm(0.2%)BHT投与のラットにおいては、絶食(詳細不明)後の肝臓タンパク質の回復も阻害された。肝臓脂質含有量は、2,000 ppm(0.2%)で増加

したが、200 ppm(0.02%)では増加しなかった。2,000 ppm(0.2%)のBHTの食中用量はまた、副腎重量とアスコルビン酸含有量を増加させたが、腺(gland)の重量に基づいて再計算した場合は有意な差はなかった。副腎のアスコルビン酸増加は、BHTが生体に課したストレスを示していると解釈される(Sporn & Schöbesch、1961)。

48匹の離乳ラット(各性24匹)の群に1,000 ppm(0.1%)のBHT含有飼料を最高16週まで投与した。48匹のラットの一群を対照群とした。成長率と摂餌量の測定、剖検時の臓器の重量と顕微鏡的病理検査では、未投与のラットとの違いはなかった。しかしながら、相対肝重量及び副腎重量の増加は、損傷の病理組織学的証拠無しに引き起こされた。肝臓グルコースホスファターゼ及びグルコース6-ホスファターゼリン酸脱水素酵素活性の、生化学的測定及び組織化学的評価では、対照群との差は明らかにならなかった(Gauntら、1965a)。

ラットに交配前及びその後の妊娠期間を通じて7日間毎日100 mg/kg体重BHTを単回投与、又は妊娠20日目に剖検した。これらの動物において、胎児の異常な兆候は一切みられなかったが、ビタミンAを投与した陽性対照群の児動物においては異常が発生した(British Industrial Biological Research Association、1964)。

1964年5月に別のグループが3世代生殖試験を開始した。彼らはまた、16匹の雌と16匹の雌ラットの群に、0.03、0.1、及び0.3%BHTを脂肪20%含有飼料に混ぜて10週間投与した。16匹の雄と16匹の雌をそれぞれ含む2つの対照群があった。雌ではどの用量においても明白な体重への影響はなく、0.3%用量の雄でわずかな抑制があったのみであった。BHTを投与した後の雌雄どちらにおいても、10週間投与したどの用量においても血液コレステロール値に有意な影響はなかった。0.3%用量の雄の4匹及び0.1%用量の2匹が試験期間中に死亡した。0.3%用量の雌で2匹が死亡した。両対照群では1匹の雄ラットが死亡しただけであった(Frawleyら、1965a)。

20匹の雄と20匹の雌ラットの群に、1%BHTを飼料に混ぜて10週間与えたところ、肝臓の体重比及び肝臓細胞の形態学的外見は動物を通常食に戻した後数週間で元に戻った(ICI、1964)。

ウサギ (原文 p.7)

BHAの高用量で記載されたものと類似した電解質の排泄に対する急性的影響が、BHT500~700 mg/kg体重(飼料中2%)の用量投与にも引き続いてみられた。それより低い用量水準ではその影響はみられなかった(Denz & Llaurodo、1957)。

イヌ (原文 p.7)

4週間以上、2~4日おきに1.4~4.7 g/kg体重の用量を与えた4匹のイヌの一群で、軽度~中程度の下痢が誘発された。死後の剖検では、有意な肉眼的病理変化は示されなかった。12ヶ月間、週5日0.17~0.94 g/kg体重の用量を与えたイヌでは、中毒兆候及び、肉眼的又は病理組織学的変化は観察されなかった(Deichmannら、1955)。

家禽 (原文 p.7)

BHTを0.125%用量で34週間10羽の若い雌鳥の一群に与えたところ、生殖能力、卵の孵化率、ヒナの健康状態は、類似した対照群と比較して、違いはなかった。抗酸化剤を与えた鶏の卵は、対照動物の卵よりもカロチノイド及びビタミンAを多く含んでいた(Shollenbergerら、1957)。

長期試験 (原文 p.8)

ラット (原文 p.8)

15匹の雄と15匹の雌ラットの群に1%ラード及び、0.2、0.5、又は0.8%BHT含有飼料を24ヶ月与えたところ、特定の中毒兆候は示さず、病理顕微鏡的(micropathological)試験は陰性であった。ある一群にはBHTを飼料に取り込む前にラードに溶解させ、その後150℃で30分加熱したBHTを0.5%含有する飼料を与えた。体重増加又は血液成分には何ら影響なく、主要な臓器の病理顕微鏡的試験は陰性であった。1%BHTの供給に引き続き、雌雄ラットの両方で、普通以下の体重増加及び脳、肝臓、そして他のいくつかの臓器の体重比相対重量の増加がおこった。病理顕微鏡的試験はこの群でもまた陰性であった。BHTのその濃度では、赤血球及び白血球数、末梢血中のヘモグロビン濃度には特定の影響はなかった。多数の雌雄のラットがこの試験中に死亡したが、その死亡は投与したBHT濃度には何ら相関性がなく、死因は本物質投与とは関係ないことが確実だと思われた。病理顕微鏡的試験がこの所見を支持している。飼料中0.5%用量で供給されたBHTはラットに対し、生殖周期、脾臓、腎臓、肝臓及び皮膚の組織、又は心臓、脾臓、あるいは腎臓の重量に関して何ら影響を与えなかった。2年間、0.1%BHT及び10%水素添加(hydrogenated)ココナツ油を含む飼料を供給したラットの死亡率の有意な増加はなかった。体重増加に対する影響はすでに記載されている(Deichmannら、1955)。

ヒトにおける観察 (原文 p.8)

4人の人間の男性被験者に約40 mgの¹⁴C標識BHTを単回投与した。投与した放射能の約75%が尿中に排泄された。投与の約50%が最初の24時間で尿中に出現し、その後、おそらく組織中に保存された化合物又は代謝物の排出を表す低速な相が続いた。ヒトでは、放射能の大部分は代謝物のエーテル不溶性グルクロニドとして排泄され、その中で、環メチル基及び1tert-ブチルメチル基はカルボキシル基に酸化され、他のtert-ブチル基のメチル基もまた、おそらくアルデヒド基に酸化される。遊離型及び抱合型BHT酸は尿の軽微な成分で、メルカプツール酸は事実上存在しない。ヒトの尿中への排泄の第一段階の速さはラットでみられたような著しい腸肝循環が無いことを示唆している(Danielら、1967)。

報告された体脂肪中のBHT値は 0.23 ± 0.15 ppm($0.000023\% \pm 0.000015\%$) (11人、英国在住) そして 1.30 ± 0.82 ppm (0.000130 ± 0.000082) (12人、アメリカ在住)であった (Collings & Sharratt, 1970)。

コメント (原文 p.8)

ラットで観察されたBHT代謝物のより長引く腸肝循環はヒトでは作用しないことが代謝試験で明らかになった。このことはラットとヒトの間で観察された代謝の相違と直接的に関係する。ヒトにおけるBHT代謝物の迅速な尿排泄のため、豊富な組織内蓄積は期待できないものと思われ、ヒトの脂肪中のBHT残留物に関するデータがそれを裏付けている。

ラットにおけるBHTの脂質代謝に対する影響は解釈することが困難である。ラットの長期試験は十分であるが、ヒトへの外挿には有意性が限定的である。BHT はマウスの寿命を伸ばすことが明らかになった。BHTは

肝臓ミクロソーム酵素システムの弱い誘導物質である。マウス及びラットの生殖試験は、より初期の無眼球症の所見を裏付けることはできなかった。

評価 (原文 p.9)

毒性的影響を引き起こさない濃度 (原文 p.9)

マウス: 飼料中5,000 ppm(0.5%) 250 mg/kg体重相当

ヒトに対する推定一日摂取許容量 (原文 p.9)

0~0.5[※] mg/kg体重^{※※}

さらなる研究又は情報 (原文 p.9)

1976年までに必要なこと

BHT、BHA 及びプロピルガレート混合物の生殖に与える影響に関する試験

ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要（評価書:JMPR 1973）

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
生殖に関する特殊試験	ラット	20% ラード 及び BHT 0.300 、 1,000、又は 3,000 ppm(0.03 、 0.1、又は 0.3%)	3,000 ppm(0.3%)投与群で、10~20%の成長率の抑制が親動物と児動物で観察された。血清コレステロール値の 20%上昇が 28 日後で観察されたが、10 日後ではコレステロール上昇はなかった。試験 42 週でと殺した際には、10~20%の相対肝重量増加も観察された。3,000 ppm(0.3%)でのその他全ての観察、及び 1,000 ppm(0.1%)と 300 ppm(0.03%)での全ての観察は対照動物と同等であった。全ての生殖基準は正常であった。催奇形性影響はみとめられなかった。児動物の第二世代の 100 日齢での 2 つの同腹児の検査では 3,000 ppm(0.3%)投与群で平均体重の減少以外の影響は明らかでなかった。
胎児毒性	マウス、ラット	1,000 mg/kg 体重、750 mg/kg 体重、マウスには 250~500 mg/kg 体重、ラットには 500 及び 700 mg/kg 体重)	完全に成長した胎児の骨格及び軟組織の検査では、他の基準と同様、有意な胎児毒性的影響は観察されなかった。生殖と生後の発達も影響されなかった。
胎児毒性	マウス	0.1 又は 0.5% ラード (10 及び 20%)	0.5%投与群frはわずかだが有意に 12 日齢の平均的児動物体重と同腹児の総体重が減少。144 匹の母動物のうち 12 匹は確実な無眼球症の系統から選択したにもかかわらず、誕生した 7,754 匹のマウスのうち無眼球症を示したマウスはなかった。
急性毒性	急性毒性(原文 p.5) の表参照		
50~64 日間短期試験	妊娠マウス	750 mg/kg 体重	胎児の異常は観察されなかった。
短期試験	マウス		母動物の繁殖年齢期間を通して生まれた 7,765 匹を代表する 1,162 の同腹児で盲目の例はなかった。
5~8 週間短期試験	ラット	0.001、0.1、又は 0.5%BHT を加えたラード(0、10、及び 20%)	0.001%では、試験した血清成分に変化は起きなかった。0.5%は 5 週以内に血清コレステロール値の上昇を引き起こした。8 ヶ月間、10%ラードを補充し 0.1%BHT を加えた飼料を与えた雌ラットは血清コレステロール値上昇を示したが、その他の有意な変化はなかった。同じ期間、10%及び 20%ラード補充した飼料に 0.5%BHT を加えたものを与えた雌ラットでは、血清コレステロール、リン脂質、及びムコタンパクの値が上昇した。
短期試験	ラット	0.3%、1.55%	5 週間ビタミン E の欠乏した餌で飼育した妊娠ラットに 0.3%BHT を混餌投与すると、毒性学的症状は示さなかった。1.55%用量は体重の大幅な減少と胎児の死亡を引き起こした。
短期試験	ラット	0.1%、20%ラード	雄ラットの初期成長率と成年重量が有意に減少。10%ラード補充では、影響はみとめられなかった。ペア飼育試験では、この成長阻害は BHT の直接的な毒性的影響

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			であり、飼料の美味しさの減少で説明することはできなかった。この用量での BHT は絶対及び相対肝重量を有意に増加させた。増加するストレス下に置かれたラットは、頭頂の毛が有意に欠落した。飼料中の脂肪負荷を増すと、BHT の毒性的影響は増大した。同腹児の 10% に無眼球症(anophthalmia)が発生した (Brown ら、1959)。
短期試験	ラット	0、0.1、0.2、0.3、0.4 及び 0.5%	雄の成長率が減少したが、その影響は 0.3%用量で有意と思われた。両性において、絶対肝臓重量と体重に対する相対重量比を増加させ、後者影響は 0.2%用量で有意。雄ラットにおいて左の副腎の体重に対する相対重量比を増加させたが、雌では一貫性のある影響はなかった。全て投与群で、血清コレステロール上昇。コレステロール濃度は BHT 用量に直接比例。副腎コレステロール濃度の有意な増加。
68~82 日間	ラット	250 mg/kg 体重	重量増加率と肝臓の脂肪浸潤が減少
20 日及び 90 日試験(経口)	ラット	0.5 又は 1%	BHT 含有飼料を美味しいと感じていないことがわかった。
25 日間ペア飼育試験	ラット	0.8 及び 1%	対照動物の値を下回って毎日の摂餌量を減少させた。飼料中 1%の用量は体重増加を遅らせた。
短期試験	ラット	2,000 ppm(0.2%)	成長刺激を引き起こし、タンパク質効率を向上させた。肝臓の N 含有量は大幅に減少し、その例外は BHT のレベルを 200 ppm(0.02%)まで抑えた場合。2,000 ppm(0.2%)BHT 投与のラットは、絶食の肝臓タンパク質の回復も阻害された。肝臓脂質含有量は、2,000 ppm(0.2%)で増加したが、200 ppm(0.02%)では増加しなかった。2,000 ppm(0.2%)は、副腎重量とアスコルビン酸含有量が増加したが、腺重量に基づいて再計算した場合は有意な差はなかった。副腎のアスコルビン酸増加は、BHT が生体に課したストレスを示していると解釈される。
16 週間短期試験	ラット	1,000 ppm(0.1%)	相対肝重量及び副腎重量の増加が、損傷の病理組織学的証拠無しに引き起こされた。
7 日間急性試験	ラット	100 mg/kg 体重	胎児の異常な兆候は一切みられなかったが、ビタミン A を投与した陽性対照群の児動物においては異常が発生した。
3 世代生殖試験	ラット	0.03、0.1、及び 0.3%	雌ではどの用量においても明白な体重への影響はなく、0.3%用量の雄でわずかな抑制があったのみだった。血液コレステロール値に有意な影響はなかった。0.3%用量の雄の 4 匹及び 0.1%用量の 2 匹が試験期間中に死亡した。0.3%用量の雌で 2 匹が死亡した。両対照群では 1 匹の雄ラットが死亡したのみであった。
10 週間短期試験	ラット	1%	肝臓の体重比及び肝臓細胞の形態学的外見は動物を通常食に戻した後数週間で元に戻った。
短期試験	ウサギ	500~700 mg/kg 体重(飼料中 2%)	BHA の高用量で記載されたものと類似した電解質の排泄に対する急性的影響が、BHT の用量投与にも引き続いてみられた。それより低い用量水準ではその影響はみられなかった。

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
4 週間短期試験	イヌ	1.4~4.7 g/kg 体重	軽度～中程度の下痢が誘発された。死後の剖検では、有意な肉眼的病理変化は示されなかった。12 ヶ月間、週5日 0.17~0.94 g/kg 体重の用量を与えたイヌでは、中毒兆候及び、肉眼的又は病理組織学的変化は観察されなかった。
34 週間短期試験	家禽	0.125%	生殖能力、卵の孵化率、ヒナの健康状態は、類似した対照群と比較して、違いはなかった。抗酸化剤を与えた鶏の卵は、対照動物の卵よりもカロチノイド及びビタミン A を多く含んでいた。
24 ヶ月長期試験	ラット	1%ラード及び、0.2、0.5、又は0.8%	特定の中毒兆候は示さず、病理顕微鏡的試験は陰性であった。体重増加又は血液成分には何ら影響なく、主要な臓器の病理顕微鏡的試験は陰性。1%BHTの供給に引き続き、雌雄ラットの両方で、普通以下の体重増加及び脳、肝臓、そして他のいくつかの臓器の体重比相対重量の増加。多数の雌雄のラットがこの試験中に死亡したが、その死亡は投与した BHT 濃度には何ら相関性がなく、死因は本物質投与とは関係ないことが確実だと思われた。病理顕微鏡的試験がこの所見を支持している。2 年間、0.1%BHT 及び 10% 水素添加 (hydrogenated) ココナッツ油を含む飼料を供給したラットの死亡率の有意な増加はなかった。体重増加に対する影響はすでに記載されている。
その他			ADI:0~0.5 mg/kg 体重 毒性的影響を引き起こさないレベル(マウス): 5,000 ppm(0.5%) (250 mg/kg 体重に相当)

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
FAO	Food and Agriculture Organization	国連食糧農業機関
WHO	World Health Organization	世界保健機関
JMPR	Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues	FAO/WHO 合同残留農薬専門家会議
LD ₅₀	50% Lethal Dose	半数致死量

ブチルヒドロキシトルエン 評価書和訳と情報整理

JECFA 1976

ウェブサイト: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v10je03.htm>

FAS 10-JECFA 20/17, 1976

ブチルヒドロキシトルエン 評価書和訳と情報整理 JECFA (1976) 目次

ジブチルヒドロキシトルエン (原文 P.1)	53
説明 (原文 P.1)	53
生物学的データ (原文 P.1).....	53
生化学的側面 (原文 P.1).....	53
排泄と分布 (原文 P.1).....	53
代謝 (原文 P.3)	55
酵素及び他の生化学的パラメータに対する影響 (原文 P.4).....	56
毒性学的試験 (原文 P.7)	59
胎児毒性に関する特殊試験 (原文 P.7)	59
変異原性に関する特殊試験 (原文 P.7)	59
生殖に関する特殊試験 (原文 P.8)	60
他の特殊試験 (原文 P.9)	60
急性毒性 (原文 P.9)	61
短期試験 (原文 P.9)	61
マウス (原文 P.9)	61
ラット(原文 P.10).....	61
ウサギ (原文 P.11)	63
家禽 (原文 P.11).....	63
イヌ (原文 P.11)	63
サル (原文 P.12).....	63
長期試験 (原文 P.12)	64
ラット (原文 P.12)	64
ヒトにおける観察 (原文 P.14).....	65
コメント (原文 P.14)	65
評価 (原文 P.14)	66
毒性的影響を引き起こさない濃度 (原文 P.14).....	66
ヒトに対する推定一日摂取許容量 (原文 P.14).....	66
さらなる研究又は情報 (原文 P.14)	66
ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要 (評価書:JMPR 1976)	67
略称.....	73

原文 目次

原文ページ

ジブチルヒドロキントルエン	1
説明	1
生物学的データ	1
生化学的側面	1
排泄と分布	1
代謝	3
酵素及び他の生化学的パラメータに対する影響	4
毒性学的試験	7
胎児毒性に関する特殊試験	7
変異原性に関する特殊試験	7
生殖に関する特殊試験	8
他の特殊試験	9
急性毒性	9
短期試験	9
長期試験	12
ヒトにおける観察	14
コメント	14
評価	14
引用文献	15
 BUTYLATED HYDROXYTOLUENE	 1
Explanation	1
BIOLOGICAL DATA	1
BIOCHEMICAL ASPECTS	1
Excretion and distribution	1
Effects on enzymes and other biochemical parameters	3
Metabolism	3
TOXICOLOGICAL STUDIES	4
Special studies on embryotoxicity	5
Special studies on genotoxicity	5
Special studies on reproduction	4
Acute toxicity	5
Short-term studies	5
Long-term studies	8
OBSERVATIONS IN MAN	8
Comments	8
EVALUATION	9
REFERENCES	10

ある食品添加物の毒性学的評価

WHO 食品添加物シリーズ 10

この書類に含まれる評価は食品添加物に関する FAO/WHO 合同専門家会議※によって準備された。

1976 年 4 月 21~29 日 ローマ

国連食糧農業機関(FAO)

世界保健機関(WHO)

※食品添加物に関する FAO/WHO 合同専門家会議第20回レポート、ジュネーブ、1976 年

WHO 科学技術レポートシリーズ No.599、FAO 食品と栄養シリーズ No.1

ジブチルヒドロキシトルエン (原文 p.1)

説明 (原文 p.1)

ジブチルヒドロキシトルエンは1961、1964、1965、及び1973年に食品添加物に関するFAO/WHO合同専門家会議により、ヒトに対する一日摂取許容量を評価されてきた(付録 I、参照No.6、p.45; No.9、p.13; No.13、p.28;及びNo.33、p.156)。

前回評価より、追加的データが利用可能になっており、以下の研究論文で要約され検討される。前回発行された研究論文は拡大され、完全な形で以下に再生されている。

生物学的データ (原文 p.1)

生化学的側面 (原文 p.1)

排泄と分布 (原文 p.1)

雌雄のラットの群を、BHTを0又は0.5%含む餌で35日間、その後BHTを含まない餌で一定期間維持した。試験食の期間中、ラットの群を5日間隔でと殺し、脂肪と肝臓をBHT分析のために除去した。餌の除去の後、ラットを2日間隔でと殺し、脂肪と肝臓からのBHTの損失を測った。試験化合物投与期間に、BHTの脂肪中での蓄積が進行するという明らかな証拠はなかった。脂肪中のBHT濃度はBHT投与10日以内に最高濃度(雄で55 ppm、雌で65 ppm)に達した。その後、観察した濃度ではかなりの変動があった。肝臓でのBHT濃度は非常に低く、BHT最高濃度は雄で約5.0 ppm、雌で1.5 ppmであった。脂肪及び肝臓におけるBHTの生物学的半減期は7~10日と推定された(Gage, 1964)。

2匹のラット(雌雄各1匹)の群に1~5回の経口投与で44 mg/体重/日のBHTを隔日で与え、各群を最終投与の24時間後にと殺した。総投与量の範囲は雄で92~103.5%、雌で92.6~98.6%になった。排泄経路で性差が示され、雌が尿中に19~43%の放射能を排泄したが、雄は3~15%に過ぎなかった。5回投与の8日後には、放射能の92%が雄により排泄され、97%が雌により排泄されていた。雌に段階的用量のBHTを皮下投与すると相

当な糞便排泄を示したが、用量増加とともに排泄率は減少した。反復経口投与の条件下では体内にBHT-¹⁴Cの蓄積の証拠はなかった(Tyeら、1965)。

¹⁴C-標識BHTの体内運命が明らかにされた。比較的遅いBHTの排泄はおそらく、組織保持(tissue retention)よりもむしろ腸肝循環(enterohepatic circulation)に起因している。BHT-¹⁴Cをラットに単回経口投与(1~100 mg/ラット)し、投与量の約80~90%が4日で尿中及び糞中で回収された。総放射能のうち、40%が雌の尿中に、25%が雄の尿中に現れた。4日後には、投与量の約3.8%が主に消化管で保持された。放射能のかなりの部分が2匹のラット(雌雄各1匹)から採取した胆汁中に40時間にわたって発見された(Daniel & Gage、1965)。

0.5%BHTを含む餌を35日間与えたラットの肝臓と体脂肪を分析した。肝臓におけるBHTの濃度は雄においては5 ppm(0.0005%)、雌においては1.5 ppm(0.00015%)以上には一度も上昇しなかった。体脂肪においては、濃度は雄では30 ppm(0.003%)、雌では45 ppm(0.0045%)あたりを変動した。通常食に戻ったラットからの脂肪はBHT濃度が進行的に減少し、半減期は約7~10日であった。¹⁴C-標識したBHT(12 mg/kg体重)を経口投与したラットにおける尿及び糞中への放射能の毎日の排泄を試験した。排泄は投与後6日までは微量となり、その時には注入量の約70%は回収されていた。1%未満が二酸化炭素として呼気中に排泄された。経口投与後24時間の間、放射能の約50%が胆汁中に排泄された(Daniel & Gage、1965)。

ラットの更なる研究において、尿中へのアスコルビン酸排出増加はBHA又はBHTが誘発する肝臓膨大と、発症、程度、持続時間において並行し、BHAに関しては急速だが一時的で、BHTに関しては発症はゆっくりだが長期であることがわかった(Gauntら、1965a)。BHTに起因する酵素活性処理(processing)の刺激、尿中のアスコルビン酸排出の増加、そして肝臓の相対的重量増加の並行性は、14日間の飼料制限により影響を受けず、肝臓重量を除くこれらの変化全ては通常食での14日間の回復期で可逆的であった(Gauntら、1965b)。

35及び50日間までの期間、それぞれ0.5%及び1.0%BHTを含む飼料を与えたラットの脂肪及び肝臓のBHT含有量は:0.5%BHT含有飼料で、脂肪中では雄で約30 ppm(0.003%)の濃度、雌で45 ppm(0.0045%)の濃度に達し、肝臓中では約1~3 ppm(0.0001~0.0003%)であった。一方1.0%BHT含有飼料で、脂肪中では雄で50 ppm(0.005%)の濃度、雌で30 ppm(0.003%)の濃度であった。投与中止すると、脂肪中のBHT濃度は下降し、半減期は7~10日であった(Daniel & Gage、1965)。脂肪中のBHT濃度は、挿管経由で500 mg/kg体重を毎日与えた場合、3~4日後に約100 ppm(0.01%)でプラトーとなった;200 mg/kg体重/日を1週間与えると約50 ppm(0.005%)の濃度を産出した(Gilbert & Golberg、1965)。

500 ppm(0.05%)BHT含有飼料を産卵雌鳥に与えると、20 ppm(0.002%)が卵の脂肪描分で見つかった;飼料中100 ppm(0.01%)は5 ppm(0.0005%)未満の残留物に帰結した。ブロイラー鶏において、21週間以上にわたり、体脂肪中での残留物は500 ppm(0.05%)飼料で55 ppm(0.0055%)で、100 ppm(0.01%)飼料で5 ppm(0.0005%)未満であった(Van Stratum & Vos、1965)。

1日齢のヒナに¹⁴C-BHTを200 ppm(0.02%)濃度で10週間混餌投与した。ブロイラー齢で、食用部分には1~3 ppm(0.0001~0.0003%)にのぼるBHT及び代謝物の残留物があつた。同様の餌を産卵雌鳥に与えると、7日後の卵の中に2 ppm(0.0002%)の残留物があり、その後の濃度は一定であった(Frawleyら、1965a)。

ラットに³Hで標識したBHT100 μg用量を腹腔内投与し、放射能の尿中への排出を4日間連続で測った。投与4日後、注入した放射能の34.5%が尿中で回収された(Ladomeryら、1963)。

¹⁴Cで標識した同用量(100 μg)のBHTをラットに与えると、最初の4日で放射能の34%が尿中に排泄され、それはトリチウム(tritiated)BHTを使用した以前の結果と近しく一致していた(Ladomeryら、1967a)。

白い雄のWistarラット(290-350g)に[¹⁴C]標識BHT、又はそのアルコール[BHT-CH₂OH]、又はそのアルデヒド[BHT-CHO]、又は酸[BHT-COOH]誘導体を静脈内又は腹腔内投与した。BHT及びその関連化合物の尿又は糞中への総排泄量を5日間試験した。静脈内投与後120-126時間胆汁中への排泄試験もそれに続いた。試験した化合物(100 μg)の低用量については、5日間の尿及び糞排泄、そして120-126時間の胆汁排泄における¹⁴Cの全回収量には有意な差はなかった。しかしながら、¹⁴Cの尿排泄と糞便排泄の比率には差があった。標識化合物の腹腔内投与後の初期胆汁に存在した主要な代謝物はBHT-COOH又はそのエステルグルクロニド(ester glucuronide)であった。酸による加水分解(acid hydrolysis)後の後期胆汁は、BHT-COOHが主要な¹⁴C成分であることを示した(Holderら、1970a)。

代謝 (原文 p.3)

ウサギに400-800 mg/kg体重の範囲でBHTを単回又は反復投与した。投与量の約16%がエステルグルクロニドとして、19%がエーテルグルクロニドとして排泄された。非抱合フェノール(8%)、**エーテル***硫酸(8%)、及びグリシン抱合体(2%)もまた排泄された。すべての検出可能な代謝物の排泄は化合物投与の3~4日後には基本的に完了し、投与量の約54%は同定された代謝物として説明がついた(Dacre、1961)。

※原文ではethorealとなっていたがetherealの間違いと考えエーテルと訳した。

500 mg/kg体重の用量でラットに単回経口投与したジブチルヒドロキシトルエン(BHT)の代謝を試験した。代謝物、2,6-di-tert-butyl-4-hydroxymethylphenol (BHT-alc)、3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoic acid (BHT-acid) 及び 4,4'-ethylene-bis-(2,6-di-tert-butylphenol)が同定された。BHTの尿中代謝物は37.5%がグルクロニドとして、16.7%がエーテル硫酸として、及び6.8%が遊離したフェノールとして構成されていた。無変化のBHTは糞中だけに存在した(Agaki & Aoki、1962a);

3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzaldehyde(BHT-ald)は、ウサギの尿から単離された(Aoki、1962)。主要な代謝経路はBHT-alcをウサギに投与し、尿中のBHT-ald、BHT-acid、エチレン-ビス誘導体と無変化BHT-alcを単離することにより確認された(Akagi&Aoki、1962b)。

¹⁴C BHTのparental単回投与(100 μg)後、ラットは4日間で放射能の32~35%を尿中に排泄し、33~37%を糞中に排泄した。腸の内容物は腸壁と共に残存能のほとんどを含有していた。胆汁への排泄は急速で、胆汁中の放射性物質は腸から容易に吸収されたが、それは腸肝循環が迅速であることを示唆している(Ladomeryら、1967a)。少量¹⁴C-BHTの静脈内及び腹腔内投与による胆汁代謝を調べると、4つの主要代謝物の存在がみられた。胆汁中の¹⁴C標識の34~53%は3-5-di-t-butyl-4-hydroxy-benzoic acidとして同定され、それはおそらくエステルグルクロニドとして存在していた。別の存在していた代謝物は、3,5-di-t-butyl-4-hydroxybenzaldehyde, 3-5-di-t-butyl-4-hydroxybenzyl alcohol, 及び 1,2-bis(3,5-di-t-butyl-4-hydroxyphenyl)ethane であった。(Ladomery ら、1967b)。

ラットに¹⁴C-BHTを単回投与し、48~96時間の範囲で尿と胆汁を採集した。糞もまた同じ時間回収した。この期間中に放射能の19~58.5%が尿中に現れ、23.7~36%が胆汁中に現れた。尿中の主要代謝物は3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoic acidで、両方とも遊離型(投与量の9%)、またグルクロニド(15%)及びS-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl)-N-acetylcysteineであった。エステルグルクロニド及びmercaptic酸もまたラットの胆汁中の主要な代謝物であった。遊離型の3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoic acidは糞中の主要な代謝物であった(Danielら、1968)。

8人の男性の集団それぞれに100 mgのBHTを4日の間隔で2つの機会に与えた。尿をBHT投与後24 時間採集した。代謝物はBHT-COOH及びベンゾイルグリシンとして同定された。別の試験では、2人の大人に1.0 gのBHTを与え、BHT-COOH及びそのエステルグルクロニドが尿中で同定された唯一の代謝物であった(Holderら、1970a)。

酵素及び他の生化学的パラメータに対する影響 (原文 p.4)

BHTを毎日挿管で与えたラットはいくつかの肝臓ミクロソーム酵素活性の上昇を示した。酵素活性の刺激は、相対的肝臓重量の増加と相関し、雌ラットでのこれら酵素活性の変化のしきい値は25~75 mgBHT/kg体重/日以下であった。脂肪中のBHT貯蔵は、プロセシング酵素活性に影響を受けるように思われた。毎日500 mg/kg体重を与えたラットで、BHTの脂肪中濃度は、2日目までに雌で230 ppm(0.023%)、雄で162 ppm(0.0162%)という値に達し、その時までには相対的肝臓重量及びプロセシング酵素活性は上昇していた。それ以後肝臓重量及び酵素活性は上昇し続けたが、両性とも脂肪のBHT含有量は約100 ppm(0.01%)のプラトーに下降した(Gilbert & Golberg、1965)。

各12匹のSPF Carworth ラットの群を性別で均等に分け、ラッカセイ油に溶かしたBHTを50、100、200、500 mg/kg体重相当の濃度で1週間連日投与した。8匹のラットの群を対照群とした。最終投与の24時間後に動物をと殺し、組織学的及び生化学的試験(グルコース-6-ホスファターゼ及びグルコース-6-リン酸脱水素酵素)を全動物の肝臓で実施した。試験動物の肝臓の組織化学的評価も実行した。雄ラットの100 mg/kg体重投与群又はそれ以上の用量で、雌ラットの200 mg/kg体重又はそれ以上の用量でBHTは肝臓重量の増加を引き起こした。BHTは、雌において、100 mg/kg体重以上の濃度でグルコース-6-ホスファターゼ活性を減少させ、最高用量試験群の雄雌両方においてグルコース-6-リン酸脱水素酵素 を増加させた。別の試験ではラットに上記スケジュールに従って投与し、その後最終投与後14~28日維持した。28日後までに、生化学的変化は観察されなかったが、それは14日後までに相対的肝臓重量が正常に戻ったのとは対照的であった(Feuerら、1965)。ラット(雌雄のCarworth Farm SPF)に500 mg/kg体重相当濃度のBHTを経口投与した。投与期間は1~5日で、100~400g体重の異なる大きさのラットを使った。投与を受けたラット由来の肝臓ミクロソーム製剤のBHTオキシダーゼ、BHTをBHTアルコールに代謝(2,6-di tert-butyl-4-methylphenolから2,6-di tert butyl-4-hydroxy methylphenolへ)する酵素を分析した。雌ラットにBHT(500 mg/kgを5日間連日)を投与すると、肝臓のグラム当たりの酵素活性は6倍に上昇し、相対的肝臓重量は35%増加したが、その両方が**アクチノマイシン※** Dにより阻害された。その誘発は雌より雄でより顕著であり、酵素の誘導は100 g体重のラットでは低く、200 g体重のラットで最高値となり、大きめのラット(300~400 g範囲)では低かった(Gilbert & Golberg、1967)。※原文ではactinomycinとなっていたが、actinomycinの間違いだと考え、アクチノマイシンと訳した。

ラットの群(雌、Alderly Park SPF系統)を5%、1%、0.1%、0.01%及び0%BHT含有飼料で28日間まで、その後BHT無し飼料で56日間飼育した。4匹の群の動物をと殺し、2匹を酵素アッセイ(アミノピレン脱メチル化

酵素aminopyrene demethylase)に、2匹を電子顕微鏡検査に使用した。酵素活性は飼料のBHT濃度に直接的に相関した。28日間の投餌期間で最低用量(0.01%)群では検出可能な増加はなかった。飼料からBHTを除去した後、酵素濃度は全試験動物で通常に戻った。5%及び1%濃度において、小抱体増殖の程度は飼料中BHT量と投餌期間に比例した。0.1%濃度では、滑面小抱体の一時的上昇があった。0.01%濃度では、増殖は観察されなかった。飼料中からBHTを除去した後は、増殖した滑面小抱体は急速に消失した。第二の試験では、ラットの群に1%BHT含有飼料を10日間、その後20日間の通常飼料期間を経て、第2期10日間にも与えた。5匹の群の動物を10、30、40、42及び47日目にと殺した。アミノピレン脱メチル化酵素分析と電子顕微鏡検査のため肝臓を除去した。両方の10日間BHT投与の後、酵素活性の有意な違いはなかった。電子顕微鏡検査では両方の10日間で類似した滑面小抱体の反応がみられた(Bothamら、1969)。

23匹の雌SPFラット(Wistar系統、体重約145 g)の群に500 mg/kg BHTをナタネ油に溶解させて試験の3日目に始まり11日間与えた。対照群のラットにはナタネ油だけを与えた。7匹のラットの群を最終投与後にと殺した。残りのラットにはそれ以上のBHT投与はせずに維持し、試験の28日目と63日目にと殺した。ラットの肝臓の、重量、DNA含有量、及び細胞核の数を調べた。BHTは、肝臓の膨大、それに付随する肝臓のDNA含有量及び核の数と倍数性の増大という結果をもたらした。肝臓の質量は2週間以内に正常に戻った。しかしながら、BHTを投与した動物の肝臓のDNA含有量は本試験終了時まで上昇したままであり、核の総数あるいは倍数性の程度が減少することはなかった(Schulte Hermannら、1971)。

2つの群、10匹の試験ラット(Alderly Park, SPF Wistar系統)のうち1匹の雄と1匹の雌に200 mg/kg体重のBHTをとうもろこし油に溶解させて7日間連日胃管投与した。4匹の雄と4匹の雌ラットに、対照群として同量のとうもろこし油を与えた。試験化合物投与5日後に採取したサンプルで、尿中のアスコルビン酸排泄を測定した。その動物は最終投与後24時間にと殺し、生化学的アッセイ(aminopyrene demethylase-AMPM、hexobarbitone oxidase-HO、cytochrome P₄₅₀、及びglucose-6-phosphatase)及び電子顕微鏡検査のため肝臓を除去した。投与を受けた別の群のラットを7日間の回復期におき、同様な肝臓試験を実施した。BHTの投与は尿中のアスコルビン酸増加をもたらし、それは投与期間を通して変わらなかった。BHT投与中止後は、対照群の数字に徐々に戻った。BHTに対する生化学的反応のいくつかには有意な性差があり、グルコース-6-ホスファターゼ活性はその例外であった。雌ラットはAPDM及びHO活性の顕著な増加を示し、それは雄ラットでは観察されなかった。Cytochrome P₄₅₀濃度は雄雌両方で上昇した。雌ラットでのAPDM活性を除き、生化学的パラメータは7日間の回復期の後は通常に戻った。電子顕微鏡検査では、肝細胞の滑面小抱体が有意に増殖していることがわかった。それ以外の形態学的変化はみとめられなかった(Burrowsら、1972)。

各群2~4匹の幼若アカゲザル(Macaca mulatta)に、BHTをコーン油に溶解して0、50、又は500 mg/kg体重相当量を連日投与した。投与は4週間であった。投与前及び1週ごとに高用量群の対照及び試験動物から、そして4週間の期間後に低用量群の試験動物から、血液サンプルを採取して、総血漿コレステロール、脂質のリン(lipid phosphorus)及び中性脂肪を測った。2週間で高用量群の試験動物から肝生検を採取した。試験期間終了時、全動物を24時間絶食させ、と殺し、肝臓及び血液サンプルを採取した。肝臓サンプルでコハク酸脱水素酵素及び過酸化反応への感受性[※]を分析した。抽出した肝臓脂肪の総コレステロール、脂質のリン及び中性脂肪を分析した。血漿及び肝臓中の総コレステロール値は有意に低下していた。血漿中の脂質のリン値は、高用量群で上昇しており、血漿及び肝臓中のコレステロール対脂質リンの比率も^{※※}。肝臓脂質の酸化反応への感受性は高用量群で低下していた(Branenら、1973)。

※原文ではsusceptabilityとなっているがsusceptibilityの間違いだと考え「感受性」と訳した。

※※「増加していた」と思われるが、明確な記載なく、原文の確認が必要と思われる。

マウス(BALB/c系統)を0.75%BHT含有飼料で維持した。試験食投与3週間後、血漿エステラーゼの活性が増大し、それは20週の試験期間を通して持続した。エステラーゼの電気泳動分離後、酵素活性の上昇は2つの特定帯域に位置することがわかった(Tyndallら、1975)。

20%ラードが補充され、0.2、0.3、0.4、又は0.5%(乾燥重量)BHTを含む餌を6週間与えたラットは、食中BHTの量に直接的に相関する血清コレステロールの上昇を示した。BHTは雄の副腎の相対重量を増加させ、さらに雌と比較した雄の成長率を有意に減少させた。試験動物で増加した肝臓重量は、肝臓の脂質含有の絶対値増加と並行した(Johnson & Hewgill, 1961)。別の試験では、ラットを0.5%BHT含有飼料(20%ラードを補充する場合／しない場合)で維持したが、食中ラードの存在の有無に関わらず、BHTは基礎代謝率、体コレステロール濃度、及び体と肝臓コレステロール合成率(the rate of synthesis)を上昇させ、体の総脂肪酸含有量を減少させた。ラード無しでBHTを与えた動物では、BHTは体の合成及び回転率、肝臓脂肪酸を増加させ、成長率を抑制した。ラードと共にBHTを与えた動物では、体の合成率と肝臓脂肪酸を減少させ、成長率を減少させたが、その程度は食中ラード無しの動物よりもさらに大きかった(Johnson & Holdsworth, 1968)。

450 mg/kg体重の用量で最大7日間連日BHTを投与したラットの肝臓からのミクロソーム製剤は、対照動物からの製剤と比較すると、標識されたアミノ酸の取り込み能力が増大していた。BHTはまた、*in vivo*でのアミノ酸の、主に小抱体のタンパク質への取り込みを刺激した(Nievel, 1969)。0.01~0.5%BHT含有飼料を12日間与えたラットは肝臓膨大とともに、肝臓ミクロソームピフェニール-4-ヒドロキシラーゼ活性の増大を示し、それは最低用量0.01%以外の全用量でみられた。1日間投与した0.5%BHTは酵素活性を有意に変化させることはなかった(Creavenら、1966)。

各群60匹のFAF雄マウスを、BHT含有0、0.25、又は0.5%半合成飼料で維持した。試験動物の平均寿命は対照動物と比較して有意に長く、0.25%又は0.5%BHTに対してそれぞれ 17.0 ± 5.0 及び 20.9 ± 4.7 月で、それに対し対照動物は 14.5 ± 4.6 月であった(Harman, 1968)。各群雌雄20匹のCharles Riverラットを(雄は24週間、雌は36週間)BHT及び／又は発がん物質(N-2-fluorenylacacetamide 又は N-hydroxy-N-2-fluorenylacacetamide)モル比30:1、6,600 ppm(0.66%)BHT相当量含有試験飼料で維持し、その後12週間対照食で維持した。N-2-fluorenylacacetamide単独では雄の70%に肝癌、雌の20%に乳腺癌を引き起こす結果となった。N-hydroxy-N-2-fluorenylacacetamideでは雄の60%が肝癌を、雌の70%が乳腺癌になった。発がん物質がN-2-fluorenylacacetamideの場合、BHTは雄の肝癌の発生頻度を20%まで減少させ、N-hydroxy-N-2-fluorenylacacetamideが試験化合物であった場合は、15%まで(雄の肝癌を)減少させた。Fischer系統ラットについても同様の結果が得られた。24週間の飲料水中のジエチルニトロソアミン(55 ppm 0.0055%)による肝臓及び食道の腫瘍発生はBHTにより影響を受けなかった(Ullandら、1973)。

若い大人のBALB/cマウスの雌雄を0.75%BHT含有飼料で1ヶ月維持し、その後525~750RのX線を照射した。100%致死率を生んだ用量未満の全ての用量で放射能防御が観察された(Clapp&Satterfield、1975a)。

10~12週齢のハイブリッド(C31F1)雄マウスを、0又は0.75%BHT含有飼料で30日間維持し、その後アルキル化物質を腹腔内注入した。BHTを投与したマウスにおいて30日死亡率の顕著な減少がみられた。雄はエチルメタンスルホネート、n-プロピル又はイソプロピルメタンスルホネート、エチルジブromid、ジエチルニトロソアミン及びシクロホスファミドに対して防御的であったが、メタンスルホン酸メチル、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグ

アリジン、又はdipropylnitrosamineに対してはそうではなかった(Cumming & Walton, 1973)。

毒性学的試験 (原文 p.7)

胎児毒性に関する特殊試験 (原文 p.7)

BHTの胎児毒性に関する試験で、3つの投与スケジュールを採用した： 特定の妊娠日に単回投与(1,000 mg/kg体重)、交配から妊娠中を通して連日反復投与(750 mg/kg体重)、交配前7~10週間、交配中と妊娠中も継続してと殺するまで(マウスには250~500 mg/kg体重、ラットには500及び700 mg/kg体重)。完全に成長した胎児の骨格及び軟組織の検査では、他のパラメータと同様、有意な胎児毒性の影響は観察されなかった。生殖及び発達も影響はされなかった(Clegg, 1965)。

マウスに0.1又は0.5%BHT含有飼料を2種類の濃度のラード(10及び20%)と共に与えた。BHT の0.5%投与群ではわずかであるが有意に12日齢の平均児動物体重と一腹総体重を減少させた。1.0%投与群ではそのような影響はみられなかった。144匹の母動物のうち12匹は確実な無眼球症の系統から選択したにもかかわらず、誕生した7,754匹のマウスのうち無眼球症(anophthalmia)を示したマウスはなかった(Johnson, 1965)。

変異原性に関する特殊試験 (原文 p.7)

(a) 細胞遺伝学

BHT2.5、25、及び250 µg/mL 濃度で、WI-38ヒト胚肺細胞を使って分裂後期異常を*in vitro*試験した。BHTは異常な分裂後期数値の数において生物学的に有意な増加をもたらした。これらの影響は本質的に細胞遺伝的だと思われ、変異原性ではないと思われる。その用語間の区別は、細胞分裂の障害が細胞遺伝的影響の可能性があるが、この影響が細胞分裂を通じて後代(progency)の細胞に伝染しないという意味において変異原性ではないということである。さらに、この手順で試験した物質の70%が生物学的影響を引き起こした。従って、偽の(false)肯定的影響を産む可能性がある(S.R.I, 1972)。

また、BHTをラットの骨髓細胞の細胞遺伝学的分析により*in vivo*で検討した。30、900、及び1,400 mg/kg体重の用量を採用した。急性及び亜急性療法を実施した。細胞遺伝学的に有意な損傷の証拠は発見されなかった(S.R.I, 1972)。

(b) 宿主経由試験

In vitro Salmonella TA-1530及びC-46をサッカロミセスD-3とともに使用した。50%濃度を試験した。変異原性はみられなかった(S.R.I, 1972)。

In vivo BHTを、急性試験では30.0、900.0、及び1,400 mg/kgの用量で、亜急性試験では30.0、250.0 及び500.0 mg/kgの用量で、ICR Swissマウスにおいて、指標有機体(organisms)としてサルモネラG-46とTA-1530、及びサッカロミセスD-3を採用して試験した。変異原性はみられなかった。BHTを、単一層スクリーン(tier one screen)の一部である、より敏感な(検知において)試験方法で検討した。この試験においては、ネズミチフス菌株TA-1535、1537、1538、及びサッカロミセスD-4を用い、プレートとサスペンション試験(plate and

suspension tests)での代謝活性化がある場合と無い場合の両方でBHTを調べた。採用した濃度パーセント(w/v)は、バクテリアに対しては0.15、0.3、及び0.6であり、イーストに対しては0.6、1.2、及び2.4であった。この試験の条件下においては、BHTは変異原性ではなかった(Brusick, 1975)。

(c) 優性致死試験

Sprague Dawley ラットにおいて、急性用量30、900、及び1,400 mg/kg、及び亜急性用量30×5、250×5、及び500×5 mg/kgでBHTを試験した。亜急性療法による有意な着床後損失は、3、4、及び6週後に引き起こされた(Brusick, 1975)。

生殖に関する特殊試験 (原文 p.8)

離乳ラット(各性16匹)に20%ラード及びBHT0、300、1,000、又は3,000 ppm(0、0.03、0.1、又は0.3%)含有飼料を与え、100日齢(試験上79日)で交配した。最初の児動物の離乳の10日後、第二の児動物を産むため再び交配した。児動物(16匹の雌と8匹の雄)を100日齢で交配した。数多くの機能及び臨床試験(血清コレステロールと脂質を含む)を親動物と第一世代の児動物(first filial)対して最大28週まで実施し、肉眼的及び顕微鏡的検査を42週で行った。3,000 ppm(0.3%)投与群で、10~20%の成長率の抑制が親動物と児動物で観察された。血清コレステロール値の20%上昇が28日後で観察されたが、10日後ではコレステロール上昇はなかった。試験42週でと殺した際には、10~20%の相対肝重量増加もまた観察された。3,000 ppm(0.3%)でのその他全ての観察、及び1,000 ppm(0.1%)と300 ppm(0.03%)での全ての観察は対照動物と同等であった。全ての生殖基準は正常であった。催奇形性影響はみとめられなかった(Frawleyら、1965b)。親世代と子の第一世代で得られた結果に類似した結果が子の第二世代でも得られた。後者の100日齢での2つの同腹児の検査では3,000 ppm(0.3%)投与群で平均体重の減少以外の影響は明らかでなかった。児動物の検査項目は: 同腹児数、平均体重、死産の発生、生存率、肉眼的及び顕微鏡的病変であった(Kennedyら、1966)。

他の特殊試験 (原文 p.9)

急性な経口腹腔内投与(マウス)、眼球刺激(ウサギ)、及び皮膚刺激(ラット)でBHTの7つの分解産物を測定した。全ての試験化合物は、親化合物よりも毒性は小さかった(Conningら、1969)。

妊娠マウスとその児動物による0.5%ブチルヒドロキシトルエン(BHT)の慢性的摂取は、多様な行動変化をもたらした。BHT投与した児動物は、探索の増加、睡眠減少、毛繕い減少、学習遅延、向き反射(orientation reflex)の減少を示した。BHT投与した児動物は、睡眠減少、社会的分離的に誘発された攻撃性の増加、及び学習の深刻な欠損を示した(Stokes & Scudder, 1974)。

若い雄のSwiss WebsterマウスにBHTを62.5~500 mg/kg体重の用量で腹腔内注入した。動物はBHT投与1、3、及び5日後にと殺した。病理組織学的変化が500 mg/kg体重投与3日後に十分みられ、多数の肺胞細胞の増殖、巨大細胞形成、及びマクロファージ増殖で成り立っていた。これらの変化には肺重量及びDNAとRNA総量の増加がともなった。その変化は用量依存的であり、より影響が小さい濃度は250 mg/kg体重であった(Saheb & Witschi, 1975)。

急性毒性 (原文 p.9)

動物	経路	LD ₅₀ (mg/kg体重)	致死量概数 (mg/kg体重)	参照
ラット	経口	1,700~1,970		Deichmann ら、 1955
ネコ	経口		940~2,100	Deichmann ら、 1955
ウサギ	経口		2,100~3,200	Deichmann ら、 1955
モルモット	経口		10,700	Deichmann ら、 1955
ラット	経口	2,450		Karplyuk、1959
マウス	経口	2,000		Karplyuk、1959

短期試験 (原文 p.9)

マウス (原文 p.9)

妊娠したマウスにBHTを18日間750 mg/kg体重の用量を毎日投与した。別の群には18日間の妊娠期間を含み合計50~64日間同じ用量を与えた。胎児の異常は観察されなかった(Clegg、1965)。

144匹の雌マウスを使って統計学的に計画した試験で、母動物の繁殖年齢期間を通して生まれた7,765匹を代表する1,162の同腹児で盲目の例はなかった(Johnson、1965)。

ラット(原文 p.10)

45組の離乳した雄ラットに5~8週間投餌試験を実施し、0.001、0.1、又は0.5%BHTを加えたラード(0、10、及び20%)を補充した飼料を与えた。0.001%では、試験した血清成分のどれにも変化は起きなかった。0.5%は5週以内に血清コレステロール値の上昇を引き起こした。8ヶ月間、10%ラードを補充し0.1%BHTを加えた飼料を与えた雌ラットは血清コレステロール値上昇を示したが、その他の有意な変化はなかった。同じ期間、10%及び20%ラード補充した飼料に0.5%BHTを加えたものを与えた雌ラットでは、血清コレステロール、リン脂質、及びムコタンパクの値が上昇した(Dayら、1959)。

5週間ビタミンEの欠乏した餌で飼育した妊娠ラットに0.3%BHTを混餌投与すると、毒性学的症状は示さなかった。1.55%用量は体重の大幅な減少と胎児の死亡を引き起こした(Amesら、1956)。

1群12匹のラットに、0.1%の食中用量で20%ラード補充と併せて7週間投与したBHTは、雄ラットの初期成長率と成年重量を有意に減少させた。10%ラード補充では、雄雌のラットで何ら影響はみとめられなかった。ペア飼育試験では、この成長障害はBHTの直接的な毒性的影響であり、飼料の美味しさ減少で説明することはできなかった。この用量でのBHTは絶対及び相対肝臓重量を有意に増加した。増加するストレス下に置かれ

たラットは、頭頂の毛が有意に欠落した。飼料中の脂肪負荷を増すと、BHTの毒性的影響は増大した。同腹児の10%に無眼球症(anophthalmia)が発生した(Brownら、1959)。

6匹の離乳ラット(雌雄3匹ずつ)の群に、20%ラード補充と併せてBHTを0、0.1、0.2、0.3、0.4及び0.5%の食中用量で6週間与えた。BHTは、特に雄において成長率を減少させたが、その影響は0.3%用量で有意になると思われた。BHTはまた、両性において、絶対肝臓重量と体重に対する相対重量比を増加させ、後者影響は0.2%用量で有意になるように思われた。BHTは雄ラットにおいて左の副腎の体重に対する相対重量比を増加させたが、雌では一貫性のある影響はなかった。副腎において、投与に起因する組織学的変化はなかった。全ての投与群で、血清コレステロールが上昇し、コレステロールの濃度はBHT用量に直接的に比例した。副腎コレステロールの濃度の有意な増加もあった。BHTは、肝臓中の総エステル型(esterified)肝臓コレステロールの濃度又は比率、総肝脂質、総多価不飽和脂肪酸の濃度においては有意な変化を引き起こさなかった(Johnson & Hewgill, 1961)。

250 mg/kg体重のBHTを68~82日間ラットに投与すると、重量※増加率と肝臓の脂肪浸潤を減少させた(Karplyuk, 1959)。※体重のことか肝臓の重量か不明、原文の確認必要と思われる

20日及び90日それぞれ投餌試験を実施すると、ラットは0.5又は1%BHT含有飼料を美味しいと感じていないことがわかった。しかしながら、これらの濃度を徐々に達成した場合は、動物はそうのように投与した餌を、より容易に摂取する。5又は10匹のラットの群の25日間ペア飼育試験では、0.8及び1%含有飼料が対照動物の値を下回って毎日の摂餌量を減少させることがわかった。飼料中1%の用量は体重増加を遅らせた(Deichmann, 1955)。

BHT(2,000 ppm(0.2%))を組み込んだ、19.9%カゼイン含有飼料を8匹の若いラットの一群に8週間投与した。別の8匹の一群を対照群とした。16.6%カゼイン含有飼料で、さらに別の一群で4週間、さらに9.6%カゼイン(コリン添加無し)で7週間試験を繰り返した。これら3例全てにおいて、BHTは成長刺激を引き起こし、タンパク質効率を向上させた。肝臓のN含有量は、しかしながら、BHT投与した動物においては、大幅に減少し、その例外はBHTの濃度を200 ppm(0.02%)まで抑えた場合であった。2,000 ppm(0.2%)BHT投与のラットにおいては、絶食(詳細不明)後の肝臓タンパク質の回復も阻害された。肝臓脂質含有量は、2,000 ppm(0.2%)で増加したが、200 ppm(0.02%)では増加しなかった。2,000 ppm(0.2%)のBHTの食中用量はまた、副腎重量とアスコルビン酸含有量を増加させたが、腺(gland)の重量に基づいて再計算した場合は有意な差はなかった。副腎のアスコルビン酸増加は、BHTが生体に課したストレスを示していると解釈される(Sporn & Schöbesch, 1961)。

48匹の離乳ラット(各性24匹)の群に1,000 ppm(0.1%)のBHT含有飼料を最高16週まで投与した。48匹のラットの一群を対照群とした。成長率と摂餌量の測定、剖検時の臓器の重量と顕微鏡的病理検査では、未投与のラットとの違いはなかった。しかしながら、相対肝重量及び副腎重量の増加は、損傷の病理組織学的証拠無しに引き起こされた。肝臓グルコースホスファターゼ及びグルコース6-ホスファターゼリン酸脱水素酵素活性の、生化学的測定及び組織化学的評価では、対照群との差は明らかにならなかった(Gauntら、1965a)。

16匹の雌と16匹の雄ラットの群に、0.03、0.1、及び0.3%BHTを脂肪20%含有飼料に混ぜて10週間投与した。16匹の雄と16匹の雌をそれぞれ含む2つの対照群があった。雌ではどの用量においても明白な体重への影響はなく、0.3%用量の雄でわずかな抑制があったのみであった。BHTを投与した後の雌雄どちらにおいても

も、10週間投与したどの用量においても血液コレステロール値に有意な影響はなかった。0.3%用量の雄の4匹及び0.1%用量の2匹が試験期間中に死亡した。0.3%用量の雌で2匹が死亡した。両対照群では1匹の雄ラットが死亡しただけであった(Frawleyら、1965a)。

20匹の雄と20匹の雌ラットの群に、1%BHTを飼料に混ぜて10週間与えたところ、肝臓の体重比及び肝臓細胞の形態学的外見は動物を通常食に戻した後数週間で元に戻った(Goaterら、1964)。

ウサギ (原文 p.11)

BHAの高用量で記載されたものと類似した電解質の排泄に対する急性的影響が、BHT500~700 mg/kg体重(飼料中2%)の用量投与にも引き続いてみられた。それより低い用量水準ではその影響はみられなかった(Denz & Llaurodo、1957)。

家禽 (原文 p.11)

BHTを0.125%用量で34週間10羽の若い雌鳥の一群に与えたところ、生殖能力、卵の孵化率、ヒナの健康状態は、類似した対照群と比較して、違いはなかった。抗酸化剤を与えた鶏の卵は、対照動物の卵よりもカロチノイド及びビタミンAを多く含んでいた(Shollenbergerら、1957)。

イヌ (原文 p.11)

4週間以上、2~4日おきに1.4~4.7 g/kg体重の用量を与えた4匹のイヌの一群で、軽度~中程度の下痢が誘発された。死後の剖検では、有意な肉眼的病理変化は示されなかった。12ヶ月間、週5日0.17~0.94 g/kg体重の用量を与えたイヌでは、中毒兆候及び、肉眼的又は病理組織学的変化は観察されなかった(Deichmannら、1955)。

サル (原文 p.12)

6匹の大人の雌アカゲザルの一群を、50 mg BHT及び50 mg BHA/kg体重の摂取量相当を供給するBHTとBHAの混合物含有試験飼料で維持した。6匹の大人の雌アカゲザルの別の一群を対照群として使用した。サルに、繁殖に先立つ1年及び165日の妊娠期間を含む追加の1年間飼料を与えた。ヘモグロビン、ヘマトクリット、ディファレンシャル(differential)白血球数と総白血球数、コレステロール、Na⁺、K⁺、総タンパク質、血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ、及び血清グルタミン酸オキサロ酢酸^{*}トランスアミナーゼを含む血液学的試験を1ヶ月間隔で実施した。体重は1ヶ月間隔で測定した。月経周期の記録は試験期間を通して行った。^{*}原文はoxylaceticとなっていたが、oxalaceticの間違いだと考えオキサロ酢酸と訳した。

1年後にその雌を、試験食を与えていない雄アカゲザルと交配させた。妊娠期間中40、80、120、及び160日目と、産後30及び60日目に全血球数測定を実施した。合計5匹の児動物が試験サルに生まれ、6匹が対照サルに産まれた。血液学的評価を、試験及び対照サルの児動物に対して1、5、15、30、及び60日目に実施し、児動物の観察を2才まで継続した。生後3ヶ月の2匹の試験児動物と2匹の対照児動物を、1ヶ月の心理学的ケージ観察のため母動物から引き離れた。試験期間中の臨床的異常は親動物にも児動物にも観察されなかった。試験動物の妊娠で合併症はなく、正常児動物を出産した。大人の雌は正常児動物を産み続けた。投与期

間中に産まれた児動物は健康を維持したが、例外的に1匹の児動物が無関係の原因により死亡した。生後3ヶ月でのケージ観察では行動的異常は何ら認められなかった(Allen、1976)。

別の試験では、それぞれ3匹の乳児あるいは幼若のサル(アカゲザル)の群に、500 mg/kg体重相当の用量でBHTを連日投与した。別の幼若サルの一群には50 mg/kg体重のBHTを投与した。投与は4週間であった。血液分析(全血球数、血清ナトリウム及びカリウム、ビリルビン、コレステロール及びグルタミン酸オキサロ酢酸※トランスアミナーゼ)を毎週実施し、完全な尿検査も同様に実施した。2週後に、幼若サルから肝生検を24時間絶食の後採取した。試験期間終了時、全動物を24時間絶食させ、と殺した。全主要臓器の組織を光学及び電子顕微鏡検査のために用意した。また肝臓組織はタンパク質、RNA及びチトクロームP₄₅₀について分析した。肝臓から調整したミクロソーム製剤を、ニトロアニソール脱メチル化酵素及びグルコース-6-ホスファターゼ活性を測定するために使った。試験動物と対照動物の尿及び血液の値は類似していた。乳児あるいは幼若動物の肝臓以外の全ての臓器の組織学的評価では、いかなる化合物関連の変化も示されなかった。BHTを投与した試験動物は、巨大肝細胞及び肝細胞核の膨大を示した。超微細構造的に、投与動物の肝細胞は、小胞体の中程度の増殖を示した。脂肪滴もこれらの肝細胞の細胞質において顕著であった。高用量群の試験動物の肝細胞の15%において、核小体の断片化がみられた。試験動物及び対照動物の肝臓におけるDNA及びRNA及びチトクロームP₄₅₀の濃度は類似していた。BHT投与した幼若動物では、ニトロアニソール脱メチル化酵素活性増加を示し、それは時間とともに増大した。乳児のサルでは酵素活性に影響はなかった。グルコース-6-ホスファターゼ活性は幼若サルでは減少したが、乳児のサルでは変化なしであった(Allen & Engblom、1972)。※原文はoxalacticとなっていたが、oxalaceticの間違いと考えオキサロ酢酸と訳した

長期試験 (原文 p.12)

ラット (原文 p.12)

15匹の雄と15匹の雌ラットの群に1%ラード及び、0.2、0.5、又は0.8%BHT含有飼料を24ヶ月与えたところ、特定の中毒兆候は示さず、病理顕微鏡的(micropathological)試験は陰性であった。ある一群にはBHTを飼料に取り込む前にラードに溶解させ、その後150℃で30分加熱したBHTを0.5%含有する飼料を与えた。体重増加又は血液成分には何ら影響なく、主要な臓器の病理顕微鏡的試験は陰性であった。1%BHTの供給に引き続き、雌雄ラットの両方で、普通以下の体重増加及び脳、肝臓、そして他のいくつかの臓器の体重比相対重量の増加がおこった。病理顕微鏡的試験はこの群でもまた陰性であった。BHTのその濃度では、赤血球及び白血球数、末梢血中のヘモグロビン濃度には特定の影響はなかった。多数の雌雄のラットがこの試験中に死亡したが、その死亡は投与したBHT濃度には何ら相関性がなく、死因は本物質投与とは関係ないことが確実だと思われた。病理顕微鏡的試験がこの所見を支持している。飼料中0.5%用量で供給されたBHTはラットに対し、生殖周期、脾臓、腎臓、肝臓及び皮膚の組織、又は心臓、脾臓、あるいは腎臓の重量に関して何ら影響を与えなかった。2年間、0.1%BHT及び10%水素添加(hydrogenated)ココナツ油を含む飼料を供給したラットの死亡率の有意な増加はなかった。体重増加に対する影響はすでに記載されている(Deichmannら、1955)。

雌(アルビノWistar)ラット(初期体重120~130 g)を、80週間、0又は0.4% W/W BHT含有飼料で維持した。試験食での1週間後、肝臓重量、ミクロソームタンパク質、チトクロームP₄₅₀、チトクロームb₅、NADPH-チトクロームc還元酵素、ピフェニル-4-ヒドロキシラーゼ、及びエチルモルヒネN-脱メチル化酵素において有意な増加が観察されたが、アニリン-4-ヒドロキシラーゼでは観察されなかった。総肝臓タンパク質、コハク酸脱水素酵素、及び、グルコース-6-ホスファターゼはわずかに低下した。このパターンは試験期間中ほとんど変化しなかった。

試験期間終了時にBHT試験食から取り除かれ、18日間BHT無しの飼料で維持したラットは、多くの肝臓パラメータについて正常に戻った。しかしながら、チトクロームb5、チトクロームc還元酵素及びエチルモルヒネN-脱メチル化酵素は上昇したままであった。飼料供給80週の終わりでの組織学的変化として、中心性細胞の膨大が含まれたが、それは18日間のBHT無しの飼料供給後には元に戻った。唯一の超微細構造的変化は滑面小胞体の増殖であった(Gray & Parke, 1974)。

食中でBHT0.75%用量を12ヶ月投与した8週齢の雄BALB/cマウス18匹の一群は、肝内胆管の著しい過形成と、それに関連する亜急性胆管炎を引き起こした(Clappら, 1973)。別の試験では、11匹のマウス(BALB/c系統)を0.75%BHT含有飼料で16ヶ月維持した。試験群の肺腫瘍発生頻度は63.6%で、それに対して対照群は24%であった(Clappら, 1974)。しかしながら、この試験を試験動物がもっと多い一群を使って再度行くと、雌雄ともに肺腫瘍の発生頻度に何ら影響が無いことがわかった(Clappら, 1975b)。

各群48匹のマウス(CFI系統)を性別で等分し、1,000 ppmのBHT含有飼料で維持した。4週後、1つの群に2,500 ppmのBHT含有飼料を与え、8週後に別の群に5,000 ppmのBHT含有飼料を与えた。動物はこれらの飼料で100週齢まで飼育した。BHT飼料の動物の生存率には統計的に有意な減少はなかった。もっとも、試験の後半4分の1の期間では、高用量の雄の生存率は低かった。試験過程で死亡したりと殺した動物は、対照動物に比べ小葉中心性(centrilobular)巨大細胞(cytomegaly)及び巨大核(karyomegaly)が大きくなっていた。胆管過形成は試験動物141例中3例でみられたのみであった。高用量群と対照群の間で、悪性腫瘍の発生頻度は有意な差がなかった。しかしながら、投与ラットの肺腫瘍の発生頻度は増加した(5,000 ppm群で75%、2,500 ppm群で73.9%、1,000 ppm群で53.2%、及び対照群で46.8%)。投与マウスと対照動物の肺腫瘍を区別できる形態的特徴はなかった。BHT投与雌マウスの良性卵巣腫瘍にも明らかな増加があり、対照動物では一切観察されなかった(Brooksら, 1976)。

ヒトにおける観察 (原文 p.14)

4人の人間の男性被験者に約40 mgの¹⁴C標識BHTを単回投与した。投与した放射能の約75%が尿中に排泄された。投与の約50%が最初の24時間で尿中に出現し、その後、おそらく組織中に保存された化合物又は代謝物の排出を表す低速な相が続いた。ヒトでは、放射能の大部分は代謝物のエーテル不溶性グルクロニドとして排泄され、その中で、環メチル基及び1tert-ブチルメチル基はカルボキシル基に酸化され、他のtert-ブチル基のメチル基もまた、おそらくアルデヒド基に酸化される。遊離型及び抱合型BHT酸は尿の軽微な成分で、メルカプツール酸は事実上存在しない。ヒトの尿中への排泄の第一段階の速さはラットでみられたような著しい腸肝循環が無いことを示唆している(Danielら, 1967)。

報告された体脂肪中のBHT値は 0.23 ± 0.15 ppm($0.000023\% \pm 0.000015\%$) (11人、英国在住) そして 1.30 ± 0.82 ppm (0.000130 ± 0.000082) (12人、アメリカ在住)であった (Collings & Sharratt, 1970)。

コメント (原文 p.14)

ラットと同様、ヒトにおけるBHTの代謝をさらに解明すると、酸化生成物は、あるものはグリシンと結合するが、迅速に尿中に排泄されることがわかった。0.5%BHTを投与した親動物の児動物であり、同様の飼料を投与したSwiss-Websterマウスに6週齢で行動試験を実施した。その結果、行動の変化がみられたが、BHT投与した親動物から産まれた乳児サルが何ら行動異常を示さなかったという事実を鑑みると、これらの変化は評価することが難しい。

マウスにいくつかの発がん試験を実施した。Balb Cマウスでは肺腫瘍の発生頻度が上昇しなかったが、CFIマウスは対照動物と比べると肺腫瘍の発生頻度が増加した。他の腫瘍に関しては、対照動物と比べて発生頻度の増加はみられず、ラットの長期試験は陰性であった。BHTをいくつかの*in vitro*及び*in vivo*システムで試験したが、非変異原性であると判明した。負の変異原性試験は、BHTの非発がん性に対し、追加的証拠を提供した。しかしながら、委員会は、最新基準を満たす適切な発がん性試験が望ましいと考えた。

前回指摘された、BHA、BHT及びプロピルガレート(propyl gallate)混合物の生殖に与える影響に関する試験の必要性は、もはや必要ではないと考えられた。

評価 (原文 p.14)

毒性的影響を引き起こさない濃度 (原文 p.14)

マウス: 飼料中5,000 ppm(0.5%) 250 mg/kg体重相当

ヒトに対する推定一日摂取許容量 (原文 p.14)

0~0.5[※] mg/kg体重^{※※}

さらなる研究又は情報 (原文 p.14)

1980年までに必要なこと

現行の許容基準を満たす適切な発がん性試験

※ BHA、BHT あるいは 両方の合計

※※ 暫定

ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要（評価書:JMPR 1976）

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
胎児毒性	マウス、ラット	1,000 mg/kg 体重、750 mg/kg 体重、マウスには 250~500 mg/kg 体重、ラットには 500 及び 700 mg/kg 体重	完全に成長した胎児の骨格及び軟組織の検査では、他の基準と同様、有意な胎児毒性的影響は観察されなかった。生殖と生後の発達もまた、影響はなかった。
胎児毒性	マウス	0.1 又は 0.5% ラード (10 及び 20%)	0.5%投与群ではわずかだが有意に 12 日齢の平均的児動物体重と一腹総体重が減少した。1.0%投与群ではそのような影響はみられなかった。144 匹の母動物のうち 12 匹は確実な無眼球症の系統から選択したにもかかわらず、誕生した 7,754 匹のマウスのうち無眼球症を示したマウスはなかった。
変異原性 (細胞遺伝学) <i>in vitro</i> 分裂後 期異常	WI-38 ヒト 胚肺細胞	2.5、25、及び 250 µg/mL	異常な分裂後期数値の数において生物学的に有意な増加をもたらした。これらの影響は細胞遺伝的だと思われ、変異原性ではない。さらに、この手順で試験した物質の70%が生物学的影響を引き起こした。従って、偽の肯定的影響を産む可能性がある。
<i>in vivo</i> 急性及 び亜急性	ラット骨髓細胞	30、900、及び 1,400 mg/kg 体重	細胞遺伝学的に有意な損傷の証拠は発見されなかった。
変異原性 (宿主経由試験) <i>In vitro</i>	Salmonella TA-1530 及び C-46、サッカロミセス D-3	50%	。変異原性はみられなかった。
<i>In vivo</i> 急性試験	マウス 指標有機体としてサル モネラ G-46 と TA-1530、 及びサッカ ロミセス D-3	30.0、900.0、及び 1,400 mg/kg	BHT は変異原性なし。
プレートとサス ペンション試験 (plate and suspension tests)	ネズミチフス 菌 株 TA-1535、 1537、 1538、及び サッカロミセ ス D-4	濃 度 パ ー セ ン ト (w/v)は、バクテリア に対しては 0.15、 0.3、及び 0.6 であ り、イーストに対して は 0.6、1.2、及び 2.4	BHT は変異原性なし。
亜急性試験	ICR Swiss マウス	30.0、250.0 及び 500.0 mg/kg	BHT は変異原性なし。

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
変異原性 (優性致死試験)	Sprague Dawley ラット	急性的用量 30、 900、及び 1,400 mg/kg、及び亜急 性用量30×5、250 ×5、及び 500×5 mg/kg	亜急性療法による有意な着床後損失は、3、4、及び 6 週後に引き起こされた。
生殖試験	ラット	20% ラード 及び BHT0、300、 1,000、又は 3,000 ppm(0、0.03、 0.1、又は 0.3%)	3,000 ppm(0.3%)投与群で、10~20%の成長率の抑制 が親動物と児動物で観察された。血清コレステロール値 の 20%上昇が 28 日後で観察されたが、10 日後ではコ レステロール上昇はなかった。試験 42 週でと殺した際に は、10~20%の相対肝重量増加もまた観察された。催奇 形性影響なし。
他の特殊試験 7種類の分解物 の急性毒性(腹 腔内)	マウス	記載なし	全ての試験化合物は、親化合物よりも毒性は小さかつ た。
他の特殊試験 7種類の分解物 の眼刺激性	ウサギ	記載なし	全ての試験化合物は、親化合物よりも毒性は小さかつ た。
他の特殊試験 7種類の分解物 の皮膚刺激性	ラット	記載なし	全ての試験化合物は、親化合物よりも毒性は小さかつ た。
発生試験	マウス	0.5%	妊娠マウスとその児動物の慢性的摂取は、多様な行動 変化をもたらした。BHT 投与した児動物は、探索の増 加、睡眠減少、毛繕い減少、学習遅延、向き反射の減 少を示した。BHT 投与した児動物は、睡眠減少、社会 的分離的に誘発された攻撃性の増加、及び学習の深刻 な欠損を示した。
腹腔内	Swiss Webster マ ウス	62.5~500 mg/kg 体重	病理組織学的変化が 500 mg/kg 体重投与 3 日後に十 分みられ、多数の肺胞細胞の増殖、巨大細胞形成、及 びマクロファージ増殖で成り立っていた。これらの変化に は肺重量及び DNA と RNA 総量の増加がともなった。 その変化は用量依存的であり、より影響が小さい濃度は 250 mg/kg 体重であった。
急性毒性	急性毒性 (原文 p.9) の表参照		
発生毒性	マウス	750 mg/kg 体重	胎児の異常は観察されなかった。
発生毒性	マウス	記載なし	144 匹の雌マウスを使って統計学的に計画した試験で、 母動物の繁殖年齢期間を通して生まれた 7,765 匹を代 表する 1,162 の同腹児で盲目の例はなかった。

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
8 ヶ月間亜慢性 毒性	ラット	0.001、0.1、又は 0.5% ラード(0、10、及び 20%)	0.001%では、試験した血清成分に変化は起きなかった。0.5%は 5 週以内に血清コレステロール値の上昇を引き起こした。8 ヶ月間、10%ラードを補充し 0.1%混餌投与した雌ラットは血清コレステロール値上昇を示したが、その他の有意な変化はなかった。同じ期間、10%及び 20%ラード補充した飼料に 0.5%BHTを加えたものを与えた雌ラットでは、血清コレステロール、リン脂質、及びムコタンパクの値が上昇した。
発生毒性	ラット	0.3%、1.55%	5 週間ビタミン E の欠乏した餌で飼育した妊娠ラットに 0.3%BHTを混餌投与すると、毒性学的症状は示さなかった。用量は体重の大幅な減少と胎児の死亡を引き起こした。
	ラット		1 群 12 匹のラットに、0.1%の食中用量で 20%ラード補充と併せて7週間投与した BHT は、雄ラットの初期成長率と成年重量を有意に減少させた。10%ラード補充では、雄雌のラットで何ら影響はみとめられなかった。ペア飼育試験では、この成長阻害は BHT の直接的な毒性的影響であり、飼料の美味しさ減少で説明することはできなかった。この用量での BHT は絶対及び相対肝臓重量を有意に増加させた。増加するストレス下に置かれたラットは、頭頂の毛が有意に欠落した。飼料中の脂肪負荷を増すと、BHT の毒性的影響は増大した。同腹児の 10%に無眼球症(anophthalmia)が発生した (Brown ら、1959)。
	ラット		6 匹の離乳ラット(雌雄 3 匹ずつ)の群に、20%ラード補充と併せて BHT を 0、0.1、0.2、0.3、0.4 及び 0.5%の食中用量で 6 週間与えた。BHT は、特に雄において成長率を減少させたが、その影響は 0.3%用量で有意になると思われた。BHT はまた、両性において、絶対肝臓重量と体重に対する相対重量比を増加させ、後者影響は 0.2%用量で有意になるように思われた。BHT は雄ラットにおいて左の副腎の体重に対する相対重量比を増加させたが、雌では一貫性のある影響はなかった。副腎において、投与に起因する組織学的変化はなかった。全ての投与群で、血清コレステロールが上昇し、コレステロールの濃度は BHT 用量に直接的に比例した。副腎コレステロールの濃度の有意な増加もあった。BHT は、肝臓中の総エステル型(esterified)肝臓コレステロールの濃度又は比率、総肝脂質、総多価不飽和脂肪酸の濃度においては有意な変化を引き起こさなかった。

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
	ラット		250 mg/kg 体重の BHT を 68~82 日間ラットに投与すると、重量※増加率と肝臓の脂肪浸潤を減少させた (Karplyuk、1959)。※体重のことか肝臓の重量か不明、原文の確認必要と思われる 20 日及び 90 日それぞれ投餌試験を実施すると、ラットは 0.5 又は 1% BHT 含有飼料を美味しいと感じていないことがわかった。しかしながら、これらの濃度を徐々に達成した場合は、動物はそうように投与した餌を、より容易に摂取する。5 又は 10 匹のラットの群の 25 日間ペア飼育試験では、0.8 及び 1% 含有飼料が対照動物の値を下回って毎日の摂餌量を減少させることがわかった。飼料中 1% の用量は体重増加を遅らせた。
8 週間	ラット	(2,000 ppm(0.2%))、 9.6%、16.6%、 19.9% カゼイン	BHT は成長刺激を引き起こし、タンパク質効率を向上させた。肝臓の N 含有量は、BHT 投与した動物においては、大幅に減少し、その例外は BHT の濃度を 200 ppm(0.02%) まで抑えた場合であった。2,000 ppm(0.2%) BHT 投与のラットにおいては、絶食(詳細不明)後の肝臓タンパク質の回復も阻害された。肝臓脂質含有量は、2,000 ppm(0.2%) で増加したが、200 ppm(0.02%) では増加しなかった。2,000 ppm(0.2%) の BHT の食中用量はまた、副腎重量とアスコルビン酸含有量を増加させたが、腺(gland)の重量に基づいて再計算した場合は有意な差はなかった。
16 週	ラット	1,000 ppm(0.1%)	相対肝重量及び副腎重量の増加は、損傷の病理組織学的証拠無しに引き起こされた。
10 週間	ラット	0.03、0.1、及び 0.3%、 脂肪 20%	雌ではどの用量においても明白な体重への影響はなく、0.3% 用量の雄でわずかな抑制があったのみ。血液コレステロール値に有意な影響はなかった。0.3% 用量の雄の 4 匹及び 0.1% 用量の 2 匹が試験期間中に死亡した。0.3% 用量の雌で 2 匹が死亡した。両対照群では 1 匹の雄ラットが死亡しただけであった。
10 週間	ラット	1%	肝臓の体重比及び肝臓細胞の形態学的外見は動物を通常食に戻した後数週間で元に戻った。
	ウサギ	500~700 mg/kg 体重(飼料中 2%)	BHA の高用量で記載されたものと類似した電解質の排泄に対する急性的影響がみられた。それより低い用量水準ではその影響はみられなかった。
34 週間	家禽	0.125%	生殖能力、卵の孵化率、ヒナの健康状態は、類似した対照群と比較して、違いはなかった。抗酸化剤を与えた鶏の卵は、対照動物の卵よりもカロチノイド及びビタミン A を多く含んでいた。
4 週間	イヌ	1.4~4.7 g/kg 体重	軽度~中程度の下痢が誘発された。死亡後の剖検では、有意な肉眼的病理変化は示されなかった。
12 ヶ月間	イヌ	0.17~0.94 g/kg 体 重	中毒兆候及び、肉眼的又は病理組織学的変化は観察されなかった。

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
2年及び165日	サル、雌アカゲザル	50 mg BHT 及び 50 mg BHA/kg 体重	試験期間中の臨床的異常は親動物にも児動物にも観察されなかった。試験動物の妊娠で合併症はなく、正常児動物を出産した。大人の雌は正常児動物を産み続けた。投与期間中に産まれた児動物は健康を維持したが、例外的に1匹の児動物が無関係の原因により死亡した。生後3ヶ月でのケージ観察では行動的異常は何ら認められなかった。
4週間	サル(アカゲザル)	500 mg/kg 体重	試験動物と対照動物の尿及び血液の値は類似していた。乳児あるいは幼若動物の肝臓以外の全ての臓器の組織学的評価では、いかなる化合物関連の変化も示されなかった。BHT を投与した試験動物は、巨大肝細胞及び肝細胞核の膨大を示した。超微細構造的に、投与動物の肝細胞は、小胞体の中程度の増殖を示した。脂肪滴もこれらの肝細胞の細胞質において顕著であった。高用量群の試験動物の肝細胞の15%において、核小体の断片化がみられた。試験動物及び対照動物の肝臓におけるDNA及びRNA及びチトクロームP ₄₅₀ の濃度は類似していた。BHT 投与した幼若動物では、ニトロアニソール脱メチル化酵素活性増加を示し、それは時間とともに増大した。乳児のサルでは酵素活性に影響はなかった。グルコース-6-ホスファターゼ活性は幼若サルでは減少したが、乳児のサルでは変化はなかった。
24ヶ月長期試験	ラット	1%ラード及び、 0.2、0.5、又は 0.8%	特定の中毒兆候は示さず、病理顕微鏡的試験は陰性であった。
	ラット	1%ラード及び、 0.2、0.5、又は 0.8%	ある一群にはBHTを飼料に取り込む前にラードに溶解させ、その後150℃で30分加熱したBHTを0.5%含有する飼料を与えた。体重増加又は血液成分には何ら影響なく、主要な臓器の病理顕微鏡的試験は陰性であった。1%BHTの供給に引き続き、雌雄ラットの両方で、普通以下の体重増加及び脳、肝臓、他のいくつかの臓器の体重比相対重量の増加がおこった。0.5%用量はラットに対し、生殖周期、脾臓、腎臓、肝臓及び皮膚の組織、又は心臓、脾臓、あるいは腎臓の重量に関して何ら影響を与えなかった。
2年間	ラット	0.1%BHT 及び 10% 水素添加 (hydrogenated)コ コナッツ油	死亡率の有意な増加はなかった。体重増加に対する影響はすでに記載されている。

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
80 週間	ラット雌 (アルビノ Wistar)	0 又は 0.4% W/W BHT	混餌投与 1 週間後、肝臓重量、ミクロソームタンパク質、チトクローム P450、チトクローム b5、NADPH-チトクローム c 還元酵素、ビフェニル-4-ヒドロキシラーゼ、及びエチルモルヒネ N-脱メチル化酵素において有意な増加が観察されたが、アニリン-4-ヒドロキシラーゼでは観察されなかった。総肝臓タンパク質、コハク酸脱水素酵素、及び、グルコース-6-ホスファターゼはわずかに低下した。このパターンは試験期間中ほとんど変化しなかった。試験期間終了時に BHT 試験食から取り除かれ、18 日間 BHT 無しの飼料で維持したラットは、多くの肝臓パラメータについて正常に戻った。しかしながら、チトクローム b5、チトクローム c 還元酵素及びエチルモルヒネ N-脱メチル化酵素は上昇したままであった。飼料供給 80 週の終わりでの組織学的変化として、中心性細胞の膨大が含まれたが、それは 18 日間の BHT 無しの飼料供給後には元に戻った。唯一の超微細構造的変化は滑面小胞体の増殖であった。
12 ヶ月	8 週齢の雄 BALB/c マウス	0.75%	肝内胆管の著しい過形成と、それに関連する亜急性胆管炎を引き起こした。
16 ヶ月	マウス (BALB/c 系統)	0.75%	投与群の肺腫瘍発生頻度は 63.6%で、それに対して対照群は 24%であった。しかしながら、この試験を試験動物がもっと多い一群を使って再度行くと、雌雄ともに肺腫瘍の発生頻度に何ら影響が無いことがわかった。
100 週齢	マウス (CFI 系統)	1,000 ppm、2,500 ppm、5,000 ppm	生存率には統計的に有意な減少はなかった。試験の後半 4 分の 1 の期間では、高用量の雄の生存率は低かった。試験過程で死亡または殺した動物は、対照動物に比べ小葉中心性巨大細胞及び巨大核が膨大していた。胆管過形成は試験動物 141 例中 3 例でみられたのみであった。高用量群と対照群の間で、悪性腫瘍の発生頻度は有意な差がなかった。しかしながら、投与ラットの肺腫瘍の発生頻度は増加した (5,000 ppm 群で 75%、2,500 ppm 群で 73.9%、1,000 ppm 群で 53.2%、及び対照群で 46.8%)。投与マウスと対照動物の肺腫瘍を区別できる形態的特徴はなかった。BHT 投与雌マウスの良性卵巣腫瘍にも明らかな増加があり、対照動物では一切観察されなかった。
その他			ADI:0~0.5 mg/kg 体重 毒性的影響を引き起こさない濃度 (マウス): 5,000 ppm(0.5%) (250 mg/kg 体重に相当)

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
FAO	Food and Agriculture Organization	国連食糧農業機関
WHO	World Health Organization	世界保健機関
JMPR	Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues	FAO/WHO 合同残留農薬専門家会議
LD ₅₀	50% Lethal Dose	半数致死量

ブチルヒドロキシトルエン(BHT) 評価書和訳と情報整理

JECFA 1980

ウェブサイト:<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v15je05.htm>

FAS 15-JECFA 24/106, 1980

ブチルヒドロキシトルエン(BHT) 評価書和訳と情報整理 JECFA(1980) 目次

ブチルヒドロキシトルエン(BHT) (原文 P.1)	80
説明 (原文 P.1)	80
生物学的データ (原文 P.1)	80
生化学的側面 (原文 P.1)	80
酵素及び他の生化学的パラメータに対する影響 (原文 P.1)	80
毒性試験 (原文 P.1)	80
特殊試験 (原文 P.1)	80
発がんの増強又は阻害 (原文 P.1)	81
変異原性 (原文 P.2)	81
生殖及び行動試験 (原文 P.2)	82
肺に対する影響 (原文 P.3)	82
免疫学的試験 (原文 P.3)	82
発がん性 (原文 P.3)	83
短期試験 (原文 P.4)	83
ラット (原文 P.4)	83
長期試験 (原文 P.4)	83
ラット (原文 P.4)	84
コメント (原文 P.5)	84
評価 (原文 P.6)	85
毒性影響が生じない濃度 (原文 P.6)	85
ヒトの暫定一日許容摂取量推定値 (原文 P.6)	85
今後の試験又は情報 (原文 P.6)	85
ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要 (評価書:JMPR 1980)	86
略称	89

原文 目次

原文ページ

ブチルヒドロキシトルエン(BHT)	1
説明	1
生物学的データ	1
生化学的側面	1
酵素及び他の生化学的パラメータに対する影響	1
毒性試験	1
特殊試験	1
発がんの増強又は阻害	1
変異原性	2
生殖及び行動試験	2
肺に対する影響	3
免疫学的試験	3
発がん性	3
短期試験	4
ラット	4
長期試験	4
ラット	4
コメント	5
評価	6
毒性影響が生じないレベル	6
ヒトの暫定一日許容摂取量推定値	6
今後の試験又は情報	6
1981 年までに必要なもの	6
引用文献	6
 BUTYLATED HYDROXYTOLUENE(BHT)	1
Explanation	1
BIOLOGICAL DATA	1
BIOCHEMICAL ASPECTS	1
Effects on enzymes and other biochemical parameters	1
TOXICOLOGICAL STUDIES	1
Special studies	1
Potentiation or inhibition of carcinogenesis	1
Mutagenicity	2
Reproduction and behavioural studies	2
Effect on lung	3
Immunological studies	3
Carcinogenicity	3

Short-term studies	4
Rat	4
Long-term studies	4
Rats	4
Comments	5
EVALUATION	6
Levels causing no toxicological effect	6
Estimate of acceptable daily intake for man	6
FURTHER WORK OR INFORMATION	6
Required by 1981	6
REFERENCES	6

ブチルヒドロキシトルエン(BHT) (原文 p.1)

説明 (原文 p.1)

FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議により、1961 年、1964 年、1965 年、1973 年及び 1976 年にブチルヒドロキシトルエン(BHT)のヒトの一日許容摂取量(ADI)が評価されている(添付 I、引用文献 6、8、11、32 及び 40 参照)。1961 年、1964 年、1965 年、1973 年及び 1976 年に毒性モノグラフが発表された(添付 I、引用文献 6、9、13、33 及び 41 参照)。

過去の評価以来追加データが得られており、これを以下のモノグラフ補遺でまとめ、論じる。

生物学的データ (原文 p.1)

生化学的側面 (原文 p.1)

酵素及び他の生化学的パラメータに対する影響 (原文 p.1)

16~24 匹の雄スwisマウスの群(25~30 g)に、トウモロコシ油中 BHT (62.5 mg、215 mg、又は 500 mg/kg 体重)又はトウモロコシ油のみ(トコフェロール除去 0.5 mL)を、単回 i.p.注射した。3 日後にマウスを屠殺した。BHT 投与後の湿潤肺重量は対照の 120%に増加し、乾燥肺重量も同様であった。DNA 含量及び非タンパク質スルフィドリルの濃度の有意な増加(対照の 133~156%)がみられた。スーパーオキシドジスムターゼ及びその他の酸化酵素の濃度が増加した。著者らは、BHT により肺の炎症及び修復・増殖過程が明らかに増加したと結論した(Omaye et al., 1977)。

雌雄の若年ウイスターラット(60~80 g)に BHT(500 mg/kg/日)を強制飼養により 7 日間投与し、動物を代謝ケージに収容した。対照動物にはトウモロコシ油溶媒だけを投与した。その後動物を屠殺し、肝酵素(アニリン 4 ヒドロキシラーゼ、ビフェニル-4-ヒドロキシラーゼ、エチルモルヒネ N-デメチラーゼ、及び 4-メチルウンベリフェロン **グルクロニル***トランスフェラーゼ)を検定し、チトクローム P-450-CO 相互作用スペクトルを評価した。D-グルカル酸、D-グルクロン酸、1-グルン酸、キシリトール及び L-アスコルビン酸を検定するためのガスクロマトグラフィを用いた尿検査を行った。BHT の投与により、肝ミクロソームタンパク量を除き、全ての測定パラメータが増強された。BHT は、雌ラットにおいて異物代謝のより強力な誘導物質であった(Lake et al., 1976)。*原文中”glucoronyl”とあるのは、”gluculonyl”の誤りです。

NMRI マウス(25~35 g)及びウイスターラット(160~320 g)の群に、大豆油に溶解した 500 mg/kg 用量の BHT を i.p.又は強制飼養により単回投与した。4 日後に、放射性標識 C¹⁴チミジンを与えた。90 分後に動物を屠殺し、肺を摘出して DNA 濃度を測定した。マウスにおいては、経口又は i.p.投与により DNA 合成が雄及び雌で等しく増加した。肺重量は増加したが、DNA 濃度に影響はなかった。ラットにおいては、雄には影響がみられず、雌にわずかな増加がみられただけであった(Larsen & Tarding, 1977)。

毒性試験 (原文 p.1)

特殊試験 (原文 p.1)

発がんの増強又は阻害 (原文 p.1)

雄スイスウェブスターマウスへの 1000 mg/kg のウレタンの単回 i.p.注射の腫瘍形成能が、その後 250 mg/kg の BHT を週 1 回反復注射することにより、有意に増加した。一群あたりに使用した動物数は 9~22 匹の間であり、動物を 9~13 週間処置した。肺表面自体の腫瘍だけをカウントした。ウレタンだけで処置した動物の約 90% が肺腫瘍を発症した。BHT による 11 週間以上の処置後に、マウスあたりの腫瘍数が有意に増加した。BHT だけで処置した動物は肺腫瘍を発症しなかった。A/J 系統マウスにも週 1 回、10 回の BHT 注射を含む同じ処置を行った。動物あたりの肺腫瘍数は、ウレタンに加えて BHT を投与した動物で、ウレタンだけを投与した動物と比較して有意に増加した。両系統のマウスとも、ウレタンで前処置せずに BHT を反復注射した場合には、トウモロコシ油を投与した対照と比較して肺腫瘍をもつ動物数又はマウスあたりの腫瘍数の増加は生じなかった。両系統のマウスとも、BHT 投与動物はトウモロコシ油の対照と比較して肺腫瘍が少なかった。上記の結果とは対照的に、動物にウレタン注射前に 0~7 日間 BHT を注射しても、腫瘍をもつ動物数又は動物あたりの腫瘍数は増加しなかった(Witschi & Cote, 1976)。

93 匹のラット群(22 日齢)に、2-アセチル・アミノフルオレン(0.02%)を 18 日投与後、0.5%BHT 又は対照飼料を 407 日間与えた。AAF を予め投与せずに BHT だけを投与した対照群はなかった*。2-AAF 投与後の長期の BHT 飼料投与により、肝臓腫瘍を有するラット数の増加により示される肝発がんの有意な増強が生じた(Peraino et al., 1977)。*原文に誤りがある可能性があります、原文通りに訳しました。

変異原性 (原文 p.2)

哺乳類代謝活性化系を加え又は加えずに Saccharomyces cerevisiae(出芽酵母)、D4 ならびに Salmonella typhimurium(ネズミチフス菌)TA-1535、TA-1537 及び TA-1538 を用いて、BHT が変異原性でないことが分かった(Brusick, 1975)。

Drosophila(ショウジョウバエ)を用いた伴性劣性致死試験において BHT を 5%濃度で投与した。BHT 処置したハエの致死率は約 0.27%(8897 匹中)、対照の致死率は 0.29%、100 ppm のエチルメタンスルホン酸を投与した陽性対照の致死率は 5.69%であった。BHT は変異原性でないと結論された(Brusick, 1975)。

BHT の除去修復合成への影響を、u.v.光を照射した培養ヒトリンパ球で試験した。BHT の存在下で培養した照射細胞は、培地中の BHT 濃度の増加に伴い DNA へのトリチウム標識チミジンの取込み低下に基づく除去修復が減少していた。この試験では、BHT により半保存的 DNA 合成も阻害された(Daugherty et al., 1978)。

3 つの放射線量(1.2 KRD、2.4 KRD 及び、3.6 KRD)を用いて、報告されている BHT の Drosophila 精子に対する放射線増感作用を確認するための試験を行った。伴性劣性致死系統で BHT の変異原作用も試験した。10 日齢の雄 D. melanogaster*(キイロショウジョウバエ)に、0.2 µl のエタノール中食塩水又は溶媒中 0.001%BHT を投与した。これを、¹³⁷CS 源からのガンマ線に 4.1 rad/秒で曝露した。これを 4 匹の雌と交配させ、xo 雄及び残る染色体不分離雌を廃棄後、2 つの連続日ブルードを試験して成熟精子及びやや未成熟の精子の感受性を測定した。F1 ハエをプールし、個体同胞交配後に F2 雌を得た。棒眼の雄の不存在は伴性劣性致死因子が存在することを示す。F1 世代の性比にシフトはなかった。照射を行わない場合 BHT は xo 雄の発生率を増加させるようである。BHT により伴性致死率が食塩水を注射した対照に対してほぼ 2 倍になったが、こ

れは統計学的に有意ではなかった。ガンマ線と比較して BHT は F1 ハエの性比に影響せず、x^B 染色体の放射損失率への影響はごくわずかなようであった。全放射線量で BHT に伴性劣性致死因子の顕著な放射線増感作用がみられた(Prasad & Kamra, 1974)。

*原文中”D. melangaster”とあるのは、”D. melanogaster”の誤記です。

生殖及び行動試験 (原文 p.2)

つがいのスピローグドーリーラット(200~220 g)に 0.5%、0.25%又は 0.125%BHT を添加した Purina 固形飼料を、交配前の週から開始して雌は授乳期及び児ラットの離乳まで継続して無制限に与えた。成長率及び死亡率に悪影響が生じた。最高用量 BHT(0.5%)群の母動物から生まれた離乳前児ラットは、7 日、14 日及び 21 日齢で体重が対照より有意に少なかった。0.5%又は 0.2%BHT を投与した母動物から生まれて試験中に死んだ児ラットの総数は、対照より有意に多かった。立直り反射、旋回運動、断崖回避、驚愕反射、水泳、オープンフィールド、ランニング、回転かご、回転棒、能動的回避、位置弁別及び受動的回避からなる行動試験を行った。離乳前試験では、低用量群又は中用量群に差は認められなかった。高用量群では、立直り時間の有意な増加、前肢水泳発達の遅延及びオープンフィールド試験での活動量低下傾向があった。離乳後試験では、0.25%BHT 群の雄に受動的回避への影響がみられ、ショックを与えられた区画への部分的再進入がより多かった。他の全ての試験では統計差がなく、BHT が基本動作の運動協調性、能動的回避獲得、又は消去パフォーマンスに影響しないことが示唆された(Brunner et al., 1979)。

肺に対する影響 (原文 p.3)

マウス肺に対する BHT の病理学的影響を試験した。60 匹の雄スイスマウスに、トウモロコシ油中に溶解した 400 mg/kg の BHT を i.p.注射した。試験動物のうち 6 匹と対照のうち 6 匹を毎日 9 日間屠殺した。屠殺の 2 時間前に各動物に 2 µCi/g のトリチウム標識チミジンを与えた。試験中に死んだ動物はなく、いずれにも呼吸困難の兆候はなかった。投与から 2 日後に、I 型肺胞上皮細胞に細胞障害が認められた。細胞分裂において II 型異常巨細胞が観察され、多くにトリチウム標識チミジンが蓄積していた。6 日目以降に小血管及び毛細血管に標識された内皮細胞がみられ、間質及び毛細血管の線維芽細胞の増加がみられた。2 日目~5 日目にかけチミジン標識された肺細胞の増加がみられたが、その後標識は減少し、9 日目までに対照群に近くなった。肺チミジンキナーゼ活性濃度は、投薬後 1~4 日目に急上昇後、急速に減少した(Adamson et al., 1977)。

BHT への急性曝露後最初の一連の事象には、I 型(扁平)上皮細胞の浸潤とその後の多巣性壊死及び血液関門の破壊を伴う。組織変化及び修復機序の流れに関する詳細な議論がなされている。扁平上皮の傷害に対する感受性は、酸素曝露、放射線曝露、及び血液により運ばれるブレオマイシンによる処置後にみられるものと類似するが、回復パターンは全く異なると述べられている。BHT は、細胞膜との相互作用の結果、細胞溶解及び細胞死を引き起こすと考えられる(匿名, 1978)。

マウスにおいて BHT 注射後に観察される肺重量の増加及び肺 DNA へのチミジン取込みの増加が、スギテルペンによる処置により阻害された。動物が生後 3 週間未満の場合には、BHT だけで処置した動物に肺重量の増加は観察されなかった。これは乳児マウスが BHT を代謝できないことによるものと考えられる(Malkinson, 1979)。

免疫学的試験 (原文 p.3)

In vitro の BHT(50 µg/培養)は、Mishell & Dutton の方法により測定されるところのマウス脾臓細胞培養のブラーク形成細胞反応を抑制した(Archer et al., 1977)。

発がん性 (原文 p.3)

50 匹のフィッシャー344 ラット/性別及び 50 匹の B6C3F1 マウス/性別の群に、飼料中 3000 ppm 又は 6000 ppm の BHT を与えた。化合物を、4%脂肪を含むオートクレーブ処理した試験用飼料と混合した。雌雄各 20 匹の動物の対照群には試験用飼料だけを与えた。ラットは 105 週間、マウスは 107 週間又は 108 週間試験した。研究の全体を通して、雌雄両方のラット及びマウスの体重に用量関連低下がみられた。ラットでは BHT の死亡率に対する有意な影響はなかった。雄マウスでは BHT が死亡率減少に有意に関係する一方、雌マウスの死亡率には BHT 投与による影響はなかった。雄マウスの肝臓では、巨大肝細胞及び肝細胞変性ならびに肝細胞壊死の発生率は用量関連的に高くなったが、肝細胞がんの発生率は用量関連的に減少した。低用量雌マウスで肺胞/細気管支がん又は腺腫の発生率が対照より有意に高かったが、高用量雌マウスでは高くなかった。BHT 投与は、雌マウスの多臓器の肉腫の発生率の有意な減少に関連していた。高用量雄マウス及び 2 匹の低用量雌で目/涙腺の 4 つの腺腫が観察されたが、対応する対照には観察されなかった。この腫瘍の歴史的*発生率は 1.2%であった。報告によれば、肉眼で病変が明らかな動物のみ涙腺を顕微鏡検査したため、涙腺腫瘍と BHT 投与を明確に関連付けることはできなかった。処置ラットにおいて、特に高用量雌で限局性肺胞組織球増殖症の発生率増加がみられた。BHT を投与した雌ラットで下垂体腺腫の発生率が有意に減少した。同報告は、ラット又はマウスにおいて BHT 投与に明確に関連付けられる新生物病変は生じなかったと結論した。試験条件下で投薬雄ラットにおける限局性肺胞組織球増殖症の発生率が増加し、BHT 投与に関連するものとも考えられた。しかし、BHT は雌雄いずれの F344 ラット又は B6C3F1 マウスにも発がん性はなかった。環境発がん物質情報センター(Clearinghouse on Environmental Carcinogens)のデータ評価/リスクアセスメント(Data Evaluation/Risk Assessment)サブグループにより、同報告が評価された。サブグループは同報告の結論を認めたが、人体曝露が普及し、肝毒性の兆候があり、肺腫瘍形成作用が示唆されることから、化学物質選択作業部会による化合物の再試験が検討されるべきとした(匿名, 1979)。*原文中”historical”は”histological”の誤りである可能性がありますが、原文どおりに訳しました。

短期試験 (原文 p.4)

ラット (原文 p.4)

雄スピローグドーリーラット(生後 6 週)の群に、半合成飼料中 0.58%~1.44%濃度の BHT 又は対照飼料のみを与えた。0.69%以上の濃度で 40 日以内に死亡が生じた。全ての死亡動物又は瀕死の動物に、胸腔及び腹腔への又は外出血としての自然大量出血が観察された。BHT の一日用量が増加するにしたがいプロトロンビン指数が減少した。4 日後に軽度の下痢が認められた。被毛粗剛及び尿の赤みが認められた。死亡は出血によるものであり、著者らはプロトロンビン濃度の減少が原因である可能性が高い二次毒性として分類した。著者らによると、影響はラットの系統及び飼料濃度に依存するようである(Takahashi & Hiraga, 1978)。

長期試験 (原文 p.4)

(「発がん性」の項も参照)

ラット (原文 p.4)

雌ラット(80~100 g)の群に、トウモロコシ油を混合した粉碎試験用固形飼料中 0.4%BHT を与え、1 週、8 週、16 週、32 週、又は 80 週の間隔で屠殺し、対照と比較した。生化学的、組織化学的、及び形態学的試験のために肝臓の試料をとり、肝変化の可逆性を調べた。4 匹のラットの群に 80 週間 BHT を投与後、対照飼料だけを 18 日間投与した。BHT を投与して 1 週後に著しい肝膨大がみられ、相対肝重量が最大 35%増加し、薬物代謝活性及び NADP-シクロム C レダクターゼ活性が増加した。80 週間の処置を終了して 18 日後には、肝重量のわずかな上昇だけがみられた。したがって影響は可逆的であった。組織学的には、BHT 処置後の肝臓は、小葉中心部肝細胞の膨大と当該部分の不均一外観を特徴とした。超微細構造的には、滑面小胞体の増殖がみられた。著者らの指摘によると、肝損傷の明確な兆候はないものの、グルコース-6-ホスファターゼ活性の低下と細胞膨大という、多くの肝臓毒及び肝発がん物質にもみられる 2 つの特徴があった。しかし、細胞学的傷害に特徴的なリソソーム変化はなく、影響は可逆的であった(Crampton et al., 1977)。

バリアシステム下で育てた試験開始時に生後 4 週の 40 匹の JCL 系統ラット/性別/群の群に、対照飼料又は飼料中 0.005%、0.062%、0.32%BHT を与えた。40 匹の各群中の 15 匹に化合物を「生涯」与え、10 匹に 24 ヶ月間与え、それぞれ 5 匹に 3 ヶ月間、6 ヶ月間又は 12 ヶ月間与えた。中間及び最終屠殺時に、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、甲状腺及び盲腸の重量を測定するとともに、血液、血清生化学、尿検査及び組織学的検査を行った。24 ヶ月目で、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、下垂体、甲状腺、副腎、精巣、前立腺及び脳の重量を測定し、血液学的及び生化学的測定を行い、組織病理学的分析を行った。0.32%の飼料濃度で肝重量、血清コレステロール、血清K⁺の増加ならびに肝臓及び腎臓の組織変化がみられた。摂食量、体重増加、給餌中の死亡率又は平均寿命には変化がなく、腫瘍誘導が疑われる所見はなかった。24 ヶ月群又は「生涯」群のいずれにおいても、腫瘍有病率の用量関連傾向を示すものはなかった。見つかった腫瘍は、高齢ラットに典型的にみられるものであるとされた。生存ラット数が少なく、腫瘍データには生涯群ならびに 6 ヶ月、12 ヶ月及び 24 ヶ月間の給餌中に死亡し又は瀕死屠殺した動物の両方が含まれる点に留意する必要がある。入手可能なデータは、ラット数を列挙しているものの、検査した個々の組織のそれぞれの数を列挙していない。データでは、より高用量群でのラットあたりの腫瘍数の減少傾向がみられる(Hiraga, 1978)。

生後 6 週の無作為交配ウィスターラットを、57 匹の雄及び 57 匹の雌の対照飼料投与群と、36 匹の雄及び 36 匹の雌の BHT 投与群(飼料中 0.25%又は 1%で 104 週間投与)とに配分した。試験群の生存率は、40%~68%の間であった。試験終了時の組織病理学検査で様々な腫瘍が認められたが、対照と比較して腫瘍の種類又は総数のいずれにも用量関連反応はなかった(Shibata et al., 1979)。

コメント (原文 p.5)

BHT に in utero 及び授乳中に曝露された新生児ラットの行動試験を含む、BHT に関するいくつかの新たな試験が入手可能であった。飼料中 0.1%を上回る濃度で、児動物生存率の減少及び行動へのわずかな影響が認められた。化学的に関連する BHA で母動物を処置した場合の新生児サルには行動への影響がみられなかったことが指摘された。

JECFA は第 20 回会合で、BHT がマウスの肺腺種の発生を増強すると報告されたことを指摘した。同会合では、BHT に発がん性がある可能性は低いとみなされたが、追加の長期試験が要請された。最近終了したマウス

及びラットによる長期試験は陰性であり、BHT に発がん性はないという見解を確認する。

BHT の 2 つの一連の試験で、BHT により一定の化学発がん剤の影響が増強されることが明らかになった。一試験においては、発がん物質のウレタンを予め注射したマウスを BHT でその後数週間処置すると、肺腺種をより多く発症することが示された。別の試験では、低レベルの発がん物質 N-フルオレニルアセトアミドで処置後に BHT で処置したラットは、発がん物質だけで処置した場合より急速に多くの肝がんを発症した。

これらの試験は、BHT が「促進」剤であることを示唆する。考えられる作用機序には、BHT による酵素誘導ならびに肺及び肝臓の過形成及び膨大の発生が含まれる。

これらの例ならびに皮膚及び膀胱を含む様々な系における発がん「促進」現象は、癌研究において高い注目を集めている。作用機序は精力的に研究されているが、まだ分かっていない。加えて、他の条件下では BHT により発がん物質の作用が阻害されることが分かっているため、かかる情報を毒性評価に使用するのは時期尚早であると思われる。

ミクロゾーム酵素、生殖及び行動への影響に関しては、齧歯動物の飼料中 50 mg/kg に等しい 0.1% の無影響量を設定しうる。

評価 (原文 p.6)

毒性影響が生じない濃度 (原文 p.6)

マウス: 250 mg/kg 体重に等しい、飼料中 5000 ppm(0.5%)。

ラット: 50 mg/kg 体重に等しい、飼料中 1000 ppm(0.1%)。

ヒトの暫定一日許容摂取量推定値 (原文 p.6)

0~0.5*mg/kg 体重**

今後の試験又は情報 (原文 p.6)

1981 年までに必要なもの

- (1) 児ラットの生存率への影響を明らかにするための試験。
- (2) 新生児ラットにおいて観察される行動に対する影響の有意性の解明。

* BHT、TBHQ、又は 3 つの化合物の合計。

** 暫定。

ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要（評価書:JMPR 1980）

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
発がんの増強又は阻害 9~13 週間	スイスウェブスターマウス雄	250 mg/kg 1000 mg/kg のウレタン	1000 mg/kg のウレタンの単回 i.p.注射の腫瘍形成能が、その後 250 mg/kg の BHT を週 1 回反復注射することにより、有意に増加した。ウレタンだけで処置した動物の約 90%が肺腫瘍を発症した。BHT による 11 週間以上の処置後に、マウスあたりの腫瘍数が有意に増加した。BHT だけで処置した動物は肺腫瘍を発症しなかった。
発がんの増強又は阻害	A/J 系統マウス	記載なし	動物あたりの肺腫瘍数は、ウレタンに加えて BHT を投与した動物で、ウレタンだけを投与した動物と比較して有意に増加した。両系統のマウスとも、ウレタンで前処置せずに BHT を反復注射した場合には、トウモロコシ油を投与した対照と比較して肺腫瘍をもつ動物数又はマウスあたりの腫瘍数の増加は生じなかった。両系統のマウスとも、BHT 投与動物はトウモロコシ油の対照と比較して肺腫瘍が少なかった。上記の結果とは対照的に、動物にウレタン注射前に 0~7 日間 BHT を注射しても、腫瘍をもつ動物数又は動物あたりの腫瘍数は増加しなかった。
発がんの増強又は阻害	ラット	0.5%BHT、 2-アセチル-アミノ フルオレン (0.02%)	93 匹のラット群(22 日齢)に、2-アセチル-アミノフルオレン(0.02%)を 18 日投与後、0.5%BHT 又は対照飼料を 407 日間与えた。AAF を予め投与せずに BHT だけを投与した対照群はなかった。2-AAF 投与後の長期の BHT 飼料投与により、肝臓腫瘍を有するラット数の増加により示される肝発がんの有意な増強が生じた。
変異原性	Saccharomyces cerevisiaeD4、 Salmonella typhimuriumTA-1535、 TA-1537 及び TA-1538		変異原性なし。
伴性劣性致死試験	ショウジョウバエ	5%	致死率は約 0.27%(8897 匹中)、対照の致死率は 0.29%、100 ppm のエチルメタンスルホン酸を投与した陽性対照の致死率は 5.69%であった。BHT は変異原性でないと結論された。
除去修復合成への影響	培養ヒトリンパ球		u.v.光を照射した培養ヒトリンパ球で試験した。BHT の存在下で培養した照射細胞は、培地中の BHT 濃度の増加に伴い DNA へのトリチウム標識チミジンの取込み低下に基づく除去修復が減少していた。この試験では、BHT により半保存的 DNA 合成も阻害された。
	キイロショウジョウバエ	0.001%BHT	F1 世代の性比にシフトはなかった。照射を行わない場合 BHT は xo 雄の発生率を増加させる。BHT により伴性致死率が食塩水を注射した対照に対してほぼ 2 倍になったが、これは統計学的に有意ではなかった。ガンマ線と比較し

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			て BHT は F1 ハエの性比に影響せず、xB 染色体の放射損失率への影響はごくわずかなようであった。全放射線量で BHT に伴性劣性致死因子の顕著な放射線増感作用がみられた。
生殖及び行動試験	スピローグドーリーラット	0.5%、0.25% 又は 0.125%BHT	成長率及び死亡率に悪影響が生じた。最高用量の BHT(0.5%)の母動物から生まれた離乳前児ラットは、体重が対照より有意に少なかった。0.5%又は 0.2%BHT を投与した母動物から生まれて試験中に死んだ児ラットの総数は、対照より有意に多かった。離乳前試験では、低用量群又は中用量群に差は認められなかった。高用量群では、立直り時間の有意な増加、前肢水泳発達の遅延及びオープンフィールド試験での活動量低下傾向があった。離乳後試験では、0.25%BHT 群の雄に受動的回避への影響がみられ、ショックを与えられた区画への部分的再進入がより多かった。他の全ての試験では統計差がなく、BHT が基本動作の運動協調性、能動的回避獲得、又は消去パフォーマンスに影響しないことが示唆された。
肺 対 する 影響	スイスマウス雄	トウモロコシ油中に溶解した 400 mg/kg の BHT を i.p.注射	試験中に死亡した動物はなく、いずれにも呼吸困難の兆候はなかった。投与から 2 日後に、I 型肺胞上皮細胞に細胞障害が認められた。細胞分裂において II 型異常巨細胞が観察され、多くにトリチウム標識チミジンが蓄積していた。6 日目以降に小血管及び毛細血管に標識された内皮細胞がみられ、間質及び毛細血管の線維芽細胞の増加がみられた。2 日目～5 日目にかけチミジン標識された肺細胞の増加がみられたが、その後標識は減少し、9 日目までに対照群に近くなった。肺チミジンキナーゼ活性濃度は、投薬後 1～4 日目に急上昇後、急速に減少した。
	マウス		BHT 注射後に観察される肺重量の増加及び肺 DNA へのチミジン取込みの増加が、スギテルペン投与により阻害された。動物が生後 3 週間未満の場合には、BHT だけで処置のみを投与した動物に肺重量の増加は観察されなかった。これは乳児マウスが BHT を代謝できないことによるものと考えられる。
免疫学的試験	マウス		<i>In vitro</i> の BHT(50 µg/培養)は、Mishell & Dutton の方法により測定されるマウス脾臓細胞培養のプラーク形成細胞反応を抑制した。
発がん性ラットは 105 週間、マウスは 107 週間又は 108 週間	フィッシャー 344 ラット B6C3F1 マウス	3000 ppm 又は 6000 ppm	BHT は雌雄いずれの F344 ラット又は B6C3F1 マウスにも発がん性はなかった。環境発がん物質情報センターのデータ評価/リスクアセスメントサブグループにより、同報告が評価された。サブグループは同報告の結論を認めたが、人体曝露が普及し、肝毒性の兆候が

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			あり、肺腫瘍形成作用が示唆されることから、化学物質選択作業部会による化合物の再試験が検討されるべきとした
短期試験	雄スピローグドーリーラット	0.58%~1.44%	0.69%以上の濃度で 40 日以内に死亡が生じた。全ての死亡動物又は瀕死の動物に、胸腔及び腹腔への又は外出血としての自然大量出血が観察された。BHT の一日用量が増加するにしたがいプロトロンビン指数が減少した。4 日後に軽度の下痢が認められた。被毛粗剛及び尿の赤みが認められた。死亡は出血によるものであり、著者らはプロトロンビン濃度の減少が原因である可能性が高い二次毒性として分類した。著者らによると、影響はラットの系統及び飼料濃度に依存する。
80 週間慢性試験	ラット雌	0.4%	投与して 1 週後に著しい肝膨大がみられ、相対肝重量が最大 35%増加し、薬物代謝活性及び NADP-シトクロム C レダクターゼ活性が増加した。80週間の処置を終了して18日後には、肝重量のわずかな上昇だけがみられた。したがって影響は可逆的であった。肝損傷の明確な兆候はないものの、グルコース-6-ホスファターゼ活性の低下と細胞膨大という、多くの肝臓毒及び肝発がん物質にもみられる 2 つの特徴があった。しかし、細胞学的傷害に特徴的なリソソーム変化はなく、影響は可逆的であった。
24 ヶ月間慢性試験	JCL 系統ラット	0.005% 0.062% 0.32%BHT	0.32%の飼料濃度で肝重量、血清コレステロール、血清K ⁺ の増加ならびに肝臓及び腎臓の組織変化がみられた。摂食量、体重増加、給餌中の死亡率又は平均寿命には変化がなく、腫瘍誘導が疑われる所見はなかった。24 ヶ月群又は「生涯」群のいずれにおいても、腫瘍有病率の用量関連傾向を示すものはなかった。見つかった腫瘍は、高齢ラットに典型的にみられるものであるとされた。生存ラット数が少なく、腫瘍データには生涯群ならびに 6 ヶ月、12 ヶ月及び 24 ヶ月間の給餌中に死亡し又は瀕死屠殺した動物の両方が含まれる点に留意する必要がある。入手可能なデータは、ラット数を列挙しているものの、検査した個々の組織のそれぞれの数を列挙していない。データでは、より高用量群でのラットあたりの腫瘍数の減少傾向がみられる。
104 週間慢性試験	ウィスターラット	0.25%又は 1%	試験群の生存率は、40%~68%の間であった。試験終了時の組織病理学検査で様々な腫瘍が認められたが、対照と比較して腫瘍の種類又は総数のいずれにも用量関連反応はなかった。
その他			ADI:0~0.5 mg/kg 体重

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			毒性影響が生じない濃度： マウス 5000 ppm(0.5%) (250 mg/kg 体重に相当) ラット 1000 ppm(0.1%) (50 mg/kg 体重に相当)

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
BHT	Butylated hydroxytoluene	ブチルヒドロキシトルエン
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives	FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
FAO	Food and Agriculture Organization	国連食糧農業機関
WHO	World Health Organization	世界保健機関
2-AAF	2-acetyl-aminofluorene	2-アセチルアミノフルオレン
ADI	Acceptable daily intake	一日許容摂取量
i.p.	intraperitoneal	腹腔内
BHA	Butylated hydroxyanisole	ブチルヒドロキシアニソール
TBHQ	tert-butylhydroquinone	tert-ブチルヒドロキノン

ブチルヒドロキシトルエン(BHT) 評価書和訳と情報整理

JECFA 1983

ウェブサイト: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v18je06.htm>

FAS 18-JECFA 27/50, 1983

ブチルヒドロキシトルエン(BHT) 評価書和訳と情報整理 JECFA(1983) 目次

ブチルヒドロキシトルエン(BHT) (原文 P.1)	95
説明 (原文 P.1)	95
生物学的データ (原文 P.1)	95
生化学的側面 (原文 P.1)	95
酵素及び他の生化学的パラメータに対する影響 (原文 P.1)	95
毒性試験 (原文 P.1)	95
発がん性に関する特殊試験 (原文 P.1)	95
マウス (原文 P.1)	95
ラット (原文 P.2)	96
発がんの増強又は阻害 (原文 P.2)	96
生殖及び行動に関する試験 (原文 P.3)	97
BHT の甲状腺に対する効果に関する特殊試験 (原文 P.4)	98
出血性中毒に関する特殊試験 (原文 P.4)	98
コメント (原文 P.5)	99
評価 (原文 P.6)	100
毒性影響が生じない濃度 (原文 P.6)	100
ヒトの暫定一日許容摂取量推定値 (原文 P.6)	100
今後の試験又は情報 (原文 P.6)	100
ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要 (評価書:JMPR 1983)	101
略称	104

原文 目次

原文ページ

ブチルヒドロキシトルエン(BHT)	1
説明	1
生物学的データ	1
生化学的側面	1
酵素及び他の生化学的パラメータに対する影響	1
毒性試験	1
発がん性に関する特殊試験	1
マウス	1
ラット	2
発がんの増強又は阻害	2
生殖及び行動に関する試験	3
BHT の甲状腺に対する効果に関する特殊試験	4
出血性中毒に関する特殊試験	4
コメント	5
評価	6
毒性影響が生じないレベル	6
ヒトの暫定一日許容摂取量推定値	6
今後の試験又は情報	6
1986 年までに必要なもの	6
引用文献	6
 BUTYLATED HYDROXYTOLUENE(BHT)	1
Explanation	1
BIOLOGICAL DATA	1
BIOCHEMICAL ASPECTS	1
Effects on enzymes and other biochemical parameters	1
TOXICOLOGICAL STUDIES	1
Special studies on carcinogenicity	1
Mouse	1
Rat	2
Potentiation or inhibition of carcinogenesis	2
Reproduction and behavioural studies	3
Special studies on the effect of BHT on the thyroid	4
Special studies on haemorrhagic toxicosis	4
Comments	5
EVALUATION	6
Level causing no toxicological effect	6
Estimate of temporary acceptable daily intake for man	6
FURTHER WORK OR INFORMATION	6
Required by 1986	6
REFERENCES	6

ブチルヒドロキシトルエン(BHT) (原文 p.1)

説明 (原文 p.1)

FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議により、1961 年、1964 年、1965 年、1973 年、及び 1980 年にブチルヒドロキシトルエン(BHT)のヒトの一日許容摂取量(ADI)が評価されている(添付 I、引用文献 6、8、11、32、40、及び 54 参照)。1961 年、1964 年、1965 年、1973 年、1976 年、及び 1980 年に毒性モノグラフが発表された(添付 I、引用文献 6、9、13、33、41 及び 55 参照)。

過去の評価以来追加データが得られており、これを以下のモノグラフ補遺でまとめ、論じる。

生物学的データ (原文 p.1)

生化学的側面 (原文 p.1)

酵素及び他の生化学的パラメータに対する影響 (原文 p.1)

スピローグドーリーラットの飼料中の BHT は、単離肝ミクロソーム調製物における NADPH-チトクローム P-450 レダクターゼ活性の著しい減少をもたらした。この影響は、BHT を *in vitro* で肝ミクロソームに加えたときには観察されなかった(Rikans et al., 1981)。飼料中 0.4%BHT を与えたラットには、肝臓の GSH-S トランスフェラーゼ活性の増加がみられたが、肺及び腎臓にはみられなかった。肝臓及び肺の GSH-レダクターゼ濃度が増加した(Partridge et al., 1982)。飼料中 BHT は、ラット肝ミクロソームタンパク質のプロトロンビンへの変換におけるカルボキシル化プロセスにも影響することが分かった(Takahashi & Hiraga, 1981)。

BHT へのサイクリック GMP の添加(ジブチル又は 8-ブロモの形での cGMP の添加)により、**ミシェルダットン***培養が抑制され、BHT の抗体産生抑制作用の反転がもたらされた(Wess & Archer, 1982)。*原文中”Mishell-Dulton”とあるのは”Mishell-Dutton”の誤りですので、訂正して訳しました。

1,2-ジメチルヒドラジンで処置したラットの結腸クロマチンに観察される腫瘍特異的抗原活性の増加は、BHT で同時処置することによりなくなった(Gabrelak et al., 1981)。

毒性試験 (原文 p.1)

発がん性に関する特殊試験 (原文 p.1)

マウス (原文 p.1)

性別で等しく分けた各 100 匹の(B6C3F1)マウスの群に、0 ppm、200 ppm、100 ppm 又は 5000 ppm(0%、0.02%、0.1%又は 0.5%)の BHT を含む飼料を 96 週間与えた後、基礎飼料を 6 週間与えた。BHT を CE-2(CLEA Japan, Inc., Tokyo)飼料と適当な濃度で混合し、ペレット化することにより飼料を作製した。試験期間終了時に生存動物を殺した。完全剖検を行い、主要臓器及び組織を顕微鏡検査した。試験中に死んだマウスも剖検した。加えて、血液検査及び血清臨床生化学検査のために終末血液サンプルを採取した。尿サン

ルも検査した。試験中の摂食量は試験群と対照群で同程度であった。1000 ppm 及び 5000 ppm(0.1%及び 0.5%)群の雌の体重は対照より低く、5000 ppm(0.5%)群の雄の体重も同様であった。高用量群において一部の臓器(唾液腺、心臓及び腎臓)の絶対重量にわずかな変化があった。雄においては、5000 ppm(0.5%)群の血清 GOT 及び GPT 濃度が対照より高かった。血液、血清及び尿の分析においてその他の化合物関連影響は観察されなかった。試験動物及び対照動物の両方において新生物病変が報告された。最大頻度で生じた腫瘍は、肺の腺腫、肝臓の過形成結節及び肝細胞がん、ならびに悪性リンパ腫であった。しかし、いずれの種類の腫瘍の発生率も、BHT 処置群と対照群との間で統計学的に有意な差はなかった(Shirai et al., 1982)。

ラット (原文 p.2)

各性別の 57 匹のウィスターラット(生後 7 週)の群を、2,500 ppm 又は 10,000 ppm(0.25%又は 1%)の BHT を含む飼料で 104 週間維持した。対照群は各性別の 36 匹のラットから成った。試験期間終了時に生存動物を殺し、完全な剖検を行った。主要臓器及び組織を顕微鏡検査した。血液検査及び血清臨床生化学検査のために終末血液サンプルを採取した。摂食量は試験動物と対照動物で同程度であったが、高用量群の雄及び雌ラット両方で体重増加が減少した。全ての試験動物に相対的肝臓重量の増加が観察され、雌に脾臓重量の減少が観察された。全ての試験動物で総血中コレステロールが増加し、雌に赤血球数の増加が観察された。全体的腫瘍発生率は、BHT 処置ラットにおいて対照より有意ではないがわずかに高かった。雌ラットの過形成結節及び膵臓がん、ならびに試験動物の下垂体腺腫及び腺がんの発生率が、対照より高かった。しかしこれらの差は、低用量雌における下垂体腺腫の発生率を除いては、対照と有意に異ならなかった。この影響は用量関連ではなかったため、BHT はこの試験条件下では発がん性なしと結論された(Hirose, 1980)。

発がんの増強又は阻害 (原文 p.2)

スイスマウスの群に、1000 mg、250 mg、又は 50 mg/kg のウレタン又は 0.9%NaCl を与えた。7 日後、ウレタン処置した動物の半数及び対照の半数に 300 mg/kg の BHT を i.p.投与し、残りの動物にトウモロコシ油だけを与えた。週 1 回の注射を 13 回行った。最初のウレタン投与の 14~24 週後に見つかった肺あたりの腫瘍数は、BHT 処置動物で有意に増加していた。別の試験では、ウレタン注射と 1 回目の BHT 処置との間隔を 6 週間遅らせると、BHT 処置からより多くの腫瘍が生じた。ウレタン処置の 1 週間後に開始する BHT 注射の数を 13 回から 4 回に減少すると、13 回投与試験と同じ腫瘍*産生の有意な増加が観察された。しかし、BHT を 1 回又は 2 回投与しても有意な影響はなかった。マウスを 13 回の BHT 注射で前処置してから 1 週間後にウレタン処置した場合には、腫瘍産生は増強されなかった。BHT とウレタンの同時投与により、ウレタン単独で処置した動物と比較して少ない腫瘍*産生がもたらされた。肺腺種の自然発生率が低いマウス系統(C57BL、C3H 及び BALB/C)をウレタン処置した後 BHT を複数回注射すると、BHT 処置により腫瘍*発生率又は肺あたりの平均腫瘍*数は有意に増加しなかった(Witschi & Lock, 1979)。*原文中”rumour”とあるのは”tumour”の誤りと思われる。

雄 Strain A マウスに 500 mg/kg のウレタンを i.p.注射した後、1 週間後に、いずれもトウモロコシ油に溶解した BHT300 mg/kg、又は BHA500 mg/kg、又はビタミン E1000 mg/kg を反復注射(週 1 回 8 週間)した。試験終了時には、BHT だけが腫瘍*産生の有意な増加を生じることが示された。BHA 処置により生じる腫瘍*の数は通常より多かったものの、統計学的に有意ではなかった。A/J マウスを 3-メチルコラントレン又はジメチルニトロソアミンで処置した後 BHT(i.p.)で処置すると、腫瘍*産生が増加した(Witschi et al., 1981)。別の試験では、雄 A/J マウスにウレタンを単回 i.p.注射した後、飼料中 0.75%BHT、もしくは BHA 又はエトキシキンを週 1 回

又は連続して 8 週間与えた。ウレタン処置の 4 か月後に肺腫瘍産生量を記録した。飼料中 BHT によりいずれの試験条件下でも肺腫瘍*形成が増強されたが、BHA 又はエトキシキンでは増強されなかった。マウスに BHA 又は BHT を含む飼料をウレタン処置の前に予め 2 週間与えてから、普通の試験用飼料で 4 ヶ月間維持した。BHT 飼料は腫瘍産生に影響しなかったが、BHA 処置は平均腫瘍数を有意に減少させた(Witschi, 1981)。

*スペルミスを訂正して訳しました。

別の試験で、A/J マウスに BHT を単回 i.p.投与(400 mg/kg)した。これは 6~7 日間急性肺損傷を惹起させ、肺の細胞増殖を生じるのに十分な量である。その期間中にウレタンを埋込型ミニポンプで連続投与した。細胞分裂期間中のウレタンの持続的存在により腫瘍*数が増加することはなかった。ウレタン注射したマウスに、SKF525A(2-ジエチルアミノエチル-2,2-ジフェニル吉草酸塩酸塩)と BHT(SKf は BHT 投与後に通常みられる肺細胞分裂を阻害する)、又は BHT を単独で i.p.投与すると、両処置ともウレタン処置した対照と比較して肺腫瘍産生の非常に有意な増加をもたらした(Witschi & Kehrer, 1982)。他の処置、例えば 95~100%濃度の酸素によりもたらされる反復的肺細胞分裂が腫瘍発生を増強しないことも示された(Witschi & Kehrer, 1982)。

*スペルミスを訂正して訳しました。

雌スピローグドーリーラットの群を、7-12-ジメチルベンズ[a]アントラセン(DMBA)又はニトロソメチルウレア(NMU)で処置後、0%又は 0.3%BHT を添加した飼料を 30 週間与えた。DMBA で処置し対照飼料で維持したラットは、27 週目までに 100%の腫瘍発生率(乳腺)を呈したが、BHT 補充飼料で維持したラットの腫瘍発生率は試験終了時まで 54%であった。飼料中 BHT は、NMU 処置により誘導される腫瘍*の発生率に影響しなかった(King, McCay & Kosanke, 1981)。*スペルミスを訂正して訳しました。

生殖及び行動に関する試験 (原文 p.3)

各 46 匹の生後 6 週のラット(ウィスター非近交系、SPF)の群に、試験中 BHT の飼料摂取量が 500 mg/kg に等しくなるように 0%又は 0.5~0.9%BHT を含む飼料を与えた。19 週目に F₀ 世代を交配させた。F₁ ラットの出生から 24 時間後に同腹児数を 8 匹に減らし、同腹児の半数を里子哺育した。試験中 F₀ ラットの生殖行動のほか、両親及び児動物の体重ならびに児動物の発達事象をモニタした。F₁ 世代に聴覚及び視覚機能ならびに運動協調の試験を実施した。F₁ 動物を 25 日齢で剖検し、脳の組織検査を行った。試験動物の体重及び体重増加は対照と比較して少なく、これは妊娠中続いた。妊娠期間、平均体重、及び一腹児数は、試験動物と対照動物で同程度であった。F₁ 児動物の平均体重及び体重増加は、投薬母動物に哺育された児動物で有意に少なかった。BHT に in utero 曝露された児動物が非投薬母動物に哺育された場合も、発達が対照より比較的遅かった。BHT に in utero 及び/又は母乳で曝露された児動物には、脳の平均死細胞数のより高い発生数ならびに観察した行動パターンの変化がみられた(Meyer & Hansen, 1980)。

化学品製造者協会(Chemical Manufacturers Association, CMA)(1983)により、BHT の生殖への影響及び催奇形性の試験についての仔細なコメントが提出された。主なコメントは、JECFA が 1980 年に検討した Brunner et al.(1978)及び Vorhees et al.(1981) の試験、ならびに Meyer & Hansen (1980)の試験に関するものである。

Brunner et al.及び Vorhees et al.試験については、試験の結果、0.125%BHT 含有飼料を与えたラット母動物に哺育された児動物に正常な生存及び発達がみられたと結論された。0.25%BHT 含有飼料を与えたラット母動物に哺育された児動物には正常な離乳後発達が観察されたが、0.25%及び 0.5%BHT 含有飼料を与え

た母動物に哺育された児動物は離乳後死亡率が増加し、0.5%群の児動物に発達遅延が生じた。Meyer & Hansen(1980)試験では、0.5%BHT 含有飼料を与えたラット母動物に哺育されたラットに発達遅延がみられた。0.25%及び0.5%投与群では、この影響はBHTのラット母動物に対する毒性影響によるもの又は授乳中の直接的毒性によるものでありうる。Brunner 又は Vorhees 試験の設計について多数の疑問も提示された。それは、(1)生存児が8匹未満の同腹児を全て廃棄するという児動物の選択が行われた点、(2)罹患同腹児ではなく児動物数をもとに超過死亡率が報告された点に関するものである。米国FDAが1983年にこの試験のデータを検査した。中用量及び高用量BHTの児動物の死亡率が増加するという著者らによる観察は、生のデータにより支持されると結論された。しかし、超過死亡率は限られた数の同腹児内でのみ生じた。例えば0.5%群では、19組の同腹児で報告された60匹の死亡のうち49件が5組の同腹児で生じ、0.25%群では42匹の死亡のうち21件が2組の同腹児で生じ、0.125%投与群では12匹の死亡のうち11件が1組の同腹児で生じた。また、高用量群では児が8匹以下の同腹児の組数が増加し、一腹児数が12匹を超えるものはなかったことも指摘された。他の用量群では、一腹児数は対照と同等であった。

Meyer & Hansen(1980)試験については、CMAのコメントは、試験で使用された濃度のBHTにより母動物に毒性が生じ、これが直接又は間接的に児動物に影響したと考えられると指摘する。飼料中0.1%BHTの「無影響」量を支持するものとして、ラットによる三世代生殖試験、ならびに数系統のマウス及びラットによる催奇形性試験及び/又は一世代生殖試験の報告もコメントで提示された。

BHTの甲状腺に対する効果に関する特殊試験 (原文 p.4)

非近交系統(約200g)の雄MOL/WIST SPFラットを用いて試験した。BHTを、ヨウ素含有量を約12 µg/100 g(ラットの栄養所要量は15 µg/100 g)で制御した半合成飼料に加えた。一試験では、ラットに飼料中0 ppm、500 ppm又は5000 ppm(0%、0.05%又は0.5%)のBHTを8日、26日及び90日間与え、甲状腺による¹²⁵Iの取り込みを測定した。飼料中のBHTの存在は、全試験期間で¹²⁵Iの取り込みの著しい増加をもたらした。ラットにBHTを様々な量のヨウ素(12 µg、150 µg又は300 µg/100 g)を含む飼料中に30日間与えると、BHT処置動物の甲状腺重量が対照と比較して有意に増加した。ラットの飼料中のBHTにより、飼料中5000 ppm(0.5%)で肝臓及び甲状腺重量が増加したが、500 ppm(0.05%)では甲状腺重量だけが増加した。BHTにより血液中のT₃及びT₄の濃度は変わらなかった。サイロキシンの生物学的半減期は、BHT飼料を与えて13日後に増加したが、75日後に正常に戻った。飼料中BHT(5000 ppm(0.5%))に28日間曝露したラットの甲状腺の電子顕微鏡検査では、濾胞細胞数の増加がみられた(Sondergaard & Olsen, 1982)。

出血性中毒に関する特殊試験 (原文 p.4)

BHTのLD₅₀(i.p.)は、近交系及び非近交系雄マウス系統間で相当な差がみられた。

系統	LD ₅₀ (mg/kg)
DBA/2N(近交系)	138
BALB/cNnN(近交系)	1,739
C57BL/6N(近交系)	917
ICR-JCL(非近交系)	1,243

全てのケースでBHT投与の4~6日後に死亡が生じ、肺の広範な浮腫及び出血が伴った(Kawano et al.,

1981)。

雄ラット(スピローグドーリー)に、0%又は1.2% BHTを含む飼料を1週間与えた。BHT処置ラットは、ほとんどの臓器に出血がみられた。精巣上体へのエバンスブルーの漏出が有意に増加した。加えて、ADP誘導血小板凝集の阻害及び血小板第3因子利用能の減少が観察された。血漿プロトロンビン因子が減少したが、線維素溶解活性*は不変であった(Takahashi & Hiraga, 1981)。*原文の”fibronolytic activity”は”fibrinolytic activity”の誤りですので、訂正して訳しました。

別の試験では、多数の系統のラット(スピローグドーリー、ウィスター、ドンリュウ及びフィッシャー)、マウス(ICR、ddY、DBA/c、C3H/He、BALB/CaAn 及び C57BL/6)、ニュージーランドホワイト種ウサギ(New Zealand White-Sat rabbits)、ビーグル犬、及びウズラに BHTを含む飼料(ラット及びマウスは飼料の1.2%)、(ウズラは飼料の1%)、(ウサギは170 mg 又は 700 mg/kg 体重)、(イヌは173 mg、400 mg 又は 760 mg/kg 体重)を14~17日の期間与え、出血性反応を試験した*。全系統の雄ラット及びフィッシャー系統の雌ラットに失血死が生じた。ドンリュウ及びスピローグドーリー系統の雌ラット**には、明らかな出血はみられなかった。ウサギ又はイヌには、出血作用は認められなかった(Takahashi et al., 1980)。*一文目が全体として文になっていないため、訂正して訳した。**原文 P.5 L.14-15 ”Female rats of the Donryu, and Sprague-Dawley strain”は、「ドンリュウの雌ラット及びスピローグドーリー系統」と解釈できますが、15-04 件の原文 P.5 L.16-17 ”Female rats of the Donryu and Sprague-Dawley strains”と同様に訳しました。

コメント (原文 p.5)

近年のマウスによる生涯試験及びラットによる104週試験では、BHTが試験条件下で発がん性でないことが示された。

マウスの感受性種による、BHTの化学発がん剤による肺腫瘍産生の増強における役割についての追加試験が入手可能である。BHTはこのアッセイ系において、試験動物を多環式炭化水素又はニトロソアミンで処置したときに促進物質として有効であることも分かっている。BHTがマウスのウレタン誘導肺腫瘍の促進剤として作用する最低用量は確立されていない。化学発がん剤による肝発がんを促進する可能性についての追加試験は入手可能でない。BHTは化学発がん剤への曝露後に投与されたときだけ促進剤として作用し、前に投与した場合には作用しない。BHTは、一部の化学発がん剤の効果を阻害することも分かっている。防護効果は、BHTによる酵素誘導により生じる発がん物質の代謝の変化に関連している可能性がある。これらの試験が毒性評価の有用な基礎となるには、それを解釈する上で役に立つ、BHTの化学発がん剤に対する阻害又は促進活性の機序ならびに条件についてのさらなる情報が必要である。

授乳中に子宮内曝露されたラットの行動及び発達に対するBHTの影響に関する近年の試験では、BHTにより児動物及び親の両方の体重増加の有意な減少が引き起こされることが示された。児動物に脳病変ならびに行動パターンの変化がみられた。しかし、この試験で用いた用量は一つのみ(飼料中0.5% BHT)であり、この濃度は母動物に対し有毒であった。Vorhees et al.(1981)試験からのデータの詳細な分析により、中用量及び高用量群(0.5%及び0.25%)の両方の超過死亡率が、同腹効果を反映している可能性があると分かった。データから、BHTによる生殖影響の「無影響」量が、ラットの飼料中0.1%であることが示される。一世代生殖試験を含むラットによる生涯給餌試験が進行中である。この試験のデータは、ラットの生殖試験におけるBHTの「無影響」量を支持するための追加情報を提供するであろう。

一定のマウス種にみられるがイヌ及び一定のラット種にはみられない BHT の大量投与による出血影響は、BHT のビタミン K 代謝を妨げる能力に関連している可能性がある。

500 ppm 又は 5000 ppm(0.05%又は 0.5%)の飼料中 BHT に曝露されたラットには、甲状腺のヨウ素取り込み能力ならびに甲状腺重量の有意な増大がみられた。しかし、最高 10,000 ppm(1%)の BHT を含む飼料で維持したラットによる生涯試験では、甲状腺への副作用はみられなかった。

これまでに報告されたミクロソーム酵素誘導、生殖及び行動影響についての試験をもとに、「無影響」量を設定する。

評価 (原文 p.6)

毒性影響が生じない濃度 (原文 p.6)

マウス: 250 mg/kg に等しい、飼料中 5000 ppm(0.5%)。

ラット: 50 mg/kg に等しい、飼料中 1000 ppm(0.1%)。

ヒトの暫定一日許容摂取量推定値 (原文 p.6)

0~0.5*mg/kg 体重

今後の試験又は情報 (原文 p.6)

1986 年までに必要なもの

進行中とされる一世代生殖試験を含む生涯給餌試験の提出。

* グループ ADI: BHA、BHT、及び TBHQ 単独又は組み合わせ。

ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要（評価書: JMPR 1983）

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
96 週間発がん性に関する特殊試験	マウス (B6C3F1)	0 ppm、200 ppm、100 ppm 又は 5000 ppm(0%、0.02%、0.1%又は0.5%)	1000 ppm 及び 5000 ppm(0.1%及び0.5%)群の雌の体重は対照より低く、5000 ppm(0.5%)群の雄の体重も同様であった。高用量群において一部の臓器(唾液腺、心臓及び腎臓)の絶対重量にわずかな変化があった。雄においては、5000 ppm(0.5%)群の血清 GOT 及び GPT 濃度が対照より高かった。血液、血清及び尿の分析においてその他の化合物関連影響は観察されなかった。試験動物及び対照動物の両方において新生物病変が報告された。最大頻度で生じた腫瘍は、肺の腺腫、肝臓の過形成結節及び肝細胞がん、ならびに悪性リンパ腫であった。しかし、いずれの種類の腫瘍の発生率も、BHT 処置群と対照群との間で統計学的に有意な差はなかった。
104 週間発がん性に関する特殊試験	ウィスターラット	2,500 ppm 又は 10,000 ppm(0.25% 又は 1%)	BHT はこの試験条件下では発がん性なしと結論された。摂食量は試験動物と対照動物で同程度であったが、高用量群の雄及び雌ラット両方で体重増加が減少した。全ての試験動物に相対的肝臓重量の増加が観察され、雌に脾臓重量の減少が観察された。全ての試験動物で総血中コレステロールが増加し、雌に赤血球数の増加が観察された。全体的腫瘍発生率は、BHT 処置ラットにおいて対照より有意ではないがわずかに高かった。雌ラットの過形成結節及び脾臓がん、ならびに試験動物の下垂体腺腫及び腺がんの発生率が、対照より高かった。しかしこれらの差は、低用量雌における下垂体腺腫の発生率を除いては、対照と有意に異ならなかった。この影響は用量関連ではなかったため、BHT はこの試験条件下では発がん性なしと結論された。
発がんの増強又は阻害 i.p. 投与	スイスマウス	300 mg/kg 1000 mg、250 mg、又は 50 mg/kg のウレタン又は 0.9%NaCl	最初のウレタン投与の 14~24 週後に見つかった肺あたりの腫瘍数は、BHT 処置動物で有意に増加していた。
発がんの増強又は阻害 i.p. 投与	マウス		ウレタン注射と 1 回目の BHT 処置との間隔を 6 週間遅らせると、BHT 処置からより多くの腫瘍が生じた。ウレタン処置の 1 週間後に開始する BHT 注射の数を 13 回から 4 回に減少すると、13 回投与試験と同じ腫瘍産生の有意な増加が観察された。しかし、BHT を 1 回又は 2 回投与しても有意な影響はなかった。マウスを 13 回の BHT 注射で前処置してから 1 週間後にウレタン処置した場合には、腫瘍産生は増強されなかった。BHT とウレタンの同時投与により、ウレタン単独で処置した動物と比較して少ない腫瘍が発生した。肺腺種の自然発生率が低いマウス系統(C57BL、C3H 及び BALB/C)をウレタン処置した後 BHT を複数回注射すると、BHT 処置により腫瘍発生率又は肺あたりの平均腫瘍数は有意に増加しなかった。

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
発がんの増強 又は阻害 i.p.	マウス	BHT300 mg/kg、 又 は BHA500 mg/kg、又はビタミ ン E1000 mg/kg、 500 mg/kg ウレタ ン	試験終了時には、BHT だけが腫瘍産生の有意な増加を生じた。BHA 処置により生じる腫瘍の数は通常より多かったものの、統計学的に有意ではなかった。
発がんの増強 又は阻害(i.p.)	A/J マウス		3-メチルコラントレン又はジメチルニトロソアミンで処置した後 BHT で処置すると、腫瘍産生が増加した。
発がんの増強 又は阻害 i.p.	雄 A/J マウス	飼 料 中 0.75%BHT、もしくは BHA 又はエトキシ シキン	いずれの試験条件下でも肺腫瘍形成が増強されたが、BHA 又はエトキシキンでは増強されなかった。マウスに BHA 又は BHT を含む飼料をウレタン処置の前に予め 2 週間与えてから、普通の試験用飼料で 4 ヶ月間維持した。BHT 飼料は腫瘍産生に影響しなかったが、BHA 処置は平均腫瘍数を有意に減少させた。
発がんの増強 又は阻害 i.p	A/J マウス	ウレタンを埋込型ミニ ポンプで連続投 与	細胞分裂期間中のウレタンの持続的存在により腫瘍数が増加することはなかった。ウレタン注射したマウスに、SKF525A(2-ジエチルアミノエチル・2,2-ジ-フェニル吉草酸塩酸塩)と BHT(SKf は BHT 投与後に通常みられる肺細胞分裂を阻害する)、又は BHT を単独で i.p. 投与すると、両処置ともウレタン処置した対照と比較して肺腫瘍産生の非常に有意な増加をもたらした(Witschi & Kehrer, 1982)。他の処置、例えば 95~100%濃度の酸素によりもたらされる反復的肺細胞分裂が腫瘍発生を増強しないことも示された。
発がんの増強 又は阻害 30 週 間	雌スピローグ ドーリーラット	0%又は 0.3%BHT	7-12-ジメチルベンズ[a]アントラセン(DMBA)又はニトロソメチルウレア(NMU)で処置後、BHT を混餌投与。DMBA で処置し対照飼料で維持したラットは、27 週目までに 100%の腫瘍発生率(乳腺)を呈したが、BHT 補充飼料で維持したラットの腫瘍発生率は試験終了時まで 54%であった。飼料中 BHT は、NMU 処置により誘導される腫瘍の発生率に影響しなかった。
多世代生殖試 験	ラット(ウィス ター非近交系、 SPF)	BHT の飼料摂取 量が 500 mg/kg に 等しくなるように 0% 又 は 0.5~0.9%BHT	試験動物の体重及び体重増加は対照と比較して少なく、これは妊娠中続いた。妊娠期間、平均体重、及び一腹児数は、試験動物と対照動物で同程度であった。F1 児動物の平均体重及び体重増加は、投薬母動物に哺育された児動物で有意に少なかった。BHT に in utero 曝露された児動物が非投薬母動物に哺育された場合も、発達が対照より比較的遅かった。BHT に in utero 及び/又は母乳で曝露された児動物には、脳の平均死細胞数のより高い発生数ならびに観察した行動パターンの変化がみられた。
甲状腺に対す る効果に関す る特殊試験	雄 MOL/WIST SPF ラット	0 ppm、500 ppm 又 は 5000 ppm(0%、0.05% 又は 0.5%)	飼料中の BHT の存在は、全試験期間で 125I の取り込みの著しい増加をもたらした。
甲状腺に対す る効果に関す る特殊試験	ラット	500 ppm(0.05%)、 5000 ppm(0.5%)	甲状腺重量が対照と比較して有意に増加した。ラットの飼料中の BHT により、飼料中 5000 ppm(0.5%)で肝臓及び甲状腺重量が増加したが、500 ppm(0.05%)では甲状腺重量だけが増加した。血液中の T3 及び T4

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			の濃度は変わらなかった。サイロキシンの生物学的半減期は、BHT 飼料を与えて 13 日後に増加したが、75 日後に正常に戻った。飼料中 BHT(5000 ppm(0.5%)) に 28 日間曝露したラットの甲状腺の電子顕微鏡検査では、濾胞細胞。
出血性中毒に関する特殊試験	マウス		BHT の $D_{50}(i.p.)$ は、近交系及び非近交系雄マウス系統間で相当な差がみられた。全てのケースで BHT 投与の 4~6 日後に死亡が生じ、肺の広範な浮腫及び出血が伴った。 出血性中毒に関する特殊試験(原文 p.4)の表参照
出血性中毒に関する特殊試験 1 週間	ラット(スピローグドーリー)	0%又は 1.2%	ほとんどの臓器に出血がみられた。精巣上体へのエバンスブルーの漏出が有意に増加した。加えて、ADP 誘導血小板凝集の阻害及び血小板第 3 因子利用能の減少が観察された。血漿プロトロンビン因子が減少したが、線維素溶解活性は不変であった。
出血性中毒に関する特殊試験 14~17 日出血性反応を試験	ラット(スピローグドーリー、ウィスター、ドンリュウ及びフィッシャー)	1.2%	全系統の雄ラット及びフィッシャー系統の雌ラットに失血死が生じた。ドンリュウ及びスピローグドーリー系統の雌ラットには、明らかな出血はみられなかった。
出血性中毒に関する特殊試験 14~17 日出血性反応を試験	マウス(ICR、ddY、DBA/c、C3H/He、BALB/CaAn 及び C57BL/6)	1.2%	全系統の雄ラット及びフィッシャー系統の雌ラットに失血死が生じた。
出血性中毒に関する特殊試験 14~17 日出血性反応を試験	ニュージーランドホワイト種ウサギ	170 mg 又は 700 mg/kg 体重	ウサギ又はイヌには、出血作用は認められなかった
出血性中毒に関する特殊試験 14~17 日出血性反応を試験	ビーグル犬	イヌは 173 mg、400 mg 又は 760 mg/kg 体重	ウサギ又はイヌには、出血作用は認められなかった
その他			ADI:0~0.5 mg/kg 体重 毒性影響が生じない濃度: マウス 5000 ppm(0.5%) (250 mg/kg に相当) ラット 1000 ppm(0.1%) (50 mg/kg に相当)

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
BHT	Butylated hydroxytoluene	ブチルヒドロキシトルエン
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives	FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
FAO	Food and Agriculture Organization	国連食糧農業機関
WHO	World Health Organization	世界保健機関
ADI	Acceptable daily intake	一日許容摂取量
i.p.	intraperitoneal	腹腔内
DMBA	7,12-dimethylbenz[a]anthracene	7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン
MNU	Methylnitrosourea	メチルニトロソ尿素
CMA	Chemical Manufacturers Association	化学品製造者協会
FDA	Food and Drug Administration	食品医薬品局
LD ₅₀	50% Lethal Dose	半数致死量
BHA	Butylated hydroxyanisole	ブチルヒドロキシアニソール
TBHQ	tert-butylhydroquinone	tert-ブチルヒドロキノン

ブチルヒドロキシトルエン(BHT) 評価書和訳と情報整理

JECFA 1986

ウェブサイト:<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v21je03.htm>

FAS 21-JECFA 30/25, 1986

ブチルヒドロキシトルエン(BHT) 評価書和訳と情報整理 JECFA(1986) 目次

ブチルヒドロキシトルエン(BHT)(原文 P.1)	110
説明 (原文 P.1)	110
生物学的データ (原文 P.1)	110
生化学的側面 (原文 P.1).....	110
代謝 (原文 P.1)	110
酵素への影響 (原文 P.1)	110
毒性試験 (原文 P.2)	110
発がん性に関する特殊試験 (原文 P.2)	111
マウス (原文 P.2)	111
ラット (原文 P.3)	111
出血影響に関する特殊試験 (原文 P.4)	112
変異原性に関する特殊試験 (原文 P.7)	115
発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験 (原文 P.7)	115
胃腸管 (原文 P.7).....	115
膀胱 (原文 P.8)	115
肝臓 (原文 P.9)	116
乳腺 (原文 P.9)	117
膵臓 (原文 P.10)	117
突然変異誘発の増強又は阻害に関する特殊試験 (原文 P.10)	117
肺毒性に関する特殊試験 (原文 P.10).....	117
生殖に関する特殊試験 (原文 P.11).....	118
ラット (原文 P.11)	118
コメント (原文 P.12)	118
評価 (原文 P.13)	119
毒性影響が生じない濃度 (原文 P.13)	119
ヒトの暫定一日許容摂取量推定値 (原文 P.13)	119
今後の試験又は情報 (原文 P.13)	120
ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要 (評価書:JMPR 1986)	121
略称.....	126

原文 目次

原文ページ

ブチルヒドロキシトルエン(BHT)	1
説明	1
生物学的データ	1
生化学的側面	1
代謝	1
酵素への影響	2
毒性試験	2
発がん性に関する特殊試験	2
マウス	2
ラット	3
出血影響に関する特殊試験	4
変異原性に関する特殊試験	7
発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験	7
胃腸管	7
膀胱	8
肝臓	9
乳腺	9
脾臓	10
突然変異誘発の増強又は阻害に関する特殊試験	10
肺毒性に関する特殊試験	10
生殖に関する特殊試験	11
ラット	11
コメント	12
評価	13
毒性影響が生じないレベル	13
ヒトの暫定一日許容摂取量推定値	13
今後の試験又は情報	13
1990 年までに必要なもの	13
引用文献	13
 BUTYLATED HYDROXYTOLUENE (BHT)	1
EXPLANATION	1
BIOLOGICAL DATA	1
Biochemical aspects	1
Metabolism	1
Effect on enzymes	2
Toxicological studies	2
Special studies on carcinogenicity	2
Mice	2

Rats	3
Special Studies on haemorrhagic effects	4
Special Studies on mutagenicity	7
Special studies on potentiation or inhibition of carcinogenicity	7
G.I.Tract	7
Bladder	8
Liver	9
Mammary glands	9
Pancreas	10
Special studies on potentiation or inhibition of mutagenesis	10
Special studies on pulmonary toxicity	10
Special studies on reproduction	11
Rats	11
Comments	12
EVALUATION	13
Level causing no toxicological effect	13
Estimate of temporary acceptable daily intake for man	13
Further work or information	13
REFERENCES	13

ブチルヒドロキシトルエン(BHT)(原文 p.1)

説明 (原文 p.1)

FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議の第 6 回、8 回、9 回、17 回、20 回、24 回及び 27 回会合で、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)のヒトの一日許容摂取量が評価された(添付 I、引用文献 6、8、11、32、41、53、及び 62)。これらの各会合後、毒性モノグラフ又はモノグラフ補遺が発表された(添付 I、引用文献 6、9、12、33、42、54、及び 63)。

過去の評価以来、第 27 回会議で要請された試験(添付 1、引用文献 62)の結果を含む追加データが得られており、これを以下のモノグラフ補遺でまとめ、論じる。

生物学的データ (原文 p.1)

生化学的側面 (原文 p.1)

代謝 (原文 p.1)

雌雄マウスに ^{14}C -BHT を経口単回投与した結果、 ^{14}C の組織への迅速な吸収及び分布が生じた。主に糞便中(41~65%)及び尿中(26~50%)に ^{14}C が排泄され、より少量が呼気中に(6~9%)排泄された。試験した主要組織(胃、腸、肝臓、及び腎臓)における単回用量の半減期は、9~11 時間であった。一日用量を 10 日間与えた場合には、検査した組織中の ^{14}C の半減期は 5~15 日であった。代謝は、tert-ブチル基の一方又は両方での酸化後のグルクロニド抱合体の形成及び尿中排泄、又は遊離酸の糞便中排泄を特徴とした。 ^{14}C -BHT をラットに投与すると、 ^{14}C の 80~90%が 96 時間以内に尿及び糞便中に排泄され、 ^{14}C の 0.3%未満が呼気中に排泄された。 ^{14}C -BHT の大部分が遊離酸として糞便中に排泄され、より少量が尿中に排泄された。マウス及びラットの尿及び糞便中に 43 以上の代謝物が存在した(Matuso, 1984)。

^{14}C -アフラトキシン B₁を投与し BHT(飼料中 0.5%)を給餌したラットには、尿及び糞便中の ^{14}C -アフラトキシン B₁の水溶性代謝物の排泄増加がみられた。加えて、BHT 前処置により、肝臓の核 DNA に結合した ^{14}C の量が減少することが分かった(Fukayama & Hsieh, 1985)。

酵素への影響 (原文 p.1)

普通の F-344 雄ラットにおいて、飼料中 BHT(300~6000 ppm)によりガンマ-グルタミルトランスぺプチダーゼの用量依存的増加が生じた。しかし、サイトゾルのグルタチオン S 転スフェラーゼは、3000 ppm 又は 6000 ppm の BHT の飼料濃度でのみ増強された(Furukawa *et al.*, 1984)。

雄スイスウェブスターマウスに BHT を飼料投与した結果、肝ミクロソームのエポキシドヒドロラーゼ及びグルタチオン-S-転スフェラーゼの著しい増加が生じた(Hammock & Ota, 1983)。

毒性試験 (原文 p.2)

発がん性に関する特殊試験 (原文 p.2)

マウス (原文 p.2)

試験開始時に生後 6~10 週の雌雄の C₃H マウスの群(17~39 匹/群の範囲)を、0.05%又は 0.5%BHT を含む半合成飼料で 10 ヶ月間維持した。対照群は、BHT を含まない半合成飼料又は市販の試験用固形飼料で維持した。試験期間終了時に肝臓及び肺を切除し、増殖性病変を肉眼検査した。明確に腫瘍と同定できると考えられた増殖性病変の約 50%を顕微鏡検査した。BHT を含む飼料で維持したマウスは対照より低体重であった。BHT を与えた雄マウスには、対照と比較して肝臓腫瘍の増加がみられた。腫瘍は組織学的に肝細胞腺腫と同定された。雌マウスには増加は観察されなかった。雄 C₃H マウスにおける肝臓腫瘍の発生率は、0.5%BHT 群、0.05%BHT 群、BHT なし対照群、及び試験用固形飼料対照群でそれぞれ 10/26(38%)、15/26(58%)、2/37(5%)、及び 7/38(18%)と報告された。C₃H マウスを 0.5%BHT を含む飼料で 1 ヶ月間の後試験用固形飼料で 10 ヶ月間維持し、又は対照飼料(BHT なし) で 1 ヶ月間の後試験用固形飼料で 10 ヶ月間維持した試験では、2 つの雄マウス群における肝臓腫瘍発生率はそれぞれ、3/35(9%)及び 5/29(17%)であった。飼料中 BHT は、雄又は雌いずれの C₃H マウスにおいても肺腫瘍の発生率増加をもたらさなかった。雄 BALB/c マウスを、BHT を含まない飼料もしくは 0.05%BHT 又は 0.5%BHT を含む飼料で 1 年間維持した別の試験では、肝臓腫瘍の発生率はそれぞれの群で 4/30(13%*)、6/43(14%)、及び 2/28(7%)であった(Lindenschmidt et al., 1986)。*原文中”131”とあるのは”13%”の誤りですので訂正しました。

C₃H マウスにおける自然発生肝腫瘍の発生率が、性別、個体密度、飼料タンパク質の濃度、及びカロリー摂取量により変化することが過去に示されている。10 ヶ月試験の過去データは入手できない。この系統における 12 ヶ月試験での肝腫瘍の発生率は、雌で 6~13%、雄で 41~68%の範囲であった。したがって、報告された肝細胞腫瘍の発生率は、同じ近交系を用いた試験におけるほぼ同年齢の他の対照と有意に異ならなかった(Peraino et al., 1973)。

ラット (原文 p.3)

雌雄それぞれ 60 匹、40 匹、40 匹、及び 60 匹のウィスターラットの群(F₀ 世代)に、それぞれ 0 mg、25 mg、100 mg、又は 500 mg/kg 体重の BHT を含む半合成飼料を与えた。13 週間の投薬後に F₀ ラットを交配させた。F₁ 群は、各群の児動物からのそれぞれ 100 匹、80 匹、80 匹、及び 100 匹の雌雄それぞれの F₁ ラットからなった。親動物の腎臓への副作用のため、F₁ 世代では最高用量群の BHT の濃度を 250 mg/kg 体重に下げた。F₁ 世代のラットが生後 144 週になったときに試験を終了した。

(毎週の) 摂食量、体重、臨床所見、及び死亡率のパラメータを試験した。試験期間中に死亡し、もしくは切迫屠殺又は終了時に屠殺した全動物に、剖検及び完全な組織病理学検査を行った。

中用量及び高用量群の F₁ 児動物の出生時平均体重は、対照群よりわずかに低かった。離乳から試験全体を通して、全ての投薬動物の体重が対照動物より低かった。低用量、中用量、及び高用量群における体重の減少は、雄で 7%、11%、及び 21%、雌で 5%、10%、及び 16%であった。摂食量は全ての群で同様であった。臨床的所見及び挙動は、全ての動物で正常と報告された。高用量の雄は、尿がわずかに赤かった。血液パラメータは BHT 処置により変化しないことが報告されたが、データは出されなかった。雌雄両方で血清トリグリセリドが減少し、雌だけコレステロールがやや上昇した。

全 BHT 摂取動物に生存の用量関連増加がみられた。雌雄両方に寿命の差($p < 0.001$)がみられた。組織学的試験で、雄ラットに肝細胞がんの増加(雌にはなし)、雄雌両方のラットに肝細胞腺腫の増加がみられた。ほとんどの肝臓腫瘍が 141~144 週目の最終屠殺の間に見つかった。対照雄で 117 週目に一つ、高用量の雄で 132 週目に一つの肝細胞がんが見つかった。残りのがんは最終屠殺時に見つかった。高投与量雄で 115 週目に最初の腺腫が認められた。表 1 及び 2 に、死亡率ならびに肝臓の腺腫及びがんの所見に関するデータをまとめている。

異なる群における死亡率及び腫瘍発生率に関するデータを、Peto et al. (1980)の手順を用いて解析した。全ての群の異質性検定*又は傾向検定を行うと、雄 F₁ ラットにおける肝細胞腺腫数の用量関連増加が統計学的に有意であった($p < 0.05$)。処置雌 F₁ ラットにおける肝細胞腺腫及びがんの増加は、傾向解析で腺腫の増加だけが統計学的に有意であった($p < 0.05$)。*原文中”heterogenicity”とあるのは、”heterogeneity”の誤記であると思われますので訂正しました。

この試験を行っている試験室ならびに欧州の他の試験室による、ウィスターラットにおける肝細胞新生物の自然発生率の報告からは、発生率が通常 3%未満であることが示される(Solleveld et al., 1984; Deerberg et al., 1980; Olsen et al., 1985)。これらの試験における動物の平均寿命は、雄が 28 ヶ月間~36 ヶ月、雌が 28 ヶ月~33 ヶ月であった。

新生物病変の統計学的に有意でないわずかな増加が報告された他の部位は、甲状腺、脾臓、卵巣、子宮、胸腺、細網内皮系、及び乳腺である。

非新生物病変が偶然に生じ、BHT 処置とは関係がなかったが、例外的に肝臓の病変には雄において胆管増殖及び嚢胞、雌において局所性細胞増大の発生率の用量関連増加がみられた。

最高投与群(250 mg/kg 体重)で腎臓への副作用はなかった(Olsen et al., 1986)。

出血影響に関する特殊試験 (原文 p.4)

10 匹の雄スピローグドーリーCLEA ラットの群に、0.58%、0.69%、0.82%、1.00%、1.20%、又は 1.44%BHT を含む飼料を 40 日間与えた。死亡率に対する用量関連影響が観察され、0.69%以上の BHT を与えたラットの 21/50 が 9~37 日の期間中に死亡した。これらの動物においては自然発生的な広範囲の出血が観察された。生存動物のプロトロンビン指数が BHT 用量依存的に減少した。最低投与群では、減少は約 651 であった(Takahashi & Hiraga, 1978a)。

BHT の LD₅₀(i.p.)は近交系及び非近交系雄マウス系統間で相当の差がみられた:

系統	LD ₅₀ (mg/kg 体重)
DBA/2N(近交系)	138
BALB/cNnN(近交系)	1739
C57BL/6N(近交系)	917
ICR-JCL(非近交系)	1243

全てのケースで BHT 投与の 4~6 日後に死亡が生じ、肺の広範な浮腫及び出血が伴った(Kawano et al., 1981)。

別の試験で、多数のラット(スピローグドーリー、ウィスター、ドンリュウ及びフィッシャー)、マウス(ICR、ddY、DBA/c、C3H/He、BALB/CaAn 及び C57BL/6)、ニュージーランドホワイト種ウサギ(New Zealand white-sat rabbits)、ビーグル犬、及びウズラ系統に BHT を含む飼料(ラット及びマウスは飼料の 1.2%; ウズラは飼料の 1%; ウサギは 170 mg 又は 700 mg/kg 体重; イヌは 173 mg、400 mg、又は 760 mg/kg 体重)を 14~17 日の期間与えた。全系統の雄ラット及びフィッシャー系統の雌ラットに出血死が生じた。ドンリュウ及びスピローグドーリー系統の雌ラットには、明らかな出血はみられなかった。**ウサギ***又はイヌでは出血作用は認められなかった(Takahashi et al., 1980)。*原文中の”rabits”は”rabbits”の誤記です。

380 mg、760 mg 又は 1520 mg BHT/kg 体重/日の一日量を 3 日連続で与えた雄アルビノラット(CRL COB CD(SD) BR)には、出血の所見はなかった。しかし、BHT によりプロトロンビン時間の用量依存的増加が生じ、380 mg/kg 体重の動物にはプロトロンビン時間への影響はなかった(Krasavage, 1984)。

表 1. F₁ラットにおける死亡数(ならびに肝腺腫及び肝がんの合計数)

BHT (mg/kg 体重)	ラッ トの 有 効 数	期間(-週~週)中の死亡数 ^a								
		0-90	91-104	105-113	114-118	119-126	127-132	133-140	141-144	合計
雄										
0	100	20	10	13	(1)/8	11	10	(1)/12	16	(2)/100
25	80	8	11	6	3	(1)/13	11	8	20	(1)/80
100	80	8	12	3	2	10	7	(2)/11	(4)/27	(6)/80
250	99	7	7	6	(1)/4	(2)/8	(2)/13	(1)/10	(20)/44	(26)/99
雌										
0	100	16	15	18	(2)/8	11	7	8	17	(2)/100
25	79	10	9	4	6	13	(1)/10	(1)/8	(1)/19	(3)/79
100	80	5	17	5	5	(1)/7	(41)/9	(1)/11	(3)/21	(6)/80
250	99	9	5	11	12	8	5	(2)/10	(12)/39	(14)/99

a 括弧内の数字はその期間中に生じた腺腫及びがんの合計である。

表 2. 肝細胞の結節性過形成、腺腫、及びがんの発生

BHT (mg/kg 体重)	ラットの有効数	結節性過形成	腺腫	がん
雄				
0	100	2	1	1
25	80	0	1	0
100	80	2	5	1
250	99	2	18 ^a	8 ^b
雌				
0	100	2	2	0
25	79	0	3	0
100	80	4	6	0
250	99	5	12 ^c	2 ^d

a 全体的異質性検定、 $p < 0.001$ 、カイ自乗=18.17、3df。

傾向検定、 $p < 0.001$ 、カイ二乗=17.97、1df。

b 全体的異質性検定、 $p < 0.05$ 、カイ二乗=11.12、3df。

傾向検定、 $p < 0.01$ 、カイ二乗=9.40、1df。

c 全体的異質性検定、有意性なし、カイ二乗=5.20、3df。

傾向検定、 $p < 0.05$ 、カイ二乗=4.99、1df。

d 全体的異質性検定、有意性なし、カイ二乗=2.87、3df。

傾向検定、有意性なし*、カイ二乗=2.59、1df。

*原文の”set significant”は”not significant”の誤記であると思われますので訂正して訳しました。

雄スピローグドーリーCLEA ラットを、85 ppm、170 ppm、330 ppm、650 ppm、1300 ppm、2500 ppm、又は 5000 ppm 濃度の BHT を含む飼料で 1~4 週間維持した。170 ppm 以上の濃度の BHT を与えた全ての群で、1 週目にプロトロンビン指数の有意な減少が観察された。しかし、ラットを試験飼料で 4 週間維持した場合には 5000 ppm 群だけでプロトロンビン指数の有意な減少が観察された。この群だけに、対照群と比較して肝臓相対重量の増大がみられた。別の試験で、1.2%BHT による雄スピローグドーリーラットの出血死、出血、及びプロトロンビン指数の減少が、0.68 モル/kg 体重/日のフィロキノンの同時添加により妨げられた。フィロキノンオキシンドによっても BHT による低プロトロンビン血症が妨げられた(Takshashi & Hiraga, 1979)。

雄スピローグドーリーラットに 0%又は 1.2%BHT を含む飼料を 1 週間与えた。BHT 処置ラットには、ほとんどの臓器に出血がみられた。精巣上体へのエバンスブルーの漏出が有意に増加した。加えて、ADP 誘導血小板凝集の阻害及び血小板第3因子利用能の減少が観察された。血漿プロトロンビン因子が減少したが、線維素溶解活性*は不変であった(Takahashi & Hiraga, 1981)。

*原文の”fibronolytic activity”は”fibrinolytic activity”の誤りです。

0.25%の飼料中 BHT を 2 週間与えた雄ラットには、肝臓中のビタミン K 濃度の減少及びビタミン K の糞便中排泄の増加がみられた(Suzuki et al., 1984)。

1.2%濃度の飼料中 BHT は血小板形態(分布幅)に影響し、血小板脂質の脂肪酸組成の変化を引き起こすこ

とが分かった(Takahashi & Hiraga, 1984)。

変異原性に関する特殊試験 (原文 p.7)

BHT の遺伝毒性を 4 つの *in vitro* 系で試験した: (1)S-9 がん誘発を伴う又は伴わない 5 つの試験系統を用いたサルモネラ菌/ミクロソーム突然変異試験(0.01~10 mg/プレートの中の 4 用量群); (2)肝細胞初代培養/DNA 修復試験(10^{-5} ~1 mg/mL の範囲の 10 用量); (3)ラット肝上皮細胞株 18 を用いた成熟ラット肝上皮細胞/ヒポキサンチン/グアニン/ホスホリボシルトランスフェラーゼ突然変異誘発(0.05~0.1 mg/mL の範囲の 6 用量); 及び(4)チャイニーズハムスター卵巣/姉妹染色分体交換(SCE)アッセイ(10^{-5} ~1 mg/mL の範囲の 4 用量)。BHT は全ての試験で陰性であった(Williams et al., 1984)。

発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験 (原文 p.7)

胃腸管 (原文 p.7)

雄 F344 ラットを N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンの単回用量で処置後、BHT なし、1.0%BHT、5%NaCl、又は 5%NaCl+1.0%BHT を含む飼料で 51 週間維持した。各群の前胃の扁平上皮がんの発生率は、対照群で 11%、BHT 群で 15.8%、NaCl 群で 3.0%、BHT+NaCl 群で 52.9%であった(Shirai et al., 1984)。

ラットに 1,2-ジメチルヒドラジン(週 1 回)後、0.5%の飼料中濃度の BHT で 36 週間維持すると、飼料中 BHT の存在は結腸腫瘍のラット数に影響しなかったが、ラットあたりの遠位結腸の腫瘍数が有意に減少した(Shirai et al., 1985)。

N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン処置(1.0 mg/mL の濃度で飲料水中投与)の間に飼料中 1.0%BHT を 25 週間与えた後、試験飼料でもう 14 週間維持したウィスターラットには、BHT を含まない飼料を与えたラットと比較して、胃癌発生率の有意な減少がみられた(82%対 36.8%) (Tatsuta et al., 1983)。

メチルニトロソ尿素*による直腸内処置後に BHT を含む飼料で維持した雄 BALB/c マウスの群には、BHT を含まない飼料で維持した処置マウスと比較して胃腸管腫瘍の発生率及び多様性の著しい増加がみられた。別の試験で、BALB/c マウスにジメチルヒドラジンを注射(週 1 回で 6 回注射)後、対照 (BHT を含まない) 飼料もしくは 0.05%BHT 又は 0.5%BHT を含む飼料で維持した。各群の結腸腫瘍発生率はそれぞれ 3/30(10%)、0/43、及び 9/28(32%)であった (Lindenschmidt et al., 1986)。* 本文中 "methylnitrosurea" は "methylnitrosourea" の誤りです。

膀胱 (原文 p.8)

雄 F344 ラットを飲料水中 0.01%又は 0.05%N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン(BBN)で 4 週間処置後、0%又は 1%BHT を含む飼料を 32 週間与えた。飼料中の BHT により、0.05%BBN で処置したラットの膀胱癌及び膀胱乳頭腫の発生率が有意に増加したが、0.01%BBN で処置したラットには同様の増加はみられなかった(Imaida et al., 1983)。

ラットに飼料中 200 ppm の N-2-フルオレニルアセタミド(FAA) を単独で、又は 6000 ppm の BHT とともに、25 週間投与した。FAA の単独投与では膀胱新生物は生じなかったが、FAA 及び BHT の同時投与により 17/41 に膀胱乳頭腫、3/41 に膀胱がんが生じた(Williams *et al.*, 1983)。

4 つの飼料中濃度の BHT(300 ppm、1000 ppm、3000 ppm、又は 6000 ppm)を、200 ppm の FAA と同時に 25 週間与えた。FAA の単独投与では新生物は生じなかったが、3000 ppm 又は 6000 ppm の BHT と組み合わせた場合には、膀胱腫瘍の発生率はそれぞれ 18%及び 44%であった。300 ppm 及び 1000 ppm BHT 群の膀胱腫瘍の発生率は低く、FAA 単独での発生率と有意に異ならなかった(肝臓への影響も参照) (Maeura *et al.*, 1984)。

雄 F344 ラットにメチルニトロソ尿素(MNU)を週 2 回 4 週間注射後、11 BHT*を含む基礎飼料を 32 週間与えた。飼料中 BHT により、膀胱の乳頭腫及び乳頭状過形成又は結節性過形成**の群あたりの発生率及びラットあたりの数が有意に増加した。MNU***+BHT による処置により甲状腺腫の発生率も増加した(しかし甲状腺がんの発生率は増加しなかった) (Imaida *et al.*, 1984)。*原文中”11 BHT”は誤記であるか単位が抜けている可能性があります、原文のまま記載しました。**原文中”hyplasia”は”hyperplasia”の誤記ですので、『過形成』と訳しました。***原文中”HNU”は”MNU”の誤記と思われるので訂正しました。

肝臓 (原文 p.9)

ラットに飼料中 200 ppm の FAA を単独で、又は 6000 ppm の BHT とともに、25 週間投与した。FAA 単独では 100%*の肝臓新生物発生が誘導された。BHT の同時投与により、良性新生物、新生物結節ならびに悪性がん及び肝細胞がんの頻度が減少した(Williams *et al.*, 1983)。*原文の”1001”は”100%”の誤記であると思われるので訂正しました。

飼料中 4 濃度の BHT(300 ppm、1000 ppm、3000 ppm、又は 6000 ppm)を 200 ppm の FAA と同時に 6 週、12 週、15 週、又は 25 週間与えた。BHT により、腫瘍発生率の用量依存的減少が生じた(BHT の非存在下で 100%から 6000 ppm BHT で 56%発生率) (膀胱への影響も参照) (Maeura *et al.*, 1984)。

ラットに 200 ppm の FAA を 8 週間、その後 300 ppm、1000 ppm、3000 ppm、又は 6000 ppm 濃度の BHT を含む飼料を最長 22 週間与えた。最高投与群で鉄放出及び FAA 投与により誘導されたガンマグルタミルトランスフェラーゼ(GGT)活性により同定される肝細胞変化巣の領域に発現増加がみられた(病巣数、GGT 陽性新生物発生前病変ならびに新生物病変の占める領域、及び新生物発生率が増加した)。より低い BHT 投与群ではこれらのパラメータに影響はなかった(Maeura & Williams, 1954)。

ラットに 200 mg/kg 体重のジエチルニトロサミンを単回 i.p.注射した後、1%BHT を含む飼料で 6 週間維持した。3 週目にラットの部分肝切除を行った。BHT を投与したラットの肝臓のガンマグルタミルトランスペプチダーゼ陽性巣*の数は、対照と比較して有意に少なかった(Imaida *et al.*, 1983)。*原文中”loci”とあるのは”foci”の誤りであると思われるので訂正して訳しました。

乳腺 (原文 p.9)

雌ラットに 0%、0.25%又は 0.5%BHT を含む飼料を与えた。試験飼料を、(a)7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン(DMBA)の投与の 2 週間前から 1 週間後まで、又は(b)DMBA 投与の 1 週間後から試験終了まで(30 週)与えた。DMBA は 8 mg の単回用量として投与した。BHT は、これらのいずれかの時間枠の間で投与したときに、乳がん発がんを有効に阻害した(投与(a)で 20%、投与(b)で 50%) (McCormick *et al.*, 1984)。

別の試験では、飼料中 BHT が、DMBA により雌スピローグドーリーラットにおいて誘導される乳腫瘍の発生率を減少させることが分かったが、MNU で処置した動物には無効であった(King *et al.*, 1981)。

BHT の阻害作用は、がん誘発物質の用量及び BHT を投与する飼料の種類に大きく影響された。AIN-76A 飼料中の BHT の投与による効果は、NIH-07 飼料中の BHT による効果と顕著に異なった。AIN-76A 飼料中の 6000 ppm の BHT は 15 mg の DMBA により誘導される乳腫瘍の発生率に影響しなかったが、NIB-07 飼料中の同濃度の BHT は腫瘍発生を 40%阻害した(Cohen *et al.*, 1984)。

脾臓 (原文 p.10)

雄 LEW 近交系ラットに 30 mg のアザセリン注射を週 1 回 3 週間行った後、0%又は 0.45%BHT を含む飼料で 4 ヶ月間維持した。BHT 処置により脾臓あたりの好酸性病巣数が 32%減少したが、病巣の大きさには影響がなかった。BHT は、好塩基性病巣の発生には影響しなかった(Roebuck *et al.*, 1984)。

突然変異誘発の増強又は阻害に関する特殊試験 (原文 p.10)

50~250 µg/プレートの BHT 添加により、ラット肝臓 S-9 画分の存在下でネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)株 TA98 及び TA100 において 3,2'-ジメチル-4-アミノビフェニルによる突然変異誘発が阻害された(Reddy *et al.*, 1983a)。

BHT は、ハムスター肝 S-9 画分で活性化したネズミチフス菌株 TA98 におけるベンジジンによる突然変異誘発の中程度に有効な阻害剤であった(Josephy *et al.*, 1985)。

100~250 µg/プレートの BHT 添加は、ネズミチフス菌株 TA98 及び TA100 における 3,2'-ジメチル-4-アミノビフェニルによる突然変異誘発を阻害することが分かった。BHT を含まない飼料を与えたラットの S-9 調製物と比べ、飼料中 BHT(0.6%)を与えたラットの S-9 調製物の使用により、変異原性がさらに阻害された(Reddy *et al.*, 1983b)。

BHT(5~20 µg/プレート)の添加により、活性化の有無を問わずネズミチフス菌株 TA98 及び TA100 を用いてのアフラトキシン B₁ の突然変異誘発能が 2 倍に増加した(Shelley & Chin, 1980)。

肺毒性に関する特殊試験 (原文 p.10)

マウスにおける BHT アナログの肺毒性の試験において、毒性活性に必須の構造特徴が、(i)4 位メチル基と(ii)水酸基の中程度の立体障害効果を生じうるオルトのアルキル基(単数又は複数)を有するフェノール環構造

であることが確かめられた(Mizutani *et al.*, 1982)。

別の試験では、4-メチル基の重水素化によりマウスにおける BHT の毒性強度が減少し、BHT 投与後の肺障害が代謝物 2,6-ジ-tert-ブチル-4-メチレン-2,5-シクロヘキサジエノンにより生じることが示唆された(Mizutani *et al.*, 1983)。

BHT の単回用量を与えた雄マウスには肺の超微構造変化がみられ、その変化は I 型上皮細胞の選択的破壊と II 型立方細胞による代替を特徴とした。これらの変化には、カタラーゼ活性ならびにペルオキシソーム数の著しい減少が伴った(Hirai *et al.*, 1983)。

BHT は、50 mg/kg を上回る用量のウレタンで処置したマウスの肺腫瘍発生率を高めることが分かった。より低用量(発癌用量以下)のウレタンでは、BHT による腫瘍発生増強はなかった。別の試験で、マウスのウレタン処置後、飼料中 0.75%BHT への 2 週間の曝露が腫瘍発生を増強するのに十分であり、0.1%BHT は 8 週間与えると有効なエンハンサーであることが分かった。BHT を処置後 24 時間以内に 8 週間投与すると、3-メチルコラントレン、ベンゾ(a)ピレン、又は N-ニトロソジメチルアミンで一度処置したマウスの腫瘍発生が増強された。マウスに BHT を週 1 回注射すると、細胞増殖ならびに累積標識率(³H-チミジンの取込み)及び標識された II 型細胞の数の両方の急速な増加がみられた。これらの影響は各注射の後により小さくなり、5 回目の注射までに増加は観察されなくなった(Witschi & Morse, 1985)。

生殖に関する特殊試験 (原文 p.11)

ラット (原文 p.11)

生後 17 週の 60 匹、40 匹、40 匹、及び 60 匹の各性別のウィスターラットの群に、飼料摂取量がそれぞれ 0 mg、25 mg、100 mg、又は 500 mg/kg 体重/日に等しくなるように BHT を含む半合成飼料を与えた。試験飼料を与えて 13 週間後にラットを交配させた。

摂食量は全ての群で同程度であった。高用量群の雌雄のラットには、試験の間中持続した有意な体重減少がみられた。妊娠率は全ての試験群で同程度であった。一腹児数及び一腹あたりの雄の数は、500 mg/kg 体重群で対照より有意に低かった。授乳期生存率は試験群と対照群で同程度であった。500 mg/kg 体重/日及び 100 mg/kg 体重/日の群の児動物の平均出生時体重は、対照よりわずかに低かった。授乳期中、飼料中 BHT により体重増加が用量に関連して有意に低くなった(25 mg、100 mg、及び 500 mg/kg 体重/日の群で対照と比べてそれぞれ 5%、7%、及び 41%低体重) (Olsen *et al.*, 1986)。

コメント (原文 p.12)

一定のマウス及びラット系統に**みられる***がイヌにはみられない BHT の大量投与による出血影響は、BHT のビタミン K の代謝を妨げる能力に関連するものである可能性がある。しかし、感受性系統のラットにおいてプロトロンビン指数の減少が一時的であることが示された。ビタミン K アナログの投与により出血影響が好転する。このことから、出血影響はビタミン K の少ない飼料に関連すると考えられる抗ビタミン K 活性の存在によるものである可能性が示唆される。出血影響の機序を解明するための追加の試験が必要である。***原文中”seed”は”seen”の誤記であると思われますので訂正して訳しました。**

化学薬剤の発がん性を変更する BHT の能力につき追加試験が行われている。腫瘍発生の増強又は減少は、投与される化学物質、BHT の飼料添加時間、飼料中の BHT 濃度、また罹患*臓器部位により変動する。例えば BHT と FAA を同時に与えたラットの場合には、ラットを亜発がん濃度の飼料中 FAA に曝露したときにも膀胱腫瘍の有意な増加がみられた。しかし、これらの条件下で肝臓腫瘍の発生は減少した。いずれの場合も影響は用量関連であり、高い飼料中濃度の BHT でのみ影響が観察された。飼料中 BHT により、試験動物の胃腸管、乳腺、及び脾臓の腫瘍を引き起こす化学物質の発がん性も変化した。一試験において NIH-07 飼料使用時には BHT がラットの DMBA 誘導乳腫瘍の有効な阻害剤であったが、AIN-76A 飼料を与えた場合には無効であったため、BHT を添加する飼料の種類も BHT の阻害作用に影響する。別のマウス試験では、BHT を含む普通の試験用固形飼料から、BHT を含まない半合成飼料よりも自然発生腫瘍が高い発生率で生じたと報告されている。***原文中”effected”は”affected”の誤記ですので訂正して訳しました。**

BHT は、多数の *in vitro* 試験において変異原性ではなかった。しかし、BHT によりサルモネラ菌試験において 3,2'-ジメチル-4-アミノビフェニル及びベンジジンによる突然変異誘発が阻害された。

近年のウィスターラットによる二世世代生涯試験で、BHT により、肝細胞腺腫及び肝細胞がんの数の用量関連増加が生じた。肝細胞腫瘍の大半が 2 歳を過ぎたラットで検出された。過去に報告されたフィッシャー344 及びウィスターラットによる BHT の一世代発がん性試験は陰性であった(添付 1、引用文献 51 及び 63)。毒性評価への近年の試験における BHT の肝発がん性の有意性から多数の疑問が生じる。それは *in utero* 曝露、試験期間、及び試験動物の低体重等、近年のラット試験と過去に陰性と報告された試験との設計差に関するものである。*in utero* 影響の原因解明が優先事項である。

BHT を含む半合成飼料を 10 ヶ月間与えた雌雄の C₃H マウスによる試験では、試験条件下で雄の肝臓腫瘍の発生率が有意に増加したが、雌では増加しなかった。この影響は用量関連でなく、高用量よりも低用量でこれらの腫瘍の発生率が高かった(58%対 38%)。加えて、腫瘍発生率は同じ近交系による試験のほぼ同年齢の他の対照と有意に異ならず、**0.51***の BHT を含む飼料を 12 ヶ月間与えた雄 BALB/c マウスには肝臓腫瘍の発生増加は観察されなかったため、報告された肝細胞腫瘍(腺腫)の増加は系統特異的であるようであった。過去に報告された B6D3F1 マウスによる発がん性試験では、BHT は試験条件下で発がん性でなかった(添付 1、引用文献 54 及び 63)。***単位記号が抜けているようですが(0.5%?)、原文通りに記載しました。**

ラットの一世代生殖試験においては、BHT は妊娠率に影響しなかったが、一腹子数、一腹あたりの雄の数、及び授乳期中の体重増加に用量関連反応がみられた。JECFA の評価はこの試験の無影響量を基礎とした。

評価 (原文 p.13)

毒性影響が生じない濃度 (原文 p.13)

ラット: 25 mg/kg 体重/日(一世代生殖試験に基づく)

ヒトの暫定一日許容摂取量推定値 (原文 p.13)

0~0.125 mg/kg 体重

今後の試験又は情報 (原文 p.13)

1990 年までに必要なもの

1. ラットにおける肝発がん性に関する BHT in utero 曝露の解明。
2. 感受性種における BHT の出血影響の機序に関する試験。

ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要（評価書:JMPR 1986）

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
10 ヲ月間発がん性に関する特殊試験	C3H マウス	0.05% 又 は 0.5%BH	BHT を含む飼料で維持したマウスは対照より低体重であった。BHT を与えた雄マウスには、対照と比較して肝臓腫瘍の増加がみられた。腫瘍は組織学的に肝細胞腺腫と同定された。雌マウスには増加は観察されなかった。雄 C3H マウスにおける肝臓腫瘍の発生率は、0.5%BHT群、0.05%BHT群、BHTなし対照群、及び試験用固形飼料対照群でそれぞれ10/26(38%)、15/26(58%)、2/37(5%)、及び7/38(18%)と報告された。
10 ヲ月間	C3H マウス	0.5%BHT	2 つの雄マウス群における肝臓腫瘍発生率はそれぞれ、3/35(9%)及び5/29(17%)であった。飼料中 BHT は、雄又は雌いずれの C3H マウスにおいても肺腫瘍の発生率増加をもたらさなかった。
1 年間	雄 BALB/c マウス	BHT を含まない飼料 も し く は 0.05%BHT 又 は 0.5%BHT	肝臓腫瘍の発生率はそれぞれの群で 4/30(13%)、6/43(14%)、及び2/28(7%)であった。
12 ヲ月	C3H マウス		肝臓腫瘍の発生率は、雌で6~13%、雄で41~68%範囲であった。したがって、報告された肝細胞腫瘍の発生率は、同じ近交系を用いた試験におけるほぼ同年齢の他の対照と有意に異ならなかった。
多世代繁殖試験	ラット	0 mg、25 mg、100 mg、又は500 mg/kg 体 重 の BHT	中用量及び高用量群の F1 児動物の出生時平均体重は、対照群よりわずかに低かった。離乳から試験全体を通して、全ての投薬動物の体重が対照動物より低かった。低用量、中用量、及び高用量群における体重の減少は、雄で7%、11%、及び21%、雌で5%、10%、及び16%であった。摂食量は全ての群で同様であった。臨床的所見及び挙動は、全ての動物で正常と報告された。高用量の雄は、尿がわずかに赤かった。血液パラメータは BHT 処置により変化しないことが報告されたが、データは出されなかった。雌雄両方で血清トリグリセリドが減少し、雌だけコレステロールがやや上昇した。 全 BHT 摂取動物に生存の用量関連増加がみられた。雌雄両方に寿命の差($p < 0.001$)がみられた。組織学的試験で、雄ラットに肝細胞がんの増加(雌にはなし)、雄雌両方のラットに肝細胞腺腫の増加がみられた。ほとんどの肝臓腫瘍が141~144週目の最終屠殺の間に見つかった。対照雄で117週目に一つ、高用量の雄で132週目に一つの肝細胞がんが見つかった。残りのがんは最終屠殺時に見つかった。高投与量雄で115週目に最初の腺腫が認められた。表1及び2に、死亡率ならびに肝臓の腺腫及びがんの所見に関するデータをまとめている。
			全ての群の異質性検定又は傾向検定を行うと、雄 F1

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			ラットにおける肝細胞腺腫数の用量関連増加が統計学的に有意であった($p < 0.05$)。処置雌 F1 ラットにおける肝細胞腺腫及びがんの増加は、傾向解析で腺腫の増加だけが統計学的に有意であった($p < 0.05$)。 この試験を行っている試験室ならびに欧州の他の試験室による、ウィスターラットにおける肝細胞新生物の自然発生率の報告からは、発生率が通常 3%未満であることが示される。これらの試験における動物の平均寿命は、雄が 28 カ月間~36 カ月、雌が 28 カ月~33 カ月であった。 新生物病変の統計学的に有意でないわずかな増加が報告された他の部位は、甲状腺、脾臓、卵巣、子宮、胸腺、細網内皮系、及び乳腺である。 非新生物病変が偶然に生じ、BHT 処置とは関係がなかったが、例外的に肝臓の病変には雄において胆管増殖及び嚢胞、雌において局所性細胞増大の発生率の用量関連増加がみられた。 最高投与群(250 mg/kg 体重)で腎臓への副作用はなかった。
<i>in vitro</i> 系変異原性に関する特殊試験 突然変異試験	サルモネラ菌/ミクロソーム	0.01~10 mg/プレート間の 4 用量	陰性
	肝細胞初代培養/DNA 修復試験	10 ⁻⁵ ~1 mg/mL の範囲の 10 用量	陰性
成熟ラット肝上皮細胞/ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ突然変異誘発	ラット肝上皮細胞株 18	0.05~0.1 mg/mL の範囲の 6 用量	陰性
姉妹染色分体交換(SCE)アッセイ	チャイニーズハムスター卵巣	10 ⁻⁵ ~1 mg/mL の範囲の 4 用量	陰性
51 週間発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験(胃腸管)	雄 F344 ラット	N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンの単回用量で処置後、BHT なし、1.0%BHT、5%NaCl、又は 5%NaCl + 1.0%BHT	各群の前胃の扁平上皮がんの発生率は、対照群で 11%、BHT 群で 15.8%、NaCl 群で 3.0%、BHT+NaCl 群で 52.9%であった。
36 週間発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験(胃腸管)	ラット	1,2-ジメチルヒドラジンを 4 回注射(週 1 回)後、0.5%飼料中濃度の BHT	結腸腫瘍のラット数に影響しなかったが、ラットあたりの遠位結腸の腫瘍数が有意に減少した。

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
25 週間発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験	ウイスターラット	N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン処置(1.0 mg/mL の濃度で飲料水中投与)の間に飼料中 1.0%BHT	胃癌発生率の有意な減少がみられた(82%対 36.8%)。
発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験	雄 BALB/c マウス	メチルニトロソ尿素による直腸内処置後に BHT	胃腸管腫瘍の発生率及び多様性の著しい増加がみられた。
発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験	BALB/c マウス	ジメチルヒドラジンを注射(週 1 回で 6 回注射)後、対照(BHT を含まない)飼料もしくは 0.05%BHT 又は 0.5%BHT	。各群の結腸腫瘍発生率はそれぞれ 3/30(10%)、0/43、及び 9/28(32%)であった。
32 週間発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験(膀胱)	雄 F344 ラット	飲料水中 0.01%又は 0.05%N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン(BBN)で 4 週間処置後、0%又は 1%BHT	0.05%BBN で処置したラットの膀胱癌及び膀胱乳頭腫の発生率が有意に増加したが、0.01%BBN で処置したラットには同様の増加はみられなかった。
25 週間発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験(膀胱)	ラット	200 ppm の N-2-フルオレニルアセタミド(FAA)を単独で、又は 6000 ppm の BHT	FAA の単独投与では膀胱新生物は生じなかったが、FAA 及び BHT の同時投与により 17/41 に膀胱乳頭腫、3/41 に膀胱がんが生じた。
25 週間発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験(膀胱)		BHT(300 ppm、1000 ppm、3000 ppm、又は 6000 ppm)を、200 ppm の FAA	FAA の単独投与では新生物は生じなかったが、3000 ppm 又は 6000 ppm の BHT と組み合わせた場合には、膀胱腫瘍の発生率はそれぞれ 18%及び 44%であった。300 ppm 及び 1000 ppm BHT 群の膀胱腫瘍の発生率は低く、FAA 単独での発生率と有意に異ならなかった(肝臓への影響も参照)。
32 週間発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験(膀胱)	雄 F344 ラット	メチルニトロソ尿素(MNU 11	膀胱の乳頭腫及び乳頭状過形成又は結節性過形成の群あたりの発生率及びラットあたりの数が有意に増加した。MNU+BHT による処置により甲状腺腫の発生率も増加した(しかし甲状腺がんの発生率は増加しなかった)。
25 週間発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験(肝臓)	ラット	200 ppm の FAA を単独で、又は 6000 ppm の BHT	FAA 単独では 100%の肝臓新生物発生が誘導された。BHT の同時投与により、良性新生物、新生物結節ならびに悪性がん及び肝細胞がんの頻度が減少した。
25 週間発がん性の増強又は阻害に関する		BHT(300 ppm、1000 ppm、3000 ppm、又は 6000	腫瘍発生率の用量依存的減少が生じた(BHT の非存在下で 100%から 6000 ppm BHT で 56%の発生率)(膀胱への影響も参照)。

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
特殊試験（肝臓）		ppm)を 200 ppm の FAA	
22 週間発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験（肝臓）	ラット	200 ppm の FAA を 8 週間、その後 300 ppm、1000 ppm、3000 ppm、又は 6000 ppm 濃度の BHT	最高用量群で鉄放出及び FAA 投与により誘導されたガンマグルタミルトランスフェラーゼ (GGT) 活性により同定される肝細胞変化巣の領域に発現増加がみられた (病巣数、GGT 陽性新生物発生前病変ならびに新生物病変の占める領域、及び新生物発生率が増加した)。より低い BHT 濃度ではこれらのパラメータに影響はなかった。
6 週間発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験（肝臓）	ラット	200 mg/kg 体重のジエチルニトロサミンを単回 i.p. 注射した後、1%BHT	3 週目にラットの部分肝切除を行った。BHT を投与したラットの肝臓のガンマグルタミルトランスペプチダーゼ陽性巣の数は、対照と比較して有意に少なかった。
発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験（乳腺）	雌ラット	0%、0.25% 又は 0.5%BHT	試験飼料を、(a)7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン (DMBA)の投与の 2 週間前から 1 週間後まで、又は (b)DMBA 投与の 1 週間後から試験終了まで(30 週)与えた。DMBA は 8 mg の単回用量として投与した。BHT は、これらのいずれかの時間枠の間で投与したときに、乳がん発がんを有効に阻害した(投与(a)で 20%、投与(b)で 50%)。
発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験（乳腺）	雌スピローグドーリーラット	DMBA	飼料中 BHT が、DMBA により誘導される乳腫瘍の発生率を減少させることが分かったが、MNU で処置した動物には無効であった。
発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験（乳腺）			BHT の阻害作用は、がん誘発物質の用量及び BHT を投与する飼料の種類に大きく影響された。AIN-76A 飼料中の BHT の投与による効果は、NIH-07 飼料中の BHT による効果と顕著に異なった。AIN-76A 飼料中の 6000 ppm の BHT は 15 mg の DMBA により誘導される乳腫瘍の発生率に影響しなかったが、NIB-07 飼料中の同濃度の BHT は腫瘍発生を 40%阻害した。
4 ヶ月間発がん性の増強又は阻害に関する特殊試験（脾臓）	雄 LEW 近交系ラット	30 mg のアザセリン注射を週 1 回 3 週間行った後、0% 又は 0.45%BHT	脾臓あたりの好酸性病巣数が 32%減少したが、病巣の大きさには影響がなかった。BHT は、好塩基性病巣の発生には影響しなかった。
突然変異誘発の増強又は阻害に関する特殊試験	ネズミチフス菌 (Salmonella typhimurium) 株 TA98 及び TA100	50~250 µg/プレート	ラット肝臓 S-9 画分の存在下において 3,2'-ジメチル-4-アミノビフェニルによる突然変異誘発が阻害された。
突然変異誘発の増強又は阻害に関する特殊試験	ネズミチフス菌 株 TA98	記載なし	ハムスター肝 S-9 画分で活性化したにおけるベンジジンによる突然変異誘発の中程度に有効な阻害剤であった。
突然変異誘発の増強又は阻	ネズミチフス菌 株 TA98 及び	100~250 µg/プレート	3,2'-ジメチル-4-アミノビフェニルによる突然変異誘発を阻害することが分かった。BHT を含まない飼料を与

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
害に関する特殊試験	TA100		えたラットの S-9 調製物と比べ、飼料中 BHT(0.6%)を与えたラットの S-9 調製物の使用により、変異原性がさらに阻害された。
突然変異誘発の増強又は阻害に関する特殊試験	ネズミチフス菌株 TA98 及び TA100	5~20 µg/プレート	活性化の有無を問わずアフラトキシン B1 の突然変異誘発能が 2 倍に増加した。
肺毒性	マウス		BHT アナログの肺毒性の試験において、毒性活性に必須の構造特徴が、(i)4 位メチル基と(ii)水酸基の中程度の立体障害効果を生じうるオルトのアルキル基(単数又は複数)を有するフェノール環構造であることが確かめられた。
肺毒性	マウス		4-メチル基の重水素化により BHT の毒性強度が減少し、BHT 投与後の肺障害が代謝物 2,6-ジ・tert-ブチル-4-メチレン-2,5-シクロヘキサジエノンにより生じることが示唆された。
肺毒性	雄マウス		単回投与したマウスには肺の超微構造変化がみられ、その変化は I 型上皮細胞の選択的破壊と II 型立方細胞による代替を特徴とした。これらの変化には、カタラーゼ活性ならびにペルオキシソーム数の著しい減少が伴った。
肺毒性	マウス		50 mg/kg を上回る用量のウレタンで処置したマウスの肺腫瘍発生率を高めることが分かった。。
生殖試験	ウイスターラット	0 mg、25 mg、100 mg、又は 500 mg/kg 体重/日	高用量群の雌雄のラットには、試験の間中持続した有意な体重減少がみられた。妊娠率は全ての試験群で同程度であった。一腹児数及び一腹あたりの雄の数は、500 mg/kg 体重群で対照より有意に低かった。授乳期生存率は試験群と対照群で同程度であった。500 mg/kg 体重/日及び 100 mg/kg 体重/日の群の児動物の平均出生時体重は、対照よりわずかに低かった。授乳期中、飼料中 BHT により体重増加が用量に関連して有意に低くなった(25 mg、100 mg、及び 500 mg/kg 体重/日の群で対照と比べてそれぞれ 5%、7%、及び 41%低体重)。
その他			ADI:0~0.125 mg/kg 体重 毒性影響が生じない濃度(ラット): 25 mg/kg 体重/日(一世代生殖試験に基づく)

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
BHT	Butylated hydroxytoluene	ブチルヒドロキシトルエン
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives	FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
FAO	Food and Agriculture Organization	国連食糧農業機関
WHO	World Health Organization	世界保健機関
LD ₅₀	50% Lethal Dose	半数致死量
i.p.	intraperitoneal	腹腔内
ADP	Adenosine diphosphate	アデノシン二リン酸
BBN	N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine	N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン
FAA	N-2-fluorenylacetamide	N-2-フルオレニルアセタミド
MNU	Methylnitrosourea	メチルニトロソ尿素
GGT	Gamma-glutamyl transferase	ガンマグルタミルトランスフェラーゼ
DMBA	7,12-dimethylbenz(a)anthracene	7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン

ジブチルヒドロキシトルエン 評価書和訳と情報整理

JECFA 1990

ウェブサイト: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v28je02.htm>

FAS 28-JECFA 37/3, 1990

ジブチルヒドロキシトルエン 評価書と訳と情報整理 JECFA (1990) 目次

1. 説明 (原文 P.1)	132
2. 生物学的データ (原文 P.1)	132
2.1 生化学的側面 (原文 P.1)	132
2.1.2 生体内変化 (原文 P.1)	132
2.1.3 酵素及び他の生化学的パラメータへの影響 (原文 P.2)	133
2.2 毒性試験 (原文 P.3)	134
2.2.2 短期試験 (原文 P.3)	134
2.2.3 長期/発がん性試験 (原文 P.3)	134
2.2.3.1 マウス (原文 P.3)	134
2.2.3.2 ラット (原文 P.3)	134
2.2.4 生殖試験 (原文 P.3)	134
2.2.5 胚毒性に関する特殊試験 (原文 P.4)	135
2.2.6 遺伝毒性に関する特殊試験 (原文 P.4)	135
2.2.7 肝毒性に関する特殊試験 (原文 P.4)	136
2.2.7.1 マウス (原文 P.5)	136
2.2.7.2 ラット (原文 P.5)	136
2.2.8 出血影響に関する特殊試験 (原文 P.5)	136
2.2.9 癌の増強又は阻害に関する特殊試験 (原文 P.6)	137
2.2.9.1 膀胱 (原文 P.6)	137
2.2.9.2 乳腺 (原文 P.7)	138
2.2.9.3 皮膚 (原文 P.7)	138
2.2.9.4 胃腸管 (原文 P.7)	139
2.2.9.5 肝臓 (原文 P.8)	139
2.2.9.6 肺 (原文 P.9)	140
2.2.10 肺毒性に関する特殊試験 (原文 P.9)	141
2.2.11 腎毒性に関する特殊試験 (原文 P.10)	141
2.3 ヒトにおける観察 (原文 P.10)	142
3. コメント (原文 P.11)	142
4. 評価 (原文 P.12)	143
ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要 (評価書: JMPR 1990)	144
略称	151

原文 目次

原文ページ

ブチルヒドロキシトルエン(BHT)	1
1. 説明	1
2. 生物学データ	1
2.1 生化学的側面	1
2.1.1 吸収、分布、及び排泄	1
2.1.2 生体内変化	1
2.1.3 酵素及び他の生化学的パラメータへの影響	2
2.2 毒性試験	3
2.2.2 短期試験	3
2.2.3 長期/発がん性試験	3
2.2.3.1 マウス	3
2.2.3.2 ラット	3
2.2.4 生殖試験	3
2.2.5 胚毒性に関する特殊試験	4
2.2.6 遺伝毒性に関する特殊試験	4
2.2.7 肝毒性に関する特殊試験	4
2.2.7.1 マウス	5
2.2.7.2 ラット	5
2.2.8 出血影響に関する特殊試験	5
2.2.9 癌の増強又は阻害に関する特殊試験	6
2.2.9.1 膀胱	6
2.2.9.2 乳腺	7
2.2.9.3 皮膚	7
2.2.9.4 胃腸管	7
2.2.9.5 肝臓	8
2.2.9.6 肺	9
2.2.10 肺毒性に関する特殊試験	9
2.2.11 腎毒性に関する特殊試験	10
2.3 ヒトにおける観察	10
3. コメント	11
4. 評価	12
5. 引用文献	12
 BUTYLATED HYDROXYTOLUENE (BHT)	1
1. EXPLANATION	1
2. BIOLOGICAL DATA	1
2.1 Biochemical aspects	1
2.1.1 Absorption, distribution, and excretion	1
2.1.2 Biotransformation	1

2.1.3 Effects on enzymes and other biochemical parameters	2
2.2 Toxicological studies	3
2.2.2 Short-term studies	3
2.2.3 Long-term/carcinogenicity studies	3
2.2.3.1 Mouse	3
2.2.3.2 Rat	3
2.2.4 Reproduction studies	3
2.2.5 Special studies on embryotoxicity	4
2.2.6 Special studies on genotoxicity	4
2.2.7 Special studies on liver toxicity	4
2.2.7.1 Mouse	5
2.2.7.2 Rat	5
2.2.8 Special studies on haemorrhagic effects	5
2.2.9 Special studies on potentiation or inhibition of cancer	6
2.2.9.1 Bladder	6
2.2.9.2 Mammary gland	7
2.2.9.3 Skin	7
2.2.9.4 Gastro-intestinal tract	7
2.2.9.5 Liver	8
2.2.9.6 Lungs	9
2.2.10 Special studies on pulmonary toxicity	9
2.2.11 Special studies on nephrotoxicity	10
2.3 Observations in humans	10
3. COMMENTS	11
4. EVALUATION	12
5. REFERENCES	12

ブチルヒドロキシトルエン(BHT)(原文 p.1)

デンマーク食糧庁毒性研究所 J.C.Larsen 博士による第一草稿

1. 説明 (原文 p.1)

FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議の第 6 回、8 回、9 回、17 回、20 回、21 回、24 回、27 回及び 30 回会合で、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)の一日許容摂取量(ADI)が評価された(添付 1、引用文献 6、8、11、32、41、44、53、62、及び 73)。これらの会合後、毒性モノグラフ又はモノグラフ補遺が発表された(添付 1、引用文献 6、9、12、33、42、54、63、及び 74)。同会議は第 30 回会合で、ラットの一世代生殖試験における 25 mg/kg 体重/日の無影響量に基づき、0~0.125 mg/kg 体重の暫定 ADI を確立した。同会議は、in utero 曝露後のラットにおける BHT の肝発がん性を解明するためのさらなる試験又は情報、ならびに感受性種における BHT の出血影響の機序についての試験を要請した。

過去の評価以来得られている追加データを以下のモノグラフ補遺でまとめ、論じる。

2. 生物学的データ (原文 p.1)

2.1 生化学的側面 (原文 p.1)

2.1.1 吸収、分布、及び排泄 (原文 p.1)

雄 F344 ラットに飼料中 0/0、0.5/0.05、1.0/0.1 及び 2.0/0.2%濃度で BHA/BHT 混合物を与え、脂肪組織中の化合物の濃度を 1 ヶ月後、2 ヶ月後、及び 4 ヶ月後に測定した。投与動物の脂肪組織の BHT の濃度はそれぞれ 1.4、2.9、及び 7.8 ppm であった。同じ投与基準で BHT は BHA の濃度の 10 倍蓄積した。しかし、いずれも時間に伴う進行性蓄積はみられなかった。6 人のヒトからの脂肪組織には、0.12 ppm の BHT が含まれていた。ヒトによる BHT の平均摂取量とラットの脂肪組織のデータを考慮し、ラットよりヒトのほうが投与量/体重基準での脂肪組織の BHT 蓄積が多いという過去の観察が確認された(Conacher et al., 1986)。

2.1.2 生体内変化 (原文 p.1)

ラット及びマウスからの肝臓及び肺マイクロソームを用いて BHT の代謝を試験した。二つの主な代謝プロセス、アルキル置換基の水酸化及び芳香族 π 電子系の酸化が生じる。前者からは、*t*-ブチル基(BHT-*t*BuOH)の水酸化により4-ヒドロキシメチル生成物(BHT-CH₂OH)及び第一アルコールが生じる。BHT-CH₂OH の対応するベンズアルデヒド及び安息香酸誘導体への酸化により、追加的代謝物が生成された。BHT-*t*BuOH の水酸化はベンジル位メチル基で起き、その結果生じたジオールがさらにヒドロキシベンズアルデヒド誘導体に酸化される。 π 系の酸化からは、おそらくヒドロペルオキシド(BHTOOH)を介して BHT-キノール(2,6-ジ-*t*-ブチル-4-ヒドロキシ-4-メチル-2,5-シクロヘキサジエノン)、BHT-キノン(2,6-ジ-*t*-ブチル-4-ベンゾキノン)、及び BHT-キノンメチド(2,6-ジ-*t*-ブチル-4-メチレン-2,5-シクロヘキサジエノン)が生じる。水酸化 *t*-ブチル基を有するキノール及びキノンの誘導体も形成された。定量的データは、BHT-CH₂OH がラット肝及び肺マイクロソームにおける主要代謝物であることを示す。マウスはこれらの組織で BHT-CH₂OH 及び BHT-*t*BuOH の両方を大量に生成する。ラットの肝臓と肺の代謝物プロファイルは類似していた。しかし、マウス肺はマウス肝臓よりも他の代謝物に対してキ

ノンを多く生成した(Thompson et al., 1987)。

三つの近交系マウス株 NGP/N、A/J 及び MA/MyJ からの肝ミクロソームによる BHT の酸化代謝を比較した。記載の株の順に、これらのマウスの *tert*-ブチル基の一つでの BHT の水酸化による BHT-BuOH 生成能の増加と相関する BHT の肺腫瘍促進に対する感受性が高くなる。BHT の週 1 回、4 回の i.p.注射は、BHT-BuOH の形成につながる BHT 酸化経路を選択的に誘導した(Thompson et al., 1989)。

マウス皮膚の腫瘍促進の媒介における反応中間体の役割を評価するために、BHTOOH の代謝を検討した。単離した新生児マウスケラチノサイト又は無細胞のヘマチン系と BHTOOH の培養で、BHT-フェノキシラジカルが生成された。ケラチノサイトにおいては BHTOOH-BHT-キノールの非ラジカル代謝物が一つだけ検出されたが、ヘマチンとの BHTOOH の培養からは複数の代謝物：オキサシクロペンテノン、BHT-キノン、BHT、BHT-スチルベンキノン、及び BHT-キノンメチドが生成された。BHTOOH の作用と対照的に、BHT 自体ならびに BHT-キノール、BHT-キノン、BHT-スチルベンキノンのマウス皮膚の表皮への局所投与により、表皮オルニチンデカルボキシラーゼ活性は誘導されなかった(Taffe et al., 1989)。

雄羊の精囊からのミクロソームにおいてプロスタグランジン H シンターゼ系により、又はホースラディッシュペルオキシダーゼにより $[^{14}\text{C}]\text{BHT}$ を *in vitro* で活性化すると、有意なタンパク質に対する共有結合が検出できた。わずかな濃度でのみ BHT-キノンメチドが検出され、したがって中間体フリーラジカルが活性代謝物として示唆された。培地への BHA の添加により、BHT-キノンメチドの形成及びタンパク質に対する共有結合が大幅に増加した(Thompson et al., 1986)。

亜毒性用量(200 mg/kg 体重) の BHT との BHA(200 mg/kg 体重)の同時投与により、雄 ddy マウスにおいて BHT の肺毒性が増強された。BHA の同時投与により、 $[^{14}\text{C}]\text{BHT}$ の 4~8 時間後に肺の巨大分子に共有結合した放射能が有意に増加した。前処置により、マウス肝臓上清における BHT の *in vitro* 代謝の速度も減少した。著者らは、BHA と BHT の同時投与により肝臓における BHT の代謝が減少し、その結果肺がより多量の BHT に曝露されることを示唆する(Yamamoto et al., 1988)。

BHA の添加により、BHT のミクロソームタンパク質に対する *in vitro* ペルオキシダーゼ触媒共有結合及び BHT-キニーネメチドの形成が増強された。食品に一般的に用いられる他のいくつかのフェノール化合物も、BHT の代謝活性化を増強した。ヒトを含む様々な動物種の肺、膀胱、腎臓髄質及び小腸のミクロソームも、過酸化水素又はアラキドン酸を基質として用いて、この BHA と BHT の相互作用を支持できた。

BHA の皮下注射により、閾値下用量の BHT を腹腔内注射したマウスの肺重量/体重比が有意に上昇した(Thompson et al., 1986)。

2.1.3 酵素及び他の生化学的パラメータへの影響 (原文 p.2)

4 匹の雄 F344 ラットの群をブチオニンスルホキシイミン(900 mg/kg 体重)で前処置し、1 時間後に BHT(100、250、400、又は 500 mg/kg 体重)を腹腔内注射した。血清 GOT(グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ)及び GPT(グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ)活性の用量関連増加が観察された。BHT 又はブチオニンスルホキシイミン単独では、影響はなかった。血清酵素活性の増加は、肝グルタチオン(GSH)濃度の著しい減少を伴った。これに対しシステイン(100~200 mg/kg 体重)による前処置は、BHT の毒性用量(1000 mg/kg

体重)で血清酵素活性の増加を阻害した(Nakagawa, 1987)。

AAF 含有飼料への 0.3%BHT の添加は、高脂肪を与えたスピローグドーリーラットにおいて AAF 肝発がんに対する保護をもたらすが、これにより肝核膜のシトクロム P-450 総含量が保護及び/又は誘導された。AAF を含み BHT を含まない短期給餌により、肝核膜の P-450 総量が著しく失われるが、P-450c 及び d が誘導される (Carubelli & McCay, 1987)。免疫学的試験により、BHT が AAF による P-450c 誘導を増強するが、P-450d 誘導は増強しないことが分かった。BHT だけではこれらの核膜酵素に影響しなかった(Friedman et al., 1989)。

2.2 毒性試験 (原文 p.3)

*2.2.1 がありません。

2.2.2 短期試験 (原文 p.3)

2.2.7~2.2.11: 特殊試験を参照。

2.2.3 長期/発がん性試験 (原文 p.3)

2.2.3.1 マウス (原文 p.3)

B6C3F1 マウスに BHT を飼料の 1%及び 2%濃度で 104 週間連続して経口投与した。処置動物を 16 週間回復させてから病理検査を行った。BHT を投与した雄マウスでは、肝細胞腺腫又は肝細胞変化巣をもつマウスの発生率が明らかな用量反応関係を示して増加した。他の腫瘍をもつ雄マウスの発生率及び任意の腫瘍をもつ雌マウスの発生率は、BHT 投与の結果として有意に増加することはなかった(Inai et al., 1988)。

2.2.3.2 ラット (原文 p.3)

二世代にわたり、すなわち in utero 曝露を含めて BHT を与えたラットでの、慢性毒性における肝臓変化の発現及び役割を調べるための長期試験が開始されている。この試験は、BHT 後 F₁ 世代の雄に肝腫瘍の増加がみられた Olsen et al., (1986)による二世代試験の模倣を目指すものである。試験では雄の児動物だけを検討し、また Olsen et al., (1986)は半合成飼料を用いたが、本試験では従来の標準飼料を用いる。用量設定試験の結果が得られており、2.2.4 生殖試験の項にまとめる。主試験(F₁ 世代の 7 ヶ月まで)からの暫定結果が入手できた。レビューは試験の最終報告を待つ。

2.2.4 生殖試験 (原文 p.3)

妊娠前及び妊娠期間中に曝露された雌ラットならびに in utero から離乳まで同様に曝露された児ラットが耐容できる BHT の最高飼料投与量を決定するために、用量設定試験を開始した。雄 3 匹及び雌 16 匹のウィスターラットの群に、0、500、750、及び 1000 mg/kg 体重/日に対応する飼料中 BHT を交配前 3 週間投与した。一群あたり少なくとも 8 匹の雌に妊娠期間中から離乳(出産の 21 日後)まで投与した。交配後、雄及び残りの雌を剖検した。これらの動物において、処置による血液凝固時間への影響はみられなかった。試験の 4 週目以降の処置雌の摂食量は対照よりかなり多かった。体重については明らかに用量関連の減少傾向があったが、有意な影響はなかった。処置動物の被毛変色を除き、健康状態への影響はみられなかった。

1000 mg/kg 体重/日の BHT で前処置したラットは、他の群より交配成功頻度が低かった。妊娠雌群の間で大きな差は観察されなかった。最も高い二つの用量で処置したラットにおける体重増加が、妊娠の最終週に阻害されているようであった。対照ラットから生まれた児動物と処置動物から生まれた児動物との間では、一腹子数に用量関連の減少傾向がみられたが、**一腹児数***又は一腹総体重に有意差はなかった。BHT の催奇形性影響の所見は得られなかった。***原文中”litter number”が”litter size”と同義で使用されていると思われます。**

一腹子数を、可能な場合 8 匹の児動物に標準化した。1000 mg/kg 体重/日の BHT で処置した母動物は離乳時により低体重で、剖検でごくわずかな体脂肪しか観察されなかった。最低 BHT 用量で処置した母動物の児は顕著な発育不良を呈したが、健康に見えた。最も高い二つの用量で処置した母動物の児は重度の発育不良を呈し、被毛状態が悪く、より不活発であった。BHT 処置動物の一腹子数が 8 未満の場合には大抵、児動物の平均体重がかなり高いことが注目された。このことは、普通の一腹子数の体重増加の低減が BHT の毒性ではなく乳汁分泌不良に関係するものであることを示唆している。各用量群から二組の同腹児からの児動物を、離乳後 4 週間対照飼料で維持した。BHT 含有飼料を与えた母動物に生まれた児動物は、対照児動物より低体重のままであった。最も高い二つの用量群からの児動物は不良状態を呈し続けた。BHT 処置により全母動物で肝臓重量が著しく増加した。肝臓重量は体重のほぼ 10%、すなわちラットにおいて可能な最大限に膨大していた。BHT 処置した母動物の児の相対肝臓重量は、対照と異ならなかった(Robens, 1990)。

2.2.5 胚毒性に関する特殊試験 (原文 p.4)

2.2.3.2 を参照

2.2.6 遺伝毒性に関する特殊試験 (原文 p.4)

サルモネラ検定系統 TA97、TA102 及び TA104、ならびに TA100 を用いて BHT の変異原作用を再評価した。BHT には代謝活性化の有無にかかわらず変異原作用はみられなかった。相乗効果を検出するために BHA と BHT を組み合わせて試験したが、変異原作用はなかった(Hageman et al., 1988)。

BHT(0.11~11 μ M)は、ラット肝細胞において、不定期 DNA 合成の著しい減少により示される 2-アセチルアミノフルオレン(2AAF)又は N-ヒドロキシ 2AAF により誘導される DNA 損傷に対する保護を提供した。BHT は、ヒト肝細胞における 2AAF 誘導 DNA 損傷も阻害した。加えて、飼料中 0.5%BHT で 10 日間前処置したラットの肝細胞は、2AAF 又は N-ヒドロキシ 2AAF に曝露したときに対照ラットの肝細胞よりも不定期 DNA 合成が少なかった(Chipman & Davies, 1988)。

20 匹の雄スピローグドーリーラット(50、150、及び 500 mg/kg 体重/日)及び 11 匹の雄マウス(101xC3H)F₁ の群に BHT を飼料中 1%濃度でそれぞれ 10 週間及び 8 週間与えた後、優性致死試験を行った。マウスには誘導された遺伝性転座試験も行った。ラットにおいては、有意性の疑わしい優性致死影響が記録された。マウスの優性致死試験及び遺伝性転座試験の結果からは、BHT の副作用は示されなかった(Sheu et al., 1986)。

BHT は 10 μ g/mL(最適 50~100 μ g/mL)の低さの濃度で、SV-40 で形質転換したジャンガリアンハムスター繊維芽細胞の培養において細胞間染料移動(ルシファーイエロー移動)に対し強い阻害影響を及ぼした。影響は可逆性であった。BHT はこの影響を一連の周知の腫瘍プロモータと共有した(Budunova et al., 1989)。

2.2.7 肝毒性に関する特殊試験 (原文 p.4)

2.2.7.1 マウス (原文 p.5)

グルタチオン(GSH)合成阻害剤ブチオニンスルホキシイミン(BOS; BHT の 1 時間前及び 2 時間後、i.p.投与あたり 4 mmol/kg 体重)と組み合わせて BHT(200~800 mg/kg 体重)で経口処置した雄 ddy マウスの群は、血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)活性の増加及び小葉中心性肝細胞壊死を特徴とする肝毒性を呈した。肝毒性反応は時間及び用量の両方に依存していた。BHT(最高 800 mg/kg)単独では肝損傷の所見は生じなかった。SKF-525A、ピペロニルブトキンド、及び二硫化炭素等の薬物代謝阻害剤は、BOS と併用して与えた BHT の肝毒性影響を妨げたが、フェノバルビタール等の薬物代謝誘導剤は、肝損傷を増加させる傾向があった。結果から、BHT がシトクロム P450 依存性代謝反応により活性化され、BOS 投与により肝 GSH を枯渇させたマウスにおいては反応性代謝物の不適切な解毒速度により肝毒性影響が生じることが示唆される。著者らは BHT の構造類似体を用いた試験に基づき、BHT-キノンメチドがマウスにおける肝毒性に関与しうることを示唆した(Mizutani et al., 1987)。

2.2.7.2 ラット (原文 p.5)

8 匹の雄ウィスターラットの群に、0、0.1、0.25、0.5、及び 0.75%BHT を含む飼料を 30 日間与えた。BHT は 30 日後に^[3H]チミジン標識率又は分裂指数により測定される肝臓、膀胱又は甲状腺の細胞増殖を誘導しなかった。第二の試験では、8 匹のラットの群を飼料中 0.5%BHT で 2、4、8、10、及び 14 日間処置した。この処置により肝細胞^[3H]チミジン標識率が一時的に増加したが、8 日以内に対照値まで下がった。この肝細胞の^[3H]チミジン標識の増加に伴い、分裂指数が予想外に大きく増加した(Briggs et al., 1989)。

雌スピローグドーリーラットの群に 700 mg/kg 体重の BHT を与え、4 時間及び 21 時間後に選択された肝臓の生化学的影響を測定した。オルニチン脱炭酸酵素(ODC)活性及びシトクロム P-450 含量がそれぞれ 190% 及び 30%増加した。肝グルタチオン含量又は血清アラニンアミノトランスフェラーゼ活性への影響はみられなかった。DNA アルカリ溶出の増加により測定される肝 DNA 損傷の徴候が得られた。BHT 用量が 140 mg/kg 体重のときには、これらのパラメータへの影響は検出できなかった。高用量の BHT が DNA 損傷影響を有すると結論された(Kitchin & Brown, 1987)。

雄ウィスターラットに BHT を 0、25、250 又は 500 mg/kg 体重/日の用量で 7 日間(5 匹/群)又は 28 日間(10 匹/群)、また、1000 及び 1250 mg BHT/kg 体重(5 匹/群)の一日量で最長4日間(亜致死量)、強制経口投与した。亜致死量投与では 48 時間以内に小葉中心性壊死が誘導されたが、より低用量の BHT を 7 日又は 28 日間投与した場合には用量関連肝腫大が生じ、最高用量群では進行性門脈周囲肝細胞壊死が誘導された。門脈周囲病変は胆管増殖、持続性線維性及び炎症性細胞反応、肝細胞過形成ならびに肝細胞及び核膨大を伴った。250 mg/kg 体重/日後も細胞障害の所見が得られたが、25 mg/kg 体重/日の用量群で BHT が肝障害を引き起こすという所見はなかった。生化学的変化は、エポキシドヒドロラーゼの用量関連誘導、シトクロム P-450 アイソザイム比率の用量関連変化及びグルコース-6-フォスファターゼの抑制から成った。BHT の測定では脂肪中の用量関連蓄積がみられたが、肝臓にはみられなかった(Powell et al., 1986)。

2.2.8 出血影響に関する特殊試験 (原文 p.5)

4~5 匹の雄スピローグドーリーラット(生後 5~6 週)の群に 1.2%ブチルヒドロキシトルエン(BHT)を含む飼料を 1~7 日間与え、血液凝固因子 II(プロトロンビン)、VII、VIII、IX 及び X、ならびに血小板凝集を測定した。BHTの平均摂取量は約 1000 mg/kg体重/日であった。II、VII、IX及びX因子の血漿中濃度は、BHTを2~7 日間投与したときに時間依存的様式で有意に減少し、BHT を 4~7 日間与えたラットには精巣上体の出血が見つかった。一方、トロンビン誘導性及びカルシウム要求性の洗浄血小板凝集は試験全体を通して不変であった。これらの結果から、BHT の投与直後に II、VII、IX 及び X 因子が急速に減少することが示唆されるが、血小板の凝集能亢進は出血により引き起こされる二次的障害でありうる(Takahashi, 1986)。

4~10 匹の雄スピローグドーリーラット(生後5~6週間)の群に、800 mg/kg体重の BHT を単回経口投与し、0.5~72 時間後に血液凝固因子 II(プロトロンビン)、VII、IX 及び X の血漿中濃度ならびに肝臓の BHT 及び BHT-キノンメチドの濃度を測定した。凝固因子の濃度は BHT 処置の 36~60 時間後に減少したが、72 時間までにいくらか回復した。肝臓 BHT 濃度は BHT 投与の 3 時間後(主要ピーク)及び 24 時間後に最大値に達し、BHT-キノンメチドは 6 時間後及び 24 時間後(主要ピーク)に最大値に達した。BHT を 200、400 及び 800 mg/kg 体重の用量で与えたときには、II、VII 及び X 因子は最高用量を与えたラットにおいてのみ 48 時間後に減少したが、IX 因子は BHT 感受性がより高く、用量依存性減少がみられた。フェノバルビタールによる 3 日間の前処置又は試験全体にわたる飼料中 1%システイン投与のいずれも、800 mg/kg の BHT によるビタミン K 依存性因子の減少を妨げなかった。これに対して、塩化コバルト又は SKF525A による前処置は、血液凝固因子の減少を部分的に防げた。これらの結果から、抗凝固作用に BHT の代謝活性化が必要でありうることを示される(Takahashi, 1987)。

上述の試験及び同じ試験室の過去の試験(添付 1、引用文献 54、63 及び 74)で用いた飼料は、ビタミン K が添加されておらず、動物は明らかにビタミン K 貯蔵が枯渇し、わずかにビタミン K 欠乏であった(Faber, 1990)。

ビタミン K 欠乏飼料で維持した雄スピローグドーリーラットのプロトロンビン時間を延長し、出血死を引き起こす上で、BHT は合成レチノイドより効率が低かった(McCarthy et al., 1989)。

2.2.9 癌の増強又は阻害に関する特殊試験 (原文 p.6)

2.2.9.1 膀胱 (原文 p.6)

20 匹の雄(生後 6 週)F344 ラットの群を飲料水中 0.05%N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミンで 2 週間前処置し、その後 0、0.25、0.5、又は 1%BHT を含む飼料を与えた。試験の 22 日目に、各ラットの左尿管下部を結紮した。試験の 24 週目に動物を殺した。BHT により膀胱の前新生物病変、乳頭状過形成又は結節性過形成の発生率及び数が用量依存的に増加した。膀胱病変の発生率は特に 1% BHT で増加した(Fukushima et al., 1987)。

20 匹の雄(生後 6 週)F344 ラットの群を飲料水中 0.05%N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミンで 4 週間前処置し、その後 0、0.4% BHA + 0.4% BHT + 0.4% TBHQ、又は 0.8% BHT を含む飼料で維持した。36 週間後に試験を終了した。BHT 含有飼料を与えた全ての群で、尿中結晶及び膀胱の乳頭状過形成又は結節性過形成の発生率及び密度の増加を観察した。膀胱乳頭腫及びがんの発生率は増加せず、腎盂に増殖性変化はみられなかった。0.8%BHT を投与した群において、肝細胞膨大が誘導された(Hagiwara et al.,

1989)。

10 匹の雄 F344 ラット(生後 6 週)に 1%BHT と 7 ppm のビタミン K を含む飼料を与えた。体重の減少が観察された。4 週間後に膀胱上皮の DNA 合成が増加した(5 匹)が、8 週間後に光学顕微鏡検査*で形態学的変化はみられなかった(5 匹)。電子顕微鏡検査で、多形性又は短い均一の微絨毛及び縄状又は葉状の微小隆起の形成等の形態的表面変化がみられた(Shibata et al., 1989)。*原文中”microscopy”とあるのは”microscopy”の誤記であり『光学顕微鏡検査』と訳しました。

20 匹の雄(生後 6 週)F344 ラットの群に飲料水中 0.05%N,N-ジブチルニトロソアミンを 16 週間与え、同時に飼料中 0 又は 0.7%BHT を投与した。BHT の同時投与により、肝病変の発生率増加がもたらされた(過形成結節 16/16(18/20); 肝細胞がん 16/16(8/20); 肺転移 8/16(0/20))。膀胱の移行上皮がんもしくは乳頭状過形成又は結節性過形成、及び食道の乳頭腫又は食道がんの発生率は変わらなかった。前胃の過形成結節の減少が観察された(Imaida et al., 1988)。

2.2.9.2 乳腺 (原文 p.7)

雌スピローグドーリーラットにおいて、飼料中 BHT に長期曝露後、7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン(DMBA)誘導乳腺腫瘍発生の用量関連阻害がみられた。BHT を発がん物質投与の 2 週間前から 210 日目の終了まで与えた。穀類ベースの NIH-07 飼料を与え低用量(5 mg/ラット) の DMBA を投与した動物には、300、1,000、3,000、及び 6,000 ppm の BHT を投与した動物の腫瘍発生に有意な全体的阻害傾向が観察された。最大阻害率は最高濃度の BHT(6,000 ppm)での約 50%であった。高用量の発がん物質でがん誘発したラットに BHT を投与したときには、乳房腫瘍発生に対する BHT の阻害影響はそれほど顕著でなかった: 15 mg DMBA/ラットでの最大阻害率は最高濃度の BHT(6,000 ppm)で 20%にとどまった。BHT をカゼインベースの AIN-76A 飼料中に与えた場合にも類似の結果が得られた。この試験でみられた阻害は、短期 BHT 曝露(-2 週/+2 週)を用いた過去の試験でみられたものほど顕著でなかった(Cohen et al., 1986)。

雌スピローグドーリーラットの乳がん発症の阻害においてレチニルアセテート(RA)と BHT が相加効果を有した。RA と BHT への慢性曝露は、高発生率の肝線維症及び胆管過形成を誘導した; これらの変化は対照にはみられず、RA だけ又は BHT だけに曝露した動物では発生率が低かった(McCormick et al., 1986)。

2.2.9.3 皮膚 (原文 p.7)

BHT は、12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート(TPA)をプロモータとして用いた二段階マウス皮膚がん発症モデルでの試験において、腫瘍誘発活性がなかった。BHT を週 2 回 5 週間 100 mg の総量で適用した(Sato et al., 1987)。

BHT のヒドロペルオキシド代謝物 BHOOH(2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロペルオキシル-2,5-シクロヘキサジェノン)は、SENCAR マウスにおける表皮 ODC 活性の有効な誘導物質であった。BHOOH の単回投与の 12 時間後に ODC 活性の誘導が最大になった。DMBA で予めがん誘発したマウスに BHOOH を週 2 回 50 週間投与すると、乳頭腫及びがん形成が観察された。2、8、及び 20 μmol の BHOOH 用量で最大の乳頭腫反応が得られた。60 週後に乳頭腫からがんへの進行が生じた。データは、BHOOH が BHT と異なりマウス皮膚における有効な腫瘍プロモータであることを示唆する。BHOOH だけで処置した発がん処置をしないマウスに

は、乳頭腫又はがんは観察されなかった(Taffe & Kensler, 1988)。

2.2.9.4 胃腸管 (原文 p.7)

生後 7 週の雄ウィスターラット(20 匹/群)に飲料水中 MNNG を(100 mg/l)*8 週間与え、10%塩化ナトリウムを添加した飼料も与えた。その後これらの動物を 1%BHT を含む飼料で 32 週間維持した。発がん物質対照群には BHT を添加しない基礎飼料を与えた。MNNG の投与開始から 40 週後に試験を終了した。BHT により、腺胃又は前胃の腫瘍の発生率は増加しなかった(Takahashi et al., 1986)。*本文中”were given in the drinking water”は本来”were given MNNG in the drinking water”であると思われます。”100 mg/l”も誤記である可能性があります、原文通りに記載しました。

21 匹の雄 F344 ラットの群に飲料水中 0.05%N,N-ジブチルニトロソアミンを 4 週間与え、その後 1%BHT と 7 ppm のビタミン K を含む基礎飼料で 32 週間処置した。BHT により食道発がんが増強された(乳頭腫: 16/21 対 3/21; がん 9/21 対 0/21)が、前胃発がんは増強されなかった。膀胱では BHT により乳頭状又は結節性過形成及び乳頭腫の発生率増加が誘発されたが、肝病変の統計学的に有意な増加はみられなかった(Fukushima et al., 1987)。

5 匹の雄 F344 ラットの群に、0 又は 0.7%BHT を含む飼料を 4 週間与えた。前胃の組織学的検査から、BHT が前胃上皮過形成を誘導しないことが分かった(Hirose et al., 1987)。

雄フィッシャー 344 ラットに、40 mg/kg の DMH の 2 回又は 4 回の sc 注射によるがん誘発直後に 0.5%又は 1.0%BHT を含む飼料を 5 ヶ月及び 6 ヶ月間与えると、BHT 処置動物において、BHT フリー対照飼料を与えた動物よりも有意に高い結腸腫瘍発生率(5 ヶ月試験)及び小腸腫瘍(十二指腸、空腸、及び回腸)の有意な発生率増加がみられた。N-ニトロソ-N-メチル尿素の投与(NMU; 90 mg/kg 経口投与)により、胃腫瘍及び結腸腫瘍が生じた。飼料中 0.5%BHT により腫瘍発生率は変化しなかった。BHT への曝露が発がん物質への曝露後である場合には、飼料中 BHT により DMH による胃腸腫瘍の発生は増強されうるが、NMU によるものは増強されないと結論された(Lindenschmidt et al., 1987)。

雄シリアゴールデンハムスターに 1%BHT を含む飼料を与えた。前胃の過形成及び新生物病変の誘導を、組織病理学的に及びオートラジオグラフィにより 1 週目、2 週目、3 週目、4 週目、及び 16 週目に検査した。BHT 飼料を与えたハムスターには、軽度の過形成が対照群よりわずかに多く生じた。BHT は、重度の過形成又は乳頭腫病変を誘導しなかった。試験中いずれの時点でも標識率の有意な増加は観察されなかった(Hirose et al., 1986)。

2.2.9.5 肝臓 (原文 p.8)

雄ウィスターラットにおいて、誘発-選択-促進プロトコルを用いて BHT をフェノバルビタール(PB)と、その肝発がんへの影響に関して比較した。ラットに、ジエチルニトロサミンの単回投与(DEN; 200 mg/kg 体重)によりがん誘発処理した。2 週後に、2-AA+を 2 週間与え、1 週間後に壊死量の四塩化炭素を与えることにより選択を行った。さらに 1 週間後、ラットをプロモータ又は 0.5%濃度の BHT を伴う飼料で維持した。3 週間、6 週間、14 週間、及び 22 週間の飼料投与後に 8~10 匹の動物の群を検査した。PB 及び DDT と同様に BHT により 14 週目に肝臓の GGT-陽性病変の頻度が著しく増加していたが、PB 及び DDT とは異なり BHT により 22 週目に肝細胞

がんの発生は増強されなかった。雄ウィスターラットにおいてがん誘発後に投与される BHT は肝臓がんのプロモータでないことが示唆された(Préat et al., 1986)。

ジエチルニトロサミン(DEN)の単回投与による肝臓がんの誘発、及び増殖刺激(CCl₄ 投与)と組み合わせた 2-アセチルアミノフルオレン(2-AAF)による選択後、PB 又は BHT (飼料中 0.5%)で最長 22 週間の期間処置した。対照動物には、がん誘発及び選択手順の後に何も処置をしなかった。がん誘発及び選択処置(I-S) 3 週間基礎飼料(BD)を与えた動物の推定前新生物病変部に 2N 核の量の増加がみられた。(I-S 後に)飼料に PB を添加すると、二倍体核の増加がより早期に始まった。がん発生時(22 週 PB 処置)には、2N 核の頻度に減少がみられた。検討期間内にがんを発症しない BHT 処置動物は、14 週の処置後にのみ前癌病変部の 2N 核の量に明らかな増加がみられた(Haesen et al., 1988)。

雄ウィスターラットにアザセリン(30 mg/kg 体重)を週 2 回 i.p.注射する間又はその直後に、飼料中 1%BHT の 26 週間の投与を開始した。アザセリンの後の BHT の投与により、GST-A 陽性局所性膵腺房病変の頻度が増したが、GST-P 陽性肝細胞病変は有意に減少した。BHT をアザセリンと一緒に与えると、肝臓には影響がみられなかったが、膵臓の前新生物病変の頻度が有意に減少した(Thornton et al., 1989)。*原文中”with azaserine BHT”は”with azaserine”の誤記であると思われます。

2.2.9.6 肺 (原文 p.9)

ウレタン単回注射(1000 mg/kg 体重)の 6 時間前の BHT(200 mg/kg の体重)の単回 i.p.注射は、異なる株及び年齢のマウスの肺腫瘍発生に様々に影響した。ウレタンによる腫瘍発生に高感受性の株(A/J、SWR/J)と低感受性の株(BALB/cByJ、129/J、C57BL/6J)の両方を試験した。BHT 処置により成熟 A/J マウスにおいて腫瘍多様性が平均 32%減少したが、成熟 SWR/J マウスでは 48%、成熟 C57BL/6J マウスでは 240%、成熟 129/J マウスでは 655%、14 日齢 A/J マウスでは 38%腫瘍数を増加させることにより、助発がん物質として作用した。これらの BHT 処置は、II 型肺胞細胞由来の肺腺腫及び細気管支クララ細胞由来の肺腺腫の両方の数に同様に影響した。BHT 前処理は、若年又は成熟いずれの BALB/cByJ マウスにおいても腺腫の多様性に影響しなかった。ウレタン後の BHT の慢性投与(週 1 回計 6 回注射)も若年 BALB/cByJ マウスにおける多様性に影響しなかったが、同株の成熟マウスにおける多様性はこの処置により数倍増加した(Malkinson & Thaete, 1986)。

ウレタン(1000 mg/kg)投与後に BHT(400 mg/kg 体重)を 4 回注射した A/J マウスは、ウレタンだけで処置したマウスより 40%多く肺腫瘍を発症した。3-メチルコラントレンで処置したマウスでは、BHT(300 mg/kg 体重)の反復注射により、腫瘍多様性ははるかに高い倍率で(500~800 倍)増加した。マウスを BHT で前処置すると、メチルコラントレンにより生成される腫瘍数が減少した。BHT の肺腫瘍発生に対する増強影響は、びまん性肺胞細胞過形成の生成によるものではなかった(Witschi, 1986)。

近交系マウス株 MA/MyJ において、BHT 及びその三つの代謝物による肺腫瘍促進を比較した。MA/MyJ マウスに、ウレタン(50 mg/kg 体重)の単回注射後、50 又は 200 mg/kg 体重の BHT、BHT-BuOH、又は他の二つの代謝物 2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール(BHT-MeOH)又は 2,6-ジ-tert-ブチル-1,4-ベンゾキノン(DBQ)を週 1 回計 6 回 i.p.注射した。肺腫瘍形成を増強した代謝物は BHT-BuOH だけであり、BHT の有効量の 1/4 で有効であった。この試験から、BHT-BuOH の形成が肺腫瘍促進につながる一連の事象における一つの重要なステップであると考えられる (Thompson et al., 1989)。

2.2.10 肺毒性に関する特殊試験 (原文 p.9)

雄 CD-1 マウスで、BHT により誘導される肺重量の変化を修正する BHA の能力を試験した。BHA 単独では、500 mg/kg 体重(s.c.)の用量まで肺重量に影響しなかった。BHA を閾値下用量の BHT 投与の 30 分前に注射すると(0~250 mg/kg 体重、i.p.)、肺重量が用量依存的に有意に増加した。BHT により誘導される肺重量変化を増強する BHA の能力は、BHT に対する BHA の投与時間及び経路の両方に依存していた(Thompson & Trush, 1988)。

マウス肺スライスによる試験では、BHA により BHT のタンパク質に対する共有結合が増強された。雄 CD-1 マウスへの BHA(250 mg/kg 体重)又はマレイン酸ジエチル(DEM、1 mL/kg 体重)の皮下投与は、いずれも BHT 誘導肺毒性の増強を同様に生じさせた。DEM と対照的に、BHA(250 又は 1500 mg/kg 体重)の投与によりマウスの肺グルタチオン濃度は低下しなかった。*In vitro* の結果から、過酸化水素形成増加とその後のペルオキシダーゼ依存性 BHT-キノンメチド形成の結果、BHA が肺の BHT 活性化を促進することが示唆された(Thompson & Trush, 1988)。

BHT 投与により、雌雄の A/J マウスの肺のサイトゾル Ca⁺⁺活性化中性プロテアーゼ(カルパイン)活性が低下した。タンパク質分解活性の変更は、肺重量/体重比(4 日目)で評価して観察可能な肺毒性を生じた用量よりも早期に(1 日目)、より低用量で生じた(Blumenthal & Malkinson, 1987)。

2~3 匹の近交系 C57BL/6J マウスの群に、10~200 mg/kg 体重の様々な用量の BHT 又は BHT の代謝物 BHT-BuOH を i.p.投与した。BHT-BuOH は、相対肺重量を増加させ、肺サイトゾル Ca⁺⁺依存性プロテアーゼ活性を減少させ、肺病理組織を引き起こす効力が BHT より 4~20 倍高かった。障害の性質(タイプ I 細胞死)及び再生反応(タイプ II 細胞過形成及び分化)は、二つの化合物で同一であった。BHT-BuOH は、肝臓、腎臓又は心臓の障害も引き起こした。著者らは BHT-BuOH の形成が、BHT の最終肺毒素(対応する BHT-BuOH-キノンメチドである可能性がある)への変換において重要なステップでありうることを示唆した(Malkinson et al., 1989)。

雄 C57BL/6N マウスに、BHT 処置の 0 時間、24 時間及び 48 時間後に合成コルチコステロイドのメチルプレドニゾロン(MP; 30 mg/kg 体重、1日 2 回 3 日間 s.c.投与)を投与すると、BHT の肺毒性から部分的に保護された。

2.2.11 腎毒性に関する特殊試験 (原文 p.10)

雄フィッシャー344 ラットへの BHT(1000 mg/kg 体重)の単回大量投与により、肝障害のほか、腎臓スライスの p-アミノ馬尿酸の蓄積減少による測定でいくらかの腎障害、タンパク尿及び酵素尿が生じた。雄ラットの BHT 処置前のフェノバルビタール(80 mg/kg 体重、i.p.、毎日 1 回 4 日間)の投与により、わずかな尿細管壊死とより顕著な生化学的変化と同時に腎障害が生じた。雌ラットは、雄ラットよりも BHT 誘導性の腎障害及び肝障害が生じにくかった(Nakagawa & Tayama, 1988)。

カゼインナトリウム又はラクトアルブミンを唯一のタンパク源として用いた半精製飼料中 1%BHT を 13~48 日間与えた 10~20 匹の雌ウィスターラット(生後 5 週間)の群で、BHT の腎石灰化症発症*影響を試験した。雌ラット

では、使用した飼料にかかわらず BHT により腎症が誘導された。カゼインナトリウム飼料を与えたラットにのみ顕著な腎石灰化症がみられた。したがって、BHT 投与後の腎症の発症と腎石灰沈着症との関連性は確立されなかった(Meyer et al., 1989)。*原文中の”nephrocalcinogenic”は、nephrocalcinosis+genic の造語(?)と思われるかもしれませんが、『腎石灰化症発症』と訳しました。

2.3 ヒトにおける観察 (原文 p.10)

44 人の慢性じんましん患者、91 人のアトピー性皮膚炎患者、及び 123 人の接触性皮膚炎患者における、BHT と BHA(50 mg)の 1:1 混合物を用いたプラセボ対照二重盲検曝露試験では、陽性反応はみられなかった(Hannuksela & Lahti, 1986)。

人及びラットにおいて BHT の単回経口投与の体内動態を比較した。7 人の健常男性ボランティアに、一晚絶食後に 0.5 mg/kg 体重の BHT の単回経口用量を摂取させた。0 分、15 分、30 分、45 分、60 分、75 分、90 分、120 分、150 分、180 分及び 240 分後に血液サンプルをとった。全尿及び糞便を 2 日間収集した。別の試験では 5 人の健常女性ボランティアに 0.25 mg/kg 体重の BHA 及び 1 週後に 0.25 mg/kg 体重の BHT を摂取させ、さらに 1 週間後に 0.25 mg/kg 体重の BHT と 0.25 mg/kg 体重の BHA を同時に投与した。各投与後に上記のように血液サンプルをとった。雄ウィスターラットでも同様の試験を行った。但し使用する BHT の用量は 20、63、及び 200 mg/kg 体重とした。ラットにおいては、BHT のピーク血漿濃度(0.2、0.3、及び 2/3 ug/mL)が 2.6 時間後にみられた。BHA の同時投与により、0.5~3 時間の間で有意に低い血漿濃度が生じた。ヒトにおいては、BHT の血漿濃度の大きな変動がみられた。1.5 時間後に達した平均ピーク血漿濃度は 0.09 ug/mL であった。BHA の同時投与は血漿濃度に影響しなかった。ラット尿においては、4 日で用量の約 2% が BHT-COOH(同量の抱合化合物及び非抱合化合物)として尿中に、10% が BHT として糞便中に排泄された。ヒトにおいては、用量の 2.8% が BHT-COOH(主に抱合型)として尿中にみられ、糞便中には BHT は検出されなかった。比較用量ベースでは、血漿中の BHT はラットよりヒトのほうが高濃度に達するようである(Verhagen et al., 1989)。

日本、英国及び米国で報告されているヒト脂肪中の BHT 濃度ならびに計算された BHT の食事摂取量に基づき、ヒトにおける BHT の生物濃縮係数(BCF; 湿潤重量ベース)が 0.36 と計算された。この BCF は、ラットにつき計算された BCF の 45 倍高かった。これと比較して、全 DDT の BCF は 1279 と計算された(Geyer et al., 1986)。

3. コメント (原文 p.11)

過去に検討されたフィッシャー344 及びウィスターラットでのいくつかの一世代長期試験と対照的に、BHT への in utero 曝露を伴うウィスターラットでの長期試験において、高用量群で雄ラットにおいて肝発がん性が見られたため、JECFA はラットにおける BHT の in utero 曝露後の肝発がん性についてさらなる試験を要請した。また JECFA は、一試験室のいくつかの試験で、高用量の BHT の投与により、少量のビタミン K を含む飼料を与えたラットに出血が引き起こされ、このことから BHT の抗ビタミン K 作用が示唆されることにも注目した。したがって JECFA は、BHT の出血影響の機序につきさらなる試験を要請した。

JECFA の要求は部分的に満たされている。雄スピローグドーリーラットでの BHT の出血影響に関するさらなる試験では、化合物によりビタミン K 依存性凝固因子の血漿中濃度の非常に急速な減少が生じる一方、血小板

凝集には当初影響がないように見えた。肝臓薬物代謝の阻害剤によって凝固因子への影響が減少することが示されたため、原因因子はおそらく BHT の代謝物であると考えられる。JECFA は、ビタミン K 欠乏ラットに出血を引き起こすには高用量の BHT が必要であると指摘し、この影響がヒトにおける BHT の食品添加物としての安全性評価に関して決定的であるとは認めなかった。

雄ウィスターラットで BHT への *in utero* 曝露後の慢性毒性における肝変化の発現及び役割についての試験が開始されたことが JECFA に報告された。JECFA は、「範囲設定」試験からの結果、及び F₁ 世代を飼料中 BHT に離乳後 7 ヶ月間曝露した主試験からの結果を検討した。試験デザインは過去に報告されたラットを化合物に *in utero* 曝露した長期試験のものと非常に類似していた。

さらなる試験により BHT の非遺伝毒性が確認され、ラットにおける BHT の肝毒性についてのいくつかの短期試験により、肝壊死の誘導には高用量の BHT が必要であり、25 mg/kg 体重/日では肝臓への毒性影響はないことが示されている。加えて JECFA は、フェノバルビタール及び DDT とは対照的に BHT はウィスターラットにおいてジエチルニトロサミンによるがん誘発後に 22 週間で肝細胞がんを増強できなかったことを指摘した。

4. 評価 (原文 p.12)

JECFA は、ラットにおける BHT の *in utero* 曝露についての結果まで、以前に確立された 0~0.125 mg/kg 体重の暫定 ADI を延長した。JECFA は、1994 年に BHT の再評価を行うためにこの試験の最終結果を要請した。

ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要（評価書:JMPR 1990）

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
長期／発がん性試験	B6C3F1 マウス		雄マウスでは、肝細胞腺腫又は肝細胞変化巣をもつマウスの発生率が明らかな用量反応関係を示して増加した。
	ラット		二世代にわたる in utero 曝露を含めた慢性毒性における肝臓変化の長期試験。2.2.4 生殖試験の項参照。主試験(F ₁ 世代の 7 ヶ月まで)からの暫定結果が入手できた。
生殖試験	ウィスターラット	、0、500、750、及び 1000 mg/kg 体重/日	処置による血液凝固時間への影響はみられなかった。1000 mg/kg 体重/日の BHT で前処置したラットは、他の群より交配成功頻度が低かった。妊娠雌群の間で大きな差は観察されなかった。最も高い二つの用量で処置したラットにおける体重増加が、妊娠の最終週に阻害されているようであった。対照ラットから生まれた児動物と処置動物から生まれた児動物との間では、一腹子数に用量関連の減少傾向がみられたが、一腹児数又は一腹総体重に有意差はなかった。BHT の催奇形性影響の所見は得られなかった。 一腹子数を、可能な場合 8 匹の児動物に標準化した。1000 mg/kg 体重/日の BHT で処置した母動物は離乳時により低体重で、剖検でごくわずかな体脂肪しか観察されなかった。最低 BHT 用量で処置した母動物の児は顕著な発育不良を呈したが、健康に見えた。最も高い二つの用量で処置した母動物の児は重度の発育不良を呈し、被毛状態が悪く、より不活発であった。BHT 処置動物の一腹子数が 8 未満の場合には大抵、児動物の平均体重がかなり高いことが注目された。このことは、普通の一腹子数の体重増加の低減が BHT の毒性ではなく乳汁分泌不良に関係するものであることを示唆している。各用量群から二組の同腹児からの児動物を、離乳後4週間対照飼料で維持した。BHT 含有飼料を与えた母動物に生まれた児動物は、対照児動物より低体重のままであった。最も高い二つの用量群からの児動物は不良状態を呈し続けた。BHT 処置により全母動物で肝臓重量が著しく増加した。肝臓重量は体重のほぼ 10%、すなわちラットにおいて可能な最大限に膨大していた。BHT 処置した母動物の児の相対肝臓重量は、対照と異ならなかった (Robens, 1990)。
胚毒性	2.2.3.2 を参照		
遺伝毒性	サルモネラ検定系統 TA97 、TA102 及び TA104、ならびに TA100		代謝活性化の有無にかかわらず変異原作用はみられなかった。相乗効果を検出するために BHA と BHT を組み合わせて試験したが、変異原作用はなかった。
	ラット	0.11~11 µM	BHT は、ラット肝細胞において、不定期 DNA 合成の著しい減少により示される 2-アセチルアミノフルオレン (2AAF) 又は N-ヒドロキシ 2AAF により誘導される DNA 損傷に対する保護を提供した。BHT は、ヒト肝細胞にお

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			ける 2AAF 誘導 DNA 損傷も阻害した。加えて、飼料中 0.5%BHT で 10 日間前処置したラットの肝細胞は、2AAF 又は N-ヒドロキシン 2AAF に曝露したときに対照ラットの肝細胞よりも不定期 DNA 合成が少なかった。
	雄スピローグドーリーラット	50、150、及び 500 mg/kg 体重/日	有意性の疑わしい優性致死影響が記録された。
	雄 マウス (101xC3H)		マウスの優性致死試験及び遺伝性転座試験の結果からは、BHT の副作用は示されなかった
	ジャンガリアンハムスター繊維芽細胞	10 µg/mL(最 適 50~100 µg/mL)	細胞間染料移動(ルシファーイエロー移動)に対し強い阻害影響を及ぼした。影響は可逆性であった。BHTはこの影響を一連の周知の腫瘍プロモータと共有した。
肝毒性	雄 ddy マウス	200~800 mg/kg 体重	グルタチオン(GSH)合成阻害剤ブチオニンスルホキニイミン(BOS; BHT の 1 時間前及び 2 時間後、i.p.投与あたり 4 mmol/kg 体重)と組み合わせて経口投与。血清グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)活性の増加及び小葉中心性肝細胞壊死を特徴とする肝毒性を呈した。肝毒性反応は時間及び用量の両方に依存していた。BHT(最高 800 mg/kg)単独では肝損傷の所見は生じなかった。SKF-525A、ピペロニルブトキシド、及び二硫化炭素等の薬物代謝阻害剤は、BOS と併用して与えた BHT の肝毒性影響を妨げたが、フェノバルビタール等の薬物代謝誘導剤は、肝損傷を増加させる傾向があった。結果から、BHT がシクロクロム P450 依存性代謝反応により活性化され、BOS 投与により肝 GSH を枯渇させたマウスにおいては反応性代謝物の不適切な解毒速度により肝毒性影響が生じることが示唆される。著者らは BHT の構造類似体を用いた試験に基づき、BHT-キノンメチドがマウスにおける肝毒性に関与しうることを示唆した(Mizutani et al., 1987)。
30 日間	雄ウィスターラット	0、0.1、0.25、0.5、及び 0.75%BHT	30 日後に[3H]チミジン標識率又は分裂指数により測定される肝臓、膀胱又は甲状腺の細胞増殖を誘導しなかった。
	ラット	0.5%BHT	肝細胞[3H]チミジン標識率が一時的に増加したが、8 日以内に対照値まで下がった。この肝細胞の[3H]チミジン標識の増加に伴い、分裂指数が予想外に大きく増加。
4 時間及び 21 時間後	雌スピローグドーリーラット	700 mg/kg 体重	選択された肝臓の生化学的影響を測定した。オルニチン脱炭酸酵素(ODC)活性及びシクロクロム P-450 含量がそれぞれ 190%及び 30%増加した。肝グルタチオン含量又は血清アラニンアミノトランスフェラーゼ活性への影響はみられなかった。DNA アルカリ溶出の増加により測定される肝 DNA 損傷の徴候が得られた。BHT 用量が 140 mg/kg 体重のときには、これらのパラメータへの影響は検出できなかった。高用量の BHT が DNA 損傷影響を有しうると結論された。
28 日間	雄ウィスターラット	0、25、250 又は 500 mg/kg 体重/日、1000 及び	亜致死量投与では 48 時間以内に小葉中心性壊死が誘導されたが、より低用量の BHT を 7 日又は 28 日間投与した場合には用量関連肝腫大が生じ、最高用量群では

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
		1250 mg BHT/kg 体重	進行性門脈周囲肝細胞壊死が誘導された。門脈周囲病変は胆管増殖、持続性線維性及び炎症性細胞反応、肝細胞過形成ならびに肝細胞及び核膨大を伴った。250 mg/kg 体重/日後も細胞障害の所見が得られた。生化学的变化は、エポキシドヒドラーゼの用量関連誘導、シトクロム P-450 アイソザイム比率の用量関連変化及びグルコース-6-フォスファターゼの抑制から成った。BHT の測定では脂肪中の用量関連蓄積がみられたが、肝臓にはみられなかった。
出血影響に関する特殊試験	雄スピローグドーリーラット	約 1000 mg/kg 体重/日	II、VII、IX 及び X 因子の血漿中濃度は、BHT を 2~7 日間投与したときに時間依存的様式で有意に減少し、BHT を 4~7 日間与えたラットには精巣上体の出血が見られた。トロンビン誘導性及びカルシウム要求性の洗浄血小板凝集は試験全体を通して不変であった。これらの結果から、BHT の投与直後に II、VII、IX 及び X 因子が急速に減少することが示唆されるが、血小板の凝集能亢進は出血により引き起こされる二次的障害でありうる。
	雄スピローグドーリーラット	800 mg/kg 体重	血液凝固因子 II(プロトロンビン)、VII、IX 及び X の血漿中濃度ならびに肝臓の BHT 及び BHT-キノメチドの濃度を測定した。凝固因子の濃度は BHT 処置の 36~60 時間後に減少したが、72 時間までにいくらか回復した。肝臓 BHT 濃度は BHT 投与の 3 時間後(主要ピーク)及び 24 時間後に最大値に達し、BHT-キノメチドは 6 時間後及び 24 時間後(主要ピーク)に最大値に達した。BHT を 200、400 及び 800 mg/kg 体重の用量で与えたときには、II、VII 及び X 因子は最高用量を与えたラットにおいてのみ 48 時間後に減少したが、IX 因子は BHT 感受性がより高く、用量依存性減少がみられた。フェノバルビタールによる 3 日間の前処置又は試験全体にわたる飼料中 1%システイン投与のいずれも、800 mg/kg の BHT によるビタミン K 依存性因子の減少を妨げなかった。これに対して、塩化コバルト又は SKF525A による前処置は、血液凝固因子の減少を部分的に防げた。これらの結果から、抗凝固作用に BHT の代謝活性化が必要でありうることが示される。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(膀胱)	F344 ラット	飲料水中 0.05%N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミンで2週間前処置し、その後 0、0.25、0.5、又は 1%BHT	試験の 22 日目に、各ラットの左尿管下部を結紮した。試験の 24 週目に動物を殺した。BHT により膀胱の前新生物病変、乳頭状過形成又は結節性過形成の発生率及び数が用量依存的に増加した。膀胱病変の発生率は特に 1% BHT で増加した。
	雄(生後 6 週)F344 ラット	飲料水中 0.05%N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミンで4週間前処置し、その後 0、0.4% BHA + 0.4% BHT + 0.4%	BHT 含有飼料を与えた全ての群で、尿中結晶及び膀胱の乳頭状過形成又は結節性過形成の発生率及び密度の増加を観察した。膀胱乳頭腫及びがんの発生率は増加せず、腎盂に増殖性変化はみられなかった。0.8%BHT を投与した群において、肝細胞膨大が誘導された。

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
		TBHQ、又は 0.8% BHT	
	雄 F344 ラット	1%BHT と 7 ppm のビタミン K	4 週間後に膀胱上皮の DNA 合成が増加した(5 匹)が、8 週間後に光学顕微鏡検査で形態学的変化はみられなかった(5 匹)。電子顕微鏡検査で、多形性又は短い均一の微絨毛及び縄状又は葉状の微小隆起の形成等の形態的表面的表面変化がみられた。
	雄(生後 6 週)F344 ラット	飲 料 水 中 0.05%N,N-ジブチルニトロソアミンを 16 週間与え、同時に飼料中 0 又は 0.7%BHT	肝病変の発生率増加がもたらされた(過形成結節 16/16(18/20); 肝細胞がん 16/16(8/20); 肺転移 8/16(0/20))。膀胱の移行上皮ががんもしくは乳頭状過形成又は結節性過形成、及び食道の乳頭腫又は食道がんの発生率は変わらなかった。前胃の過形成結節の減少が観察された。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(乳腺)	雌スピローグドローラット	300 、 1,000 、 3,000、及び 6,000 ppm の BHT	飼料中 BHT に長期曝露後、7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン(DMBA)誘導乳腺腫瘍発生の用量関連阻害がみられた。
	雌スピローグドローラット	レチニルアセテート(RA)と BHT	乳がん発症の阻害においてレチニルアセテート(RA)と BHT が相加効果を有した。RA と BHT への慢性曝露は、高発生率の肝線維症及び胆管過形成を誘導した; これらの変化は対照にはみられず、RA だけ又は BHT だけに曝露した動物では発生率が低かった。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(皮膚)	マウス	100 mg	12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート(TPA)をプロモータとして用いた二段階マウス皮膚がん発症モデルでの試験において、腫瘍誘発活性がなかった。
	SENCAR マウス		ヒドロペルオキシド代謝物 BHTOOH(2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロペルオキシル-2,5-シクロヘキサジエノン)は、マウスにおける表皮 ODC 活性の有効な誘導物質であった。BHTOOH の単回投与の 12 時間後に ODC 活性の誘導が最大になった。DMBA で予めがん誘発したマウスに BHTOOH を週 2 回 50 週間投与すると、乳頭腫及びがん形成が観察された。2、8、及び 20 µmol の BHTOOH 用量で最大の乳頭腫反応が得られた。60 週後に乳頭腫からがんへの進行が生じた。データは、BHTOOH が BHT と異なりマウス皮膚における有効な腫瘍プロモータであることを示唆する。BHTOOH だけで処置した発がん処置をしないマウスには、乳頭腫又はがんは観察されなかった。
32 週間癌の増強又は阻害に関する特殊試験(胃腸管)	雄ウィスターラット	飲料水中 MNNG を(100 mg/1)*8 週間与え、10%塩化ナトリウムを添加した飼料も与えた。その後これらの動物を 1%BHT	MNNG の投与開始から 40 週後に試験を終了した。BHT により、腺胃又は前胃の腫瘍の発生率は増加しなかった。
32 週間	雄 F344 ラット	飲 料 水 中 0.05%N,N-ジブチルニトロソアミンを 4	食道発がんが増強された(乳頭腫: 16/21 対 3/21; がん 9/21 対 0/21)が、前胃発がんは増強されなかった。膀胱では BHT により乳頭状又は結節性過形成及び乳頭腫

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
		週間与え、その後 1%BHT と 7 ppm のビタミン K	の発生率増加が誘発されたが、肝病変の統計学的に有意な増加はみられなかった。
	雄 F344 ラット	0 又は 0.7%BHT	前胃の組織学的検査から、BHT が前胃上皮過形成を誘導しないことが分かった。
6 カ月	雄フィッシャー344 ラット	40 mg/kg の DMH の 2 回又は 4 回の sc 注射によるがん 誘発直後に 0.5% 又は 1.0% BHT	BHT フリー対照飼料を与えた動物よりも有意に高い結腸腫瘍発生率(5 カ月試験)及び小腸腫瘍(十二指腸、空腸、及び回腸)の有意な発生率増加がみられた。N-ニトロソ-N-メチル尿素の投与(NMU; 90 mg/kg 経口投与)により、胃腫瘍及び結腸腫瘍が生じた。飼料中 0.5%BHT により腫瘍発生率は変化しなかった。BHT への曝露が発がん物質への曝露後である場合には、飼料中 BHT により DMH による胃腸腫瘍の発生は増強されうるが、NMU によるものは増強されないと結論された。
	雄シリアゴールデンハムスター	1%BHT	前胃の過形成及び新生物病変の誘導を、組織病理学的に及びオートラジオグラフィーにより 1 週目、2 週目、3 週目、4 週目、及び 16 週目に検査した。BHT 飼料を与えたハムスターには、軽度の過形成が対照群よりわずかに多く生じた。BHT は、重度の過形成又は乳頭腫病変を誘導しなかった。試験中いずれの時点でも標識率の有意な増加は観察されなかった。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肝臓)	雄ウィスターラット	0.5%	誘発・選択・促進プロトコルを用いて BHT をフェノバルビタール(PB)と、その肝発がんへの影響に関して比較した。ラットに、ジエチルニトロサミンの単回投与(DEN; 200 mg/kg 体重)によりがん誘発処理した。2 週後に、2-AA+を 2 週間与え、1 週間後に壊死量の四塩化炭素を与えることにより選択を行った。さらに 1 週間後、ラットをプロモータ又は BHT を伴う飼料で維持した。3 週間、6 週間、14 週間、及び 22 週間の飼料投与後に 8~10 匹の動物の群を検査した。PB 及び DDT と同様に BHT により 14 週目に肝臓の GGT 陽性病変の頻度が著しく増加していたが、PB 及び DDT とは異なり BHT により 22 週目に肝細胞がんの発生は増強されなかった。雄ウィスターラットにおいてがん誘発後に投与される BHT は肝臓がんのプロモータでないことが示唆された。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肝臓)	雄ウィスターラット	0.5%	ジエチルニトロサミン(DEN)の単回投与による肝発がんの誘発、及び増殖刺激(CCl ₄ 投与)と組み合わせた 2-アセチルアミノフルオレン(2-AAF)による選択後、PB 又は BHT (飼料中 0.5%)で最長 22 週間の期間処置した。対照動物には、がん誘発及び選択手順の後に何も処置をしなかった。がん誘発及び選択処置(I-S) 3 週間基礎飼料(BD)を与えた動物の推定前新生物病変部に 2N 核の量の増加がみられた。(I-S 後に)飼料に PB を添加すると、二倍体核の増加がより早期に始まった。がん発生時(22 週 PB 処置)には、2N 核の頻度に減少がみられた。検討期間内にがんを発症しない BHT 処置動物は、14 週の処置後により前癌病変部の 2N 核の量に明らかな増加がみられた。
26 週間	雄ウィスター	アザセリン (30	アザセリンの後の BHT の投与により、GST-A 陽性局所

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
	ラット	mg/kg 体重)を週 2 回 i.p.注射する間又はその直後に、飼料中 1%BHT	性腺腺房病変の頻度が増したが、GST-P 陽性肝細胞病変は有意に減少した。BHT をアザセリンと一緒に与えると、肝臓には影響がみられなかったが、脾臓の前新生物病変の頻度が有意に減少した。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肺)	マウス	ウレタン単回注射(1000 mg/kg 体重)の 6 時間前の BHT(200 mg/kg の体重)の単回 i.p.注射	ウレタンによる腫瘍発生に高感受性の株(A/J, SWR/J)と低感受性の株(BALB/cByJ, 129/J, C57BL/6J)の両方を試験した。BHT 処置により成熟 A/J マウスにおいて腫瘍多様性が平均 32%減少したが、成熟 SWR/J マウスでは 48%、成熟 C57BL/6J マウスでは 240%、成熟 129/J マウスでは 655%、14 日齢 A/J マウスでは 38%腫瘍数を増加させることにより、助発がん物質として作用した。これらの BHT 処置は、II 型肺胞細胞由来の肺腺腫及び細気管支クララ細胞由来の肺腺腫の両方の数に同様に影響した。BHT 前処理は、若年又は成熟いずれの BALB/cByJ マウスにおいても腺腫の多様性に影響しなかった。ウレタン後の BHT の慢性投与(週 1 回計 6 回注射)も若年 BALB/cByJ マウスにおける多様性に影響しなかったが、同株の成熟マウスにおける多様性はこの処置により数倍増加した(Malkinson & Thaete, 1986)。
	A/J マウス	ウレタン(1000 mg/kg)投与後に BHT(400 mg/kg 体重)を 4 回注射	ウレタンだけで処置したマウスより 40%多く肺腫瘍を発症した。3-メチルコラントレンで処置したマウスでは、BHT(300 mg/kg 体重)の反復注射により、腫瘍多様性ははるかに高い倍率で(500~800 倍)増加した。マウスを BHT で前処置すると、メチルコラントレンにより生成される腫瘍数が減少した。BHT の肺腫瘍発生に対する増強影響は、びまん性肺胞細胞過形成の生成によるものではなかった。
	近交系マウス株 MA/MyJ マウス	ウレタン(50 mg/kg 体重)の単回注射後、50 又は 200 mg/kg 体重の BHT、BHT-BuOH、又は他の二つの代謝物 2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール(BHT-MeOH)又は 2,6-ジ-tert-ブチル-1,4-ベンゾキノン(DBQ)	BHT 及びその三つの代謝物による肺腫瘍促進を比較した。肺腫瘍形成を増強した代謝物は BHT-BuOH だけであり、BHT の有効量の 1/4 で有効であった。この試験から、BHT-BuOH の形成が肺腫瘍促進につながる一連の事象における一つの重要なステップであると考えられる。
肺毒性	雄 CD-1 マウス		BHT により誘導される肺重量の変化を修正する BHA の能力を試験した。BHA 単独では、500 mg/kg 体重(s.c.)の用量まで肺重量に影響しなかった。BHA を閾値下用量の BHT 投与の 30 分前に注射すると(0~250 mg/kg 体重、i.p.)、肺重量が用量依存的に有意に増加した。BHT により誘導される肺重量変化を増強する BHA の能力は、BHT に対する BHA の投与時間及び経路の両方に依存していた(Thompson & Trush, 1988)。

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
	雄 CD-1 マウス	250 mg/kg 体重	マウス肺スライスによる試験では、BHA により BHT のタンパク質に対する共有結合が増強された。マウスへの BHA 又はマレイン酸ジエチル(DEM、1 mL/kg 体重)の皮下投与は、いずれも BHT 誘導肺毒性の増強を同様に生じさせた。DEM と対照的に、BHA(250 又は 1500 mg/kg 体重)の投与によりマウスの肺グルタチオン濃度は低下しなかった。 <i>In vitro</i> の結果から、過酸化水素形成増加とその後のペルオキシダーゼ依存性 BHT-キノンメチド形成の結果、BHA が肺の BHT 活性化を促進することが示唆された。
	雌雄の A/J マウス		マウスの肺のサイトゾル Ca ⁺⁺ 活性化中性プロテアーゼ(カルパイン)活性が低下した。タンパク質分解活性の変更は、肺重量/体重比(4 日目)で評価して観察可能な肺毒性を生じた用量よりも早期に(1 日目)、より低用量で生じた。
	近 交 系 C57BL/6J マウス	10~200 mg/kg 体重	BHT 又は BHT の代謝物 BHT-BuOH を i.p.投与した。BHT-BuOH は、相対肺重量を増加させ、肺サイトゾル Ca ⁺⁺ 依存性プロテアーゼ活性を減少させ、肺病理組織を引き起こす効力が BHT より 4~20 倍高かった。障害の性質(タイプ I 細胞死)及び再生反応(タイプ II 細胞過形成及び分化)は、二つの化合物で同一であった。BHT-BuOH は、肝臓、腎臓又は心臓の障害も引き起こした。著者らは BHT-BuOH の形成が、BHT の最終肺毒素(対応する BHT-BuOH-キノンメチドである可能性がある)への変換において重要なステップでありうることを示唆された。
	雄 C57BL/6N マウス		BHT 処置の 0 時間、24 時間及び 48 時間後に合成コルチコステロイドのメチルプレドニゾロン(MP; 30 mg/kg 体重、1 日 2 回 3 日間 s.c.投与) を投与すると、BHT の肺毒性から部分的に保護された。
腎毒性	雄フィッシャー 344 ラット	(1000 mg/kg 体重)	肝障害のほか、腎臓スライスの p-アミノ馬尿酸の蓄積減少による測定でいくらかの腎障害、タンパク尿及び酵素尿が生じた。雄ラットの BHT 処置前のフェノバルビタール(80 mg/kg 体重、i.p.、毎日 1 回 4 日間)の投与により、わずかな尿細管壊死とより顕著な生化学的変化と同時に腎障害が生じた。雌ラットは、雄ラットよりも BHT 誘導性の腎障害及び肝障害が生じにくかった。
13~48 日間腎石灰化症発症影響を試験	雌ウィスター ラット	1%BHT	BHT 投与後の腎症の発症と腎石灰沈着症との関連性は確立されなかった。雌ラットでは、使用した飼料にかかわらず BHT により腎症が誘導された。カゼインナトリウム飼料を与えたラットにのみ顕著な腎石灰化症がみられた。
その他			暫定 ADI: 0~0.125 mg/kg 体重

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
BHT	Butylated hydroxytoluene	ブチルヒドロキシトルエン
ADI	Acceptable daily intake	一日許容摂取量
FAO	Food and Agriculture Organization	国連食糧農業機関
WHO	World Health Organization	世界保健機関
BHA	Butylhydroxyanisole	ブチルヒドロキシアニソール
BOS	Buthionine sulfoximine	ブチオニンスルホキシイミン
GSH	Glutathione	グルタチオン
GOT	Glutamate oxalate transaminase	グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ
GPT	Glutamate pyruvate transaminase	グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ
ODC	Ornithine decarboxylase	オルニチンデカルボキシラーゼ
DMBA	7,12-dimethylbenz[a]anthracene	7,12-ジメチルベンズ[a]アントラセン
RA	Retinyl acetate	レチニルアセテート
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate	12-O-13-テトラデカノイルホルボル・アセテート
MNNG	N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine	N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン
DMH	1,2-dimethylhydrazine	1,2-ジメチルヒドラジン
sc/s.c.	Subcutaneous	皮下
i.p.	intraperitoneal	腹腔内
NMU	N-nitroso-N-methylurea	N-ニトロソ-N-メチル尿素
PB	Phenobarbital	フェノバルビタール
DEN	Diethylnitrosamine	ジエチルニトロサミン
DDT	Dichloro-diphenyl-trichloroethane	ジクロロ-ジフェニル-トリクロロエタン
GGT	γ -glutamyltranspeptidase	γ -グルタミルトランスペプチターゼ
2-AAF	2-acetylaminofluorene	2-アセチルアミノフルオレン
BD	Basal diet	基礎飼料
I-S	Initiation-Selection	がん誘発-選択
GST	Glutathione-S-transferase	グルタチオン-S-トランスフェラーゼ
DEM	Diethyl maleate	マレイン酸ジエチル
MP	Methylprednisolone	メチルプレドニゾロン

ジブチルヒドロキシトルエン 評価書和訳及び情報整理

JECFA 1995

ウェブサイト:<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je02.htm>

FAS 35-JECFA 44/3, 1995

ジブチルヒドロキシトルエン評価書和訳及び情報整理 JECFA(1995) 目次

1. 説明 (原文 P1)	159
2. 生物学データ (原文 P2)	160
2.1 生化学的観点 (原文 P2)	160
2.1.1 吸収、分布及び排出 (原文 P2)	160
2.1.1.1 マウス (原文 P2)	160
2.1.1.2 ラット (原文 P2)	160
2.1.1.3 鶏 (原文 P5)	162
2.1.1.4 ヒト (原文 P5)	162
2.1.2 生体内変化 (原文 P6)	163
2.1.2.1 マウス (原文 P6)	163
2.1.2.2 ラット (原文 P7)	164
2.1.2.3 ウサギ (原文 P7)	164
2.1.2.4 反芻動物 (原文 P8)	165
2.1.2.5 ヒト (原文 P8)	165
2.1.2.6 結合種 (原文 P8)	165
2.1.3 酵素及びその他の生化学的パラメータに及ぼす作用 (原文 P9)	166
2.1.3.1 マウス (原文 P9)	166
2.1.3.2 ラット (原文 P9)	166
2.1.3.3 ウサギ (原文 P13)	169
2.1.3.4 サル (原文 P13)	169
2.2 毒性学的試験 (原文 P13)	169
2.2.1 急性毒性試験 (原文 P13)	169
2.2.2 短期毒性試験群 (原文 P13)	170
2.2.2.1 マウス (原文 P13)	170
2.2.2.2 ラット (原文 P15)	171
2.2.2.3 イヌ (原文 P18)	173
2.2.2.4 サル (原文 P18)	173
2.2.3 長期毒性/発癌性試験 (原文 P18)	173
2.2.3.1 マウス (原文 P18)	173
2.2.3.2 ラット (原文 P21)	175
2.2.4 生殖毒性試験 (原文 P28)	182
2.2.4.1 マウス (原文 P28)	182
2.2.4.2 ラット (原文 P29)	182

2.2.4.3 鶏（原文 P32）.....	185
2.2.4.4 サル（原文 P32）.....	185
2.2.5 催奇形性に関する特殊試験（原文 P32）.....	185
2.2.6 遺伝毒性に関する特殊試験（原文 P32）.....	186
2.2.7 肝毒性に関する特殊試験（原文 P36）.....	188
2.2.7.1 マウス（原文 P36）.....	188
2.2.7.2 ラット（原文 P36）.....	189
2.2.8 腎毒性に関する特殊試験（原文 P39）.....	190
2.2.9 肺毒性に関する特殊試験（原文 P39）.....	191
2.2.10 出血作用に及ぼす特殊試験（原文 P44）.....	195
2.2.10.1 マウス（原文 P44）.....	195
2.2.10.2 ラット（原文 P44）.....	195
2.2.11 甲状腺に及ぼす作用に関する特殊試験（原文 P47）.....	198
2.2.12 免疫系に及ぼす作用に関する特殊試験（原文 P48）.....	198
2.2.13 癌の増強又は阻害に関する特殊試験（原文 P48）.....	198
2.2.13.1 膀胱（原文 P49）.....	199
2.2.13.2 消化管（原文 P51）.....	201
2.2.13.3 肝（原文 P52）.....	202
2.2.13.4 肺（原文 P55）.....	204
2.2.13.5 乳腺（原文 P57）.....	206
2.2.13.6 脾臓（原文 P59）.....	207
2.2.13.7 皮膚（原文 P59）.....	207
2.2.14 その他の作用に関する特殊試験（原文 P59）.....	208
2.3 ヒトでの観察（原文 P60）.....	208
3. コメント（原文 P61）.....	209
4. 評価（原文 P62）.....	210
ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要（評価書:JMPR 1995）.....	211
略称.....	244

原文 目次

原文ページ

1. 説明	1
2. 生物学データ	2
2.1 生化学的観点	2
2.1.1 吸収、分布及び排出	2
2.1.1.1 マウス	2
2.1.1.2 ラット	2
2.1.1.3 鶏	5
2.1.1.4 ヒト	5
2.1.2 生体内変化	6
2.1.2.1 マウス	6
2.1.2.2 ラット	7
2.1.2.3 ウサギ	7
2.1.2.4 反芻動物	8
2.1.2.5 ヒト	8
2.1.2.6 結合種	8
2.1.3 酵素及びその他の生化学的パラメータに及ぼす作用	9
2.1.3.1 マウス	9
2.1.3.2 ラット	9
2.1.3.3 ウサギ	13
2.1.3.4 サル	13
2.2 毒性学的試験	13
2.2.1 急性毒性試験	13
2.2.2 短期毒性試験群	13
2.2.2.1 マウス	13
2.2.2.2 ラット	15
2.2.2.3 イヌ	18
2.2.2.4 サル	18
2.2.3 長期毒性/発癌性試験	18
2.2.3.1 マウス	18
2.2.3.2 ラット	21
2.2.4 生殖毒性試験	28
2.2.4.1 マウス	28
2.2.4.2 ラット	29
2.2.4.3 鶏	32
2.2.4.4 サル	32
2.2.5 催奇形性に関する特殊試験	32
2.2.6 遺伝毒性に関する特殊試験	32
2.2.7 肝毒性に関する特殊試験	36

2.2.7.1 マウス.....	36
2.2.7.2 ラット	36
2.2.8 腎毒性に関する特殊試験.....	39
2.2.9 肺毒性に関する特殊試験.....	39
2.2.10 出血作用に及ぼす特殊試験	44
2.2.10.1 マウス.....	44
2.2.10.2 ラット	44
2.2.11 甲状腺に及ぼす作用に関する特殊試験.....	47
2.2.12 免疫系に及ぼす作用に関する特殊試験	48
2.2.13 癌の増強又は阻害に関する特殊試験	48
2.2.13.1 膀胱.....	49
2.2.13.2 消化管	51
2.2.13.3 肝	52
2.2.13.4 肺	55
2.2.13.5 乳腺.....	57
2.2.13.6 脾臓.....	59
2.2.13.7 皮膚.....	59
2.2.14 その他の作用に関する特殊試験	59
2.3 ヒトでの観察.....	60
3. コメント	61
4. 評価.....	62

ジブチルヒドロキシトルエン (BHT)

初稿作成者 Ms. Elizabeth Vavasour

カナダ保健省健康保護部門、化学的安全食品委員会、毒性学的評価部 (オタワ、オンタリオ州カナダ)

説明

生物学データ

生化学的観点

吸収、分布及び排出

生体内変化

酵素及びその他の生化学的パラメータにおよぼす作用

毒性学的試験

急性毒性試験

短期毒性試験

長期毒性試験/発癌性試験

生殖毒性試験

催奇形性に関する特殊試験

遺伝毒性に関する特殊試験

肝毒性に関する特殊試験

腎毒性に関する特殊試験

肺疾患に関する*特殊試験

出血作用に関する特殊試験

甲状腺への作用に関する特殊試験

免疫系への作用に関する特殊試験

癌の相乗作用又は阻害作用に関する特殊試験

その他の作用に関する特殊試験

ヒトでの観察試験

コメント

評価

参考文献

*原文 oil は on の誤記と思われる。

1. 説明 (原文 p1)

ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) はこれまでに第 6、8、9、17、20、24、27、30 及び 37 回の会議で評価されてきた (補遺 1、参考文献 6、8、11、32、41、53、62、73 及び 94)。第 37 回の会議では、ウィスターラットの肝癌の発生にみる肝変化の役割を解明するためにデザインし、BHT に子宮内曝露及び生涯にわたって曝露させて観察した 1 件の試験の結果が出るまでは、第 30 回の会議で設定された暫定 ADI (一日摂取許容量) 0~0.125 mg/kg 体重/日という数値を引き続き用いることとした。

上述の試験結果は今回の会議で再検討された。さらに、以前に注目された BHT の肺、肝、腎、凝固機序及び発癌の促進/阻害、長期試験及び生殖毒性試験、遺伝毒性検定及びヒト観察試験に関する新たなデータも再検討された。

以下の総合的な研究論文は、過去の研究論文及び論文補遺からの試験を編集したものであり、今回の会議で初めて再検討された。

2. 生物学データ (原文 p2)

2.1 生化学的観点 (原文 p2)

2.1.1 吸収、分布及び排出 (原文 p2)

2.1.1.1 マウス (原文 p2)

雌雄のマウスに ^{14}C -BHT の単回経口投与を実施したところ、 ^{14}C の組織への迅速な吸収及び分布が生じた。 ^{14}C の排出は主に糞中 (41~65%) 及び尿中 (26~50%) であり、少量が呼気中 (6~9%) である。主要な組織 (胃、腸、肝及び腎) における単回投与の半減期は 9~11 時間である。1 日量×10 日間の場合、 ^{14}C の組織中の半減期は 5~15 日であることが検査済みである。この物質の代謝の特徴として、一方又は両側の t-[tert-]ブチル (基) の酸化に続いてグルクロニド抱合体が形成されてから、尿中に排出されるか又は糞中の遊離酸として排出される。今回、マウスの尿中及び糞中には 43 種類以上の代謝物が存在していた (Matsuo ら、1984 年)。

2.1.1.2 ラット (原文 p2)

ラットに ^{14}C -BHT の投与を実施したところ、 ^{14}C の 80~90% が 96 時間以内に尿中及び糞中に排泄され、0.3% 未満が呼気中に排出された。 ^{14}C -BHT の大半は糞中の遊離酸として排泄され、それよりも少量が尿中に排出される。ラットの尿中及び糞中には 43 種類以上の代謝物が存在していた (Matsuo ら、1984 年)。

F344 ラットの雄に BHA/BHT 混合物を濃度 0/0、0.5/0.05、1.0/0.1 又は 2.0/0.2% で飼料中に投与し、この化合物の脂肪組織中の濃度を 1、2 及び 4 ヶ月後に測定した。投与したラットの脂肪組織中で検出した BHT の濃度はそれぞれ 1.4、2.9 及び 7.8 mg/kg であった。等価用量ベースでは、BHT が BHA の 10 倍の濃度で蓄積されていた。しかし、両物質ともに経時的な進行性蓄積は示さなかった。ラットの脂肪組織データ、ヒト 6 名から得たヒトの BHT の平均摂取量及び脂肪組織中の対応する BHT の濃度 (0.12 mg/kg) を考慮し、用量/体重ベースでの脂肪組織中の BHT の蓄積率がヒトではラットよりも高いという以前の観察結果を確認した (Conacher ら、1986 年)。

ラットの雌雄群に飼料中濃度 0% 又は 0.5% BHT を 35 日間継続して投与した後、BHT を含有しない飼料期間を設けた。この試験飼料の期間に 5 日間隔でラットの群を殺処分し、脂肪及び肝を切除して BHT を分析した。BHT を含有しない飼料期間には 2 日間隔でラットを殺処分し、脂肪及び肝からの BHT の損失量を測定した。

試験物質の投与期間には、脂肪中の BHT の進行性蓄積の明確なエビデンスはみられなかった。BHT に曝露させてから 10 日以内に、脂肪中の BHT 濃度は最大濃度に達した (雄 55 mg/kg、雌 65 mg/kg)。その後、観察された濃度に相当な変動が認められた。肝中の BHT 濃度はきわめて低値であったが、最大 BHT 濃度は雄が 5 mg/kg であり、雌が 1.5 mg/kg であった。脂肪及び肝からの BHT の生物学的半減期は 7~10 日間であった (Gage, 1964 年)。

2 匹のラット (雌雄各 1 匹) から成る複数群に、44 mg/kg 体重/日の BHT を 1~5 回経口隔日投与し、最終投与の

24 時間後に殺処分した。総量は雄が(投与量の)92~104%であり、雌が 93~99%であった。排出のルートに性差は認められなかったが、尿中の放射能の排出率は雌が 19~43%であり、雄がわずか 3~15%であった。5 回投与した 8 日後に排出された放射能は雄が 92%、雌が 97%であった。雌ラットに対する BHT の段階的用量での皮下投与から、相当量が糞中に排泄されるが、用量の増大に伴ってその排泄量が減少することが明らかになった。反復経口投与の条件下では ^{14}C -BHT の体内蓄積のエビデンスは認められなかった(Tye ら、1965 年)。

ラットに ^{14}C -BHT を単回経口投与(1~100 mg/ラット)したところ、4 日以内に投与量の約 80~90%が尿中及び糞中で回収された。放射能総量のうち、雌では 40%、雄では 25%がそれぞれの尿中で検出された。4 日後に、投与量の約 3.8%が主に消化管で保持されていた。2 匹のラット(雌雄各 1 匹)では 40 時間を超えても相当量の放射能が胆汁中で検出された。BHT の排出が比較的遅延しているのは、組織内残留よりも腸肝循環が原因であると考えられた(Daniel & Gage, 1965 年)。

0.5%BHT を含有する飼料を 35 日間与えたラットの肝脂肪及び体脂肪を分析した。肝中 BHT 濃度は、雄が 5 mg/kg、雌が 1.5 mg/kg を上回ることにはなかった。体脂肪については、雄が 30 mg/kg、雌が 45 mg/kg 前後で変動した。BHT を含有しない飼料に戻したラットでは、脂肪中の BHT 濃度が漸進的な低下を示し、BHT の半減期は約 7~10 日間であった。

^{14}C -標識 BHT を単回経口投与(12 mg/kg 体重)した放射能の尿中及び糞中の 1 日排泄量を試験した。投与後 6 日目には投与量の約 70%が回収され、排泄量はごく微量となった。1%未満が二酸化炭素として呼気中に排出された。放射能の約 50%は、経口投与後 24 時間以内に胆汁中に排出された(Daniel & Gage, 1965 年)。

最長で 35 日間及び 50 日間にわたり、0.5 又は 1%BHT 含有の飼料を与えたラットの脂肪及び肝の BHT 含有量を分析した。飼料中濃度 0.5%BHT は、雄では脂肪中濃度約 30 mg/kg 体重、雌では同 45 mg/kg 体重に達し、肝中では約 1~3 mg/kg であった。1%BHT 飼料群では、脂肪中濃度は雄が 50 mg/kg、雌が 30 mg/kg となった。投与中止時の脂肪中 BHT 濃度は半減期である 7~10 日目に低下していた(Daniel & Gage, 1965 年)。

500 mg/kg 体重/日で 3~4 日間、挿管投与した場合、脂肪中 BHT 濃度は約 100 mg/kg で水平状態に達した。200 mg/kg 体重/日で 1 週間投与すると、濃度は約 50 mg/kg となった(Gilbert & Goldberg, 1965 年)。

ラットに 100 μg の ^3H -標識 BHT を腹腔内注入し、放射能の尿中排出量を 4 日間連続測定した。投与した 4 日後、注入した放射能の 34.5%が尿中で回収された(Lodomery ら、1963 年)。同量の ^{14}C -標識 BHT(100 μg)をラットに投与したところ、投与後 4 日以内に放射能の 34%が尿中に排泄され、以前のトリチウム標識 BHT を用いた結果と近似していた(Lodomery ら、1967a 年)。

ラットに ^{14}C -標識 BHT(100 μg)の非経口単回投与したところ、4 日以内に放射能の 32~35%が尿中に、35~37%が糞中に排泄された。残留物放射能の大半は腸及び腸壁に含まれていた。胆汁排泄が迅速であり、胆管中の放射性物質は急速に胃から吸収されたことは、迅速な腸肝循環を示唆していた(Lodomery ら、1967b 年)。

白ウイスターラット雄(290~350 g)に、 ^{14}C -標識 BHT 又はそのアルコール[BHT- CH_2OH]又はそのアルデヒド[BHT-CHO]又は酸[BHT-COOH]誘導体を静注またや腹腔内注入した。BHT 及びその関連化合物の尿中及び糞中への総排出量を 5 日間試験し、腹腔内注入後に胆汁排泄を 120,426 時間モニターした。試験した化合物の低用量群(100 μg)では、5 日間の尿中及び糞中での ^{14}C の総回収率及び 120~126 時間の胆汁排泄率

との間に有意差はみられなかった。しかし、 ^{14}C の尿中：糞中の排泄率の比には差がみられた。標識化合物の腹腔内注入後の早期に胆汁内に存在した主要な代謝物は、BHT-COOH 又はそのグルクロニドエステルであった。その後の酸加水分解後の胆汁では、BHT-COOH が主要な ^{14}C 成分であった (Holder ら、1970a)。

ラットに 800 mg/kg 体重の BHT を単回経口投与した後、BHT 及び BHT キノンメチドの一過性の濃度変化を試験するため、血漿中、消化管及び一部の脂肪組織中濃度を GLC 表示器を用いて 48 時間にわたってモニターした。Sprague-Dawley ラット雄 4～5 匹の群を BHT の投与後 0.5、1、3、6、12、18、24、30、36 又は 48 時間後に殺処分した。胃含有量中の BHT の量は 12 時間後までは一定であったが、次の 24 時間後までは急速に低下した後、48 時間後までは漸減した。いずれの時点でも血漿中に BHT は検出できなかったが、BHT キノンメチドの濃度は投与した 12～18 時間後に急速に上昇した後、48 時間後までは漸減した。BHT は投与直後に精巣上体、皮下、腎周囲及び褐色背側脂肪組織で検出された。18 時間後に精巣上体及び皮下脂肪ではピーク濃度が示されたが、腎周囲及び褐色背側脂肪組織ではこの傾向が示されなかった。

2 番目の試験では、単回経口投与の BHT 800 mg/kg 体重を投与してから 4～7 時間後又は 24～27 時間後にラット 5～6 匹の群を殺処分したところ、投与後 4～7 時間群のラットの空腹時及び食後の胃含有量に有意な増大が認められた。投与後 24～27 時間群のラットの食後の胃含有量に関しては対照群との間に差はみられなかった。この試験では、単回高用量投与の BHT が、代謝物の血漿中濃度の遅延に反映される胃排出の遅延を引き起こすことを示唆していた。

別の試験では、麻酔下のラット 5 匹に 800 mg/kg 体重の BHT を点滴で十二指腸内投与し、30 分後に門脈ならびに下行大動脈の血中、肝中及び精巣脂肪組織中の BHT 濃度及び BHT 代謝物を測定した。投与した 30 分後に採取したサンプルでは、BHT 及び又は BHT ラジカルが下行大動脈を除く全サンプルで検出されたが、BHT キノンメチドはいずれのサンプルにも存在しなかった (Takahashi, 1990 年)。

2.1.1.3 鶏 (原文 p5)

生後 1 日の鶏の飼料に濃度 200 mg/kg の ^{14}C -標識 BHT を 10 週間投与した。この鶏の若鶏期の可食部には 1～3 mg/kg の BHT 及び代謝物が残留していた。類似の飼料を産卵鶏に投与したところ、投与の 7 日後に産卵した卵に濃度 2 mg/kg の残留物が生じ、その後もこの濃度が維持された (Frawley ら、1965a 年)。

産卵鶏に 500 又は 100 mg/kg の BHT を含有する飼料を投与したところ、卵の脂肪画分でそれぞれ濃度 20 又は <5 mg/kg の残留物が検出された。生後 21 週以上の若鶏の体脂肪では、BHT 濃度 500 mg/kg の飼料の場合に 55 mg/kg、同 100 mg/kg の飼料の場合に <5 mg/kg の残留物が検出された (Van Stratum & Vos, 1965 年)。

2.1.1.4 ヒト (原文 p5)

ヒト男性 4 名の被験者に約 40 mg の ^{14}C -標識 BHT を単回投与した。投与した放射能の約 75% が尿中に排泄された。この尿中の検出量の約 50% は投与後 24 時間以内のものであり、その後に組織中の BHT 化合物又はその代謝物の放出を示すと考えられる緩やかな排出段階が続いた。ヒトでは、放射能の大部分が代謝物の 1 種のエーテル不溶性グルクロニドとして排出されたが、この代謝物については環状メチル基及び 1 個の t-[tert-]ブチルメチル基がカルボキシル基に酸化され、別の t-[tert-]ブチルメチル基の上の 1 個のメチル基も酸化されてアルデヒド基になったと考えられた。

遊離酸又は共役酸の BHT 酸及びメルカプツール酸は、尿中では微量の化合物であり、実質的には不在とされた。ヒトの尿排泄では、その最初の段階の排出速度が、ラットで観察されたような多量の腸肝循環がみられない

ことを示唆している (Daniel ら、1967 年)。

報告された体脂肪中の BHT 値は 0.23 ± 0.15 mg/kg (英国在住の 11 名) 及び 1.30 ± 0.82 mg/kg (米国在住の 12 名) であった (Colling & Sharratt, 1970 年)。

日本、英国及び米国におけるヒト体脂肪中の BHT 値ならびに算出した食事中的 BHT 摂取量の報告に基づき、BHT のヒトでの生物濃縮係数を 0.36 と計算した (湿重量ベースの BCF (生物濃縮係数))。この BCF はラットで算出された値よりも 45 倍高値であった。比較のために挙げると、総 DDT に関する BCF は 1279 と計算されている (Geyer ら、1986 年)。

BHT の単回経口投与をヒトとラットとで比較した。一晚絶食した健常志願者の男性 7 名に 0.5 mg/kg 体重の BHT を単回経口投与した。血液サンプルは 0、15、30、45、60、75、90、120、150、180 及び 240 分後に採取した。すべての尿及び糞は 2 日間にわたって回収した。別の試験では、健常志願者の女性 5 名に 0.25 mg/kg 体重の BHA を摂取させ、その 1 週間後に 0.25 mg/kg 体重の BHT を摂取させた。さらに 1 週間後に 0.25 mg/kg 体重の BHA に加えて 0.25 mg/kg 体重の BHT を同時摂取させた。各投与の後には上記と同様に血液サンプルを採取した。雄のウィスターラットでも、用量 20、63 又は 200 mg/kg 体重の BHT を用いたこと以外は類似の試験を実施した。ラットでは、2.6 時間後に BHT の最高血漿中濃度 (0.2、0.3 及び 2.3 $\mu\text{g/mL}$) が認められた。BHA を同時投与した場合、0.5～3 時間の血漿中濃度が有意に低値となった。BHT のヒト血漿中濃度には大きなばらつきが認められた。最高血漿中濃度の平均は 0.09 $\mu\text{g/mL}$ であり、この濃度に到達したのは 1.5 時間後であった。最高血漿中濃度は BHA との同時投与の影響を受けなかった。ラットでは、4 日以内に投与量の約 2% が BHT-COOH として尿中に排泄され (抱合化合物も非抱合化合物も同程度の量)、10% が BHT として糞中に排泄された。ヒトでは、投与量の 2.8% が BHT-COOH として尿中に排泄され (主に抱合化合物)、BHT は糞中で検出できなかった。比較用量ベースでは、血漿中の BHT はヒトではラットよりも高濃度に達すると考えられる (Verhagen ら、1989 年)。

2.1.2 生体内変化 (原文 p6)

2.1.2.1 マウス (原文 p6)

NGP/N, A/J 及び MA/MyJ の 3 種類の近交系マウスで、肝ミクロソームによる BHT の酸化的代謝を比較した。この 3 種類のマウスの順序は、BHT 肺腫瘍促進に対する感受性の増大がみられる順であり、この増大は t-[tert-]ブチル基のひとつで BHT の水酸化によって BHT-BuOH の産生能が増大することと関連している。4 週間の BHT の腹腔内注入は、選択的に BHT 酸化経路を誘発し、BHT-BuOH の形成を引き起こした (Thompson ら、1989 年)。

この BHTOOH の代謝作用を試験し、マウス皮膚での発癌促進の介在に果たす反応中間体の役割を評価した。分離させた新生児マウスの角化細胞又は無細胞ヘマチン系を用いた BHTOOH の培養から、BHT フェノキシラジカルの生成が得られた。角化細胞では、BHTOOH-BHT-キノールの非ラジカル代謝物が 1 個しか検出されなかったが、ヘマチン系を用いた BHTOOH の培養からは、オキサシクロペンテノン、BHT-キノン、BHT、BHT-スチルベンキノン及び BHT-キノンメチドという複数の代謝物が検出された。BHTOOH の作用とは対照的に、BHT-キノール、BHT-キノン、BHT-スチルベンキノン及び BHT 自体をマウスの表皮に局所適用した場合は、表皮性オルニチン・デカルボキシラーゼ活性を誘発しなかった (Taffe ら、1989 年)。

亜中毒量の BHT (200 mg/kg 体重) 及び BHA (200 mg/kg 体重) の同時投与は、雄マウスで BHT の肺毒性を

増強させた。BHA の同時投与は、 ^{14}C -BHT の投与の4～8時間後に、肺巨大分子と共有結合している放射能を有意に増大させた。BHA の事前投与は、マウス肝上澄み液中の BHT の *in vitro* 代謝率も低下させた。BHA 及び BHT の同時投与は、肝中の BHT の代謝を低下させ、その結果、肺が大量の BHT に曝露された (Yamamoto ら、1988 年)。

2.1.2.2 ラット (原文 p7)

静注及び腹腔内注入による少量の ^{14}C -標識 BHT の胆汁中代謝物の試験から、主要な 4 種類の代謝物の存在が示された。胆汁中の ^{14}C -標識 BHT の約 34～53%が 3,5-ジ-*t*-ブチル-4-ヒドロキシ安息香酸であると同定され、これがグルクロニドエステルとして存在していたと考えられた。これ以外の代謝物は 3,5-ジ-*t*-ブチル-4-ヒドロキシベンズアルデヒド、3,5-ジ-*t*-ブチル-4-ヒドロキシベンジルアルコール及び 1,2-ビス(3,5-ジ-*t*-ブチル-4-ヒドロキシフェニル)エタンとして存在していた (Ladomery ら、1967b 年)。

ラットに ^{14}C -標識 BHT を単回投与した後、48～96 時間にわたって尿及び胆汁を回収した。同じ時期に糞も回収した。この時期の放射能は約 19～59%が尿中に、約 26～36%が胆汁中で認められた。尿中の主要な代謝物は両者とも遊離型(用量の 9%)の 3,5-ジ-*t*-[*tert*-]ブチル-4-ヒドロキシ安息香酸のほか、グルクロニド(15%)及び S-(3,5-ジ-*t*-[*tert*-]ブチル-4-ヒドロキシベンジル)-N-アセチルシステインであった。グルクロニドエステル及びメルカプツール酸もまた、ラット胆汁中の主要な代謝物であった。遊離型 3,5-ジ-*t*-[*tert*-]ブチル-4-ヒドロキシ安息香酸は糞中の主要な代謝物であった (Daniel ら、1968 年)。

雄ウィスターラットに腹腔内注入で 200 mg/kg 体重の BHT 酸又は 2,6-ジ-*t*-[*tert*-]ブチルフェノール (DBP) を投与した。BHT 酸の投与後は 5 日間、DBP の投与後は 3 日にわたって糞及び尿を回収した。BHT 酸の投与後 24 時間は胆汁も回収した。BHT 酸の投与後、糞中及び胆汁中で DBP 代謝物、2,6-ジ-*t*-[*tert*-]ブチル-*p*-ベンゾキノン (BBQ)、2,6-ジ-*t*-[*tert*-]ブチルヒドロキノン (BHQ) グルクロニド及び BHT 酸グルクロニドが同定された。このことは、BHT 酸が BHT の主要な代謝性最終産物であり、これがジ-置換フェノール (DBP) を形成する脱炭酸反応の後にキノン及びヒドロキノンに代謝されることを示唆していると考えられる。キノン、BBQ を形成する代替ルートは、ラット肝チトクロム P-450 によって触媒されるヒドロペルオキシドの O-O 結合の同種溶血反応の一種であった (Yamamoto ら、1991 年)。

2.1.2.3 ウサギ (原文 p7)

ウサギに 400～800 mg/kg 体重のブチルヒドロキシトルエン (BHT) を反復又は単回投与した。投与量の約 16% がエステルグルクロニドとして、19%がエーテルグルクロニドとして排出された。また、非抱合フェノール(8%)、エーテル硫酸(8%) 及びグリシン抱合体(2%)も排出された。検出されたすべての代謝物の排出は、化合物の投与後、主に 3～4 日で完了し、投与量の約 54%が同定された代謝物として計上された (Dacre, 1961 年)。

ウサギに 500 mg/kg 体重で単回経口投与したジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の代謝作用を試験した。代謝物 2,6-ジ-*t*-[*tert*-]ブチル-4-ヒドロキシメチル・フェノール (BHT-アルコール)、3,5-ジ-*t*-[*tert*-]ブチル-4-ヒドロキシ安息香酸 (BHT-酸) 及び 4,4'-エチレン-ビス-(2,6-ジ-*t*-[*tert*-]ブチルフェノール) が同定された。BHT の尿中代謝物は、グルクロニド 37.5%、エーテル硫酸 16.7%及び遊離フェノール 6.8 から成り、未変化の BHT は糞中にのみ存在した (Akagi & Aoki, 1962a 年)。さらに、3,5-ジ-*t*-[*tert*-]ブチル-4-ヒドロキシベンズアルデヒド (BHT-アルデヒド) もウサギの尿中から分離された (Aoki, 1962 年)。主要な代謝経路は、BHT-アルコールをウサギに投与し、BHT-アルデヒド、BHT-酸、エチレン-ビス誘導体及び未変化の BHT-アルコールを尿中で分離することによって確認された (Akagi & Aoki, 1962b 年)。

2.1.2.4 反芻動物 (原文 p8)

[¹⁴C]-BHT が *in vitro* で、ラム精囊由来のミクロソームのプロスタグランジン H シンターゼ系又は西洋ワサビのペロキシダーゼによって活性化された場合、タンパクとの有意な共有結合を検出することができた。BHT-キノンメチドの検出はごく低濃度であったことから、フリーラジカル中間物が活性代謝物のひとつであることが示唆された。この培養液に BHT を追加すると、BHT-キノンメチドの形成及びタンパクとの共有結合が大幅に増大した (Thompson ら、1986 年)。

2.1.2.5 ヒト (原文 p8)

男性 8 名の群で各自に 100 mg の BHT を 4 日間隔で 2 回投与した。BHT 投与の後 24 時間にわたって尿を回収した。BHT の代謝物は BHT-COOH 及びベンゾイル-グリシンであると同定された。別の試験で 1.0 g の BHT、BHT-COOH を投与した 2 名の成人では、尿中で同定された主要な代謝物は BHT のグルクロニドエステルのみであった (Holder ら、1970b)。

2.1.2.6 結合種 (原文 p8)

ラット及びマウス由来の肝及び肺ミクロソームを用いて、BHT の代謝作用を試験した。ここでは、アルキル置換基の水酸化及び芳香族 1/4 電子系の酸化という 2 種類の主要な代謝プロセスが生じた。前者は、*t*-[*tert*-]ブチル基 (BHT-*t*BuOH) の水酸化から 4-ヒドロキシメチル生成物 (BHT-CH₂OH) 及び第 1 アルコールをもたらした。これ以外にも、ベンズアルデヒド誘導体及び安息香酸誘導体に相当する代謝物が BHT-CH₂OH の酸化によって発生した。BHT-*t*BuOH の水酸化はベンジルメチル位で発生し、その結果生じたジオールがさらにヒドロキシベンズアルデヒド誘導体へと酸化された。ヒドロペルオキシド (BHTOOH、過酸化水素) を経由すると考えられる 1/4 系の酸化は、BHT-キノール (2,6-ジ-*t*-[*tert*-]ブチル-4-ヒドロキシ-4-メチル-2,5-シクロ-ヘキサジエノン)、BHT-キノン (2,6-ジ-*t*-[*tert*-]ブチル-4-ベンゾキノン)、及び BHT-キノンメチド (2,6-ジ-*t*-[*tert*-]ブチル-4-メチレン-2,5-シクロヘキサジエノン) をもたらした。また、水酸化された *t*-[*tert*-]ブチル基を有するキノール及びキノンの誘導体も形成された。定量的データから、BHT-CH₂OH がラット肝及び肺ミクロソーム中の主代謝物であることが明らかになった。マウスのこのような組織内では、BHT-CH₂OH 及び BHT-*t*BuOH が両者ともに大量に生成された。その代謝プロフィールはラット肝及び肺のものと類似していた。しかし、マウス肺ではマウス肝よりも、他の代謝物と比較して相対的に大量のキノンが生成された (Thompson ら、1987 年)。

ペロキシダーゼ触媒による BHT の *in vitro* でのミクロソームタンパクとの共有結合及び BHT-キノンメチドの形成は、BHA の添加によって増強された。一般に食品に使用されている数種類の他のフェノール化合物も、BHT の代謝活性が増強された。ヒトを含むさまざまな動物種の肺、膀胱、腎髄質及び小腸由来のミクロソームでも、基質として過酸化水素又はアラキドン酸のいずれかを用いて、このような BHA と BHT の相互作用を裏づけることができた (補遺 1、参考文献 95)。

Sprague-Dawley ラット及び A/J マウスのフェノールパルビタール (PB) による事前投与は、肺ミクロソーム標本中の (BHT 又は BHT-BuOH) キノンメチド形成に対してわずかな作用を及ぼしたか又は全く作用が及ばなかったが、このような動物種の肝ミクロソームでの BHT 代謝活性を 6~37 倍に誘発した。PB 投与は、マウスの肺ミクロソームでは BHT から QM-OH への 2 段階の酸化にはほとんど作用を及ぼさなかったが、肝ミクロソームでは PB 事前投与がこの活性の 100 倍の増大をもたらした。このことは主に、マウス肝ミクロソームにおける最初の *t*-[*tert*-]ブチル水酸化段階で 100 倍以上に増大したことが原因であると判明した。この作用の増強は、7-pentoxoresorufin O-dealkylase 活性よりもいくぶん高めであり、*t*-[*tert*-]ブチル水酸化がこの酵素の特異的なマーカーとして作用し

ている可能性を示していた。また、この結果は、ラット由来では示されないが、マウス由来の肺ミクロソームが BHT の t-[tert-]ブチル水酸化に関して相対的に高い P-450 常時活性を有することも示しており、このことは、この代謝物が BHT 誘発性肺毒性に関与しているという意見を裏づけている。PB 処置したマウス肝ミクロソームでは、2 種類のチトクロム P-450 阻害薬、SKF-525-A 及び metapyrone は、BHT が QM 及び QM-OH に変換するのを同程度に阻害した。このテルペノイド・アルコールセドロールは、BHT の QM-OH への変換を選択的に阻害することが明らかになった。この化合物を BHT を事前投与したマウスに投与すると肺毒性を阻害することが、既に明らかにされている。未投与のマウス肝ミクロソームでは、BHT-MeOH への BHT 水酸化が最大の活性を示し、次に活性を示したのは QM への酸化、最後が BHT-BuOH への水酸化であった (Bolton & Thompson, 1991 年)。

2.1.3 酵素及びその他の生化学的パラメータに及ぼす作用 (原文 p9)

2.1.3.1 マウス (原文 p9)

マウス (BALB/c 株) を対象に、7.5 g/kg の BHT を含有する飼料で飼育した。この試験食を実施した 3 週間後、血漿中エステラーゼの活性が増強し、これが 20 週間の試験期間にわたって持続した。このエステラーゼを電気泳動分離したところ、この酵素の高い活性は特定の 2 バンドに局限していた (Tyndall ら、1975 年)。

雄のスイス Webster マウスに対する BHT の飼料中投与から、肝ミクロソームのエポキシドヒドロラーゼならびにグルタチオン S-トランスフェラーゼの著明な増大がもたらされた (Hammock & Ota, 1983 年)。

2.1.3.2 ラット (原文 p9)

離乳ラット 45 対に関して、BHT 0.01、1 又は 5 g/kg を添加したラードサプリメント 0、10 又は 20% を含有する飼料を与える 5~8 週間の飼料試験を実施した。BHT 0.01 g/kg 群では血清中成分に全く変化は観察されなかったが、5 g/kg 群では 5 週間以内に血清コレステロール値の増大が認められた。BHT 1 g/kg を添加したラードサプリメント 10% 含有の飼料を 8 ヶ月間与えた雌ラット群でも、血清コレステロール値の増大が認められたが、その他に有意な変化はみられなかった。同じ期間に、BHT 5 g/kg を添加したラードサプリメント 10% 及び 20% 含有の飼料を与えた雌ラット群では、血清中のコレステロール、リン脂質ならびにムコタンパクの値が増大した (Day ら、1959 年)。

ラットに関する他の試験では、開始時に BHA 又は BHT によって誘発された肝腫大を伴う尿中アスコルビン酸の排出量の増大が認められたが、その程度及び時期については、BHA の場合は急速で一過性であり、BHT の場合は長く遅延した (Gaunt ら、1965a 年)。BHT がもたらした (タンパク合成) プロセッシング酵素活性の同時刺激、尿中アスコルビン酸の排出量の増大及び肝の相対重量の増大は、14 日間の飼料制限の影響を受けず、このような変化は肝重量の変化を除き、正常食による 14 日間の回復期に改善することが可能であった (Gaunt ら、1965b 年)。

ラットに経管飼料法で連日 BHT を投与したところ、一部の肝ミクロソーム酵素に高い活性が示された。酵素活性の刺激は肝の相対重量の増大と相関していた。このような酵素活性が変化するための閾値用量は、雌ラットでは BHT 25~75 mg/kg 体重/日であった。脂肪中の BHT の貯蔵はプロセッシング酵素活性による影響を受けていると考えられる。500 mg/kg 体重/日を投与したラットは、脂肪中の BHT 濃度が 2 日目までに雌では 230 mg/kg、雄では 162 mg/kg に達し、これによって相対的な肝重量及びプロセッシング酵素活性も増大した。その後、肝重量及び酵素活性は持続的に増大したが、脂肪の BHT 含有量は低下し、両性とも約 100 mg/kg で水平状態に達した (Gilbert & Golberg, 1965 年)。

均等に両性を配分した 12 匹の SPF (病原菌非汚染特殊動物) Carworth ラットの複数群を対象に、ラッカセイ油に溶解した用量 50、100、200 又は 500 mg/kg 体重/日の BHT を 1 週間連日投与した。ラット 8 匹の 1 群を対照群とした。このラットを最終投与の 24 時間後に殺処分し、試験した全ラットの肝に関して組織学的及び生物化学的試験(グルコース-6-ホスファターゼ:及びグルコース-6-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ)を実施した。また、試験したラットの肝の組織化学的評価も実施した。BHT は雄では用量 100 mg/kg 体重以上、雌では 200 mg/kg 体重以上で肝重量の増大を引き起こした。BHT は雌では 100 mg/kg 体重以上でグルコース-6-ホスフェート活性の低下を引き起こし、試験した最高用量では雌雄両者のグルコース-6-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ活性を増大させた。別の試験では上述のスケジュールに従った用量で投与し、最終投与の後も 14~28 日間飼育した。28 日目までに生物学的変化は観察されず、相対的な肝重量も 14 日までに正常値に回復した(Feuer ら、1965 年)。

濃度 100~5,000 mg/kg の BHT 含有の飼料をラットに 12 日間与えたところ、100 mg/kg 以外のすべての濃度群で、肝腫大のほか、肝ミクロソームのビフェニル-4-ヒドロキシラーゼの高活性を示した。酵素活性は、5,000 mg/kg の 1 日間の投与では有意な変化はみられなかった。(Creaven ら、1966 年)。

ラット(SPF 飼育場の雌雄の Carworth ラット) 500 mg/kg 体重に相当する BHT を経口投与した。投与は 1~5 日間とし、100~400 g と体重がさまざまなラットを使用した。投与したラットの肝由来のミクロソーム調合液を用い、BHT を BHT アルコールに代謝する(2,6-ジ-*t*-[*tert*-]ブチル-4-メチルフェノールから 2,6-ジ-*t*-[*tert*-]ブチル-4-ヒドロキシメチル・フェノールへ)酵素のひとつである BHT オキシダーゼに関して評価した。雌ラットへの BHT (500 mg/kg 体重/日×5 日間)の投与は、肝のグラムあたりの酵素活性を 6 倍に増大させたほか、相対的な肝重量の 35%増大をもたらしたが、両者ともにアクチノマイシン D によって阻害された。この誘発は雄では雌よりも著明であり、この酵素の誘発は体重が 100 g の範囲のラット群では低く、200 g の体重範囲のラット群が最大に達し、これよりも大重量の大きいラット(300~400 g)では低下した(Gilbert & Golberg, 1967 年)

Alderly Park SPF ラットの雌群に、0%、0.01%、0.1%、1%又は5%BHT 含有の飼料を最大 28 日間維持した後、BHT を含有しない飼料を 56 日間与えた。このラットを 4 群に分けて殺処分し、このうち 2 群を酵素検定(アミノピリン・デメチラーゼ)、残り 2 群を電子顕微鏡検査に用いた。酵素活性の増大は直接的に BHT の飼料中濃度を相関していた。最低用量群では、28 日間の飼料期間にわたって検出可能な増大は観察されなかった。BHT を飼料中から除去した後は、いずれの試験群でも酵素濃度が正常値まで回復した。5%及び 1%濃度群では、小胞体増殖の程度は、飼料中の BHT 量及び投与期間と比例していた。濃度 0.1%濃度群では、滑面小胞体の一時的上昇が認められた。濃度 0.01%群では増殖は観察されなかった。飼料中から BHT を除去した後は、増殖した平滑小胞体の迅速な消失が認められた。

2 番目の試験では、ラットの複数群に BHT 1%含有の飼料を 10 日間与え、次の試験との間に正常食の 20 日間を設けた後、10 日間の 2 回目の飼料試験を実施した。このラット群は 5 匹ずつの群で 10、30、40、42 又は 47 日後に殺処分した。ラット肝はアミノピリン・ジメチラーゼの検定及び電子顕微鏡検査のために除去した。酵素活性については BHT の 10 日間の投与期間は 2 回とも有意差はみられなかった。電子顕微鏡検査では、2 回の投与期間に平滑小胞体反応の類似の反応が示された(Botham ら、1970 年)。

450 mg/kg 体重の BHT を 7 日間連日投与したラット肝由来のミクロソーム標本からは、対照群由来の標本と比較して、標識アミノ酸の取り込み能力の増大が示された。また、*in vivo* では、BHT は主に小胞体のタンパクへのアミノ酸の取り込みを刺激した(Nievel, 1969 年)。

SPF ラット(ウィスター株)の雌 23 匹の群に、ナタネ油に溶解した 500 mg/kg の BHT を 11 日間投与した。対照群にはナタネ油のみを投与した。ラット 7 匹から成る複数群を最終回の投与後に殺処分した。残りのラットはこれ以上 BHT に曝露させずに飼育し、試験 28 日目及び 63 日目に殺処分した。ラット肝の重量、DNA 含量及び細胞核の数を検査した。BHT の投与は、DNA 含量及び細胞核の数の増大を伴う肝腫大をもたらした。肝質量は 2 週間以内に正常に回復した。しかし、BHT を投与したラット肝の DNA 含量は、この試験の終了時まで上昇を続け、細胞核の総数又は倍数性の程度の低下はみられなかった(Hermann ら、1971 年)。

雌雄各 10 匹のラットから成る 2 つの群(Alderly Park, SPF ウィスター株)に胃チューブにより、トウモロコシ油に溶解した 200 mg/kg 体重/日の BHT を 7 日間投与した。対照群として、雌雄各 4 匹に等量のトウモロコシ油を投与した。試験物質を 5 日間投与した後で尿サンプルを回収し、尿中アスコルビン酸を測定した。ラットは最終投与の 24 時間後に殺処分し、生化学的検定(アミノピリン・ジメチラーゼ-AMPM、ヘキサバルビタール・オキシダーゼ-HO、チトクロム P-450 及びグルコース-6-ホスファターゼ)及び電子顕微鏡検査のために肝を除去した。投与したラットの別の群には 7 日間の回復期間を設け、類似の一連の肝試験を実施した。BHT の投与は、投与期間を通して持続的なアスコルビン酸の尿中排泄を増大をもたらした。BHT 投与を中止した後は、対照値に向かって緩徐な回復が認められた。BHT に対する一部の生化学的反応には、グルコース-6-ホスファターゼ活性を除き、有意な性差が認められた。雌ラットは APDM 及び HO 活性の著明な増大を示したが、これは雄ラットでは観察されなかった。チトクロム P-450 値は雌雄ともに増大した。生化学的パラメータは、雌ラットの APDM 活性を除き、7 日間の回復期間後に正常値に回復した。電子顕微鏡検査では、肝細胞の平滑小胞体の有意な増殖が示された。その他の形態学的変化は検出されなかった(Burrows ら、1972 年)。

雌雄の若年ウィスターラットの複数群に、BHT(500 mg/kg 体重/日)を強制栄養で 7 日間投与した後、そのラット群を代謝ケージで飼育した。対照群のラットにはトウモロコシ油のビヒクルのみを投与した。その後、ラット群を殺処分し肝酵素(アニリン-4-ヒドロキシラーゼ、ピフェニル 1-4-ヒドロキシラーゼ、エチルモルフィン N-デメチラーゼ及び 4-メチル・ウンベリフェロン・グルクロニルトランスフェラーゼ)の検定の後、チトクロム P-450-CO の相互作用領域を評価した。GC(ガスクロマトグラフィー)を用いた尿分析を実施し、D-グルカル酸、D-グルクロン酸、1-グルロン酸、キシリトール及び L-アスコルビン酸を検定した。BHT の投与は、肝ミクロソームタンパク量を除き、測定したいずれのパラメータも増大させた。BHT は雄よりも雌ラットにとってより強力な肝異物代謝の誘発剤であった(Lake ら、1976 年)。

Sprague-Dawley ラット群の飼料中の BHT は、分離した肝ミクロソーム標本の NADPH-チトクロム P-450 レダクターゼ活性の著明な低下をもたらした。この作用は *in vitro* で肝ミクロソームに BHT を添加した場合には観察されなかった(Rikans ら、1981 年)。

また、飼料中の BHT は、ラット肝ミクロソームタンパクのプロトンポンプへの転換におけるカルボキシル化プロセスにも影響を及ぼすことが示された(Takahashi & Hiraga, 1981a 年)。

BHT 0.4%含有の飼料を与えたラットは、肝の GSH-Sトランスフェラーゼ活性の増大を示したが、肺及び腎では示さなかった。肝及び肺の GSH-レダクターゼ値は増大した(Partridge ら、1982 年)。

飼料中の BHT は 300~6,000 mg/kg*正常な F344 雄ラットにガンマ-グルタミル・トランスペプチダーゼの用量依存性の増大を引き起こした。しかし、細胞質グルタチオン S-転移酵素活性は飼料中の濃度が 3,000~6,000 mg/kg でのみ増強された(Furukawa ら、1984 年)。

F344 雄ラット 4 匹の複数群にブチオニン除去剤であるブチオニンスルホキシミンを事前投与し(900 mg/kg 体重)、1 時間後に BHT(100、250、400 又は 500 mg/kg 体重)を腹腔内注入した。血清中 GOT 及び GPT 活性の用量依存性の増大が観察された。BHT 又はブチオニンスルホキシミンの単独投与では作用がみられなかった。これに対して、システイン(100~200 mg/kg 体重)の事前投与は、中毒量(1,000 mg/kg 体重)の BHT の場合でも血清酵素の増大を阻害した(Nakagawa, 1987 年)。

高脂肪食を給餌した Sprague-Dawley ラットにおいて、AAF による肝細胞癌発症を予防するための BHT 0.3% を添加した AAF(アスコルビン酸因子)含有の飼料の補給したところ、肝核膜チトクロム P-450 の総量が保護されるか又は誘発された。BHT を添加しない AAF を含む飼料を短期間補給したところ、肝核膜チトクロム P-450 の総量の著明な喪失がもたらされた(Carubelli & McCay, 1987 年)。免疫学的試験群からは、BHT が P-450c については AAF 依存性の誘発を増強するが、P-450d については増強しないことが示された。BHT は単独では、このような核膜酵素に作用を及ぼさなかった(Friedman ら、1989 年)。

雄ウィスターラットの飼料への 2 週間の 0.5% BHT の投与は、一部の基質に関する肝ミクロソームの UDP-グルクロノシル・トランスフェラーゼ活性を対照群と比較して 236~269%に増大させた。酵素活性の増大と並行して、肝ミクロソームの UDP-グルクロノシル・トランスフェラーゼ・タンパク量及び関連 mRNA も増大した。BHT の投与は、肝活性の誘発に加え、腎及び小腸由来のミクロソーム活性の増大ももたらした(Kashfi ら、1994 年)。

2.1.3.3 ウサギ (原文 p13)

また、500~700 mg/kg 体重で BHT を投与したところ、大用量の BHA の場合に報告されたものと類似した電解質排出に及ぼす急性作用が認められた。このような作用は低用量では観察されなかった(Denz & Llauro, 1957 年)。

2.1.3.4 サル (原文 p13)

若年のアカゲザル(Macaca mulatta)2~4 匹から成る複数群に、トウモロコシ油に溶解した BHT を 0、50 又は 500 mg/kg 体重で 4 週間投与した。血液サンプルについては、対照群及び高用量群では投与前及びその後 1 週間ごとに採取し、低用量群では 4 週間の試験終了時に採取し、総血漿コレステロール、リン脂質及びトリグリセリドを測定した。2 週間目に高用量群では被験サルの肝生検を採取した。試験終了時には、すべての被験サルを 24 時間絶食させた後で殺処分し、肝及び血液のサンプルを得た。肝サンプルをコハク酸デヒドロゲナーゼ及び過酸化作用に対する感受性について分析した。抽出した肝脂質を分析し、総コレステロール、リン脂質及びトリグリセリドについて分析した。血漿中ならびに肝中総コレステロール濃度は有意に低下していた。高用量群では血漿中リン脂質のほか、コレステロール、血漿中及び肝中のリン脂質値の比が増大した。肝脂質の酸化に対する感受性は高用量群では低下していた(Branen ら、1973 年)。

2.2 毒性学的試験 (原文 p13)

2.2.1 急性毒性試験 (原文 p13)

BHT による毒性試験の結果を表 1 に要約した。

BHT の 7 種類の分解生成物に関して、急性口腔ならびに腹腔内刺激(マウス)、眼刺激(ウサギ)及び皮膚刺激(ラット)を測定した。試験した全化合物の毒性は親化合物を下回った(Conning ら、1969 年)。

表 1. BHT による急性毒性

動物	経路	LD ₅₀ (mg/kg 体重)	おおよその致死量 (mg/kg 体重)	参照
ラット	経口	> 1700-1970	-	Deichmann et al., 1955
ネコ	経口	-	940-2100	Deichmann et al., 1955
ウサギ	経口	-	2100-3200	Deichmann et al., 1955
モルモット	経口	-	10 700	Deichmann et al., 1955
ラット	経口	2450		Karplyuk, 1959
マウス	経口	2000		Karplyuk, 1959

表 2 に示すとおり、BHT の LD₅₀(腹腔内)は近親及び非近親の雄マウスでも株によって相当な差が示された。いずれの場合、肺の大規模な浮腫及び出血を伴い、BHT の投与後 4～6 日で死亡した(Kawano ら、1981 年)。

表 2. マウスの種における LD₅₀ の変化 (Kawano et al., 1981)

種	LD ₅₀ (mg/kg 体重)
DBA/2N (同系交配)	138
BALB/cNnN (同系交配)	1739
C57BL/6N (同系交配)	917
ICR-JCL (非近親交配)	1243

2.2.2 短期毒性試験群 (原文 p13)

2.2.2.1 マウス (原文 p13)

マウスの BHT に関する MTD(最大耐容量)を測定するため、生後 6 週間の雌雄各 5 匹の B6C3F₁ マウスに 0、3,100、6,200、12,500、25,000 又は 50,000 mg/kg の BHT を含有する飼料を 7 週間与えた。各マウスの体重を 2 回/週、測定した。全ラットについて肉眼による剖検を実施した。25,000 mg/kg 群の雌 1 匹、50,000 mg/kg の雄 1 匹及び雌 4 匹が試験終了前に死亡した。

体重減少は大半が用量依存性であり、いずれの投与群でも対照群と比較して著明であった。25,000 mg/kg 群の雄マウスの組織学的検査からは、きわめて少量の肝細胞の小葉中心性細胞質空胞化が明らかになったが、この現象は 12,500 mg/kg の雌群(高用量雌群は検査しなかった)では観察されなかった(NCI, 1979 年)。

次の発癌性試験の投与濃度を確定するために類似の試験を実施した。B6C3F₁ マウス(雌雄各 10 匹)の複数群に、濃度 0.25%、0.5%、1%、2%又は 4%BHT を 10 週間、飼料中に投与した。対照群には雌雄 20 匹のマウス群を用いた。最高用量の BHT を投与した雌雄群には両者とも、対照群の値よりも 10%以上大幅な体重増加率の抑制が認められた。さらに、濃度 4%群のマウスの組織病理学検査からは、脾臓、心臓及び腎の著明な飢餓萎縮が明らかになった。このような変化はひとつ低い用量群(飼料中 2%)又はその他の群では認められなかった。BHT の MTD(最大耐容量)は飼料中濃度 2%であると考えられた(Inai ら、1988 年)。

生後 6～10 週間の雌雄 C₃H マウス(17～39 匹/群)の複数群を対象に、BHT 0.05 又は 0.5%を含有する半合成飼料で 10 ヶ月間飼育した。対照群は BHT を含有しない半合成飼料又は市販の試験用飼料で飼育した。試験期間の終了時に、肝及び肺を切除し、増殖性病変に関して肉眼で検査した。この増殖性病変は腫瘍として明確に確認できると考えられ、約 50%を顕微鏡的に検査した。BHT 含有の飼料で飼育されたマウスは対照群よりも低体重であった。BHT 含有の飼料を与えた雄マウス群では、対照群と比較して肝腫瘍の増大が示された。組織学的には、この腫瘍は肝細胞腺腫であると同定された。雌マウスでは肝腫瘍の増大は観察されなかった。雄 C₃H マウスでは、BHT 0.5%群の 38%(10/26 匹)、同 0.05%群の 58%(15/26 匹)、半合成飼料の対照群の 5%(2/37 匹)及び試験用飼料の対照群の 18%(7/38 匹)に肝腫瘍の発症が報告された。

ある試験で、C₃H マウスを BHT 0.5%を含有する飼料で 1 ヶ月間飼育した後、試験用飼料で 10 ヶ月間飼育するか又は対照飼料(BHT を含有しない)で 1 ヶ月間飼育してから試験用飼料で 10 ヶ月間飼育したところ、この 2 群の雄ラットでの肝腫瘍の発症率はそれぞれ 9%(3/35 匹)及び 17%(5/29 匹)であった。飼料中 BHT は雌雄のいずれに対しても肺腫瘍の発症率の増大をもたらさなかった。

雄の BALB/c マウスに関する別の試験では、BHT を含有しない飼料、BHT 0.05%又は 0.5%を含有する飼料で 1 年間飼育したところ、雄ラットの 2 つの群での肝腫瘍の発症率はそれぞれの群 13%(4/30 匹)、14%(6/43 匹)及び 7%(2/28 匹)であった(Lindenschmidt ら、1986 年)。

C₃H マウスの自然発生の肝腫瘍が性別、マウスの飼育密度、飼料性タンパクの濃度及びカロリー摂取量によって変化することは以前から明らかになっている。1 件の 10 ヶ月間の試験では、歴史的母動物を入手することができなかった。このマウス株での 12 ヶ月間の試験における肝腫瘍の発症率は雌では 6～13%、雄では 41～68%であった(Peraino ら、1973 年)。したがって、この試験で報告された肝細胞腫瘍の発症率と同じ近交系マウスの同年齢の対照群との間では有意差はみられなかった。

2.2.2.2 ラット (原文 p15)

20 日間又は 90 日間実施した飼料試験から、ラットが BHT をそれぞれ 0.5%又は 1%含有する飼料を嗜好しないことが示された。しかし、ラットは BHT の濃度を漸増した場合には摂食が促進した。5～10 匹の対(つがい)ラットから成る群の 25 日間の飼料試験では、BHT を 0.8%及び 1%含有する飼料は、飼料の 1 日摂取量を対照値を下回る程度に低下させることが明らかになった。飼料中濃度 1%では体重増加率が遅延した(Deichmann, 1955 年)。

妊娠ラットのビタミン E を欠乏させた飼料中に 5 週間にわたって BHT を投与したところ、BHT (0.3%) 群では毒性徴候は生じなかったが、同 (0.6%) 群では急激な体重低下及び胎児死亡を引き起こした(Ames ら、1956 年)。

ラット(12 匹/群)に、飼料中に 20%又は 10%添加したラードサプリメントに濃度 0.1%BHT を投与し、7 週間給餌した。ラードサプリメント 20%飼料群では、雄ラット群の初期成長率及び成熟時体重に有意な遅延が観察された。ラードサプリメント 10%飼料群では、雌雄いずれのラット群にも作用はみられなかった。1 対(つがい)の雌雄飼料試験では、この成長の抑制が BHT の直接的な毒性作用であり、飼料の嗜好の低下だけでは説明できないことが示された。この濃度の BHT は、肝の絶対重量及び体重に対する相対重量の両者に有意な増大をもたらした。

高ストレス下のラットは頭頂部の毛の有意な喪失を示した。BHT の毒性作用は、飼料中の脂肪負荷が高くなると増大した。同腹の児ラットの 10%に無眼球症が発生した (Brown ら、1959 年)。

BHT を用量 250 mg/kg 体重/日でラットに 68～82 日間投与したところ、肝の脂肪浸潤及び体重増加率の抑制が発生した (Karplyuk, 1959 年)。

離乳ラット6匹(雌雄各 3 匹)に、飼料中に 20%添加したラードサプリメントに濃度 0、0.1、0.2、0.3、0.4 又は 0.5%BHT を投与し、6 週間給餌した。BHT は特に雄の成長率を抑制し、その作用は BHT 0.3%群以上で有意となった。また、両性ともに肝の絶対重量及び肝重量の体重比の両者に有意な増大をもたらした。肝重量の体重比の増大作用は BHT 0.2%群以上で有意となった。BHT は雄ラットでは左副腎重量の対体重比を増大させたが、雌では一貫した作用はみられなかった。投与に起因する副腎の組織学的変化はみられなかった。いずれの飼料中 BHT 濃度でも、血清コレステロール値及びコレステロール値が BHT 濃度に正比例して増大した。また、副腎コレステロール値の有意な増大も認められた。BHT は、肝中のエステル型肝コレステロールの総濃度又は濃度比、肝脂質濃度、多価不飽和脂肪酸の総濃度には有意な変化をもたらさなかった (Johnson & Hewgill, 1961 年)。

飼料中 20%添加したラードサプリメントに濃度 0、0.2、0.4 又は 0.5%(乾燥重量)の BHT を投与し、ラットに 6 週間給餌したところ、飼料中 BHT の濃度と正比例した血清コレステロール値の増大が示された。BHT は雄の副腎の相対重量を増大させたほか、雌と比較した成長率の有意に大幅な抑制を引き起こした。被験ラットの肝重量の増大は肝脂質の絶対量の増大と並行して生じた (Johnson & Hewgill, 1961 年)。

別の試験では、飼料中に 20%添加したラードサプリメントに濃度 0.5%BHT を投与した群又はラードサプリメントを添加せずに BHT を投与した群においてラットを飼育した。BHT は基礎代謝率、体内コレステロール濃度及び体内ならびに肝コレステロールの合成率を増大させたほか、体内総脂肪酸含有率を低下させたが、これは飼料中のラードの有無とは無関係であった。ラードを添加せずに BHT を給餌したラット群では、BHT は体脂肪酸及び肝脂肪酸の合成率及びターンオーバーを増大させ、成長率を抑制した。このような作用は、ラードを添加した BHT を投与した群の方が大規模に発生した (Johnson & Holdsworth, 1968 年)。

8 匹の若年ラット群に、飼料中に 19.9%添加したカゼインに濃度 0、0.02 又は 0.2%BHT を投与し、8 週間給餌した。この試験は 16.6%添加したカゼインでも 4 週間、さらに、9.6%添加したカゼイン(コリンは非添加)でも 7 週間反復した。この 3 回の試験すべてで、BHT は成長促進及びタンパク効率の改善を引き起こした。しかし、BHT 投与群で肝の窒素含有量は大幅に減少し、0.02%となった。絶食後の肝タンパク回収(詳細は記載せず)も 0.2%BHT 投与群のラットでは阻害された。肝脂質含有量は 0.2%BHT 群では増大したが、0.02%BHT 群では増大しなかった。また 0.2%BHT という飼料中濃度は、副腎重量及びアスコルビン酸含有量を増大させたが、腺重量に基づいて再計算したところ、有意差はみられなかった。副腎重量及びアスコルビン酸含有量の増大は、BHT が臓器に負荷したストレスを示していると解釈された (Sporn & Schöbesch, 1961 年)。

雌雄各 20 匹のラットに飼料中濃度 1%BHT を 10 週間給餌し、正常食に戻したところ、数週間以内に肝重量の体重比のほか、肝細胞の形態学的外見が回復した (Goater ら、1964 年)。

離乳ラット 48 匹(雌雄各 24 匹)の複数群に、0 又は 0.1%BHT 含有の飼料を最長で 16 週間にわたって給餌した。成長率、飼料摂取量、体重、剖検時の臓器の顕微病理学的検査からは、投与群と対照群との間の差は明ら

かにされなかった。しかし、組織病理学的エビデンスは得られなかったものの、肝相対重量及び副腎重量の増大がもたらされた。肝グルコースリン酸及びグルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性の生化学的測定及び組織化学的評価からは、対照群との間の差は明らかにされなかった (Gaunt ら、1965a)。

ラット群(雌雄各 16 匹)に、飼料中に 20%添加した脂肪及び濃度 0、0.03、0.1 又は 0.35%BHT を含有する飼料を 10 週間給餌した。雌群ではいずれの濃度でも体重に及ぼす明確な作用は観察されなかったが、雄群では 0.3%濃度群でわずかな体重低下がみられた。雌雄ともに、いずれの BHT 濃度群でも血中コレステロール値に及ぼす有意な作用はみられなかった。試験中に、0.3%濃度群の雄 4 匹及び 0.1%群の 2 匹が死亡した。雌群では 0.3%群で 2 匹の死亡が発生した。対照群では雌雄群のうち雄 1 匹のみが死亡した (Frawley ら、1965b)。

ラットの BHT に関する MTD を決定するため、F344 ラットの複数群(雌雄各 5 匹)に、濃度 0、6,200、12,500、25,000 又は 50,000 mg/kg の BHT を含有する飼料を 7 週間給餌した。体重は 2 回/週測定した。この試験の全ラットに関して肉眼による剖検を実施した。50,000 mg/kg 群では、いずれの雌雄ラットも試験終了前に死亡した。これ以外の投与群及び対照群では、12,500 mg/kg 群の雄 1 匹を除き、試験終了時まで生存した。試験の 7 週目に、用量依存性の体重減少が示され、25,000 mg/kg 群のラットの体重は対照値のわずか 38%~44%であった。飼料中濃度 12,500 mg/kg 群では、雌雄ともに造血にわずかな増大が認められた (NCI, 1979 年)。

2.2.2.3 イヌ (原文 p18)

用量 1.4~4.7 g/kg 体重の BHT を 2~4 日間隔で 4 週間投与したイヌ 4 匹の 1 群に、軽度~中等度の下痢が誘発された。しかし、剖検からは、肉眼的病理所見にみる重大な変化は認められなかった。中毒の徴候はみられなかったが、用量 0.17~0.94 g/kg 体重で 5 日/週を 12 ヶ月間投与した群では、肉眼的病理所見にみる変化が観察された (Deichmann ら、1955 年)

2.2.2.4 サル (原文 p18)

3 匹の乳児又は若年サル (Macaca Mulatta) の複数群に、用量 0、50 又は 500 mg/kg 体重/日の BHT を 4 週間投与した。血液分析 (完全細胞計数、血清ナトリウム及びカリウム、ビリルビン、コレステロール及び GOT) 及び完全尿分析を毎週実施した。2 週間目に、24 時間絶食させた若年サル由来の肝生検を実施した。試験期間の終了時に、全サルを 24 時間絶食させた後で殺処分した。光学顕微鏡及び電子顕微鏡のために主要臓器由来の組織を作成した。肝組織についても、タンパク、RNA 及びチトクロム P-450 に関して分析した。肝から作成したミクロソーム標本は、ニトロアニソール・ジメチラーゼ及びグルコース-6-ホスファターゼ活性を測定するために使用した。投与したサル及び対照サルの尿中値及び血中中値は類似していた。乳児又は若年サルの肝を除く全臓器の組織学的評価からは、いずれの化合物関連の変化も示されなかった。BHT を投与した被験サルでは、肝巨細胞の増殖及び肝細胞核の増大が認められた。投与したサルの肝細胞では小胞体の中等度の増殖が示された。このようなサルの肝細胞の細胞質中では、また、脂質滴が多く認められた。高用量群の被験サルの肝細胞の 15%では核小体の崩壊が認められた。被験サル及び対照群のサルの肝中 DNA、RNA 及びチトクロム P-450 濃度は、ほぼ同じであった。BHT を投与した若年群では、ニトロアニソール・ジメチラーゼ活性の経時的な増大が示された。この酵素活性は乳児サルには作用しなかった。グルコース-6-ホスファターゼ活性は若年サルでは低下したが、乳児サルでは変化しなかった (Allen & Engblom, 1972 年)。

2.2.3 長期毒性/発癌性試験 (原文 p18)

2.2.3.1 マウス (原文 p18)

FAF雄マウス60匹の複数群を対象に、BHT 0、0.25 又は0.5%を含有する半合成飼料で間飼育した。被験マウスの寿命は対照群よりも有意に長期であり、0.25%群が 17.0±5.0 ヲ月、0.5%群が 20.9±4.7 ヲ月であったのに対し、対照群では 14.5±4.6%であった (Harman, 1968 年)。

生後 8 週間のマウス 18 匹 (BALB/C 株) の群を濃度 0.75%BHT を含有する飼料で 12 ヲ月間飼育したところ、関連する亜急性胆管炎を伴う肝胆管の著明な過形成が発現した (Clapp ら、1973 年)。

マウス 11 匹 (BALB/C 株) の群を濃度 0.75%BHT を含有する飼料で 16 ヲ月間飼育した。被験群の肺腫瘍の発生率が 63.6%であったのに対し、対照群は 24%であった (Clapp ら、1974 年)。しかし、この試験の反復で、これよりも大規模な被験マウス群を用いたところ、雌雄とも肺腫瘍の発生率に BHT の影響は示されなかった (Clapp ら、1975 年)。

マウス 48 匹 (CFI 株) を性別に均等に分配し、BHT 1,000 mg/kg を含有する飼料で飼育した。4 週目に、1 群を BHT 2,500 mg/kg を含有する飼料、8 週目に別の 1 群を BHT 5,000 mg/kg を含有する飼料にそれぞれ切り替えた。このマウス集団を年齢が 100 週に達するまで、このような飼料で飼育した。BHT 含有の飼料で飼育したラット群には生存率の統計的に有意な減少はみられなかったが、高用量群の雄ラットでは試験期間の残り 1/4 での生存率が低かった。試験期間中に死亡又は殺処分したラットからは、対照群と比較して大量の小葉中心性巨大細胞及び巨大核が示された。胆管過形成が観察されたのは被験ラットの 141 匹中 3 匹のみであった。悪性腫瘍の発生率に関しては、高用量群では対照群と比較して有意差はみられなかった。しかし、被験ラットでは肺腫瘍の高い発生率が認められた (5,000、2,500、1,000 mg/kg 及び対照群ではそれぞれ 75%、74%、53%及び 47%)。被験マウスと対照群とを区別するような形態学的徴候はみられなかった。また、BHT を投与した雌マウスでは良性卵巣腫瘍の明らかな増大が観察されたが、対照群では全く観察されなかった (Brooks ら、1976 年)。

雌雄の B6C3F₁ マウスの 20 匹 (対照群) 又は 50 匹 (投与群) に、BHT を濃度 0、3,000 又は 6,000 mg/kg で飼料中に 107,108 週間*投与した。このマウス集団を健康不良の徴候に関して 2 回/日、観察した。身体診察を毎月実施し、体重も最低 1 回/月は測定した。試験終了時及び試験中に死亡したすべてのマウスに関して、入手可能な部位の肝、甲状腺及び前胃を含む 28 種類の主要な臓器、組織及び大規模な病巣の肉眼的及び顕微鏡的検査を実施した。作成可能な部位の末梢血液塗抹標本を作成した。試験期間を通じて、被験マウスは雌雄ともに対照群よりも低体重であった [数字データは提供せず]。体重増加率の抑制の程度は用量依存性であった。飼料中への BHT の投与は、投与群と対照群との比較では同等の生存率又は生存率の改善をもたらした。試験終了時の生存率は、雄マウスが対照群、低用量群及び高用量群でそれぞれ 60%、86%及び 92%であり、雌マウスが 85%、82%及び 90%であった。雄では肝の巨大細胞性及び非腫瘍性病巣 (紫斑病、肝細胞性変性/壊死及び細胞質空胞化) の発生に関する著明な用量依存性の増大がみとめられたが、雌ではみられなかった。投与群の雌雄ともに、肝細胞性腺腫又は癌の発症率の有意な増大はみられなかったが、投与した雌群に、腺腫及び癌の合計発生率の小幅な増大が認められた (対照群、低用量群及び高用量群でそれぞれ 1/20 匹、4/46 匹及び 5/49 匹) であったが、統計的に有意ではなかった。

*原文通りに訳したが、誤記と思われる。

肝細胞癌の文献対照発症率は得られなかった。雌マウスの肺胞上皮癌/細気管支癌又は腺腫の発生率は、低用量群 (35%) では対照群 (5%) よりも有意に高値であったが、高用量群 (14%) では有意ではなかった。この肺胞上皮癌/細気管支癌又は腺腫の文献対照発生率は 4.7%であった。雌マウスでは、BHT の飼料中の慢性摂取は、多くの臓器での肉腫の発生率の有意な低下と相関していた。高用量群の雄 4 匹 (8%) 及び低用量群の雌 2

匹に眼/涙腺の腺腫が観察されたが、対照群ではみられなかった。この腫瘍の文献対照発生率は雄マウスでは1.2%であった。マウスの涙腺腺腫は肉眼的に明らかな病巣でも顕微鏡的検査しかできないため、報告書では、涙腺腺腫とBHT投与とを明確に関連づけることはできなかったとしている(NCI, 1979年)。

B6C3F₁マウス(雌雄各100匹)に、飼料中に含有したBHTを濃度0、200、1,000又は5,000 mg/kgで96週間投与した後、基本食を8週間給餌した。試験期間の終了時に生存していたマウスを殺処分した。完全剖検を実施し、主要な臓器及び組織を顕微鏡的に検査した。試験期間に死亡したマウスも剖検した。さらに、血液学的検査及び血清臨床生化学検査のために終末部血液サンプルを採取した。尿サンプルも検査した。試験期間の飼料摂取量については試験群と対照群とはほぼ同じであった。1,000及び5,000 mg/kg群の雌の体重は対照群よりも低値であり、5,000 mg/kg群の雄の体重についても同様であった。高用量群では一部の臓器(唾液腺、心臓及び腎)の絶対重量に小幅な変化がみられた。5,000 mg/kg群の雄では、血清GOT及びGPT値が対照群よりも高値であった。血液学的、血清及び尿分析においては、これ以外の化合物関連作用は観察されなかった。試験群でも対照群でも腫瘍性病変が報告された。このような腫瘍については、肺腺腫、肝の過形成結節及び肝細胞癌及び悪性リンパ腫の発症率が高値であった。しかし、いずれのタイプの腫瘍についても、BHT投与群と対照群との間で統計的な有意差はみられなかった(Shiraiら、1982年)。

BHTをB6C3F₁マウス(雌雄各50匹)に、飼料中に含有したBHTを濃度0、1%、又は2%で104週間投与した。投与期間の後、生存していた全マウスに追加的な基本食を16週間給餌した。投与群のマウスには16週間の回復期間を経て病理学的検査を実施した。投与群の雄及び雌マウスの平均体重は対照群よりも低値であった。両性にみる用量依存性の体重増加率の抑制は、雌の方が雄マウスよりも著明であった。BHTの投与は用量依存性に雌雄両群の生存率を改善したことが認められた。投与期間(104週間)の終了時の雄/雌マウスの生存率は、40%/58%(対照群)、64%/81%(1%投与群)及び74%/89%(2%投与群)であった。BHT投与群の雄マウスでは、肝細胞腺腫(対照群、低用量群及び高用量群でそれぞれ19%、38%及び53%)又は肝細胞変性病変の統計的に有意な増大が認められ、明確な用量依存性の相関を示していた。肝細胞腺腫又は肝細胞変性のみられる雌マウスの数の増大は報告されなかった。雄マウスのこれ以外の腫瘍の発生率及び雌マウスの何らかの腫瘍の発生率については、BHT投与の影響としての有意な増大はみられなかった。リンパ腫又は白血病については、雌雄両方で用量依存性の発症率の低下傾向がみられた(Inaiら、1988年)。

2.2.3.2 ラット (原文 p21)

ラット群(雌雄各15匹)に、ラード1%含有又はBHT 0.2、0.5又は0.8%含有の飼料を24ヵ月間与えたところ、中毒の徴候は示されず、マクロ病理学試験でも陰性であった。BHT 0.5%含有の飼料を与えた群では、BHTはラードに溶解し、飼料中に投与する前に150°Cで30分間加熱した。体重増加率又は血液成分に及ぼす作用は認められず、主要な臓器の顕微病理学的試験は陰性であった。0.8%BHTの投与後の雌雄ラット両者に、平均値以下の体重増加率のほか、脳、肝及びその他の臓器の重量の体重比の増大が生じた。この群でも顕微病理学的試験は陰性であった。BHTは赤血球及び白血球数又は末梢血のヘモグロビン濃度に特異的な作用を及ぼさなかった。ラットは両性とも多数が試験期間に死亡したが、致死的原因は治療関連ではなかった。この観察は病理学的試験群で裏づけられた。BHT 0.5%群では、ラットの生殖サイクル、脾臓、腎、肝及び皮膚の組織学又は心臓、脾臓、腎の重量に及ぼす作用は認められなかった。2年間にわたってBHT 0.1%及び10%硬化コナツツオイル含有の飼料を給餌したラットには、死亡率の有意な増大はみられなかった(Deichmann, 1978年)。

バリアシステム下で飼育され、試験開始時に生後4週であったJCL株ラット(雌雄各20匹/群)の複数群に、濃度0、0.005、0.062又は0.32%BHTを飼料中に投与した。各群40匹のうち、15匹には「生涯」にわたって化合

物(BHT)を投与し、10 匹には 24 ヶ月間、5 匹にはそれぞれのラットに 3、6 又は 12 ヶ月間投与した。中間ならびに最終の殺処分時には、肝、腎、心臓、脾臓、甲状腺及び盲腸の重量を測定したほか、血液検査、血液生化学検査、尿分析及び組織の組織学的検査を実施した。24 ヶ月後、心臓、肝臓、腎、脾臓、下垂体、甲状腺及び、副腎、精巣、前立腺及び脳の重量を測定し、血液学的測定及び生化学的測定を実施して組織病理学的検査を実施した。飼料中濃度 0.32%群では BHT 肝重量、血清コレステロール、血清 K^+ の増大のほか、肝及び腎の組織学的変化が認められた。飼料摂取量、体重増加率、飼育中の死亡率又は平均寿命に関する変化のほか、腫瘍誘発が疑われる所見は認められなかった。24 ヶ月間投与群も「生涯」投与群も、腫瘍罹患率の用量依存性の傾向を示唆するものは認められなかった。試験で認められた腫瘍は、いわゆる高齢ラットに典型的なものであった。生存していたラットは少数であるが、その腫瘍データに 6、12 及び 24 ヶ月間の飼育中に死亡又は瀕死状態で殺処分した生涯投与群のラットが含まれていたことは、注目すべきである。この利用可能なデータには個別の組織検査の数値は挙げられていなかったが、検査したラット数は挙げられていた。このデータでは、BHT 高用量群でのラット 1 匹あたりの腫瘍数に低下傾向が示されていた(Hiraga, 1978 年)。

Fischer 344 ラットの複数群(雌雄各 50 匹)に、飼料中に含有した濃度 3,000 mg/kg 又は 6,000 mg/kg の BHT を 105 週間投与した。この化合物(BHT)は脂肪 4%を含有するオートクレーブ処理した試験用飼料と混合した。雌雄 20 匹から成る対照群には試験用飼料のみを給餌した。このラット集団は健康不良の徴候に関して 2 回/日、観察した。身体診察を毎月実施し、少なくとも 1 回/月は体重を記録した。試験終了時及び試験中に死亡したすべてのマウスに関して、入手可能な部位の肝、腎、甲状腺及び前胃を含む 28 種類の主要な臓器、組織及び大規模な病巣の肉眼的及び顕微鏡的検査を実施した。全ラットに関して作成可能な部位の末梢血液塗抹標本を作成した。試験期間を通じて、被験ラットの雌雄ともに用量依存性の体重の低下がみられた。BHT の生存率に及ぼす有意な作用は認められず、さまざまな腫瘍の発症率については、投与群と対照群との間で差はみられなかった。BHT を投与した雌群では、下垂体腺腫の発症率が有意に減少した。投与した雌雄ラットには、対照群と比較して病巣の肺胞組織球増加症の発症率が用量依存性に増大した。この作用は雄よりも雌に著明であった(NCI, 1979 年)。

生後 7 週間のウィスターラットの複数群(雌雄各 57 匹/群)を対象に、濃度 0.25%又は 1%BHT を含有する飼料で 104 週間飼育した。対照群は雌雄各 36 匹であった。試験期間の終了時に、生存していたラットを殺処分して完全剖検を実施し、肝、脾臓及び腎の重量を求めた。主要な臓器及び組織を顕微鏡的に検査した。末梢血サンプルを採取し、血液検査及び臨床血清生化学検査を実施した。試験群の生存率は 40~68%であった。この試験の 96 週目から、高用量群の雄の死亡率の有意な増大が示された。飼料摂取量は試験群も対照群もほぼ同じであったが、体重増加率は高用量群の雄では 60 週目まで、高用量群の雌では試験期間の大半で有意に低下した。投与した全ラットに肝の平均絶対重量及び相対重量の増大がみられたほか、投与した雌群に脾臓の絶対重量及び相対重量の低下が観察された。投与した雄群に血清トリグリセリドの用量依存性の変化(減少)及び GGT(の増大)のほか、投与した雌群に血中総コレステロール(の増大)が示された。BHT 投与に起因する肝の有意な形態学的変化は観察されなかった。試験終了時の組織病理学的検査では、さまざまな腫瘍が示されたが、腫瘍のタイプ又は腫瘍総数のいずれについても、対照群と比較した用量依存性反応はみられなかった。雌ラットの肝の過形成結節及び脾臓癌の発症率のほか、試験群の両性の下垂体腺腫及び下垂体腺癌の発症率は対照群と比較して高値であった。しかし、低用量群の雌の下垂体腺癌の発症率は例外であり、その差は対照群と比較して有意ではなかった。この作用は用量依存性ではなかったため、BHT がこの試験の条件下では発癌性物質ではないという結論に達した(Shibata ら、1979 年;Hirose ら、1981 年)。

雌雄各群が 60、40、40 又は 60 匹のウィスターラットの群(F_0 世代)を対象に、それぞれ 0、25、100 又は 500

mg/kg 体重/日の飼料中用量で BHT を投与した。このうち F₀ ラット群は投与の 13 週間後に交尾させた。F₁ ラット 100、80、80 及び 100 匹から成る F₁ ラット群は各群の児ラットの雌雄で構成されていた。親ラットの腎に及ぼす有害作用のため、最高用量群の BHT 濃度は F₁ ラット世代の 250 mg/kg 体重/日にまで低くした。この試験は F₁ 世代が生後 144 週に達した時に終了した。試験したパラメータは飼料摂取量(毎週)、体重、外見及び死亡率であった。試験中に死亡又は瀕死状態で殺処分したラット又は終了殺処分した全ラットについて、剖検及び完全組織病理学的検査を実施した。

BHT を摂取した全ラットの生存率に用量依存性の増大がみられた。寿命には両性で差 ($p < 0.001$) が認められた。F₁ 児ラットの出生時の平均体重は、中等量及び高用量群では対照群よりもやや低値となった。離乳時から試験期間を全体を通して、すべての用量群でラットの体重が対照群よりも低値であった。低用量群、中等量群及び高用量群での体重減少は雄/雌がそれぞれ、7%/5%、11%/10%及び 21%/16%であった。飼料摂取量は全群で同程度であった。臨床的な外見及び行動はいずれのラットも正常であることが報告された。高用量群の雄はやや赤みを帯びた尿を排尿した。血液学的パラメータでは BHT 投与による変化のないことが報告されたが、データは得られなかった。両性では血清トリグリセリドが減少したが、雌のみでコレステロールがいくぶん増大した。

組織学的試験群から、雄ラットでの肝細胞癌の増大及び両性での肝細胞腺腫の増大が示された。大半の肝腫瘍は、生後 141～144 週目の最終殺処分時に検出された。肝細胞癌のうち 1 件は生後 117 週目に雄の対照群で、別の 1 件は生後 132 週目に雄の高用量群で検出された。これ以外の癌は終了時の殺処分で検出された。最初に検出された腺腫は 115 週目に雄の高用量群で報告された。表 3 及び表 4 に死亡率及び肝の腺腫ならびに癌の外観を要約した。さまざまな群の死亡率及び腫瘍の発生率に関するデータは、Peto らの手法を用いて解析した(1980 年)。肝細胞腺腫の数の用量依存性の増大は、試験した全群を異種遺伝子型に関して検定又は傾向解析した場合、雄の F₁ ラットでは統計的に有意であった ($p < 0.05$)。投与した F₁ ラット雌の肝細胞腺腫ならびに癌の増大は、傾向解析した場合に腺腫に関してのみ統計的に有意であった ($p < 0.05$ の場合)。ウイスターラットの肝細胞腫瘍の自然発生率に関して、この試験を実施した試験所からの報告では、他のヨーロッパの試験所と同様に、通常は 3%未満であった (Solleveld ら、1984 年;Deerberg ら、1980 年;Olsen ら、1984 年)。この試験群のラットの平均寿命は雄が 28～36 ヶ月、雌が 28～33 ヶ月であった。統計的に有意ではない腫瘍性病変の微増が示された他の部位は、甲状腺、膵臓、卵巣、子宮、胸腺、細網内皮系及び乳腺であった。

非腫瘍性病変の偶発的な発生がみられたが、雄での胆管増殖及び嚢胞の用量依存性の増大のほか雌での局所性の細胞拡大を示した肝病変を除き、BHT 投与との相関は示されなかった。最高用量群 (250 mg/kg 体重/日) でも、腎に及ぼす有害作用は認められなかった (Olsen ら、1986 年)。

ラットを BHT に子宮内/生涯曝露させた後で肝細胞癌の発生における肝変化の役割を調べるため、1 件の長期試験を実施した。この試験の用量レジメン及びラット株は Olsen らが実施した 2 世代試験 (1986 年) とほぼ同じものを用いた。ウイスターラット雄 6 匹 (生後 13 週)、雌 48 匹 (生後 9 週) から成る複数群に、用量 0、25、100 又は 500 mg/kg 体重/日の BHT を交尾前に 3 週間投与した (Olsen 試験では 13 週)。次に、ラットを雄雌 1:8 匹の比で最長 21 日間交尾させた。腹部触診で妊娠を確認した場合は、その母ラットを個別ケージに移動させた。妊娠 20 日目に、妊娠ラット 5 匹を殺処分し、体重及び肝重量を測定し、肝を組織病理学的に評価した。その児ラットは帝王切開で出産させ、パラメータ数値を評価するために飼育した。残りの雌ラットは正常分娩させた (対照群及び高用量群の母ラット各 20 匹;低用量群及び中等群の母ラット各 24 匹)。分娩の 6 日後、その分娩後、児ラットを間引き又は補充して 8 匹から成るようにした際、各群の児ラットの中で丈夫な雄の数が最大になるようにし

た。離乳時(第3週)に、各群の同腹の児ラット5匹から4匹を無作為に選択して雄の数を最大にし、パラメータの数値を評価した。試験を継続するため、残りの児ラット(約60匹/群)から雄児を選択し、4群のうち1群を親ラットと同じ飼料群として割り付けたが、今回の高用量群はOlsenの試験と同様に250 mg/kg 体重/日に減量した。1、6、11又は16ヵ月目に中間殺処分を実施した。この試験は、F₁雄ラットを試験食に割り付けてから22ヵ月後に終了した。この試験期間を通して、全ラットの毒性に関する臨床徴候又は行動的徴候を毎日観察した。F₀雌ラットは妊娠から離乳まで触診し、F₁雄ラットは生後15ヵ月から終了まで触診した。

2週おきに体重を記録し、飼料摂取量を数日おきにモニターした。試験中に死亡したラット又は予定通りに殺処分したラットは肉眼で剖検した。予定通りの殺処分時に、F₁胎児及び離乳ラット及びF₁雄ラットの全群では以下のパラメータを毎回測定した: 体重及び肝重量、グルコース-6-ホスファターゼに関する肝酵素活性、エポキシドヒドロラーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、O-脱エチル化エトキシレゾルフィン及びO-脱ペンチル化ペントキシレゾルフィン、肝チトクロムP-450総量、総グルタチオン、総ミクロソーム及び総サイトゾルタンパク及び肝の組織病理学的変化。さらに、予定通りの殺処分時に毎回、対照群及び高用量群で、肝切片のチトクロムP-450 1Aならびに2B及びエポキシドヒドロラーゼに関する免疫化学的染色を実施した。4週目に各投与群からの5匹のラットで肝の細胞増殖を測定し、その後の殺処分ではいずれもプロモデオキシウリジンをを用いたパルス標識技術を使用した(対照群及び高用量群の結果のみを報告した)。11、16及び22ヵ月目の殺処分時に、上記のパラメータに加えて以下の多くのパラメータをモニターした: 副腎、腎及び甲状腺の組織病理学的変化、組織化学的染色による肝グルコース-6-ホスファターゼ及びガンマ-グルタミルトランスフェラーゼの分布の評価、及び血清チロキシン濃度(16ヵ月目及び22ヵ月目のみ提示)。

BHTを投与してから最初の5週間は、高用量群の雄で体重増加率の抑制が示された。この傾向はBHTを投与する前から始まり、BHTの投与を開始した後も持続した。これ以外の投与群での体重増加率は対照群と類似していた。ラットの健康に及ぼす治療関連作用は示されなかった。妊娠中及び授乳中は、投与群と対照群の雌の間で飼料摂取量に差はみられず、離乳時に同腹の児も体重はほぼ同じであった。妊娠20日目の殺処分時に、高用量群では同腹の児の肝の絶対重量及び相対重量に用量依存的に増大し、統計的に有意であった。全群の雌では、その児を含めた場合でも除外した場合でも体重が類似していた。肝の組織病理学的検査から、高用量群(500 mg/kg 体重/日)の4/5及び低用量群の1/5(25 mg/kg 体重/日)で小葉中心性肺細胞の軽度の拡大及び好酸球増多症がみられ、これが酸化活性の混合機能の誘発と一致していることが明らかになった。100及び500 mg/kg 体重/日群で、母ラット由来の肝細胞の分裂指数の低下が示されたが、この結果は不明確であった。

表 3. F₁ ラットでの死亡率（及び関連する肝腺腫及び肝癌腫）（Olsen et al., 1986）

BHT (mg/kg 体重/ 日)	ラットの 有効数		死亡数								
			0	91	105	114	119	127	133	141	Total
			-90	-104	-113	-118	-126	-132	-140	-144	
雄											
0	100	20	10	13	(1)/8	11	10	(1)/12	16	(2)/100	
25	80	8	11	6	3	(1)/13	11	8	20	(1)/80	
100	90	8	12	3	2	10	7	(2)/11	(4)/27	(6)/80	
250	99	7	7	6	(1)/4	(2)/8	(2)/13	(1)/10	(20)/44	(26)/99	
雌											
0	100	16	15	18	(2)/8	11	7	8	17	(2)/100	
25	79	10	9	4	6	13	(1)/10	(1)/8	(1)/19	(3)/79	
100	80	5	17	5	5	(1)/7	(1)/9	(1)/11	(3)/21	(6)/80	
250	99	9	5	11	12	8	5	(2)/10	(12)/39	(14)/99	

^a 括弧内の数字は期間内における腺腫及び癌腫に関連している。

表 4. 肝細胞の結節性過形成、腺腫及び癌腫の発生率（Olsen et al., 1986）

BHT (mg/kg 体重/日)	ラットの有効数	結節性過形成	腺腫	肉腫
雄				
0	100	2	1	1
25	80	0	1	0
100	90	2	5	1
250	99	2	18 ^a	8 ^b
雌				
0	100	2	2	0
25	79	0	3	0
100	80	4	6	0
250	99	5	12 ^c	2 ^d

^a Over-all test for heterogeneity, $p < 0.001$, chi-square
18.17, 3 df.

Test lot trend, $p < 0.001$, chi-square = 17.97, 1 df.

^b Over-all test for heterogeneity, $p < 0.05$. chi-square
11.12, 3 df.

Test for trend, $p < 0.01$, chi-square = 9.40. 1 df.

^c Over-all test for heterogeneity, not significant, chi-square =
5.20, 3 df.

Test for trend, $p < 0.05$, chi-square = 4.99, 1 df

^d Over-all test for heterogeneity, not significant, chi-square = 2.87, 3 df.

Test for trend, not significant, chi-square = 2.59, 1 df.

生殖パラメータは以下の通り、交尾率 54～65%、妊娠率 93～96%、生存力率(生後 6 日までの)93～96%。このようなパラメータには投与関連作用はみられなかった。また、母ラットあたりの再吸収の絶対数についても、投与群と対照群とは類似していた。低用量群及び高用量群の児数/同腹にはわずかな減少がみられたが、用量依存的な傾向は明確ではなかった。高用量群の児ラットの出生時(10%)、授乳期の 6 日目(12%)及び 21 日目(21%)の体重は対照群よりも有意に低値であった。間引き後に残した児ラットの死亡率は授乳期の 21 日目までが用量が増大するに従い 2%、8%、12 及び 15%と上昇した。6 日目に非無作為に児ラットを間引きしてからは、このようなデータは BHT 投与群のラットの生殖機能の不偏評価には用いることができなくなった。

試験を継続した F₁ 雄ラットの体重は、高用量群では 22 ヶ月間の投与期間を通して対照群よりも低値であった。この試験の最初の 1 年間では、その差は 10～20%であった。また、中等量群でも治療期間の前半で体重が対照群と比較して約 5%低値となった。投与に対する有害反応又は飼料摂取量に及ぼす作用の報告はなかった。ラットの毛の主観的評価では、100 及び 250 mg/kg 体重/日群では加齢関連の劣化が対照群よりも少なかった。予定した殺処分時に、肝の相対重量には一貫した用量依存性増大がみられたが、絶対重量にはみられず、このことは高用量群では統計的に有意であった。

試験の 6 ヶ月目から開始した予定通りの殺処分時に、用量依存性の小葉中心性肝細胞の拡大ならびに好酸球増多症が一貫して観察された。このことは混合機能オキシダーゼの誘発と一致する SER の増殖を示唆していた。対照群及び高用量群由来の肝切片の免疫組織学的染色から、BHT 投与に伴って試験期間を通して持続していた肝細胞量含有量の著明な増大及びチトクロム P-450 2B の分布が明らかになった。チトクロム P-450 1A 又はエポキシドヒドロラーゼの染色パターンには変化はみられなかった。組織化学的染色からは、高用量群のラットの大半で、投与の 11 ヶ月目から門脈周囲肝細胞のガンマ-グルタミルトランス-ペプチダーゼ活性の著明な誘発が始まったことが明らかになった。この作用は中等量群ではやや小規模であった。

投与群のラットにみるグルコース-6-ホスファターゼ活性の分布は正常であった。投与関連の胆管過形成又は門脈管での炎症性細胞浸潤のエビデンスはみられなかった。投与群では 11 ヶ月目の一部のラットに変性肝細胞病巣(AHF)がみられたが、全群では 16 及び 22 ヶ月目に認められた。病巣の特殊なタイプの発生率と治療との関連性はみられなかった。22 ヶ月目に、好酸球病巣及び好塩基性球増多症の高発生率が認められた。肝切片の組織化学的染色から、高用量群の少数のラットにグルコース-6-ホスファターゼ欠乏 AHF のみられたことは統計的に有意であった。高用量群の肝結節のみられるラット数では、22 ヶ月目の GGT に関する AHF 染色陽性の発生率に投与関連の増大が示され、これも統計的に有意な増大であった(これ以外の群ではゼロであったのに対し 6/19 ラット)。

離乳後 4 週間からの試験のいずれの時点でも、BHT の投与に起因する肝細胞増殖率の増大はみられなかった。このため、Clayson ら(1993 年)が雄ウィスターラットに対する飼料中 BHT 0.5%投与開始から 2～4 日目に肝細胞増力の増大を観察したことは興味深いことである。今回の試験で用いたような間隔の開いたサンプリング時間では、このような一過性の増大を検出することは困難であったと考えられる。

異物代謝関連の肝酵素活性及びその他のパラメータの数値は、BHT 投与の結果として変化した。総チトクロム P-450 含有量は、高用量群で生後 21 日目に 30～60%に増大した。また、生後 21 日目からは、エポキシドヒドロラーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ及びペントキシレゾルフィン O-脱ペンチル化(PROD)の用量依存性の増大も示され、これは中等量群及び高用量群では統計的に有意であった。PROD 活性はきわめて大幅に増大し、中等量群で 10～25 倍、高用量群で 20～80 倍に達した。エトキシレゾルフィン*O-脱エチル化活性の中等度な用量依存性が示されたが、対照群との差は統計的に有意ではなかった。試験期間を通して、肝グルタチオン又はグルコース 6-ホスファターゼ活性に及ぼす作用は示されなかった。

*原文の *resomfin* は誤記と思われる。

腎の組織病理学的検査から、慢性進行性腎症に罹患していたラット群すべての重篤度が 11 ヶ月目から軽減したことが明らかになった。副腎に及ぼす作用は示されなかったが、同じ試験所で実施したほぼ同一の方法であるが、無効となった 1 件の試験では(Robens 研究所、1989 年)、中等量群及び高用量群で離乳後 4 週間目に副腎皮質束状層の巨細胞が観察されたものの、それは投与後の時点ではなかった。今回の試験では、離乳後 11 ヶ月目から副腎の組織病理学的検査を開始した。中等量群(ラットの 75～82%が罹患した軽度な変化がみられた)及び高用量群(ラットの 100%が罹患した著明な変化がみられた)の両群では、11 ヶ月目に濾胞細胞の大きさの縮小、コロイドの不在又は減少、濾胞細胞外観の不規則性、濾胞細胞の充血ならびに数の増大という特徴を有する甲状腺過活動のエビデンスが示された。この作用は BHT の肝に及ぼす二次的な作用であると考えられた。投与したラット群と対照群との間で血清サイロキシン濃度に差はみられなかった。

中等量群及び高用量群で肝酵素誘発及び持続的な甲状腺過活動に及ぼすことが明らかになった作用及び Olsen 試験からの腫瘍データは共に、NOEL (最大無作用量)が 25 mg/kg 体重/日であることを示唆していた(Price, 1994 年)。

F344 ラットの雄の飼料に最長で 110 週間 BHT を添加した。最初の試験では、F344 ラット雄 36 匹の 1 群に NIH-07 のみを給餌する一方で、別の 21 匹のラットから成る複数群には BHT 300、1,000、3,000 又は 6,000 mg/kg を含有する飼料を与えた。各群から無作為に 4 匹を選択し、12 週、36 週、48 週又は 76 週目に変性した肝細胞病巣の測定を実施した。

生存していたラットは 76 週目に殺処分した。2 番目の試験では、F344 ラット雄 27 匹の複数群に、基本飼料あるいは 12,000 mg/kg の BHT 又は BHA 含有の飼料を 110 週間与えた後で生存していた全ラットを殺処分した。両試験では、4 週おきに体重を測定した。全ラットに肉眼による剖検を実施した。ラット肝は重力を測定し、その他の臓器の腫瘍及び肉眼的病変と共に組織病理学的検査に送った。

試験 1 のいずれのラットも投与期間終了まで生存した(76 週間)。試験 2 では、対照群及び投与群の生存率が 84 週目から低下したが、投与関連の傾向はみられなかった。投与期間の終了時に、BHT 3,000 又は 6,000 又は 12,000 mg/kg を投与したラット群はそれぞれ対照群と比較して体重が有意に低下した。この 3 群の体重低下率は約 10%であった。BHT 6,000 mg/kg を投与したラット群では、76 週間に肝の絶対重量及び相対重量が対照群と比較して有意に増大した。BHT 12,000 mg/kg を 110 週間投与したラット群では、肝の絶対重量及び相対重量が対照群と比較して有意に減少した。BHT 投与群では、各群の罹患ラット 1 匹あたりの貯蔵鉄欠乏の肝細胞病巣の密度が、48 週目及び 76 週目にわずかではあるが有意に増大したが、BHT 12,000 mg/kg では、110 週目には病巣の発生率及び大きさがやや低下した。肝細胞癌はいずれの群でも検出されなかった。肝細胞腺腫は対照群を含む全群で検出され、発症率に用量依存性の傾向はみられなかった。また、特定の臓器にみられる肉

眼で観察可能な腫瘍の発生率に関しては、BHT の投与関連作用はみられなかった (Williams ら、1990a 年)。

2.2.4 生殖毒性試験 (原文 p28)

2.2.4.1 マウス (原文 p28)

0.1 又は 0.5%濃度の BHT を含有する飼料を 2 通りの飼料中濃度のラード(10%又は 20%)と共にマウスに給餌した。0.5%濃度の BHT 群では、生後 12 日目の児マウスの平均体重及び同腹の全マウスの重量が、わずかではあるが有意に低下した。0.1%濃度の BHT 群ではこのような作用は認められなかった。母マウス 144 匹のうち 12 匹を無眼球症の確定診断を受けたマウス株から選択したにも関わらず、生涯での繁殖期全体で出生した 7,754 匹のマウスの中で無眼球症は 1 匹もみられなかった (Johnson, 1965 年)。

妊娠マウス及びその児マウスに 0.5%濃度の BHA を慢性的に摂取させたところ、さまざまな行動的变化が生じた。対照群と比較して、BHT 投与群の妊娠マウスには対照群と比較して、探索活動の増大、睡眠の減少、毛繕いの減少、学習の遅滞及び指向反射の低下が示された。BHT 投与群の児マウスには睡眠の減少、社会的ならびに孤立的に誘発される攻撃性の増大及び重篤な学習の欠如が示された (Stokes & Scudder, 1974 年)。

1 件のマウスの 3 世代試験を実施し、生殖、発達及び行動に及ぼす作用を評価した。雌雄各 10 匹の Crj: CD-1 マウスから成る複数群に、飼料中濃度 0、0.015%、0.045%、0.135%又は 0.405% (それぞれ 0、20、70、200 又は 610 mg/kg 体重/日に相当) の BHT を生後 5 週目から投与した。生後 9 週目にマウスを 1:1 ベースで 5 日間交配させた。この交配から生まれた児マウスを生後 4 週目に離乳させ、無作為に選択して雌雄マウス 10 匹/群とし、試験を継続した。生後 9 週目に前の世代と同様に雌雄を交配させた。

F₁ 及び F₂ 群それぞれの生殖パラメータ: 同腹の児数及び児数、同腹の児の大きさ及び体重、雌雄の比、授乳日 0、4、7、14 及び 21 日の児マウスの体重及び 21 日までの生存率。授乳期間のさまざまな時点に測定された神経行動学的パラメータ: 正面立ち直り反応、負の走地性、断がい回避、遊泳行動及び臭覚定位行動。マウスの飼料への BHT の投与は、測定されたパラメータのうち 1 つのみに有害な影響を及ぼした。F₁ の高用量群では授乳期の 7 日～21 日目にかけて体重増加率が持続的に抑制されたが、F₂ の児マウスでは対照群と比較して体重差は示されなかった。F₂ の雄児マウス群のうち体重が低値のマウスはオープン・フィールド試験に割り付ける投与群を 180°変えさせたが、このことによる影響は F₂ の雌児マウス群では明らかにならなかった。このため、この試験で用いた飼料中の BHT 濃度では、投与による毒性学的に重大な作用は明らかにならなかった (Tanaka ら、1993 年)。

2.2.4.2 ラット (原文 p29)

離乳ラット(雌雄各 16 匹)にラード 20%及び BHT 0、300、1,000 又は 3,000 mg/kg を含有する飼料を与え、生後 100 日目に交配させた(試験の 79 日目)。最初の児ラットが離乳して 10 日後に、そのラット群を再び交配させ、2 度目の児ラットを出産させた。その児ラット(雌 16 匹及び雄 8 匹)は生後 100 日目に交配させた。最長 28 週間まで、親ラット及び最初の児世代に血清コレステロール及び血清脂質など、数多くの機能検査及び臨床検査を実施した後、42 週目に肉眼ならびに顕微鏡検査を実施した。飼料中濃度 3,000 mg/kg では、親ラット及び児の成長率に 10～20%の低下が観察された。28 週間後に血清コレステロール値の 20%の上昇が観察されたが、10 週間後にはコレステロール値の上昇はみられなかった。また、飼料中に投与して 42 週後に殺処分したところ、相対肝重量の 10～20%の増大が観察された。3,000 mg/kg 群でのその他の観察及び 1,000 mg/kg 及び 300 mg/kg での観察内容すべてが対照群と類似していた。生殖に関するいずれの基準も正常であった。催奇形性作用は検出されなかった (Frawley ら、1965b)。

親ラット及び最初の児世代については、2 世代に関して類似の結果が得られた。生後 100 日の 2 世代のラット児の検査から、濃度 3,000 mg/kg での平均体重の低下を除き、作用はみられないことが明らかになった。ラットの児世代については、児の大きさ、平均体重、死産の発生率、生存率の検査のほか、肉眼的ならびに顕微鏡的病理学検査を実施した (Kennedy ら、1966 年)。

雌雄の Sprague-Dawley ラット (200~220 g) に、交配の 1 週間前から BHT 0.125%、0.25% 又は 0.5% を含有する Purina Chow 補助飼料を自由摂取させ、その雌には続けて、児ラットの授乳期及び離乳期も摂取させた。その結果、成長率及び生存率に有害な影響が認められた。高用量群の母ラットから産まれた離乳前の児ラットの体重は生後 7 日、14 日及び 21 日目に対照群と比較して有意に低値であった。濃度 0.25 又は 0.5% BHT を摂取していた同腹の児ラットのうち試験中に死亡した総数は、対照群と比較して有意に高値であった。立ち直り反応、旋回運動、断がい回避、驚愕反応、遊泳行動及びオープン・フィールド・ランニング、車輪活動、ロータロッド、能動回避、位置弁別及び受動回避などの行動的検査を実施した。離乳前の児ラットの検査では、低用量群と中等用量群との間に差は示されなかった。高用量群では、正面立ち直り反応時間、前肢の遊泳機能の発達遅延及びオープン・フィールド試験での活動性の低下傾向に有意な増大が認められた。離乳後のテストでは、0.25% BHT 群の雄では、ショックを与えたコンパートメントに再度入ったラット数が多かったという受動回避に及ぼす作用がみられた。その他のテストではいずれも統計的な有意差はみられず、BHT の協調運動、能動回避獲得又は消去能力に及ぼす作用はみられなかった (Brunner ら、1978 年)。

生後 6 週の 46 匹から成るラットの複数群 (非近交系ウィスターラット、SPF (病原菌非汚染特殊動物)) に、試験期間を通して、0 又は BHT 500 mg/kg 体重/日に相当する 0.5~0.9% BHT を含有する飼料を摂取させた。F₀ 世代は生後 19 週で交配させた。生後 24 時間の F₁ ラットは同腹の児の試験サイズを 8 匹に減少させたが、その同腹の児動物の半数を相互-飼育した。試験期間に親ラット及びその児動物の体重、児動物の発達関連事象及び F₀ ラットの生殖能力をモニターした。F₁ ラット世代には聴覚機能、視覚機能及び協調運動テストを実施した。この F₁ ラット群を生後 25 日で剖検し、脳の組織学的検査を実施した。検査したラットは対照群と比較して体重増加率が低値であり、これが妊娠中も持続した。この妊娠期間の平均体重及びその児ラットの大きさについては、試験群と対照群とは類似していた。F₁ 児ラット群の平均体重及び平均体重増加率は、投与群の母ラットから授乳された児ラット群が有意に低値であった。また、胎児期に BHT に曝露された児ラット群は、母ラットが非投与群であった対照群と比較して発達に相対的な遅れがみられた。胎児期又は母ラットの乳によって BHT に曝露された児ラット群は、行動パターンの変化のほか、脳の死細胞の平均数が高値であった (Meyer & Hansen, 1980 年)。

BHT の生殖作用及び催奇形性作用に関する試験群については、米国化学品製造者協会 (CMA) が詳細なコメント (1983 年) を発表している。主要なコメントは、1980 年の JECFA (補遺 1、参考文献 54) で再検討された Brunner ら (1978 年) 及び Vorhees ら (1981 年) の試験のほか、Meyer & Hansen (1980 年) の試験に関するものである。

Brunner らの試験及び Vorhees らの試験の場合は、0.125% BHT を含有する飼料で飼育された母ラットから産まれた児ラットの生存率及び発達が正常を示した、と結論づけている。また、0.25% BHT を含有する飼料で飼育された母ラットから産まれた児ラットは離乳後に正常な発達が観察されたが、0.25% 及び 0.5% BHT を含有する飼料で飼育された母ラットから産まれた児ラットの離乳後の死亡率は高値であり、0.5% BHT 群では児ラットに発達

遅滞が生じた。Meyer&Hansen(1980年)の試験では、0.5% BHTを含有する飼料で飼育された母ラットから産まれた児ラットに発達遅滞が認められた。0.25%及び0.5% BHT 濃度での BHT の作用は、母ラットに及ぼす毒性作用又は授乳中の直接毒性に起因すると考えられる。また、Brunner 及び Vorhees の試験デザインに関しては次のような多くの問題が浮上した。(i) 児ラットの選択、生存している児動物数が 8 匹未満の同腹児を廃棄している(ii) 試験中に罹患した児動物を上回る児動物の過剰死亡率が報告されている。この試験からのデータは米国 FDA の間差を受けている(1983 年)。この試験の生データには、BHT の中等量群及び高用量群の児動物の高死亡率に関する著者らの観察が裏づけがあるという結論に至った。しかし、少数の児動物数において過剰な死亡率が発生していた。例えば、0.5%群では同腹児 19 匹中から 60 匹の死亡、同腹児 5 匹中に 49 匹の死亡が発生し、0.25%群では全 42 匹の死亡のうち、同腹児 2 匹から 21 匹の死亡が生じ、0.125%群では全 12 匹の死亡のうち、同腹児 1 匹から 11 匹の死亡が発生した。また、高用量群では、同腹児が 8 匹以下又は同腹児が 12 匹以下となる出生率が増大した。他の用量群では、同腹児数が対照群と同程度であった。

Meyer & Hansen(1980 年)の試験には、この試験の BHT 濃度が母動物に中毒を引き起こし、これが児動物に直接又は間接的に作用したと考えられる、という CMA(化学製造業者協会)のコメントが記されている。また、いくつかのマウス株及びラット株における催奇形性試験及び又は 1 世代の生殖毒性試験のほか、ラットの 3 世代の生殖毒性試験に関する報告書には、飼料中の 0.1%濃度の BHT は「無作用」であることを裏づけるコメントが記されている。

生後 7 週間の雌雄各 60、40、40 又は 60 匹のウィスターラットに、飼料中含有量がそれぞれ 0、25、100 又は 500 mg/kg 体重/日に相当する BHT を含有する半合成食を給餌した。この飼料で飼育した 13 週間後にラットを交配させた。

飼料摂取量は全群が同程度であった。高用量群の雄雌ラットは、試験期間を通して持続した体重の有意な低下を示した。妊娠率は全群で同程度であった。500 mg/kg 体重/日群の雄 1 匹あたりの同腹児の大きさ及び数は、対照群と比較して有意に低値であった。授乳期間の生存能力については試験群と対照群は同程度であった。児ラットの出生時の平均体重は 500 及び 100 mg/kg 体重/日群では対照群よりもやや低値であった。授乳期間に、BHT は有意な用量依存性の体重増加率の低下を引き起こした(25、100 及び 500 mg/kg 群が対照群と比較してそれぞれ 5%、7%及び 41%低値となった)(Olsen ら、1986 年)。

妊娠前及び妊娠中に曝露させた雌ラット及び胎児～授乳期にかけて同じように曝露させた児ラットに関して、このような場合に許容される飼料中 BHT の最大許容量を決定するための試験を実施した。雄 3 匹及び雌 16 匹から成るウィスターラットの複数群に、0、500、750 又は 1,000 mg/kg 体重/日の飼料中 BHT を交配前の 3 週間に投与した。少なくとも各群の雌 8 匹には妊娠中～授乳期まで(産後 21 日まで)投与した。交配後、雄及び残りの雌を剖検した。このラット群には血液凝固時間には投与による作用はみられなかった。投与群の雌の飼料摂取量は、試験の 4 週間前には対照群よりも大幅に高値であった。体重に及ぼす有意な作用はみられなかったが、体重低下に用量依存性の傾向が顕著であった。投与群のラット毛に変色がみられた以外は、全身の健康状態に及ぼす作用は認められなかった。

交配の成功率は 1,000 mg/kg 体重/日の BHT 投与群が他の群よりも低率であった。雌の妊娠ラットには投与群による大きな差は観察されなかった。観察からは 2 つの高用量群のラットは妊娠最終週の体重増加率が抑制されたと考えられた。同腹児数又は児動物の体重には、母ラットの投与群間又は対照群との間で有意差は認められなかったが、同腹児数に体重の用量依存性の減少傾向が明らかであった。同腹児の大きさが小柄であった。

BHT の催奇形性作用の徴候は報告されなかった。

同腹児の試験サイズを可能であれば 8 匹まで標準化した。授乳期に、BHT 1,000 mg/kg 体重/日群であった母ラットには剖検時に低体重及びきわめて低い体脂肪が観察された。最低用量群の BHT の母ラットの児は成長に著明な抑制がみられたが、外見は健康的であった。2 つの高用量群の母ラットの児の成長は重度に抑制され、体毛状態が不良であり、活動量が低いことが示された。BHT 投与群のラットでは同腹児の試験サイズを 8 匹未満としたところ、平均的な児動物体重が相対的に大幅に高くなった。このことは、通常の試験サイズの同腹児にみる体重増加率の抑制は、BHT の毒性というよりも母乳の産出量不足に起因していることを意味している。各用量群からの 2 匹の同腹児を離乳後に 4 週間、対照用飼料で飼育した。BHT 含有の飼料を摂取していた母ラットの児動物は、依然として対照群よりも低体重であった。2 つの高用量群の母ラットの児動物は、引き続き不良な健康状態を示した。BHT はいずれの母ラットにも肝重量の著明な増大をもたらした。その肝重量は体重の約 10% であり、ラット体内で可能な最大の膨大程度に達していた。BHT 投与群の母ラットの児動物にみる相対肝重量は、対照群と比べて差がなかった (Robens Institute, 1989 年)。

2.2.4.3 鶏 (原文 p32)

雌鳥 10 匹に BHT を濃度 0.125% で 34 週間投与したところ、類似の対照群と比較して、妊娠率、卵の孵化率又は幼鳥の健康状態に関する差はみられなかった。抗酸化処理した鶏の卵には対照群と比較してカロチノイド及びビタミン A が多く含まれていた (Shellenberger ら、1957 年)。

2.2.4.4 サル (原文 p32)

摂取量がそれぞれ 50 mg/kg 体重/日に相当する BHT と BHA との混合物を含む試験食で、アカゲザルの成体雌 6 匹の 1 群を飼育した。別のアカゲザルの成体雌 6 匹から成る 1 群は、対照群として用いた。このサル群を繁殖期までの 1 年間及び 165 日の妊娠期を含むさらに 1 年間をこの飼料で飼育した。1 ヶ月おきにヘモグロビン、ヘマトクリット、総白血球及び分類白血球、コレステロール、 Na^+ 、 K^+ 、総タンパク、血清 GPT 及び GOT などの血液学的試験を実施した。体重も 1 ヶ月おきに測定した。試験期間を通して月経周期の記録を継続した。

この雌群が 1 年後に雄のアカゲザルを出産し、このサルには試験食を給餌しなかった。妊娠期間の妊娠 40、80、120 及び 160 日目及び産後 30 及び 60 日目に全血球計算を実施した。出産した児動物の数は被験サルが計 5 匹、対照サルが計 6 匹であった。試験群と及び対照群の幼児に、出生後 1、5、15、30 及び 60 日に血液学的評価を実施し、この幼児が 2 歳に達するまで観察を継続した。生後 3 ヶ月目に試験群及び対照群から各 2 匹ずつ選択して母サルから隔離し、1 ヶ月間の心理学的ホームケージ観察を実施した。

試験期間に親サル又は児サルに臨床的異常は観察されなかった。被験サルの妊娠期間には合併症はみられず、正常な幼児を出産した。成体雌サルは持続的に正常な児サルを出産した。BHT の曝露期間に生まれた幼児も、投与とは無関係な原因による 1 匹の幼児の死亡を除き、いずれも健康であった。生後 3 ヶ月目のホームケージ観察では行動異常は示されなかった (Allen, 1976 年)。

2.2.5 催奇形性に関する特殊試験 (原文 p32)

BHT の胚毒性に関する試験では次の 3 通りの用量計画を用いた: 妊娠期の特定日の単回投与 (1,000 mg/kg 体重/日)、交配日から妊娠期間までの反復投与 (750 mg/kg 体重/日) 及び交配前 7~10 週間に連日投与 (マウス 250~500 mg/kg 体重/日、ラット 500 及び 700 mg/kg 体重/日)、これを交配から妊娠期間を通して被験動物を殺処分するまで継続した。完全に発達した胎児の骨格及び軟組織の検査及びその他の基準では、有意な胚毒

性は観察されなかった。生殖後及び出生後の発達にも影響はみられなかった (Clegg, 1965 年)。

2.2.6 遺伝毒性に関する特殊試験 (原文 p32)

BHT による遺伝側性試験の結果を表 5 に要約している。

10 µg/mL という低濃度の BHT (至適濃度 50~100 µg/mL) でも、BHT は形質転換 *Djungarian* ハムスターの線維芽細胞の培養液中で、細胞から細胞への染料移動 (黄リン移動) に強力な阻害作用を及ぼした。この作用は可逆性であった。BHT はこの作用を一連の既知の腫瘍プロモータと共有していた (Budunova ら、1989 年)。

Bombard らは 1 件の論文で、上述のデータを含む BHT の遺伝毒性試験の広範囲なデータベースを再検討した (1992 年)。この著者らは、多くのエビデンスから BHT が点突然変異、染色体異常を誘発するかまた DHA を損傷するか損傷及び相互作用を有することに関して可能性が低いことが指摘されており、BHT はヒトに対する遺伝毒性リスクを示していないという結論に至った。

高次コイルプラスミド DNA の切断を誘発するための BHT の能力及びその代謝物について、pUC18 でアガロースゲルを用いた電気泳動で試験した。 $10^6 \sim 10^{-3}$ M 範囲の BHT-キノンに関しては用量依存性の DNA の切断が示されたが、高用量の BHT-アルデヒド及び BHT-ペルオキシキノンを用いた場合には、切断の程度が低下した。BHT、BHT-キノンメチド及びその他の BHT 代謝物は、プラスミド DNA に作用を及ぼさなかった。遊離ラジカルスカベンジャーは BHT-キノン及び BHT-ペルオキシキノンに対して有効であるが、BHT-アルデヒドに対しては無効であった。チトクロム C の減少によって測定されたスーパーオキシドラジカルの形成は、BHT-キノンでのみ示された (Nagai ら、1993 年)。

BHT (5~20 µg/プレート) の添加は、活性及び不活性に関わらず、サルモネラチフィウム TA98 株及び TA100 株を用いたアフラトキシン B₁ による突然変異の可能性を 2 倍に増大させた (Shelef & Chin, 1980 年)。

BHT (50~250 µg/プレート) の添加は、ラット肝 S-9 分画の存在下で、サルモネラチフィウム TA98 株及び TA100 株を用いた 3,2'-ジメチル-4-アミノビフェニル誘発性の突然変異を阻害した (Reddy ら、1983a)。

表 5. BHT による遺伝毒性試験の結果

試験系	対象	BHT 濃度	結果	文献
<u>Point Mutation</u>				
Ames test ¹	<i>S. typhimurium</i> TA1535, TA1537 TA1538	0.015-0.6%	Negative	Brusick 1975
Ames test ¹	<i>S. typhimurium</i> TA97, TA102 TA104, TA100		Negative	Hageman et al. 1988
Ames test ¹	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100 TA1535, TA1537 TA1538	100-10 000 µg/plate	Negative	Williams et al. 1990b
Ames test ¹	<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100	100-1000 µg/plate	Negative	Yoshida 1990
Ames test ¹	<i>S. typhimurium</i> TA 98	10 µg/plate	Negative	Dettinger et al. 1993
Host-mediated assay	ICR Swiss mouse/ <i>S. typhimurium</i> G46, TA1530	30-1400 mg/kg - acute 30-500 mg/kg - subacute	Negative	SRI 1972
Mammalian cell gene mutation	rat liver epithelial cell (line 18), HGPRT locus	60-90 µg/ml	Negative	Williams et al. 1990b

表 5 (続き)

試験系	対象	BHT 濃度	結果	文献
Sex-linked recessive lethal	<i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i>	2.0×10^{-6} µg	Negative ²	Prasad & Kamra 1974
Sex-linked recessive lethal	<i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i>	5% diet	Negative	Brusick 1975
<u>Clastogenic effects and chromosomal aberrations</u>				
Chromosomal aberration assay	human WI-38 (embryonic lung cells)	2.5-250 µg/ml	Positive ²	SRI 1972
Sex chromosome loss	<i>Drosophila</i> <i>melanogaster</i>	2.0×10^{-6}	Negative ²	Prasad & Kamra 1974
Micronucleus assay	rat bone marrow	30, 90, 1400 mg/kg (acute and subacute)	Negative	SRI 1972
Dominant lethal assay	Sprague-Dawley rat	30, 900, 1400 mg/kg bw (acute)	Negative	Brusick 1975
		30, 250, 500 mg/kg bw/day (subacute)	Positive	
Dominant lethal assay	male Sprague-Dawley rats	50, 150, 500 mg/kg bw/day	Positive ²	Sheu et al. 1986
	male mice	1% diet	Negative	

表 5 (続き)

試験系	対象	BHT 濃度	結果	文献
Heritable translocation assay	male mice	1% diet	Negative	Sheu et al. 1986
<u>DNA interactions</u>				
Mitotic recombination	Saccharomyces cerevisiae D4	0.6-2.4%	Negative	Brusick 1975
Mitotic recombination - Host-mediated	Saccharomyces cerevisiae D3/ICR	30, 900, 1400 mg/kg bw (acute)	Negative	SRI 1972
	Swiss mouse	30, 250, 500 mg/kg bw/day (subacute)	Negative	
Sister chromatid exchange ¹	CHO cells	1 - 1000 µg/ml	Negative	Williams et al. 1984
DNA excision repair synthesis	UV-irradiated human lymphocytes	?	Positive	Daugherty 1978
DNA repair test	hepatocyte primary culture	0.01 - 10 µg/ml	Negative	Williams et al. 1990b

¹ ラット肝 S9 代謝活性化系存在及び非存在の両方

² この結果の考察は Bombard et al. (1992)に含まれている。

BHT(100～250 µg/プレート)の添加は、サルモネラチフィウム TA98 株及び TA100 株における 3,2'-ジメチル-4-アミノビフェニル誘発性の突然変異の阻害を示し、さらに、飼料中 BHT(0.6%)を投与したラット由来の S-9 分画標本では、BHT 無添加の飼料を与えたラット由来の S-9 分画標本と比較して阻害率が高かった (Reddy ら、1983b)。

BHT はハムスター肝由来の S-9 分画において、サルモネラチフィウム TA98 株及び TA100 株におけるベンジジン誘発性の突然変異に対し、中程度に有効な阻害剤であった (Josephy ら、1985 年)。

BHT(0.11～11 µM)は、不定期 DNA 合成の著明な減少という形で、AAF 又は N-ヒドロキシ AAF 誘発性の肝細胞の遺伝子損傷に対して防護した。また、BHT は、ヒト肝細胞で AAF 誘発性の DNA 損傷を阻害した。さらに、飼料中の 0.5%BHT を 10 日間前投与したラットでは、このような細胞を AAF 又は N-ヒドロキシ AAF に曝露させた場合に、不定期 DNA 合成の発現率が対照群のラットよりも低値であった (Chipman & Davies, 1988 年)。

2.2.7 肝毒性に関する特殊試験 (原文 p36)

2.2.7.1 マウス (原文 p36)

雄 ddY マウスに、BHT(200～800 mg/kg 体重)及び合成 GSH の阻害剤、ブチオニンスルホキシミンとの混合物を経口投与したところ (BSO は BHT を投与した 1 時間前及び 2 時間後に 4 mmol/kg 体重を腹腔内投与)、SGPT 活性ならびに小葉中心性壊死の増大という特徴を有する肝毒性が発現した。この肝毒性反応は時間ならびに用量依存性であった。

BHT(最大量 800 mg/kg 体重)単独では肝損傷のエビデンスはみられなかった。SKF-525A、ピペロニルブトキシ

ド及び二硫化炭素などの薬物代謝阻害剤は、BHT 及び BSO の併用投与による肝毒性作用を阻害する一方で、肝傷害を増大させる傾向のあるフェノバルビツールなどの薬物代謝の誘発剤でもあった。この結果は、BHT がチトクロム P-450 依存性の代謝反応によって活性化され、BSO 投与によって肝 GSH が枯渇したマウスにおいて、反応性代謝物の不十分な解毒率による肝毒性作用が引き起こされたことを示している。著者らは、BHT 構造的類似体を用いた試験群に基づき、BHT-キノンメチドがマウスの肝毒性において役割を担っている可能性のあることを示唆している(Mizutani ら、1987 年)。

2.2.7.2 ラット (原文 p36)

0 又は 0.4%BHT を含有する飼料で、体重の初期値が 120~130 g であった雌(白ウィスター)ラットを 80 週間飼育した。この試験食を始めて 1 週間後、肝重量、ミクロソームタンパク、チトクロム P-450、チトクロム b5、NADPH-チトクロム c レダクターゼ、ビフェニル-4-ヒドロキシラーゼ及びエチルモルフィン N-デメチラーゼの値が有意に増大したが、アニリン-4-ヒドロキシラーゼの値は増大しなかったことが観察された。肝総タンパク、コハク酸デヒドロゲナーゼ及びグルコース-6-ホスファターゼの値はやや低下した。このパターンは試験期間を通してほとんど変化しなかった。試験期間の終了時に BHT を含有した試験食から離脱したラットに、BHT を含有しない飼料を 18 日間摂取させたところ、チトクロム b5、チトクロム c レダクターゼ及びエチルモルフィン N-デメチラーゼの値を除き、多くの肝パラメータが正常値に回復したことが示された。80 週間の飼育の終了時の小葉中心性細胞の膨大を含む組織学的変化は、18 日間の BHT を含有しない飼料によって可逆的であった。唯一の超微細構造変化は平滑小胞体の増殖であった(Gray ら、1972 年)。

雌ラット群(80~100g)に、トウモロコシ油に溶解した 0.4%BHT を試験食に混合して投与した後、1、8、16、32 又は 80 週間間隔で殺処分し、対照群と比較した。肝サンプルを採取し、生化学、組織化学及び形態学的試験を実施した。肝変化の可逆性を検討するため、80 週間の BHT 投与後に、4 匹のラットから成る 1 群に対照食を 18 日間給餌した。BHT を投与して 1 週間後に、薬物代謝活性の増大及び NADP チトクロム c レダクターゼ活性の増大を伴って、肝の相対重量が 35%増大するという著明な肝膨大が認められた。80 週間の投与から離脱した 18 日後には、肝重量の増大はごくわずかであった。このことから、この作用は可逆的であると考えた。組織学的には、BHT 投与後の肝は、この領域の不均一な外観を伴った小葉中心性肝細胞の膨大という特徴がみられた。超微細構造的には、平滑小胞体の増殖が認められた。この著者らは、肝傷害のエビデンスは不明瞭であるが、グルコース-6-ホスファターゼ活性の低下及び細胞膨大など、多くの肝毒素及び肝癌にみられるような特徴が認められると記している。しかし、細胞傷害に特徴的なリソソーム変化は認められず、作用は可逆的であった(Crampton ら、1977 年)。

8 匹のウィスターラット雄から成る複数群に、0、0.1、0.25、0.5 又は 0.75%BHT を含有する飼料を 30 日間給餌した。 ^3H チミジン標識指数又は分裂指数を用いて測定したところ、BHT は 30 日後に肝、膀胱又は甲状腺の細胞増殖を誘発しなかった。2 番目の試験では、8 匹のラットから成る複数群に、0.5%BHT を含有する飼料を 2、4、8、10 又は 14 日間給餌した。この投与は時間制限的に肝細胞の ^3H チミジン標識指数を増大させたが、8 日以内に対照値まで沈静化した。このような肝の ^3H チミジン標識指数の増大は、分裂指数の予想外に大幅な増大を伴った(Briggs ら、1989 年)。

Sprague-Dawley ラット雌の複数群に 700 mg/kg 体重の BHT を投与し、4 時間後及び 21 時間後に選択した肝生化学作用を測定した。オルニチン・デカルボキシラーゼ(ODC)活性及びチトクロム P-450 含有量がそれぞれ 190%及び 30%増大した。肝グルタチオン含有量又は血清アラニンアミノトランスフェラーゼ活性に及ぼす作用

は認められなかった。増大したアルカリ性 DNA 溶離により、肝 DNA 損傷の徴候が得られた。BHT 用量が 140 mg/kg 体重の場合には、このようなパラメータに及ぼす作用は検出できなかった。BHT の高用量群では高用量群では DNA 損傷作用が生じる可能性があるという結論に達した (Kitchin & Brown, 1987 年)。

ウィスターラット雄から成る複数群に、0、25、250 又は 500 mg/kg 体重/日の BHT を 7 日間 (5 匹/群) 又は 28 日間 (10 匹/群) 強制経口投与し、さらに、1 日量が 1,000 又は 1,250 mg/kg 体重/日の BHT を最長 4 日間投与した (5 匹/群) (致死未満量)。この致死未満量は 48 時間以内に小葉中心性壊死を誘発し、一方、7 日間又は 28 日間投与した 250 又は 500 mg/kg 体重/日の BHT は用量依存性の肝腫脹を引き起こしたほか、最高用量では、進行性の門脈周囲肝細胞壊死を誘発した。門脈周囲の病変は、胆管の増殖、持続的な線維性ならびに炎症性細胞反応、肝細胞過形成、肝細胞ならびに細胞核膨大と関連していた。200 mg/kg 体重/日の用量では、軽度の細胞損傷のエビデンスが得られたが、25 mg/kg 体重/日では BHT が肝損傷を引き起こすというエビデンスは認められなかった。生化学的変化には、エポキシドヒドロラーゼの用量依存性の誘発、チトクロム P-450 イソ酵素の比率における用量依存性の変化及びグルコース-6-ホスファターゼの減少などが挙げられた。BHT の測定値は、用量依存性の脂肪中への蓄積を示したが、肝中への蓄積は示さなかった (Powell ら、1986 年)。

ラットへの 500 mg/kg 体重の BHT の単回投与に関して、ミクロソーム酵素誘発剤の 1 種であるフェノバルビタール (PB) 及びグルタチオン除去剤の 1 種であるブチオニンスルホキシミン (BSO) と併用摂取した場合の急性作用を検討した。Sprague-Dawley ラット雄 10 匹から成る複数群に対し、80 mg/kg 体重/日の PB を生理食塩水中に投与する前の 3 日間に BHT を投与する群、900 mg/kg 体重の BSO を生理食塩水中に投与する 1 時間前に BHT を投与する群とし、それぞれの飼料中トウモロコシ油に BHT を添加するか又はトウモロコシ油単独を投与する群とした。BHT 投与の 36 時間後、ラット群を殺処分して血液を採取し、血清酵素活性 (ALT、AST、アルカリホスファターゼ、乳酸脱水素酵素)、アルブミン、APTT 及び凝固因子 II、VII、X 及び IX に関するアッセイ (分析) を実施した。チトクロム P-450 1A 及び 2B 分布の肝ロット視覚化のための免疫化学的染色などの組織病理学的検査のために、(四枚の肝葉それぞれからの) 肝、肺及び腎を処理した。また、肝ホモジネートについても、還元グルタチオン、ミクロソーム・チトクロム P-450、エトキシレゾルフィン-O-脱エチル化 (EROD) 活性、エトキシマリン-O-脱エチル化 (ECOD) 活性、エポキシドヒドロラーゼ仮性及びマロンジアルデヒドに関して分析した。

この結果は、500 mg/kg 体重の BHT の単回経口投与が閾値を下回る急性肝毒性をもたらすことを示していた。BHT 投与は、凝固因子 IX の濃度のわずかな低下を除き、血清パラメータに作用を及ぼさなかった。BHT 誘発性肝細胞壊死ならびに肝マロンジアルデヒド濃度にはエビデンスは認められず、脂質過酸化反応は対照群よりも軽度であった。また、BHT の単回投与は 10 匹中 8 匹のラットで肝細胞の有糸分裂活性を増大させ、ミクロソームタンパク含有量又は EROD 活性に影響することなく ECO の肝活性を増大させたほか、肝エポキシドヒドロラーゼ活性の著明な増大に関与していた。最後に、フィロキノンエポキシド・レダクターゼ活性の BHT 誘発性の障害も仮説して挙げられる。肝 GSH 濃度に及ぼす作用は認められず、チトクロム P-450 1A 及び 2B イソ酵素ファミリーに関する肝細胞の免疫化学的染色においても明白な投与関連の変化はみられず、肺又は腎の組織病理学的変化もみられなかった。PB 又は BSO の前投与は、無条件の肝損傷 (肝細胞変性又は凝固壊死) をもたらしたが、約半数のラットでは損傷のほとんどが小葉中心性領域であり、組織損傷の指標として一般に用いられる血清パラメータ (ALT、AST、乳酸デヒドロゲナーゼ) には影響はみられなかった。このような投与は、BHT の反復投与で観察されたような門脈周囲の細胞損傷を再現したため、この結果を BHT の反復投与で誘発された酵素プロファイルの変化に関する試験モデルとして、利用することはできなかった (Powell & Connolly, 1991 年)。

2.2.8 腎毒性に関する特殊試験 (原文 p39)

雄 F344 ラット群への BHT (1,000 mg/kg 体重) の単回投与は、肝損傷に加え、腎切片での p-アミノ馬尿酸の蓄積量の低下、タンパク尿及び酵素尿によって測定できるような多少の腎損傷をもたらした。雄ラットに BHT 投与前にフェノバルビタールを投与したところ (80 mg/kg 体重/日×4 日間、腹腔内投与)、わずかな尿細管壊死及び著明な生化学的変化を伴う腎損傷が生じた。雌ラットは BHT 誘発性の腎ならびに肝損傷に対しては雄よりも感受性が低かった (Nakagawa & Tayama, 1988 年)。

10～20 匹の雌ウィスターラット (生後 5 週) の複数群に、唯一のタンパク源としてカゼイン酸ナトリウム又はラクトアルブミンを使用した半精製飼料中の 1%BHT を 13～48 日間投与し、BHT の腎臓発癌作用を試験した。雌ラットにみられた BHT 誘発性の腎症はこの飼料の使用とは無関係であった。著明な腎石灰化症が認められたのは、カゼイン酸ナトリウムを含有する飼料を摂取したラットのみであった。このため、腎症の発症と BHT 投与後の腎臓発癌性との間の相関は確認されなかった (Meyer ら、1989 年)

雄 ddY マウス 10 匹から成る群に、(0、1,570、1,980、2,630、3,300、4,980 又は 5,470 mg/kg 体重/日に相当する) 精製飼料中の 0、1.35%、1.75%、2.28%、2.96%、3.85% 又は 5.00%BHT をそれぞれ 30 日間投与した。投与したマウスのいずれの群でも最終体重が対照群よりも低値であり、その体重差の範囲は最低用量群の 15%～最高用量群の 30% であり、最高用量の 3 つの群では統計的に有意であった。腎の絶対重量及び相対重量にはそれぞれ用量依存性の減少及び増大がみられ、これは体重増加率の低下と相関していた。肉眼による病理学的試験の結果からは、高用量群の 10 匹中 7 匹の腎に「不格好な腎」がみられたのに対し、その他の投与群又は対照群にはこの現象はみられなかったことが明らかになった。腎の組織病理学的検査からは中毒性腎症の発症率及び重篤度の劇的な用量依存性の増大 (それぞれの投与群の 10 匹中 0、2、3、6、8、10 及び 10 匹に発症) が明らかになり、このことは多くの尿細管病変によって示された (遠位及び近位尿細管変性、遠位尿細管壊死、遠位尿細管新生、尿細管膨張及び嚢胞)。このことは投与関連である可能性があるが、このような同じマウスの肝では病理学的変化は示されなかった。健康な雄マウスに飼料中 BHT を 30 日間投与した場合の中毒性腎症の ED₅₀ (50%有効量) は、2,300 mg/kg 体重/日と計算された (Takahashi, 1992 年)。

2.2.9 肺毒性に関する特殊試験 (原文 p39)

スイスウェブスターマウス若年雄群に濃度 63～500 mg/kg 体重の BHT を腹腔内投与した。このマウス群に BHT を投与した 1、3 又は 5 日後に殺処分した。発育良好な群に 500 mg/kg 体重を投与した 3 日後に、多数の肺胞細胞の増殖、巨細胞の形成及びマクロファージの増殖などの組織病理学的変化が認められた。このような変化は、肺重量及び DNA ならびに RNA 総量の増大と伴った。この変化は用量依存性であり、最小有効量は 250 mg/kg 体重であった (Saheb & Witschi, 1975 年)。

スイスマウスの雄 60 匹に濃度 400 mg/kg 体重の BHT をトウモロコシ油に溶解して腹腔内投与した。9 日後に被験マウス群 6 匹及び対照群 6 匹を殺処分した。殺処分する 2 時間前に、各マウスに 2 µCi/g の放射性チミジンを投与した。試験中に死亡したマウスはなく、いずれのマウスにも呼吸窮迫の徴候はみられなかった。投与した 2 日後に、1 型肺胞上皮の細胞傷害が認められた。有糸分裂で異常な II 型巨細胞が観察されたほか、放射性チミジンの蓄積が多くみられた。6 日後に、小血管及び毛細管で標識内皮細胞がみられたほか、間質及び毛細管で線維芽細胞の増大が認められた。標識が剥がれ落ちた 2～5 日後にチミジンで標識した肺細胞の増大がみられ、9 日後までに対照群の値に近づいた。肺チミジンキナーゼ活性の値は投与の 1～4 日後に急上昇し、その後は急速に下降した (Adamson ら、1977 年)。

NMRI マウス (25～35 g) 及びウィスターラット (160～320 g) の群に

大豆油に溶解し、単回の腹腔内投与又は強制経口投与で BHT 500 mg/kg 体重を投与した。投与した 4 日後に放射性標識 ^{14}C チミジンを投与した。90 分後、被験動物を殺処分し、肺を除去して DNA 濃度を測定した。マウスでは、腹腔内又は経口投与群の DNA 合成が雄と雌とで等しく増大した。肺重量は増大したが、DNA 濃度は影響を受けなかった。雄ラットには作用はみられなかったが、雌ラットには(肺重量の)わずかな増大が認められた(Larsen & Tarding, 1978 年)。

スイスマウスの雄 16~24 匹の群(25~30 g)にトウモロコシ油に溶解した単回腹腔内投与の BHT(63、215 又は 500 mg/kg 体重)又はトウモロコシ油単独(トコフェロール圧搾油 0.5 mL)を投与した。3 日後にマウスを殺処分した。BHT 投与後、乾燥重量と同じく、肺の湿重量が対照群と比して 120%増大した。DNA 含有量及び非タンパク・スルフィドリルの濃度が有意に増大した(133~156%)。スペルオキシド不均化酵素及びその他の酸化酵素濃度も上昇した。この著者らは、BHT が肺の炎症過程及び修復増殖過程を明らかに増大させるという結論に至った(Omaye ら、1977 年)。

BHT への急性曝露の後、I 型(扁平)上皮細胞の浸潤に関連する初期の一連の事象に続いて、多発性壊死及び血液関門の破壊が生じた。この一連の組織変化及び修復機序に関する詳細な考察が行われた。それによると、扁平上皮の傷害に対する感受性は、酸素曝露、放射線曝露及び血液感染症のブレオマイシンによる治療の後に認められたものと類似していたが、修復パターンはきわめて異なっていた。BHT は細胞膜との相互作用の結果として、細胞溶解及び細胞死を引き起こすと考えられる(BIBRA, 1977 年)。

BHT 注入後のマウスで観察された肺重量の増大及び肺 DNA へのチミジン取込み反応は、シーダーテルペンによる治療によって阻害された。生後 3 週間未満のマウスに BHT を単独投与した場合には、肺重量の増大は観察されなかった。このことは幼児マウスに BHT を代謝する能力のないことに起因していると思われる(Malkinson, 1979 年)。

BHT アナログのマウスでの肺毒性試験では、毒性作用に必須の構造的特徴のひとつが 4 位にメチル基及びオルト・アルキル基を有するフェノール環であり、これがヒドロキシ基の束縛作用をもたらす可能性がある(Mizutani ら、1982 年)。

別の試験では、マウスでの BHT の毒性効力が 4-メチル基の重水素化によって低下し、このことは BHT の投与後の肺損傷が代謝物 2,6-ジ-*t*-[*tert*-]ブチル-4-メチレン-2,5-シクロヘキサジエノンによって引き起こされることを示唆していた(Mizutani ら、1983 年)。

単回投与の BHT を投与した雄マウスが、I 型上皮細胞が選択的に破壊されて II 型立方細胞が取って代わるという特徴を有する、肺の超微細構造変化を示した。このような変化はペルオキシソーム数及びカタラーゼ活性の著明な減少を伴っていた(Hirai ら、1983 年)。

BHA の皮下注射は、BHT を閾値以下で腹腔内に皮下注投与したマウスの肺重量/体重の比を有意に増大させた(Thompson ら、1986 年)。

雄 CD-1 マウスで、肺重量にみる BHT 誘発性変化を緩和する BHA の能力を試験した。BHA 独では、用量 500 mg/kg 体重(単回皮下注)までは肺重量に作用を及ぼさなかった。閾値以下の用量の BHT(0~250 mg/kg 体重 J.p.)を投与する 30 分前に、BHA を投与した場合、BHA は肺重量を用量依存性に増大させた。このような BHT

誘発性の肺重量の変化を増強する BHA の作用は、時間のほか、相対的に BHT よりも BHA の投与ルートに左右された (Thompson ら、1988a 年)。

マウス肺切片を用いた試験では、BHA は BHT とタンパクとの共有結合を増強した。また、CD-1 マウスに対する BHA (250 mg/kg 体重) 又はマレイン酸ジエチル (DEM, 1 mL/kg 体重) のいずれかの皮下注投与は、BHT 誘発性肺毒性の類似の増強をもたらした。DEM と異なり、BHA の投与 (250 又は 1,500 mg/kg 体重) はマウスの肺グルタチオン濃度を低下させなかった。In vitro の結果から、過酸化水素の形成及び BHT-キノンメチドの一連のペルオキシダーゼ依存性の形成を増大させた結果として、BHA が BHT の肺での作用を促進することが示唆されている (Thompson & Trush, 1988b 年)。

BHT 投与は、雄雌 A/J マウスの肺での細胞質性 Ca^{++} -活性化中性プロテアーゼ (カルパイン) 活性を低下させた。このタンパク分解活性の早期 (1 日目) 及び終了に生じた変化は、肺重量/体重の比 (4 日目) で評価した観察可能な肺毒性を引き起こした変化よりも小規模であった (Blumenthal & Malkinson, 1987 年)。

同系交配の C57BL/6J マウス 2~3 匹から成る複数群に、用量 10~200 mg/kg 体重の BHT 又は BHT-BuOH、BHT 代謝物を腹腔内投与した。BHT-BuOH は、肺相対重量の増大、肺細胞質性 Ca^{++} -依存性プロテアーゼ活性の低下及び肺組織病理に及ぼす効力が BHT よりも 4~20 倍強力であった。損傷の性質 (I 型細胞死) 及び変性反応 (II 型細胞過形成及び分化) については、両化合物は同等であった。また、BHT-BuOH は肝、腎又は心臓に損傷を引き起こした。この著者らは、BHT-BuOH の形成は BHT が、BHT-BuOH-キノンメチドである可能性の高い最終的な肺毒素に変換するために必須の段階である可能性があるとし唆した (Malkinson ら、1989 年)。

BHT の投与後 0、24 又は 48 時間後に投与した場合、合成コルチコステロイド・メチルプレドニゾロン (MP; 30 mg/kg 体重、2 回/日×3 日間を皮下注投与) は部分的に、雄 C57BL/6N マウスを BHT の肺毒性から防護した (Okine ら、1986 年)。

試験したすべての同系交配のマウス株で BHT 投与後に肺毒性が観察されたが、ラットにはみられなかったこと、さらに、BHT-BuOH がマウス肝及び肺ミクロソームの主要な生成物であったが、ラットのミクロソームでは生成の痕跡のみであったことに基づき、マウスで肺毒性を誘発する t-[tert-]ブチル基 1 個の水酸化 BHT (BHT-BuOH) の代謝物活性試験をした。肺重量/体重比、 Ca^{2+} -依存性プロテアーゼ (カルパイン) 活性を測定し、肺の組織病理学的検査によって肺損傷を評価した。BHT-BuOH の腹腔内投与がもたらした肝、心臓及び腎の組織病理学的変化を試験した。BHT-BuOH は、用量 50 mg/kg 体重を腹腔内した 4 日後に、投与肺重量/体重比のほぼ倍増を誘発した。比較試験では、このパラメータに持続的な増大を生じさせるには、BHT の用量 200 mg/kg 体重以上が必要であった。これ以外の BHT 代謝物である DBQ、BHT-MeOH、BHT-OOH 及び BHT-OH は、用量 200 mg/kg 体重の腹腔内投与では作用がみられなかった。用量 50 mg/kg 体重の BHT-BuOH を投与したマウスでは、肺カルパイン活性が有意に低下し、投与の 3~4 日後には活性が最大喪失に達した。この低下作用は時間経過を経ても BHT 400 mg/kg 体重によって誘発された作用と同程度であった。10 mg/kg 体重/日の BHT-BuOH でも、高用量群ほど著明ではなかったものの、カルパイン活性の有意な低下がもたらされた。50 mg/kg 体重/日の腹腔内投与の BHT-BuOH に対する反応として、肺胞変性及び代償性 II 型細胞の過形成、炎症反応及び細気管細胞過形成が観察された。用量 10 mg/kg 体重/日ではこれよりも小規模な作用がみられ、このような作用は 400 mg/kg 体重の BHT が誘発した作用に匹敵すると考えられた。このマウス肺での BHT 及び BHT-BuOH の質的類似性、代謝物の高力価及び BHT-BuOH の形成と肺毒性との種族間の相関に基づき、この著者らは、

BHT-BuOH が BHT の生体内変化における中間体であり、マウスでは毒性代謝物であるという結論に達した (Malkinson ら、1989 年)。

マウスの肺毒性に関与している代謝物として、*t*-[*tert*-]ブチル側基のヒドロキシ化(QM-OH)の後で形成される BHT のキノンメチド代謝物を試験した。QM-OH は BHT キノンメチドよりも強力な求電子であり、GSH (グルタチオン)を用いた反応時間が 6 倍速いことが示されている。ラット及びマウスの両者由来の肝ならびに肺ミクロソームでは BHT からキノンメチドを生成したが、BHT から迅速に QM-OH が迅速に生成されたのはマウスのミクロソームのみであった。ラット肝由来のミクロソームは QM-OH の痕跡をもたらしたが、肺ミクロソームは全くもたらさなかった。このような結果を利用して、マウスの肺毒性とこの作用の種特異的なキノンメチドの生成とを関連づけた以前の結果を調整した。この著者らは、マウスでの臓器特異的な BHT の毒性は、毒性代謝物を不活化するための GSH が肺では肝よりも低濃度であることに起因しているという仮説を立てた (Bolton ら、1990 年)。

4 種類マウス株で、用量 350～1,700 mg/kg の 50%致死量を用いて、BHT 誘発性の肺傷害の修復に関する経時的变化を試験した。試験した 4 種類のマウス株は、等量では同じ程度の傷害が発生し、肺傷害と致死率との間の相関は確認できなかった (Kehrer & DiGiovanni, 1990 年)。

いくつかの化合物の生体内活性化に関与する BHT などのイソ酵素を肺毒素として同定するため、特異的なチトクロム P-450 イソ酵素の活性を変化させる多くの化合物を使用した。MF1 非近交系マウスにおいて、O,O,S-トリメチルホスホロジチオエート、プロモホス、*p*-キシレン、 β -ナフトフラボン又はピラゾールのマウスへの前投与はいずれも、BHT 投与の 3 日後の肺重量/体重比を低下させることが示されている BHT 400 mg/kg 体重の腹腔内単回投与によって誘発された肺毒性の軽減をもたらした。この最初の 3 剤は、50%致死量の増大で示される BHT のマウスでの致死率を大幅に低下させた。このような薬剤による肺毒性の阻害は BHT の致死率を比例的に低下させた。また、この 3 剤は、ラット肺ミクロソームのペントキシシレゾルフィン (PROD) 活性及び CYP 2B1 に寄与する作用を著明に阻害した。 β -ナフトフラボンはこのような 50%致死量の値及び PROD 活性のほかピラゾール誘発性の PROD 活性に対してやや小規模な作用を及ぼす。この著者らは、この 3 剤がマウスでの BHT の肺毒性を抑制したほか、ラット肺ミクロソームでの PROD 活性を阻害したことから、CYP 2B1 はマウス肺で BHT の生体内活性化を誘発する薬剤である可能性が高かった。しかし、BHT のラット肺への毒性がみられないことから、ラット肺ミクロソームで得た結果はマウスでは必ずしも妥当ではなかった。さらに、この著者らは、マウスへのピラゾールの前投与には言及せず、肺重量/体重比の BHT による増大の抑制のほか、ラット肺ミクロソームの PROD 活性の抑制について言及している (Verschoyle ら、1993 年)。

マウス肺から分離したクララ (非線毛性上皮) 細胞について、BHT を代謝する能力を試験したほか、このような細胞に及ぼすキノンメチド QM-OH の推定上の毒素を BHT と BHT-BuOH とで比較した。このような細胞は肺の大半のモノオキシゲナーゼ活性、主に CYP 2B1/2B2 を含有する。定量的な代謝物データの分析から、マウス肺クララ細胞の BHT-BuOH を生成する *t*-[*tert*-]ブチル基では BHT-MeOH を生成する 4-メチル位置よりも、BHT の水酸化が 5 倍に速まることが明らかになった。また、このデータは、QM-OH が BHT 由来の BHT-QM よりも BHT-BuOH から迅速に生成されることを示唆していた。BHT-BuOH は、BHT よりも培養物中でクララ細胞の生存能力をさらに有効に低下させた。濃度 5～10 μ M の BHT-BuOH は、濃度 75～100 μ M の BHT と同程度に生存能力を低下させた。SKF 525-A によるチトクロム P-450 の阻害は、BHT 及び BHT-BuOH の両者が誘発したクララ細胞への傷害を軽減した。この著者らは、BHT-BuOH は、QM-OH と考えられている細胞毒性種となる前の BHT の P-450-触媒酸化における中間体のひとつであるという結論に至った (Bolton ら、1993 年)。

スイス白マウス雄 20 匹からなる複数群に、単回腹腔注入で用量 0、200、400 又は 800 mg/kg 体重のオリーブオイル中の BHT 又はオリーブオイル単独を投与した。BHT への曝露後、各群から 5 匹のマウスを 24 時間、48 時間又は 7 日後に殺処分した。肺から洗浄液を採取し、総タンパク含有及び乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性を検定した。沈殿物中の細胞数を計算した。肺の組織病理学的検査を実施した。48 時間及び 7 日後に気管支肺胞の洗浄液中の細胞数の時間依存性及び用量依存性の増大のほか、総タンパク含有量及び LDH 活性の増大が示された。毛細管及び小血管のうっ血のほか、肺胞中隔の細胞充実度及びびまん性肥厚の増大で示される組織病理学的病変の重篤度もまた、時間依存性及び用量依存的に増大した (Waseem & kaw, 1994 年)。

2.2.10 出血作用に及ぼす特殊試験 (原文 p44)

2.2.10.1 マウス (原文 p44)

結合種、2.2.10.3 節を参照

2.2.10.2 ラット (原文 p44)

雄 Sprague-Dawley ラットの複数群 (生後 6 週) に濃度 0.6%~1.4% 半合成食中の BHT 又は対照食のみを給餌した。濃度 0.7% 以上の群では 40 日以内に死亡が生じた。死亡したラット又は瀕死のラットには胸腔及び腹腔での突発性の大量出血又は外出血が観察された。BHT の 1 日量が増大するにつれてプロトロンビン指数が低下した。4 日後に軽度の下痢が示された。荒れた体毛及び赤みのある尿がみられた。出血に起因する死亡及び中毒から二次的に生じたタイプとして著者らが分類した死亡は、プロトロンビン濃度の低下に起因すると考えられた。著者らによれば、この作用はラット株及び飼料中濃度に左右されると思われる (Takahashi & Hiraga, 1978a)。

雄 Sprague-Dawley CLEA ラットを濃度 0.6、0.7、0.8、1.0、1.2 又は 1.4% BHT を含有する飼料で 40 日間飼育した。9~37 日目に濃度 0.7% 以上の BHT では、死亡率に及ぼす用量依存性の作用 (50 匹中 21 匹が死亡) が観察された。このようなラット群には特発性の大量出血が観察された。生存していたラットのプロトロンビン指数が低下し、これは BHT の用量依存性であった。最低濃度でも低下率は約 65% となった (Takahashi & Hiraga, 1978b)。

雄 Sprague-Dawley CLEA ラットを濃度 85、170、330、650、1,300、2,500 又は 5,000 mg/kg 体重の BHT を含有する飼料で 1~4 週間飼育した。170 mg/kg 体重以上の BHT を投与した全群に 1 週目からプロトロンビン指数の有意な低下が観察された。しかし、ラットをこの試験食で 4 週間飼育したところ、プロトロンビン指数の有意な低下がみられたのは濃度 5,000 mg/kg 体重群のみであった。この群では唯一、対照群と比較して肝相対重量の増大が示された。他の試験では、1.2% BHT によって雄 Sprague-Dawley に生じた出血性死亡、出血及びプロトロンビン指数が、0.68 モル/kg 体重/日のフィロキシンの同時添加によって抑制された。オキシドフィロキシンも BHT に起因する低プロトロンビン血症を抑制した (Takahashi & Hiraga, 1979 年)。

雄 Sprague-Dawley CLEA ラットを 0 又は 1.2% BHT 含有の飼料で 1 週間飼育した。BHT を投与したラット群は大部分の臓器に出血が示された。副睾丸内へのエバンスブルーの漏出が有意に増大した。さらに、ADP 誘発性の血小板凝集の阻害及び血小板因子 3 のアベイラビリティの低下が観察された。血漿プロトロンビン因子は低下したが、線維素溶解活性は変化しなかった (Takahashi & Hiraga, 1981b 年)。

雄アルビノラット群(CRL COB CD(SD)BR)に連続した3日間、380、760、1,520 mg/kg 体重/日の1日量を投与したところ、出血のエビデンスは示されなかった。しかし、BHTは380 mg/kg 体重/日群でプロトロンビン時間の用量依存性の増大をもたらし、プロトロンビン時間には作用を及ぼさなかった(Krasavage, 1984 年)。

雄ラットに飼料中濃度 0.25%BHT を2週間投与したところ、肝のビタミン K 濃度の低下及びビタミン K の糞中排泄率の増大を示した(Suzuki ら、1983 年)。

濃度 1.2%での飼料中 BHT は血小板の形態(分布幅)に作用するほか、血小板脂質の脂肪酸組成に変化を引き起こすことが示された(Takahashi Hiraga, 1984 年)。

雄 Sprague-Dawley ラット(生後 5~6 週)4~5 匹を 1.2% BHT 含有の飼料で 1~7 日間飼育し、血液凝固因子 II(プロトロンビン)、VII、VIII、IX、X 及び血小板凝集を測定した。BHT の平均投与量は約 1,000 mg/kg 体重/日であった。BHT を投与すると 2~7 日以内に、凝固因子 II、VII、IX 及び X の血漿中濃度は時間依存性に有意に減少し、BHT を投与したラットの副睾丸に 4~7 日以内に出血が認められた。これに対して、トロンビン誘発性及びカルシウムを必要とする洗浄血小板の凝集は、試験期間中に変化しなかった。このような結果は、BHT の投与直後に凝固因子 II、VII、IX 及び X が急速に減少したことを示唆しているが、血小板の過剰凝集能は出血によって引き起こされた二次的作用である可能性がある(Takahashi, 1986 年)。

雄 Sprague-Dawley ラット(生後 5~6 週)4~10 匹から成る複数群に、単回経口投与で 800 mg/kg 体重の BHT を投与し、0.5~72 時間後に血液凝固因子 II(プロトロンビン)、VII、IX 及び X のほか、BHT 及び BHT キノンメチドの肝中濃度を測定した。凝固因子の濃度は BHT の投与の 36~60 時間後に低下したが、72 時間までには回復が生じた。BHT の肝中濃度は BHT を投与した 3 時間後(大天井)及び 24 時間後に最大に達し、BHT-キノンメチドは 6 時間後及び 24 時間後(大天井)に最大に達した。BHT を用量 200、400 又は 800 mg/kg 体重で投与したところ、最高用量を投与したラット群のみで因子 II、VII 及び X が 48 時間後に低下したが、因子 IX は BHT に対してさらに感受性が高く、用量依存性の低下を示した。フェノバルビタールによる 3 日間の前投与も 1%システインの飼料中の添加も、用量 800 mg/kg 体重での試験期間を通してのビタミン K 依存性の因子の低下を抑制することはできなかった。これに対して、塩化コバルト又は SKF 525A による前投与は、血中凝固因子の低下を部分的に抑制した。この結果は抗凝固作用には BHT の代謝活性が必要である可能性があることを示唆している(Takahashi, 1987 年)。

上述の試験及び同じ試験施設での以前の試験に使用した飼料にはビタミン K を添加していないため、被験動物はややビタミン K 欠乏であることが明らかであった(Faber, 1990 年)。

ビタミン K を欠乏させた飼料で飼育した雄 Sprague-Dawley ラットでは、BHT は合成レチノイドよりもプロトロンビン時間の上昇及び出血死を引き起こす効果が低かった(McCarthy ら、1989 年)。

血小板凝集に及ぼす BHT の作用を試験した。*In vitro* 試験では、BHT は約 10^{-3} M 以上の濃度では、ADP ならびにコラーゲン誘発性の血小板凝集を阻害したが、アラキドン酸誘発性の場合には阻害しなかった。BHT-キノンメチドもやや小規模ではあるが、ADP ならびにコラーゲン誘発性の血小板凝集を阻害した。別の試験では、雄 Sprague-Dawley ラットを濃度 1.2%BHT (650~740 mg/kg 体重/日)含有の飼料で 4 日間又は 7 日間飼育した。投与したラット群では対照群と比して著明な体重増加率の低下がみられた。飼料中に BHT を投与した全ラットの精巣上体脂肪組織で、出血が検出された。このようなラットから採取した血小板の豊富な血漿中で ADP 及

びコラーゲンによって誘発された血小板凝集能は、正常であると考えられた。3.9 mM のアラキドン酸によって誘発された凝集は、1.2%BHT を 7 日間投与したラットの血小板では著明に阻害されたが、至適濃度のアラキドン酸塩 (2.0 mM) によって誘発された血小板凝集は正常であった。このような結果は、BHT を投与したラット群と対照群との間の血漿又は血小板の特性の差を示していた。この著者らは、ラットの BHT 誘発性の出血は、BHT が血小板凝集に及ぼす直接作用に起因するものではなかったという結論に達した。*In vitro* の結果と *in vivo* の結果の差は、*in vivo* に存在していた BHT 又は BHT-キノンメチドの血漿中濃度が低かったことが原因であった (Takahashi, 1991 年)。

この試験は、ビタミン K 欠乏食及びビタミン K 補助食を摂取させたラットにみるビタミン K 依存性の凝固因子に及ぼす BHT の作用に関して報告している。ウィスターラット雄 5~6 匹から成る複数群に、次の名目摂取量に BHT を添加した飼料を摂取させた: (1) 飼料中の BHT 0、3,000 mg/kg 体重/日又は 3,000 mg/kg 体重/日+250 mg のビタミン K₃/kg を 7、14 日間又は 21 日間; (2) 同じレジメンで 250 mg/kg 体重を 7 又は 14 日間、ビタミン K を対照群に添加する; (3) 0、12.5、125 又は 600 mg/kg 体重/日又は 600 mg/kg 体重/日+3 mg のビタミン K₃ を 28 日間。最小限の 3 mg のビタミン K₃ を含有することがわかっている基本飼料 (SDS Ltd., Witham, Essex, 英国) の方が、このビタミンの推奨摂取量を供給するには適していると考えられた。最初の試験では、プロトロンビン時間 (PT) の測定と共に特異的なビタミン K 依存性の因子欠乏が認められた。この結果は 3,000 mg/kg 体重/日の BHT は PT に作用を及ぼさないが、特に、十分なビタミン K を含有する飼料を摂取させていたラットのビタミン K 依存性の凝固因子 II、VII、X 及び IX を減少させた。試験 2 及び 3 では、PT 及び APTT のための異なった検定方法に加えて、齧歯類に対して至適化したトロンボテストを用いた。血清フィブリノーゲン値は試験 2 のみで測定した。3,000 mg/kg 体重/日の投与の終了後 7 日以内にトロンボテスト時間、PT 及び APTT は対照群と比して有意に増大した。飼料中 250 mg/kg 体重/日のビタミン K₃ 補給は、BHT 誘発性のトロンボテスト時間及び APTT を増大させ、BHT の PT に及ぼす作用を抑制した。BHT の投与は血清フィブリノーゲン濃度に作用を及ぼさなかった。BHT 600 mg/kg 体重/日の 28 日間の投与後には、PT 又は APTT ではなく、トロンボテスト時間が対照群と比して有意に増大した。この作用は 3 mg/kg のビタミン K₃ を飼料中の補助剤として同時投与することによって抑制された。この試験では、ラットで BHT のビタミン K に及ぼす拮抗作用が、飼料中に十分なビタミン K が含有されている場合でも血液凝固因子の減少をもたらすことを確認した。この著者らは、閾値及び急勾配の用量反応曲線をもたらす高用量現象を指摘している (Cottrell ら、1994 年)。

多種類のラット株 (Sprague-Dawley、ウィスター、Donryu 及び Fischer ラット)、マウス株 (OCR、ddY、DBA/c、C₃H/HBe、BALB/CaAn 及び C57BL/6)、ニュージーランド White-Sat ウサギ、ビーグル犬及び日本ウズラに対し、BHT (ラット及びマウスには飼料中 1.2%; ウズラには 1%; ウサギには 170 又は 700 mg/kg 体重/日; 及びイヌには 173,400 又は 760 mg/kg 体重/日) を 14~17 日間給餌した。全株の雄ラット及び Fischer 株の雌ラットに出血死が発生した。Donryu 及び Sprague-Dawley 株の雌ラット群には明らかな出血はみられなかった。ウズラ、ウサギ又はイヌには出血作用は報告されなかった (Takahashi ら、1980 年)。

精製飼料中の 0.5%、1.0% 又は 2.0%BHT (660、1,390 又は 2,860 mg/kg 体重/日に相当) の 21 日間の投与は、ワイヤー底のケージで飼育された雄 ddY マウスで、肺の大量出血に起因する死亡率の用量依存性の増大をもたらした。生き残ったマウスには、終了時に肺ならびに肝の絶対重量及び相対重量の両者に用量依存性の増大が示された。出血死及び肺ならびに肝の絶対重量及び相対重量の増大は、1.35%、5%BHT を含有する飼料を 30 日間摂取させ、柔らかいウッドチップ床敷きのケージで飼育した ddY マウス雄、又は 0.125%~2.0%BHT を含有する飼料を 14~17 日間摂取させた Hartley モルモットには観察されなかった。濃度 1.0% 以上の飼料中 BHT の投与を受けていた ddY マウスの全群で、プロトロンビン時間が有意に増大した (濃度 2.0% のワイヤー底

のケージ群を除く)。この作用は、柔らかいウッドチップ床敷きのケージで飼育した投与群でも、用量に関係なく同程度であった(約 25%)。カオリン加トロンボプラスチン時間に関する結果も同程度であった。モルモットでの凝固に及ぼす作用はあいまいであった。この著者らは、用量依存性の相関のみられないマウスでの凝固傷害は胆汁機能の小規模な損傷及び又は脂肪肝及び臓器に傷害をもたらす肺の出血に起因していると考えた。この出血及び凝固障害は必然的に、ラットで観察されたものとは同じ原因によるものではなかった。マウス及びモルモットの肝では用量依存性の濃度 (0.2~4/μg/組織 1g) で BHT を検出した。このような種には BHT-キノメチドは検出されなかったが、Takahashi らの試験ではラット肝で (7~40/μg/組織 1g) 以前に検出されている (1980 年) (Takahashi, 1992 年)。

2.2.11 甲状腺に及ぼす作用に関する特殊試験 (原文 p47)

雄 MOL/WIST SPF ラットの非近交系株 (約 200 g) を試験に用いた。BHT は、ヨード含有量を約 12/ μg/100 g (ラットの栄養的必要量は 15/ μg/100 g) に調整した半合成飼料に添加した。1 件の試験では、ラットに 0、500 又は 5,000 mg/kg 体重を 8、26 又は 90 日間投与したところ、甲状腺で ¹²⁵I の取り込みが測定された。飼料中 BHT の存在は、試験中のいつの時期でも ¹²⁵I の取り込みの著明な増大をもたらした。さまざまな量のヨウ素 (12、150 又は 300/ μg/100 g) を含有する飼料中に BHT を投与し、ラットに 30 日間摂取させたところ、BHT 投与群のラットに対照群と比して甲状腺重量の有意な増大が認められた。飼料中の BHT の投与は飼料中 5,000 mg/kg 体重で肝及び甲状腺の重量を増大させたが、500 mg/kg 体重群の甲状腺の重量のみは増大しなかった。BHT は血中の T₃ 及び T₄ 濃度を変化させなかった。

チロキシン (甲状腺ホルモン) の生物学的半減期は、BHT を含有する飼料で飼育した 13 日後に増大したが、75 日後に正常に戻った。5,000 mg/kg 体重の BHT に 28 日間曝露させたラット甲状腺の電子顕微鏡検査では、濾胞細胞数の増大が示された (Sondergaard & Olsen, 1982 年)。

2.2.12 免疫系に及ぼす作用に関する特殊試験 (原文 p48)

Mishell & Dulton の方法で測定したところ、BHT (50/ μg/培養物) は *in vitro* でマウス脾臓細胞培養のプラーク形成細胞反応を抑制した (Archer ら、1978 年)。

BHT への環状 GMP (ジブチル又は 8-ブロモ形態として添加した cGMP) の添加は Mishell -Dulton 培養を抑制し、抗体産生の BHT 抑制の逆転に作用した (Wess & Archer, 1982 年)。

2.2.13 癌の増強又は阻害に関する特殊試験 (原文 p.48)

雄 A 株マウスに腹腔内投与で 500 mg/kg 体重のウレタンを注入し、その 1 週間後にトウモロコシ油に溶解した 300 mg/kg 体重の BHT、500 mg/kg 体重の BHA 又は 1,000 mg/kg 体重のビタミン E のいずれかを反復投与した (週 1 回×8 週間)。試験終了時に、BHT のみが腫瘍の発生に有意な増大をもたらすことが示された。BHA 投与群で発生した腫瘍数は通常よりも増大していたが、統計的に有意ではなかった。3-メチルコラントレン又はジメチルニトロソアミンを投与した A/J マウスに、次に BHT (腹腔内投与) を投与したところ、腫瘍発生の増大をもたらした (Witschi ら、1981 年)。

Charles River ラット (雌雄各 20 匹) の複数群に、BHT 6,600 mg/kg 体重及び又は分子比 30:1 の発癌物質 (N-2-フルオレニルアセトアミド又は N-ヒドロキシ-N-2-フルオレニル-アセトアミド) を含有する飼料を摂取させ (雄 24 週、雌 36 週)、その後、さらに 12 週間の対照食で飼育を持続した。N-ヒドロキシ-N-2-フルオレニルアセトアミドによって、雄の 60% に肝細胞癌、雌の 70% に乳腺腺腫が生じた。試験した発癌物質が N-2-フルオレニルアセトアミドの場合には BHT は雄の肝細胞癌の発生率を 20% に抑制し、N-ヒドロキシ-N-2-フルオレニルアセトアミド

の場合には 15%に抑制した。Fischer 株ラットでも類似の結果が得られた。濃度が飲料水中 55 mg/L のジメチルニトロソアミンの 24 週間の摂取による肝腫瘍及び食道腫瘍の発生率は、BHT による影響を受けなかった (Ulland ら、1973 年)。

雄 F344 ラット 20 匹から成る複数群に、単回胃内投与による 100 mg/kg 体重の MNNG、750 mg/kg 体重の EHEN、皮下注×2 回投与による 0.5 mg/kg 体重の MBN 又は皮下注×4 回投与による 40 mg/kg 体重の DMH を投与した。同時に、このラット群に 0.1%DBN を 4 週間投与した後、0.1%DHPN を飲料水中に 2 週間投与し、発癌物質への総曝露期間を 6 週間とした。このような投与が終了した 3 日後に、このラット群に 0 又は 0.7%BHT を 36 週間、飼料中に投与した。10 匹又は 11 匹のラットから成る複数の対照群には 0.7%BHT を単独又は基本飼料を単独で摂取させた。両者の BHT 投与群の最終体重はそれぞれの対照群よりも有意に低値であり(発癌物質投与の対照群と比して 7%、基本飼料の対照群と比して 13%低値)、このことは腎相対重量を強く反映していた。肝相対重量は約 60~75%増大した。発癌物質の投与後の飼料中 BHT は、小腸癌の外観を縮小したほか、腎の一部の前腫瘍性病変及び腫瘍性病変の発生率及び多重度を低下させた。BHT 投与は甲状腺の過形成、腺腫及び癌の発生率を増大させたが、舌、食道、前胃、腺胃、十二指腸、小腸、肝、肺又は膀胱には作用を及ぼさなかった (Hirose ら、1993 年)。

2.2.13.1 膀胱 (原文 p49)

雄 F344 ラットに飲料水中の 0.01 又は 0.05%N-ブチル-N-(4-ヒドロキシ-ブチル)ニトロソアミン(BBN)を 4 週間投与した後、0 又は 1%BHT を含有する飼料を 32 週間摂取させた。飼料中の BHT は、0.05%群のラットでは膀胱の癌及び乳頭腫の有意な増大と関連していたが、0.01%群では相関がみられなかった (Imaida ら、1983 年)。

ラット群の飼料中に 200 mg/kg の N-2-フルオレニルアセトアミド (FAA)を単独又は 6,000 mg/kg の BHT と併用して 25 週間投与した。膀胱腫瘍は FAA 単独投与では生じなかったが、FAA と BHT とを併用した結果、17/41 匹に乳頭種、3/41 匹に癌がそれぞれ膀胱に発生した (Williams ら、1983 年)。

4 通りの飼料中濃度 (300、1,000、3,000 又は 6,000 mg/kg 体重) の BHT と 200 mg/kg の FAA とを 25 週間同時投与した。FAA の投与は単独では腫瘍を生じさせなかったが、3,000 又は 6,000 mg/kg 体重の BHT と併用したところ、膀胱腫瘍の発生率がそれぞれ 18%及び 44%となった。膀胱腫瘍の発生率は 300 及び 1,000 mg/kg の BHT 群では低値であり、FAA 単独群との間に有意差はみられなかった (肝に及ぼす作用についても参照) (Maeura & Williams, 1984 年)。

雄 F344 ラットにメチルニトロソ尿素 (MNU) を 2 回/週×4 週間注入した後、1%BHT を含有する基本食を 32 週間摂取させた。BHT は膀胱の乳頭種及び腺癌又は結節性過形成の発生率のほか、甲状腺の腺腫 (腺癌ではない) の発生率を有意に増大させた (Imaida ら、1984 年)。

雄 F344 ラット 20 匹から成る複数群 (生後 6 週) に、飲料水中の 0.05%N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミンを 2 週間前投与した後、0、0.25、0.5 又は 1%BHT を含有する飼料を 2 週間摂取させた。試験の 22 日目に、各ラットの左尿管の下部を結紮した。このラット群を試験の 24 週目に殺処分した。BHT は用量依存性に膀胱の前腫瘍性病変、乳頭腫又は結節性過形成の発生数を増大させた。膀胱の病変の発生率は特に 1%BHT 群で増大した (Fukushima ら、1987a 年)。

雄 F344 ラット 20 匹から成る複数群(生後 6 週)に、飲料水中の 0.05%N,N-ジブチルニトロソアミンを 16 週間投与すると同時に、0 又は 0.7%BHT を含有する飼料を摂取させた。この BHT の同時投与は、肝病変の高発生率を引き起こした。膀胱の移行上皮癌、乳頭状過形成又は結節性過形成の発生率あるいは食道の乳頭腫又は癌の発生率は変化しなかった。前胃では過形成結節の減少が認められた(Imaida ら、1988 年)。

雄 F344 ラット 20 匹から成る複数群(生後 6 週)に、飲料水中の 0.05%N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミンを 4 週間前投与した後、0、0.4%BHA+0.4%BHT+0.4%TBHQ 又は 0.8%BHT を含有する飼料を摂取させた。この試験は 36 週間後に終了した。BHT 含有の飼料を摂取した全群で、尿中結晶の増大及び膀胱上皮の乳頭状過形成又は過形成結節の発生率ならびに密度の増大が観察された。膀胱乳頭腫及び膀胱癌は増大せず、腎盂の増殖性変化は認められなかった。0.8%BHT 投与群では肝細胞膨大が誘発された(Hagiwara ら、1989 年)。

雄 F344 ラット 10 匹の群(生後 6 週)に、7 mg/kg のビタミン K と共に 1%BHT を含有する飼料を摂取させた。体重の低下が観察された。光学顕微鏡では 4 週間後に膀胱上皮の DNA 合成が増大したが、8 週間後も形態学的変化はみられなかった。電子顕微鏡では、多形成又は短縮、均一な微絨毛及び粘性又は葉状の微細リッジなど、形態学的な表面の変化が認められた(Shibata ら、1989 年)。

膀胱腫瘍プロモータに応答した腎盂上皮の早期の増殖関連反応を試験するため、1 件の試験を実施した。雄 F344 ラット 10 匹の複数群に 0 又は 1%BHT を投与した。4 週間目に、5 ラット/群からの 1,000 細胞で腎盂上皮細胞の DNA 標識指数を測定した。8 週間後に、SEM 試験のために腎切片を用意した。投与群のラットの体重は 4 週間目に 18%、8 週間目に 25%、それぞれ対照群よりも低値であった(Shibata ら、1989 年)。投与の 4 週間後の腎盂上皮にみる平均 DNA 標識指数は対照群よりやや高値であったが、統計的に有意ではなかった。SEM (走査型電子顕微鏡)では投与の 8 週間後に細胞表面の変化は観察されなかった(Shibata ら、1991 年)。

雄 F344 ラット 20 匹から成る複数群(生後 4 週又は 54 週)に、多臓器発癌物質の 1 種である 50 mg/kg の 3,2'-ジメチル-4-アミノビフェニル(DMAB)を 1 回/週×10 週間皮下注投与した。同時にこのラット群に飼料中 1%BHT を 11 週間投与した。この試験は初回投与の 55 週後に終了した。DMAB と BHT の併用投与は、ラットの若年、老年の両者の 95%以上に膀胱の乳頭腫ならびに癌の発生をもたらした。

DMAB による肝病巣及び膵臓腺房細胞病巣の誘発は、BHT の同時投与によって抑制された。BHT を投与したラットの膀胱上皮細胞では、免疫組織学的染色で検出された DMAB-DNA 付加体形成の増大が免疫組織学的染色で検出された。BHT の投与は肝でこのような付加体の形成を抑制したが、小腸、膵臓又は前立腺での付加体形成には作用をもたらさなかった。この著者らは、BHT のこのような作用が薬物代謝酵素数を誘発する能力と関連しているため、特定の組織での活性代謝物の量を変化させると示唆している(Shirai ら、1991 年)。

F344 ラットのこの化合物の最小有効発癌量である 6,000 mg/kg の BHT と 50 mg/kg の AAF との 76 週間の同時投与は、癌を含む膀胱腫瘍の発生率及び多重度を増大させた。3,000 mg/kg 及び 6,000 mg/kg の BHT の両群と AAF との併用投与は、BHT の飼料中濃度 300 mg/kg 以下で、膀胱の結節過形成の発生率の増大のほか、この病変の発生の陽性傾向をもたらしたことが報告された。同じ試験では、100~6,000 mg/kg の BHT の飼料中投与が、変性肝病変の誘発(鉄貯蔵欠乏及び GGT 陽性)の用量依存性の抑制、AAF 誘発性の腺腫の多重度のほか、肝癌及び癌の発生率を抑制をもたらした(Williams ら、1991 年)。

2.2.13.2 消化管 (原文 p51)

マウス

雄 BALB/c マウスに直腸内投与でメチル-nitrosurea を投与した後、BHT を含有する飼料で飼育したところ、BHT 無添加の飼料で飼育した対照群と比して消化管腫瘍の発生率及び多重度に著明な増大が示された。別の試験では、BALB/c マウスにジメチルヒドラジンを注入し(6 週間の注入)、次に対照食(BHT 無添加)又は 0.05%又は 0.5%BHT を含有する飼料で飼育した。結腸腫瘍の発生率はそれぞれの群で 10%、0%及び 32%であった(Lindenschmidt ら、1986 年)。

ラット

1,2-ジメチルヒドラジンを投与したラットの結腸クロマチンで観察された腫瘍特異的な抗原活性の増大が、BHT の同時投与によって消失した(Gabryelak ら、1981 年)。

雄 F344 ラットに単回投与の N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)を投与した後、BHT 無添加、1.0%BHT、5%NaCl 又は 5%NaCl+1.0%BHT を含有する飼料を 51 週間摂取させた。前胃での扁平細胞癌の発生率はそれぞれの群で 11%、16%、3%及び 53%であった(Shirai ら、1984 年)。

1,2-ジメチルヒドラジンの 4 回の注入の後(1 回/週)、ラットに飼料中 BHT 0.5%を 36 週間摂取させた場合、BHT は結腸腫瘍に罹患したラット数には影響しなかったが、ラット 1 匹当たりの遠位結腸に生じた腫瘍数を有意に減少させた(Shirai ら、1985 年)。

ウィスターラットに N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)を投与し(飲料水中に濃度 1.0 mg/mL で投与)、この投与期間に飼料中 BHT 1.0%を 25 週間摂取させた後、試験食でさらに 14 週間飼育したところ、BHT 無添加の飼料を摂取させていたラット群と比して、胃癌の発生率の有意な低下が示された(82%に対して 37%) (Tatsuta ら、1983 年)。

生後 7 週の雄ウィスターラット(20 匹/群)に対し、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)を飲料水中に 8 週間投与し(100 mg/L)、飼料には 10%塩化ナトリウムを補給した。その後、ラットを 1%BHT を含有する飼料で 32 週間飼育した。癌対照群には BHT を添加しない基本食を摂取させた。この試験は MNNG の投与を開始してから 40 週後に終了した。BHT は腺胃又は前胃の腫瘍の発生率を増大させなかった(Takahashi ら、1986 年)。

雄 F344 ラット 21 匹から成る複数群に、飲料水中の 0.5 g/L の N,N-ジブチル-ニトロソアミンを 4 週間投与した後、1%BHT 及び 7 mg/kg のビタミン K を含有する基本食を 32 週間摂取させた。BHT は食道癌発生を増強したが(乳頭腫: 16/21 匹に対して 3/21 匹;癌 9/21 匹に対して 0/21 匹)、前胃癌の発生は増強しなかった。BHT は膀胱の乳頭過形成又は結節過形成及び乳頭腫の発生率の増大を誘発したが、肝病変の統計的に有意な増大はみられなかった(Fukushima ら、1987b)。

雄 F344 ラット 5 匹から成る複数群に、0 又は 0.7%BHT を含有する飼料を 4 週間摂取させた。前胃の組織学的検査から、BHT が前胃上皮では過形成を誘発しなかったことが示された(Hirose ら、1987 年)。

雄 Fisher 344 ラット群に、最初に DMH (40 mg/kg 体重) を 2 又は 4 回皮下注射し、その直後に 0 又は 0.5% 又は 1.0%BHT を含有する飼料を 5~6 ヶ月間摂取させたところ、BHT 投与群に BHT 無添加の飼料の対照群と比して、結腸腫瘍の有意に高い発生率 (5 ヶ月間試験) 及び小腸 (十二指腸、空腸及び回腸) 腫瘍の有意に高い発生率が認められた。N-ニトロソ-N-メチル尿素の投与 (NMU; 90 mg/kg 体重を経口投与) は、胃及び結腸腫瘍を発生させたが、飼料中の 0.5%BHT は腫瘍の発生率に作用しなかった。飼料中 BHT は DMH がもたらす消化管腫瘍の発生を増強する可能性があるが、発癌物質への曝露後に BHT に曝露させた場合には、NMU がもたらす発生は増強しないと結論づけた (Lindenschmidt ら、1987 年)。

ハムスター

雄シリアンゴールデンハムスターに、1%BHT を含有する飼料を摂取させた。第 1、2、3、4 及び 16 週目に前胃の過形成及び前腫瘍性病変の誘発を組織病理学的及びオートラジオグラフによって検査した。BHT 投与群のハムスターでは対照群よりも、軽度の過形成がやや多く発生していた。BHT は重篤な過形成又は乳頭腺腫病変を誘発した。標識指数の有意ではない増大が試験期間を通して観察された (Hirose ら、1986 年)。

2.2.13.3 肝 (原文 p52)

93 匹のラット (生後 22 日) から成る複数群に、AAF (0.02%) の 18 日間の投与後、0 又は 0.5%BHT を含有する飼料を 407 日間摂取させた。AAF 後の BHT 食の摂取は肝腫瘍の有意な増大をもたらした (Peraino ら、1977 年)。

ラットに 200 mg/kg の AAF を飼料中に単独投与又は 6,000 mg/kg 体重の BHT と同時に 25 週間投与した。AAF 単独では肝腫瘍の発生を 100%誘発した。BHT の同時投与は、良性腫瘍、腫瘍性結節及び悪性腫瘍及び肝細胞癌の発生率を低下させた (Williams ら、1983 年)。

濃度 300、1,000、3,000 又は 6,000 mg/kg 体重の BHT を 200 mg/kg の AAF と 6、12、18 又は 25 週間同時投与した。BHT は用量依存性の腫瘍の発生率の低下をもたらした (BHT の不在下では 100%の発生率に対し、6,000 mg/kg 体重の BHT 投与下では 56%) (膀胱に及ぼす作用についても参照) (Maeura ら、1984 年)。

ラット群に 200 mg/kg 体重の AAF を 8 週間摂取させた後、濃度 300、1,000、3,000 又は 6,000 mg/kg 体重の BHT を含有する飼料を 22 週間まで摂取させた。AAF の投与によって誘発された鉄排除及びガンマ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) 活性によつて判別される変性肝細胞病変の領域では、最高用量の BHT 群で病変の高い発生が示された (病巣の数、GGT 陽性の前腫瘍が占める領域及び腫瘍性病変のほか、腫瘍発生率が増大した)。このようなパラメータは低用量の BHT では影響を受けなかった (Maeura & Williams 1984)。

ラットに単回腹腔内投与によってジェチルニトロソアミン 200 mg/kg 体重を注入した後、1%BHT を含有する飼料で 6 週間飼育した。3 週間目に、ラットに部分的肝切除を実施した。BHT 投与群のラットの肝のガンマ-グルタミルトランスフェラーゼ陽性病巣の数は、対照群と比して有意に減少した (Imaida ら、1983 年)。

開始-選択-促進プロトコルを用いて、雄ウィスターラットの肝癌発生に及ぼす作用について、BHT をフェノバルビツール (PB) 及び DDT と比較した。ラット群に対し、ジェチルニトロソアミン (DEN; 200 mg/kg 体重) の単回投与で開始した。2 週間後、AAF を選択的に 2 週間摂取させた後、致死量の四塩化炭素を 1 週間投与した。さらに何週間か、発癌促進物質又は濃度 0.5%BHT を添加した飼料で飼育した。この飼料を開始した 3、6、14 又は 22 週間後に、8~10 匹のラットから成る複数群を試験した。BHT は PB 及び DDT と同様、14 週目に肝の GGT 陽

性病変の発生頻度を強力に増大させたが、PB 及び DDT とは異なり、BHT は 22 週目の肝細胞癌の発生を増強しなかった。このことは、BHT が投与開始後には、雄ウィスターラットの肝癌の促進物質ではなかったことを示唆していた (Préat ら、1986 年)。

ジエチルニトロソアミン (DEN) の単回投与による肝癌発生の開始のほか、増殖刺激と結び付いた AAF の選択 (CCl₄ 投与) の後、PB 又は BHT (飼料中 0.5%) を最大 22 週間投与した。対照群には開始及び選択プロセス後は投与を実施しなかった。開始及び選択 (I-S) 及び 3 週間の基本食を摂取させた被験動物の推定前腫瘍病変では、2N 核の数量的増大がみられた。飼料に (I-S の後で) PB を添加させたところ、2 倍体核の増大が早期に開始された。癌が発現した時点 (PB 投与の 22 週間後) では、2N 核の発生頻度の低下が認められた。BHT 投与群のうち、予想されたタイムスパン内に癌を発症しなかった被験動物では、投与のわずか 14 週間後に前癌病巣での 2N 核の明確な増量が示された (Haeson ら、1988 年)。

雄ウィスターラットに対し、週 1 回ののアザセリン (30 mg/kg 体重) の腹腔内投与を 2 回実施している最中又はその直後に、1%BHT の 26 週間の飼料中投与を開始した。アザセリンの後の BHT の投与は、脾臓の GST-A 陽性腺房病巣の発生頻度を増強したが、GST-P 陽性肝細胞病変は有意に抑制した。BHT をアザセリンと併用した場合、肝には作用はみられなかったが、脾臓での前腫瘍病変の発生頻度は有意に抑制された (Thornton ら、1989 年)。

1 件の試験を実施し、食物脂肪及び BHT の AAF 誘発性肝癌発生に及ぼす調節作用と核膜 (NE) 中のチトクロム P-450 の濃度との関係の有無を確認した。離乳ラットに飼料中 0.3%BHT を 2 週間投与した後、最大 16 週間まで飼料中に 0.05%AAF を添加した。BHT による前投与は、最高量の飽和脂肪量の飼料群では 9 週間、高用量のポリ不飽和脂肪の飼料群では 3 週間にわたって、AAF 誘発性の NE チトクロム P-450 含有量の減少から肝細胞を保護した。この BHT のチトクロム P-450 含有量に及ぼす作用は明らかに、高脂肪食中の AAF を摂取したラットの腫瘍減少作用と相関していた。低脂肪食のラットの結果では、BHT は AAF 誘発性の発癌性に対して有意な作用を示さず、高用量群の飼料を摂取したラットとは差がみられた。低脂肪食のラットでは、AAF は投与して 9 週目になるまでチトクロム P-450 含有量を減少させず、BHT による投与を開始する前の時点では、部分的にこの作用の逆戻りが生じた。最初の 3 週間以内に、AAF を投与したラットのチトクロム P-450 含有量は対照群のラットと同程度になり、BHT による前投与は、AAF 投与を受けたラットに、このような誘発を引き起こす結果となった (Carubelli & McCay 1989 年)。

濃度 1~14mM の BHT はラット肝ミクロソーム標本の存在下では、AAF と仔牛胸腺 DNA との結合を対照値の 20%に低下させた。N-水酸化 2-AAF の場合、チトクロム P-450 は、使用された AAF の酸化生成物を活性化し、BHT (0.1~8.0 mM) は DNA との結合を対照群の濃度のわずか 80%に低下させた。ラット肝細胞培養では、濃度 0.01~0.10 mM の BHT が AAF と DNA との結合を対照群の濃度の約 85%に低下させた。このような結果は、BHT の抗癌作用に関与する可能性のある *in vivo* で示された機序 (解毒酵素の誘発など) に追加的な機序を示した (Richer ら、1989 年)。

雄 B6C3F₁ マウスに 100 又は 200 µmol/kg 体重のジエチルニトロソアミン (DEN) を 1 回/週×10 週間、腹腔内投与した。4 週間の回復期間後、このマウスに 5,000 mg/kg の BHT 又は 500 mg/kg のフェノバルビツール (陽性対照) を含有する飼料を 24 週間摂取させた。この終了時に、DEN 単独群は、用量依存性の変性肝病巣及び肝細胞腺腫の発生が誘発された。DEN 後に BHT を投与した群は、このような病変の発生又は多重度に作用がみられず、フェノバルビツール投与群はこの作用が DEN 群の 2~3 倍に強化された (Tokumo ら、1991 年)。

50mg/kg の AAF の飼料中投与は、76 週後に肝腫瘍の 100% の発生を誘発することが認められた。100～6,000 mg/kg の濃度の飼料中 BHT との同時投与では、変性肝病巣の誘発が阻害され、肝細胞腺腫ならびに癌の多重度のほか、癌発生率が抑制された (Williams ら、1991 年)。

5、25 又は 125 mg/kg 濃度の飼料中 BHT の 42 週間の投与と、アフラトキシン B₁ (5 µmol/kg 体重、3 回/週) の強制経口投与との同時投与では、最高用量の BHT で最後の 40 週目に胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼに関する肝病巣の染色陽性濃度の低下がもたらされた (Iatropoulos ら、1994 年)。

2.2.13.4 肺 (原文 p55)

雄 Swiss-Webster マウスに、単回、腹腔内投与した 1,000 mg/kg 体重のウレタンの腫瘍原性は、その後の BHT 250 mg/kg 体重、1 回/週の反復投与によって有意に増大した。このマウス数を 9～22 匹/群とし、9～13 週間投与した。肺表面の腫瘍のみを計算した。投与群のマウスの約 90% に、ウレタン単独によって誘発された肺腫瘍が発生した。マウス 1 匹当たりの腫瘍数は BHT の投与後 11 週以上経過してから有意に増大した。BHT 単独投与の群では肺腫瘍の発生はみられなかった。A/J 株マウスにも BHT の同じ注入投与を 10 週間実施した。マウス 1 匹当たりの肺腫瘍の数は、ウレタンに BHT を加えた群ではウレタン単独群と比して有意に増大した。マウスの両株において、ウレタンの前投与なしで BHT を反復注入した場合は、トウモロコシ油のみを投与した対照群と比して、肺腫瘍のみられるマウスの数又はマウス 1 匹当たりの腫瘍数の増大をもたらさなかった。両マウス株では、BHT を投与したマウス群がトウモロコシ油のみを投与した対照群と比して、肺腫瘍の数が少なくなった。上記の結果とは異なり、ウレタン注入の 0～7 日前に BHT を注入したマウスでは、マウス 1 匹当たりの肺腫瘍の数が増大しなかった (Witschi & Cote, 1976 年)

スイスマウスの群に、50、250 又は 1,000 mg/kg 体重のウレタン又は 0.9%NaCl を投与した。7 日後、ウレタン投与群の半数のマウス及び対照群の半数のマウスに 300 mg/kg 体重の BHT を腹腔内投与し、残りのマウスにはトウモロコシ油のみを投与した。マウスには 13 回注入/週を投与した。初回のウレタン投与の 14～24 週後に認められた腫瘍数/肺の数は BHT 投与群で有意に増大していた。

別の試験では、ウレタン投与と初回の BHT 投与との間の間隔を 6 週間に遅らせたところ、BHT 投与はさらに多くの腫瘍をもたらした。ウレタン投与の 1 週間後に開始した BHT の注入回数は 13 回から 4 回に減少させたが、13 回投与した試験と同程度の腫瘍発生の増大が観察された。

しかし、BHT の 1 又は 2 回の投与は有意な作用をもたらさなかった。マウスに BHT を 13 回前投与し、その 1 週間後にウレタンを投与した場合、腫瘍発生の増強はみられなかった。BHT とウレタンとの同時投与は、ウレタン単独群と比して腫瘍数が減少した。肺腺腫の自然発生率の低いマウス株 (C57BL、C3H 及び BALB/C) にウレタンを投与した後、BHT を多数回投与したところ、BHT 投与は腫瘍の発生率又は肺腫瘍の平均数を有意に増大させなかった (Witschi & Lock, 1979 年)。

雄 A/J マウスにウレタンを単回、腹腔内投与した後、飼料中に 0.75%BHT、BHA のいずれか又はエトキシクインを 1 回/週又は連続的に 8 週間投与した。肺腫瘍発生はウレタン投与の 4 ヶ月後に計算した。両試験条件下で、飼料中 BHT は肺腫瘍形成を増強したが、BHA 又はエトキシクインは作用しなかった。

マウスにウレタンを投与する前に、BHA 又は BHT を含有する飼料を 2 週間摂取させ、その後は従来の試験飼料で 4 ヶ月間飼育した。BHT 含有食は腫瘍発生に作用しなかったが BHA 投与は腫瘍の平均数を有意に減少させた (Witschi, 1981 年)。

A/J マウスに、肺に 6~7 日間で急性肺損傷及び肺細胞増殖を生じさせるのに十分な量の BHT を単回、腹腔内投与した (400 mg/kg 体重)。この期間に、留置したミニポンプでウレタンを持続的に投与した。細胞分裂の時期にウレタンが持続的に存在することは、腫瘍数の増大に影響しなかった。ウレタンを注入したマウスに、腹腔内投与により SKF525A (2-ジエチルアミノエチル-2,2-ジ-塩酸フェニルバレレート) 及び BHT (通常、BHT の投与後に SKF による肺細胞分裂の阻害がみられる) 又は BHT 単独投与した場合、両者の投与はウレタン投与のみの対照群と比して、肺腫瘍発生をきわめて有意に増大させた。95~100%酸素など、その他の投与によって反復された肺細胞分裂は、腫瘍発生の増強を示さなかった (Witschi & Kehrer, 1982 年)。

マウスに 50 mg/kg 体重以上のウレタンを投与した場合には、BHT は肺腫瘍の発生を増強することが示された。これよりも低用量のウレタン (発癌用量以下) では、BHT は腫瘍発生を増強しなかった。別の試験では、マウスにウレタンを投与した後で腫瘍の発生を増強するには、飼料中 0.75%BHT では 2 週間の曝露が十分な用量であり、0.1%BHT では 8 週間投与した場合に有効な増強剤であった。

BHT を 24 時間以内に後投与し、8 週間摂取させた場合には、一度、3-メチルコラントレン、ベンゾピレン又は N-ニトロソジメチルアミンを投与したマウスの腫瘍発生を増強した。

マウスに毎週 BHT を注入投与した場合、細胞増殖のほか、累積標識指数 (^3H -チミジンの取り込み) 及び標識 II 型細胞数の両者に迅速な増大がみられた。このような作用は毎回の投与後には小規模であり、5 回目の投与までは増大は認められなかった (Witschi & Morse, 1985 年)。

ウレタンの単回注入 (1,000 mg/kg 体重) の 6 時間前に BHT (200 mg/kg 体重) を単回腹腔内投与した場合、種々のマウス株及び年齢のマウスの肺腫瘍発生にさまざまな作用を及ぼした。マウス株はウレタンの腫瘍形成に対して高感受性を示す群 (A/J、SWR/J) 及び低感受性を示す群 (BALB/cByJ、129/J、C57BL/6J) の両者を試験した。BHT 投与は、成体 A/J マウスでは腫瘍の多重度を平均して 32%低下させたが、発癌補助物質として成体 SWR/J では腫瘍数を 48%増大させ、成体 C57BL/6J では 240%増大、成人 129/J では 655%に増体させ、年齢の A/J マウスでは 14 日間に 38%増大させた。肺胞 II 型細胞由来及び気管支クララ細胞由来の両者の肺腺腫は、同程度に BHT の投与による影響を受けた。BALB/cByJ マウスでは幼若、成体の両者で BHT の前投与は腺腫の多重度には作用を及ぼさなかった。BALB/cByJ の幼若マウスの多重度は、ウレタンの投与後の慢性的な BHT の投与 (6 回注入/週) によっても影響を受けなかったが、このような投与は、このマウス株の成体マウスでは多重度の数倍の増大をもたらした (Maokinson & Thaete, 1986 年)。

A/J マウスに、1,000 mg/kg 体重のウレタンを投与した後で 400 mg/kg 体重の BHT を注入した場合、肺腫瘍の発生がウレタン単独投与のマウスよりも 40%増大した。3-メチルコラントレンを投与したマウスに BHT (300 mg/kg 体重) を反復注入したところ、腫瘍の多重度がさらに大規模な因子によって増大した (500~800)。マウスの BHT による前投与は、メチルコラントレンによって生じた腫瘍数を減少させた。肺腫瘍発生に及ぼす BHT の増強作用は、広範性の肺胞細胞過形成の発生が原因ではなかった (Witschi, 1986 年)。

BHT 及び BHT の 3 つの代謝物による肺腫瘍促進を同種交配マウス株 MA/MyJ で比較した。MA/MyJ マウスはウレタン (50 mg/kg 体重) の単回注入の後、50 又は 200 mg/kg 体重の BHT、BHT-BuOH、2,6-ジ-*t*-[*tert*-]ブチル-4-ヒドロキシメチル・フェノール (BHT-MeOH) 又は 2,6-ジ-*t*-[*tert*-]ブチル-1,4-ベンゾキノン (DBQ) を 6 回/週、腹腔内投与した。肺腫瘍形成を増強した唯一の代謝物は BHT-BuOH であり、この代謝物は BHT の有効用量の 1/4 で有効であった。この試験は BHT-BuOH 形成が、肺腫瘍の促進をもたらす一連の事象の重要な段階であることを意味している (Thompson ら、1989 年)。

BHT の肺腫瘍-促進作用に対する種々のマウス株の感受性は、BHT、*t*-[*tert*-]ブチル基のひとつが水酸化された BHT-BuOH の代謝物を産生するための各株由来の肝ミクロソーム標本の能力と相関している。腫瘍促進と BHT-MeOH (メチル基が水酸化された) のミクロソーム産生又は DBQ (キノン代謝物) との間には相関は存在しなかった。MA/MyJ 株は、ウレタン誘発性の肺腫瘍の BHT による促進に対する感受性が最も高く、BHT 代謝物である BHT-BuOH の 50 mg/kg 体重の 6 回/週の腹腔内投与では、200 mg/kg 体重の BHT と同程度の促進作用がもたらされたが、200 mg/kg 体重の BHT 代謝物である BHT-MeOH 又は DBQ には促進作用はみられなかった。この著者らは、BHT による肺腫瘍促進における *t*-[*tert*-]ブチルの水酸化経路を意味する別のエビデンスを挙げている: この代謝物以外の BHT の代謝生成物と比して優先的な *in vitro* 形成は、BHT による肺腫瘍促進に対するマウス種 (ラット対マウス) 及び株の感受性と相関し、肺腫瘍形成と相関している BHT の反復投与レジメンもまた、*t*-[*tert*-]ブチル基での水酸化の誘発及びマウス肺の主要な代謝経路と相関している (Thompson ら、1989 年)。

BHT による肺腫瘍促進に対する感受性を調整する遺伝子は、一部のマウス近交系が肺腫瘍の発生に素因を有する *pas* (肺腺腫への感受性) 遺伝子とは異なることを示すエビデンスが挙げられている。BHT の作用に応答する株による差は、遺伝子によって介在され、特異的な経路に沿って BHT を代謝する能力を調整していることが示唆されている (Malkinson, 1991 年)。

2.2.13.5 乳腺 (原文 p57)

雌 Sprague-Dawley ラットの複数群に 7,12-ジメチルベンツアントラセン (DMBA) 又はニトロソメチル尿素 (NMU) を投与した後、0 又は 0.3%BHT を含有する飼料で 30 週間飼育した。DMBA を投与したラットは対照食で飼育したところ、27 週までに (乳腺) 腫瘍の 100% 発生率が生じたが、BHT 補助食のラット群の試験終了時の発生率は 54% であった。飼料中 BHT は NMU 投与が誘発した腫瘍の発生に作用しなかった (King ら、1981 年)。

雌ラットに 0、0.25 又は 0.5%BHT を含有する飼料を摂取させた。この試験食の投与は (a) DMBA の投与の 2 週間前～1 週間後又は (b) DMBA の投与の 1 週間後～試験終了 (30 週間) のいずれかとした。DMBA は 8 mg を単回投与した。BHT は、このような時間枠のいずれかに投与した場合には、乳癌発生の有効な阻害剤であった (レジメン (a) では 20%、レジメン (b) では 50% 阻害した) (McCormick ら、1984 年)。

飼料性 BHT は、DMBA によって誘発された雌 Sprague-Dawley ラットの乳腺腫瘍の発生率を低下させたが、NMU を投与したラットには作用しなかった (King ら、1981 年)。

BHT の阻害作用は、癌を発生させる用量及び BHT を投与する飼料の種類による影響を強く受けた。BHT の AIN-76A 飼料への投与は BHT を NIH-07 飼料へ投与した場合とは著明に異なった作用を示した。AIN-76A 飼料では、6,000 mg/kg 体重の BHT でも、15 mg の DMBA によって誘発された乳腺腫瘍の発生への作用は認め

られなかったが、類似の濃度の BHT が NIH-07 飼料中では腫瘍形成の 40%阻害をもたらした (Cohen ら、1984 年)。

飼料性 BHT への長期の曝露後に、雌 Sprague-Dawley ラットには DMBA 誘発性の乳腺腫瘍形成に対する用量依存性の阻害が認められた。BHT は発癌物質の投与の 14 日前から 210 日目の終了時まで投与した。ラット群にシリアルベースの NIH-07 飼料を給餌し、低用量の DMBA (5 mg/ラット)を投与したところ、300、1,000、3,000 又は 6,000 mg/kg 体重の BHT の投与群の腫瘍形成率に有意な全体的な阻害傾向がみとめられた。BHT が乳腺腫瘍に及ぼした最大阻害率は最高用量群の約 50%であった。BHT の乳腺腫瘍形成率に及ぼす阻害作用は、最高用量の発癌物質を投与されたラットに BHT を投与した場合にやや不明瞭であった。15 mg の DMBA/ラットでは、最大阻害率は BHT の最高用量でもわずか 20%であった。BHT をカゼインベースの AIN-76A 飼料中に投与した場合にも、類似の結果が得られた。この試験でみられた阻害作用は、BHT への短期曝露を用いた以前の試験の結果よりもやや不明瞭であった (Cohen ら、1986 年)。

酢酸レチニル (RA) 及び BHT は、雌 Sprague-Dawley ラットでの乳腺腫瘍形成の阻害において相加効果がみられた。RA+BHT への慢性曝露は、肝線維症及び胆管過形成の高発生率を誘発し、このような変化は、RA 単独又は BHT 単独に曝露させた対照群及び低用量群のラットには観察されなかった (McCormick ら、1986 年)。

^{32}P ポストラベル技術を用いて、雌 Sprague-Dawley ラットで BHT の飼料中投与が DMBA による乳腺の DNA 付加体の形成に及ぼす作用を試験した。生後 39 日のラット群に、32 mg/kg の DMBA の経口投与後に、0.4% 又は 0.8%BHT を含有する飼料を 2 週間摂取させた。BHT の投与は、DMBA 由来の DNA 付加体のいずれのタイプの形成も 22 時間後に DMBA 投与した対照群と比して、それぞれ 42%又は 36%減少させた。飼料中 BHT はシン・ジアステレオマーとして、DMBA の抗ジアステレオマー由来の付加体の形成を選択的に阻害した。この試験で用いた BHT の飼料中濃度は、DMBA 誘発性の癌発生の開始を有意に阻害することが報告されている (Singletary & Nelshopen, 1991 年)。

この試験では、BHT 及び BHT の代謝物である BHT-MeOH 及び DBQ (BHT-キノン) の DMBA 誘発性のラット乳腺癌発生に及ぼす作用のほか、ラット乳腺 DMBA-DNA 付加体の *in vivo* での形成を試験した。このような代謝物の選択は、ラット肝ミクロソームによる BHT の培養後に検出された主要な代謝物の観察に基づいており、その後のラット乳腺ミクロソームを用いた阻害では代謝物は検出されなかった。各化合物を 33 mg/kg 体重の DMBA の経口投与の 2 週間前及び 1 週間後に投与した。200 mg/kg 体重の腹腔内投与の BHT 及び (BHT-MeOH ではなく) DBQ はそれぞれ乳腺腫瘍形成を 39%及び 25%阻害した。BHT 及び DBQ による乳腺腫瘍形成の阻害と DMBA-DNA 付加体形成の阻害との間には適切な定量的相関が認められた。用量 100 及び 200 mg/kg 体重の BHT は DMBA-DNA の結合を同程度に阻害した。BHT と DBQ とは、特異的な付加体の阻害の選択性に差がみられた。DMBA の抗ジヒドロジオレポキンドとデオキシグアニンとの付加体の形成の減少は、BHT 及び DBQ の乳腺腫瘍形成を阻害する能力と相関していた (Singletary ら、1992 年)。

2.2.13.6 脾臓 (原文 p59)

雄 LEW 近交系ラットに 30 mg のアザセリンを 1 回/週×3 週間注入した後、0 又は 0.45%BHT を含有する飼料で 4 ヶ月間飼育した。BHT 投与は 1 脾臓当たりの好酸性病巣数を 32%減少させたが、病巣サイズには作用しなかった。BHT は好塩基性病巣の発生率には作用を及ぼさなかった (Roebuck ら、1984 年)。

2.2.13.7 皮膚 (原文 p59)

促進物質として 12-O-テトラデカノイル・ホルボール-13-アセテート(TPA)を用い、2 段階のマウス皮膚癌発生モデルで試験した場合、BHT には腫瘍-初発活性はみられなかった。BHT は 2 回/週×5 週で計 100 mg を投与した(Sato ら、1987a)。

BHT のヒドロペルオキシド(過酸化水素)代謝物である BHTOOH (2,6-ジ-*t*-[*tert*-]ブチル-4-ヒドロペルオキシ-1-2,5-シクロヘキサジエノン)は、SENCAR マウスの表皮性 ODC 活性の有効な誘発剤である。ODC (オルニチン・デカルボキシラーゼ)活性の最大誘発は、BHTOOH の単回投与の 12 時間後に観察された。DMBA による誘発の前に BHTOOH を 2 回/週×50 週投与したマウスには、乳頭腫ならびに癌の形成が観察された。用量 2、8 及び 20 μmol の BHTOOH は最大の乳頭腫反応をもたらした。乳頭腫から癌への進行が 60 週間後に生じた。このデータは、BHTOOH が BHT とは異なり、マウス皮膚での有効な腫瘍促進物質であることを示唆している。BHTOOH のみを投与し、BHT を投与しなかったマウスには乳頭腫及び癌は観察されなかった(Taffe & Kensler, 1988 年)。

2.2.14 その他の作用に関する特殊試験 (原文 p59)

若年 BALB/c マウス雌雄群に、0.75%BHT を含有する飼料を 1 ヶ月間摂取させ、次に 525~750 R の X 線で放射した。100%致死率をもたらす線量を下回るいずれの線量でも、放射線防護が観察された(Clapp & Satterfield, 1975 年)。

ハイブリッド(生後 10~12 週の C31F₁ 雄マウス)を 0 又は 0.75%BHT を含有する飼料で 30 日間飼育した後、アルキル化剤物質を腹腔内投与した。BHT を給餌した雄マウス群に 30 日死亡率の著明な減少が認められ、エチル・メタンスルホン酸、*n*-プロピル又はイソプロピル・メタンスルホン酸、二臭化エチル、ジエチルニトロアミン及びシクロフォスファミドに対して防護されたが、メチル・メタンスルホン酸、*N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソ-グアニジン又はジプロピルニトロソアミンに対しては防護されなかった(Cumming & Walton, 1973 年)。

¹⁴C-アフラトキシン B₁ を投与したラットに BHT (飼料中 0.5%) を摂取させたところ、¹⁴C-アフラトキシン B₁ の水溶性代謝物の尿中及び糞中への排泄の増強が示された。さらに、BHT を前投与した場合は、肝核 DNA と結合した ¹⁴C 量の減少が示された(Fukayama & Hsieh, 1985 年)。

2.3 ヒトでの観察 (原文 p60)

BHT と BHA が 1:1 の混合物 (50 mg) を用いて、慢性じんましん 44 名、アトピー性皮膚炎 91 名及び接触性皮膚炎 123 名に対する二重盲検プラセボ対照誘発試験を実施した。陽性反応はみられなかった(Hannuksela & Lahti, 1986 年)。

2 名の下腿潰瘍の患者で、BHT を含有するサポート包帯がアレルギー性接触皮膚炎を誘発することが観察された。この病変は疑わしい包帯の使用を中止した場合に改善が示された。両患者には BHT を用いた皮膚パッチテストで陽性反応が生じた(Dissanayake & Powell, 1989 年)。

1,336 名の湿疹患者のパッチテスト及び化学製品に関するデータベース由来の推定値に基づき、BHT の感作リスクを評価するための 1 件の試験を実施した。患者を試験した 2 年間の間に、BHT は陽性反応を生じさせなかった。このような結果から、BHT の頻繁な使用が工業用設定でも消費者製品でも、正常使用で用いられる BHT の濃度ではアレルギー性接触皮膚炎を誘発しないと考えられる、という結論に至った(Flyvholm & Menné, 1990 年)。

慢性特発性じんましん患者 2 名を対象に一連の食品添加物を用いて、二重盲検プラセボ対照経口誘発試験を実施した。BHT 及び BHA は試験中に原因物質として同定された。BHT 及び BHA を含有する食品を除去したところ、じんましん性エピソードの重篤度及び発生頻度に長期的な軽減がもたらされた (Goodman ら、1990 年)。

健康志願者由来の血小板を用いて、トロンビン誘発性血小板活性化に及ぼす BHT の阻害作用を試験した。血小板培養混合液中の濃度 20~300 μmol の BHT は、プロテインキナーゼ C の用量依存性の活性化をもたらした。この著者らは、この作用が、その後の生理的作動薬であるトロンビン及びコラーゲンによる血小板活性化に起因するホスホリパーゼ C 活性化に拮抗して、血小板を脱感作化することを指摘した (Ruzzene ら、1991 年)。

100 μmol の BHT 濃度は、培養中でヒト末梢リンパ球に対する細胞毒であった。60 μmol までの濃度では、トリチウム標識チミジンのフィトヘマグルチニン (植物性赤血球凝集素) 刺激リンパ球中への取り込みに対して作用を及ぼさなかったが、用量依存性のコルチゾール又はプレドニゾロンの相乗的阻害が示された。50 μmol の BHT 濃度では、混合リンパ球反応 (MLR) が抑制された。各試験物質の組み合わせから受けるリンパ球の刺激率と 50 μmol の BHT による MLR の阻害程度との間には線形相関がみられた。この著者らによれば、この試験のリンパ球培養で使用した BHT の濃度は、食事性曝露で達成される血漿中濃度に相当するものであるとはみなされなかった (Klein & Bruser, 1992 年)。

3. コメント (原文 p61)

長期的な BHT 投与の作用は多くの齧歯類の試験で適切に報告されてきたが、このうち唯一、明白であったのは 1 件のウィスターラットでの試験 (Olsen ら、1986 年) での肝癌の発癌作用であった。この試験は以前に実施されたラットの胎児性及び授乳中の BHT 曝露試験とは異なっており、標準の 2 年間の曝露期間の後にさらに 40 週間実施した。使用した用量は 25、100 又は 500 mg/kg 体重/日であった。このような長期試験の一部としては、500 mg/kg 体重/日の最高用量は生殖試験部分では 250 mg/kg 体重/日に減量する必要があった。試験した最高用量群では雌雄ともに、肝細胞腫瘍の生存率-調整発生率の統計的に有意な増大が観察された。このような腫瘍の大半は悪性ではなかったが、高用量群の雄ラットでは未投与の雄群よりも肝癌の発生率が有意に高値であった。この腫瘍はこの試験の終了間近になって発見され、その大半は投与の 141~144 週後にラットを殺処分した時に検出された。生殖試験部分の授乳期間にみる同腹児のサイズ、雌雄比及び児ラットの体重増加率に及ぼす作用に基づき、NOEL (最大無作用量) は 25 mg/kg 体重/日とした。

当試験委員会は、上述の試験が国際癌研究機構 (IARC, 1986 年) によって再検討されてきたことに言及し、投与群と対照群との間の生存率にみる差が大きいために、投与群で観察された肝病変の発生率に関して結論を下すことは困難であるという結論に至った。BHT のヒトに対する発癌性を評価することはできなかった。

新規の試験 (Price, 1994 年) で用いられた治験計画書は、胎児期及び生涯にわたって最大 22 ヶ月間まで BHT に曝露させるという、雄ウィスターラットの肝変化を試験することを目的としており、Olsen らの 1986 年の計画書とほぼ同じであった。この新規試験では、母ラットに最高用量 (500 mg/kg 体重/日) で投与した F₀ 群で肝腫脹が観察されたが、最大 250 mg/kg 体重/日まで投与した F₁ 群で毒性学的に有意な肝膨張は観察されなかった。最高用量群の児ラットの体重は、授乳期間を通して対照群の児動物よりも有意に低値であり、投与群の児ラットでは授乳期の 6~21 日の間で、用量依存性に死亡率が増大した。F₁ 雄群での BHT 投与は最高用量群で、小葉中心性及び末梢性肝細胞でのチトクロム P-450 2B 及びガンマ-グルタミル・トランスペプチダーゼ活性の持続的で

著明な誘発を試験期間を通してもたらしたほか、きわめて初期段階(生後 21 日)に開始したガンマ-グルタミル・トランスペプチダーゼ活性を増大させたが、中等量群では作用がやや小規模であった(チトクロム P-450 2B 活性は測定しなかった)。

中等量群及び最高用量群では、チトクロム P-450 及びエポキシド加水分解酵素の総量、エトキシレゾルフィン O-デエチラーゼ及びグルタチオン S-トランスフェラーゼ活性もまた、用量依存性に持続的に上昇した。個別試験では、5 g/kg (500 mg/kg 体重/日と等量) BHT を投与した雄ウィスターラット肝でウリジン二リン酸グルクロノシル転移酵素(UDP)活性が誘発された。小葉中心性肝細胞の持続的な膨大は、250 mg/kg 体重/日の最高用量を投与したラット群では 6 ヶ月目から明らかに認められるようになり、このことは混合機能オキシダーゼの誘発と一致する滑面小胞体の増殖を示していた。しかし、組織病理学的検査からは、この群の肝細胞壊死の徴候を明らかにすることはできなかった。さらに、投与群ではグルコース-6-ホスファターゼ活性の低下及び細胞内グルタチオン含有量の低下によって示される肝毒性のエビデンスもみられなかった。試験期間を通して、持続性の肝細胞増殖は示されなかった。最高用量群(250 mg/kg 体重/日)で 22 ヶ月目に、小規模ではあるが有意な数のグルコース-6-ホスファターゼ欠乏の変性肝病巣が認められた。この群では肝結節として示される病変が 19 匹中 6 匹のラットにみられたが、低用量群及び対照群では全くみられなかった。濾胞過形成を伴う甲状腺膨大のエビデンスは、高値の血清チロキシンの不在下で 100 及び 250 mg/kg 体重/日の投与群に示された。中等量群及び高用量群では、F₁ 雄の性的成熟前の副腎皮質に及ぼす早期の一過性の作用が認められ、これは副腎皮質束状層の細胞の巨大細胞という形態をとった。

BHT は雄ウィスターラットでは、長期試験で使用するよりも高用量となり、最大許容量を超えた場合には、肝細胞壊死ならびに増殖を誘発することが示されている。1,000 又は 1,250 mg/kg 体重/日×4 日間の致死未満量では、48 時間以内に小葉中心領域の肝細胞壊死が誘発された。これより低用量の BHT (500 mg/kg 体重/日)を 1～4 週間投与した場合は、酵素誘導を生じさせ、胆管増殖、肝細胞過形成及び持続的な線維性及び炎症性細胞反応が門脈周囲領域で観察された。肝のひとつの領域から別の領域への損傷の局在性の移動は、反応性代謝物の産生における誘導性の肝薬物代謝酵素の関与を示唆していた。

4. 評価 (原文 p62)

当委員会は、BHT の反復投与関連の肝細胞損傷の発生において肝酵素誘発が関与している可能性があるという点からみて、この場合の酵素誘発は肝に及ぼす作用の最も高感度な指標であるという結論に至った。この会議の最初に再検討された 25 mg/kg 体重/日という NOEL が得られた長期試験では、100 mg/kg 体重/日で適切に定義された閾値が示された。また、胎児期/生涯曝露試験群の生殖部分で観察された作用も、この NOEL を導くにあたっては考慮された。当委員会は、BHT に 0～0.3 mg/kg 体重という ADI (人体 1 日摂取許容量)を割り当てるために、100 という安全係数を使用した。

ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要（評価書:JMPR 1995）

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
急性毒性	表 1、表 2 参照		
7 週間亜急性 毒性 (経口)	マウス (B6C3F1)	0、3,100、6,200、 12,500、25,000 又 は 50,000 mg/kg	25,000 mg/kg 群の雌 1 匹、50,000 mg/kg の雄 1 匹及 び雌 4 匹が試験終了前に死亡。 体重減少は大半が用量依存性であり、いずれも著明であ った。 25,000 mg/kg 雄群:少量の肝細胞の小葉中心性細胞 質空胞化。12,500 mg/kg の雌群ではみられず。
10 週間亜急性 毒性 (経口)	マウス (B6C3F1)	濃 度 0.25%、 0.5%、1%、2% 又 は 4%	最高用量投与群:対照群の値よりも 10%以上大幅な体 重増加率の抑制がみられた。 さ濃度 4%投与群:、脾臓、心臓及び腎が著明な飢餓萎 縮。これはその他の群ではみられず。 MTD(最大耐容量)は飼料中濃度 2%であると考えられ た。
10 ヶ月間亜急 性毒性 (経口)	マウス (C3H)	0.05 又は 0.5%	雄では、0.5%投与群の 38%(10/26 匹)、0.05%投与群 の 58%(15/26 匹)、半合成飼料の対照群の 5%(2/37 匹)及び試験用飼料の対照群の 18%(7/38 匹)に肝腫瘍 の発症。 雌にはみられず。
亜急性毒性 (経口)	マウス (C3H)	BHT0.5% を 含 有 する飼料で 1 ヶ月 間飼育した後、試 験用飼料で10ヵ月 間飼育するか又は 対照飼料(BHT を 含有しない)で 1 ヶ 月間飼育してから試 験用飼料で10ヵ月 間飼育	両群の雄ラットでの肝腫瘍の発症率はそれぞれ 9% (3/35 匹)及び 17%(5/29 匹)であった。 雌雄のいずれに対しても肺腫瘍の発症率の増大なし。
	マウス (BALB/c)	0%、0.05% 又 は 0.5%	投与群の雄での肝腫瘍の発症率はそれぞれの群 13% (4/30 匹)、14%(6/43 匹)及び 7%(2/28 匹)であった。
12 ヶ月亜急性 毒性	マウス (C3H)		肝腫瘍の発症率は雌では 6～13%、雄では 41～68%で あった。
	ラット		20 日間又は 90 日間実施した飼料試験から、ラットが BHTをそれぞれ 0.5%又は 1%含有する飼料を嗜好しな いことが示された。しかし、ラットは BHT の濃度を漸増し た場合には摂食が促進した。5～10 匹の対(つがい)ラッ トから成る群の 25 日間の飼料試験では、BHTを0.8%及 び 1%含有する飼料は、飼料の 1 日摂取量を対照値を下 回る程度に低下させることが明らかになった。飼料中濃 度 1%では体重増加率が遅延した(Deichmann, 1955 年)。
5 週間亜急性 毒性 (経口)	ラット	0.3%、0.6%	0.6%投与群でのみ急激な体重低下及び胎児死亡。
7 週間亜急性 毒性	ラット	濃度 0.1% (ラードサプリメント)	ラードサプリメント 20%飼料群では、雄ラット群の初期成 長率及び成熟時体重に有意な遅延が観察された。ラー

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
(経口)		を 20%又は 10%含む飼料中)	ドサプリメント 10%飼料群では、雌雄いずれのラット群にも作用はみられなかった。1 対(つがい)の雌雄飼料試験では、この成長の抑制が BHT の直接的な毒性作用であり、飼料の嗜好の低下だけでは説明できないことが示された。この濃度の BHT は、肝の絶対重量及び体重に対する相対重量の両者に有意な増大をもたらした。高ストレス下のラットは頭頂部の毛の有意な喪失を示した。BHT の毒性作用は、飼料中の脂肪負荷が高くなると増大した。同腹児ラットの 10%に無眼球症が発生した。
82 日間亜急性毒性 (経口)	ラット	250 mg/kg 体重/日	肝の脂肪浸潤及び体重増加率の抑制。
6 週間亜急性毒性 (経口)	ラット	0、0.1、0.2、0.3、0.4 又は 0.5% (ラードサプリメントを 20%含む飼料中)	BHT は特に雄の成長率を抑制し、その作用は BHT 0.3%群以上で有意となった。また、両性ともに肝の絶対重量及び肝重量の体重比の両者に有意な増大をもたらした。肝重量の体重比の増大作用は BHT 0.2%群以上で有意となった。BHT は雄ラットでは左副腎重量の対体重比を増大させたが、雌では一貫した作用はみられなかった。投与に起因する副腎の組織学的変化はみられなかった。いずれの飼料中 BHT 濃度でも、血清コレステロール値及びコレステロール値が BHT 濃度に正比例して増大した。また、副腎コレステロール値の有意な増大も認められた。BHT は、肝中のエステル型肝コレステロールの総濃度又は濃度比、肝脂質濃度、多価不飽和脂肪酸の総濃度には有意な変化をもたらさなかった。
6 週間亜急性毒性 (経口)	ラット	0、0.2、0.4 又は 0.5%(乾燥重量) (ラードサプリメントを 20%含む飼料中)	濃度と正比例した血清コレステロール値の増大。 雄の副腎の相対重量が増大。 雌と比較した成長率の有意に大幅な抑制を引き起こした。 被験ラットの肝重量の増大は肝脂質の絶対量の増大と並行して生じた。
亜急性毒性 (経口)	ラット	0.5% (ラードサプリメントを 0%又は 20%含む飼料中)	基礎代謝率、体内コレステロール濃度及び体内ならびに肝コレステロールの合成率が増大。 体内総脂肪酸含有率が低下。 ラードサプリメント 0%投与群:体脂肪酸及び肝脂肪酸の合成率及びターンオーバーが増大。成長率の抑制。 このような作用は、ラードを添加した BHT を投与した群の方が大規模に発生した。
8 週間亜急性毒性 (経口)	ラット	0、0.02 又は 0.2% (カゼインを 19.9%含む飼料中) 16.6% 4 週間 9.6% 7 週間	成長促進及びタンパク効率の改善。 肝の窒素含有量は大幅に減少し、0.02%となった。絶食後の肝タンパク回収も 0.2%BHT 投与群のラットでは阻害された。肝脂質含有量は 0.2%BHT 群では増大したが、0.02%BHT 群では増大しなかった。また 0.2%BHT という飼料中濃度は、副腎重量及びアスコルビン酸含有量を増大させたが、腺重量に基づいて再計算したところ、有意差はみられなかった。副腎重量及びアスコルビン酸含有量の増大は、BHT が臓器に負荷したストレスを示していると解釈された (Sporn & Schöbesch, 1961 年)。

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
10 週間亜急性毒性(経口)	ラット	1%	BHT 給餌後正常食に戻したところ、数週間以内に肝重量の体重比、肝細胞の形態学的外見が回復。
16 週間亜急性毒性(経口)	ラット	0 又は 0.1%	成長率、飼料摂取量、体重、剖検時の臓器の顕微病理学的検査からは、投与群と対照群との間の差は明らかにされなかった。 肝相対重量及び副腎重量の増大。 肝グルコースリン酸及びグルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性の生化学的測定及び組織化学的評価からは、対照群との間の差はみられず。
10 週間亜急性毒性(経口)	ラット	飼料中に 20%添加した脂肪及び濃度 0、0.03、0.1 又は 0.35%BHT	雄の 0.3%濃度群でわずかな体重低下。 他に体重への明確な影響なし。 血中コレステロール値に影響なし。 0.3%濃度群の雄 4 匹及び 0.1%群の 2 匹が死亡。 雌群では 0.3%群で 2 匹の死亡。 対照群では雌雄群のうち雄 1 匹のみが死亡。
を 7 週間(経口)	ラット	0 、 6,200 、 12,500、25,000 又は 50,000 mg/kg	50,000 mg/kg 群では、いずれの雌雄ラットも試験終了前に死亡した。これ以外の投与群及び対照群では、12,500 mg/kg 群の雄 1 匹を除き、試験終了時まで生存した。試験の 7 週目に、用量依存性の体重減少が示され、25,000 mg/kg 群のラットの体重は対照値のわずか 38%~44%であった。飼料中濃度 12,500 mg/kg 群では、雌雄ともに造血にわずかな増大が認められた。
4 週間(経口)	イヌ	1.4~4.7 g/kg 体重	軽度~中等度の下痢が誘発された。剖検からは、肉眼的病理所見にみる重大な変化は認められなかった。中毒の徴候はみられなかったが、用量 0.17~0.94 g/kg 体重で 5 日/週を 12 ヶ月間投与した群では、肉眼的病理所見にみる変化が観察された
4 週間亜急性毒性	サル	0、50 又は 500 mg/kg 体重/日	投与群及び対照群の尿中値及び血中中値は類似していた。乳児又は若年サルの肝を除く全臓器の組織学的評価からは、いずれの化合物関連の変化も示されなかった。BHT を投与した被験サルでは、肝巨細胞の増殖及び肝細胞核の増大が認められた。投与したサルの肝細胞では小胞体の中等度の増殖が示された。このようなサルの肝細胞の細胞質中では、また、脂質滴が多く認められた。高用量群の被験サルの肝細胞の 15%では核小体の崩壊が認められた。被験サル及び対照群のサルの肝中 DNA、RNA 及びチトクロム P-450 濃度は、ほぼ同じであった。BHT を投与した若年群では、ニトロアニソール・ジメチラーゼ活性の経時的な増大が示された。この酵素活性は乳児サルには作用しなかった。グルコース-6-ホスファターゼ活性は若年サルでは低下したが、乳児サルでは変化しなかった。
長期毒性/発癌性試験	マウス	0、0.25 又は 0.5%	被験マウスの寿命は対照群よりも有意に長期であり、0.25%群が 17.0±5.0 ヶ月、0.5%群が 20.9±4.7 ヶ月であったのに対し、対照群では 14.5±4.6%であった。
12 ヶ月間長期毒性/発癌性試験	マウス	0.75%	関連する亜急性胆管炎を伴う肝胆管の著明な過形成が発現した。
16 ヶ月間長期	マウス	0.75%	被験群の肺腫瘍の発生率が 63.6%であったのに対し、

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
毒性/発癌性試験			対照群は 24%であった。しかし、この試験の反復で、これよりも大規模な被験マウス群を用いたところ、雌雄とも肺腫瘍の発生率に BHT の影響は示されなかった。
100 週長期毒性/発癌性試験	マウス	1,000 mg/kg 4 週目に、1 群を BHT 2,500 mg/kg を含有する飼料、8 週目に別の 1 群を BHT 5,000 mg/kg を含有する飼料にそれぞれ切り替え	投与群には生存率の統計的に有意な減少はみられなかったが、高用量群の雄ラットでは試験期間の残り 1/4 での生存率が低かった。試験期間中に死亡又は殺処分したラットからは、対照群と比較して大量の小葉中心性巨大細胞及び巨大核が示された。胆管過形成が観察されたのは被験ラットの 141 匹中 3 匹のみであった。悪性腫瘍の発生率に関しては、高用量群では対照群と比較して有意差はみられなかった。しかし、被験ラットでは肺腫瘍の高い発生率が認められた (5,000、2,500、1,000 mg/kg 及び対照群ではそれぞれ 75%、74%、53%及び 47%)。被験マウスと対照群とを区別するような形態学的徴候はみられなかった。また、BHT を投与した雌マウスでは良性卵巣腫瘍の明らかな増大が観察されたが、対照群では全く観察されなかった。
107,108 週間長期毒性/発癌性試験	マウス	0、3,000 又は 6,000 mg/kg	試験期間を通じて、被験マウスは雌雄ともに対照群よりも低体重。体重増加率の抑制の程度は用量依存性。投与群と対照群で同等の生存率又は生存率の改善をもたらした。試験終了時の生存率は、雄マウスが対照群、低用量群及び高用量群でそれぞれ 60%、86%及び 92%であり、雌マウスが 85%、82%及び 90%であった。雄では肝の巨大細胞性及び非腫瘍性病巣 (紫斑病、肝細胞性変性/壊死及び細胞質空胞化) の発生に関する著明な用量依存性の増大がみとめられたが、雌ではみられなかった。投与群の雌雄ともに、肝細胞性腺腫又は癌の発症率の有意な増大はみられなかったが、投与した雌群に、腺腫と癌の合計発生率の小幅な増大が認められた (対照群、低用量群及び高用量群でそれぞれ 1/20 匹、4/46 匹及び 5/49 匹)であったが、統計的に有意ではなかった。肝細胞癌の文献対照発症率は得られなかった。雌マウスの肺胞上皮癌/細気管支癌又は腺腫の発生率は、低用量群 (35%) では対照群 (5%) よりも有意に高値であったが、高用量群 (14%) では有意ではなかった。この肺胞上皮癌/細気管支癌又は腺腫の文献対照発生率は 4.7%であった。雌マウスでは、BHT の飼料中の慢性摂取は、多くの臓器での肉腫の発生率の有意な低下と関連していた。高用量群の雄 4 匹 (8%) 及び低用量群の雌 2 匹に眼/涙腺の腺腫が観察されたが、対照群ではみられなかった。この腫瘍の文献対照発生率は雄マウスでは 1.2%であった。マウスの涙腺腺腫は肉眼的に明らかな病巣でも顕微鏡的検査しかできないため、報告書では、涙腺腺腫と BHT 投与とを明確に関連づけることはできなかったとしている。
96 週間長期毒性/発癌性試験	マウス	0、200、1,000 又は 5,000 mg/kg	試験期間の飼料摂取量については試験群と対照群とはほぼ同じ。1,000 及び 5,000 mg/kg 群の雌の体重は対照群よりも低値であり、5,000 mg/kg 群の雄の体重についても同様。高用量群では一部の臓器 (唾液腺、心臓及

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			び腎)の絶対重量に小幅な変化がみられた。5,000 mg/kg 群の雄では、血清 GOT 及び GPT 値が対照群よりも高値であった。血液学的、血清及び尿分析においては、これ以外の化合物関連作用は観察されなかった。試験群でも対照群でも腫瘍性病変が報告された。このような腫瘍については、肺腺腫、肝の過形成結節及び肝細胞癌及び悪性リンパ腫の発症率が高値であった。しかし、いずれのタイプの腫瘍についても、BHT 投与群と対照群との間で統計的な有意差はみられなかった。
104 週間長期毒性/発癌性試験	マウス	0、1%、又は 2%	投与群の雄及び雌マウスの平均体重は対照群よりも低値であった。両性にみる用量依存性の体重増加率の抑制は、雌の方が雄マウスよりも著明であった。BHT の投与は用量依存性に雌雄両群の生存率を改善したことが認められた。投与期間(104 週間)の終了時の雄/雌マウスの生存率は、40%/58%(対照群)、64%/81%(1%投与群)及び 74%/89%(2%投与群)であった。BHT 投与群の雄マウスでは、肝細胞腺腫(対照群、低用量群及び高用量群でそれぞれ 19%、38%及び 53%)又は肝細胞変性病変の統計的に有意な増大が認められ、明確な用量依存性の相関を示していた。肝細胞腺腫又は肝細胞変性のみられる雌マウスの数の増大は報告されなかった。雄マウスのこれ以外の腫瘍の発生率及び雌マウスの何らかの腫瘍の発生率については、BHT 投与の影響としての有意な増大はみられなかった。リンパ腫又は白血病については、雌雄両方で用量依存性の発症率の低下傾向がみられた。
24 ヶ月間長期毒性/発癌性試験	ラット	ラード 1%含有又は BHT 0.2、0.5 又は 0.8%	中毒の徴候は示されず、マクロ病理学試験でも陰性であった。BHT 0.5%含有の飼料を与えた群では、BHT はラードに溶解し、飼料中に投与する前に 150° C で 30 分間加熱した。体重増加率又は血液成分に及ぼす作用は認められず、主要な臓器の顕微病理学的試験は陰性であった。0.8%BHT の投与後の雌雄ラット両者に、平均値以下の体重増加率のほか、脳、肝及びその他の臓器の重量の体重比の増大が生じた。この群でも顕微病理学的試験は陰性であった。BHT は赤血球及び白血球数又は末梢血のヘモグロビン濃度に特異的な作用を及ぼさなかった。ラットは両性とも多数が試験期間に死亡したが、致死的原因は治療関連ではなかった。この観察は病理学的試験群で裏づけられた。BHT 0.5%群では、ラットの生殖サイクル、脾臓、腎、肝及び皮膚の組織学又は心臓、脾臓、腎の重量に及ぼす作用は認められなかった。2 年間にわたって BHT 0.1%及び 10%硬化ココナッツオイル含有の飼料を給餌したラットには、死亡率の有意な増大はみられなかった。
生涯長期毒性/発癌性試験	ラット	0、0.005、0.062 又は 0.32%	飼料中濃度 0.32%群では BHT 肝重量、血清コレステロール、血清 K ⁺ の増大のほか、肝及び腎の組織学的変化が認められた。飼料摂取量、体重増加率、飼育中の死亡率又は平均寿命に関する変化のほか、腫瘍誘発が疑われる所見は認められなかった。24 ヶ月間投与群も「生涯」

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			投与群も、腫瘍罹患率の用量依存性の傾向を示唆するものは認められなかった。試験で認められた腫瘍は、いわゆる高齢ラットに典型的なものであった。生存していたラットは少数であるが、その腫瘍データに 6、12 及び 24 ヶ月間の飼育中に死亡又は瀕死状態で殺処分した生涯投与群のラットが含まれていたことは、注目すべきである。この利用可能なデータには個別の組織検査の数値は挙げられていなかったが、検査したラット数は挙げられていた。このデータでは、BHT 高用量群でのラット 1 匹あたりの腫瘍数に低下傾向が示されていた。
105 週間長期毒性/発癌性試験	ラット	3,000 mg/kg 又は 6,000 mg/kg	試験期間を通じて、被験ラットの雌雄ともに用量依存性の体重の低下がみられた。BHT の生存率に及ぼす有意な作用は認められず、さまざまな腫瘍の発生率については、投与群と対照群との間で差はみられなかった。BHT を投与した雌群では、下垂体腺腫の発生率が有意に減少した。投与した雌雄ラットには、対照群と比較して病巣の肺胞組織球増加症の発症率が用量依存性に増大した。この作用は雄よりも雌に著明であった。
104 週間長期毒性/発癌性試験	ラット	0.25%又は 1%	試験終了時の組織病理学的検査では、さまざまな腫瘍が示されたが、腫瘍のタイプ又は腫瘍総数のいずれについても、対照群と比較した用量依存性反応はみられなかった。雌ラットの肝の過形成結節及び脾臓癌の発症率のほか、試験群の両性の下垂体腺腫及び下垂体腺癌の発症率は対照群と比較して高値であった。しかし、低用量群の雌の下垂体腺癌の発症率は例外であり、その差は対照群と比較して有意ではなかった。この作用は用量依存性ではなかったため、BHT がこの試験の条件下では発癌性物質ではないという結論に達した。
長期毒性/発癌性試験	ラット	0、25、100 又は 500 mg/kg 体重/日	BHT を摂取した全ラットの生存率に用量依存性の増大がみられた。離乳時から試験期間を全体を通して、すべての用量群でラットの体重が対照群よりも低値であった。高用量群の雄はやや赤みを帯びた尿を排尿した。血液学的パラメータでは BHT 投与による変化のないことが報告されたが、データは得られなかった。両性では血清トリグリセリドが減少したが、雌のみでコレステロールがいくぶん増大した。 組織学的試験群から、雄ラットでの肝細胞癌の増大及び両性での肝細胞腺腫の増大が示された。(表 3 及び表 4 参照)。
長期毒性/発癌性試験	ラット	0、25、100 又は 500 mg/kg 体重/日	BHT を投与してから最初の 5 週間は、高用量群の雄で体重増加率の抑制が示された。この傾向は BHT を投与する前から始まり、BHT の投与を開始した後も持続した。これ以外の投与群での体重増加率は対照群と類似していた。ラットの健康に及ぼす治療関連作用は示されなかった。妊娠中及び授乳中は、投与群と対照群の雌の間で飼料摂取量に差はみられず、離乳時に同腹児も体重はほぼ同じであった。妊娠 20 日目の殺処分時に、高用量群では同腹児の肝の絶対重量及び相対重量に用量依存的に増大し、統計的に有意であった。全群の雌で

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			は、その児動物を含めた場合でも除外した場合でも体重が類似していた。肝の組織病理学的検査から、高用量群 (500 mg/kg 体重/日) の 4/5 及び低用量群の 1/5 (25 mg/kg 体重/日) で小葉中心性肺細胞の軽度の拡大及び好酸球増多症がみられ、これが酸化活性の混合機能の誘発と一致していることが明らかになった。100 及び 500 mg/kg 体重/日群で、母ラット由来の肝細胞の分裂指数の低下が示されたが、この結果は不明確であった。生殖パラメータは以下の通り、交尾率 54～65%、妊娠率 93～96%、生存力率(生後 6 日までの)93～96%。このようなパラメータには投与関連作用はみられなかった。また、母ラットあたりの再吸収の絶対数についても、投与群と対照群とは類似していた。低用量群及び高用量群の児動物数/同腹にはわずかな減少がみられたが、用量依存的な傾向は明確ではなかった。高用量群の児ラットの出生時(10%)、授乳期の 6 日目(12%)及び 21 日目(21%)の体重は対照群よりも有意に低値であった。間引き後に残した児ラットの死亡率は授乳期の 21 日目までが用量が増大するに従い 2%、8%、12 及び 15%と上昇した。6 日目に非無作為に児ラットを間引きしてからは、このようなデータは BHT 投与群のラットの生殖機能の不偏評価には用いることができなくなった。 試験を継続した F1 雄ラットの体重は、高用量群では 22 ヶ月間の投与期間を通して対照群よりも低値であった。この試験の最初の 1 年間では、その差は 10～20%であった。また、中等量群でも治療期間の前半で体重が対照群と比較して約 5%低値となった。投与に対する有害反応又は飼料摂取量に及ぼす作用の報告はなかった。ラットの毛の主観的評価では、100 及び 250 mg/kg 体重/日群では加齢関連の劣化が対照群よりも少なかった。予定した殺処分時に、肝の相対重量には一貫した用量依存性増大がみられたが、絶対重量にはみられず、このことは高用量群では統計的に有意であった。 試験の 6 ヶ月目から開始した予定通りの殺処分時に、用量依存性の小葉中心性肝細胞の拡大ならびに好酸球増多症が一貫して観察された。このことは混合機能オキシダーゼの誘発と一致する SER の増殖を示唆していた。対照群及び高用量群由来の肝切片の免疫組織学的染色から、BHT 投与に伴って試験期間を通して持続していた肝細胞量含有量の著明な増大及びチトクロム P-450 2B の分布が明らかになった。チトクロム P-450 1A 又はエポキシドヒドロラーゼの染色パターンには変化はみられなかった。組織化学的染色からは、高用量群のラットの大半で、投与の 11 ヶ月目から門脈周囲肝細胞のガンマ-グルタミルトランス-ペプチダーゼ活性の著明な誘発が始まったことが明らかになった。この作用は中等量群ではやや小規模であった。

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			投与群のラットにみるグルコース-6-ホスファターゼ活性の分布は正常であった。投与関連の胆管過形成又は門脈管での炎症性細胞浸潤のエビデンスはみられなかった。投与群では 11 ヶ月目の一部のラットに変性肝細胞病巣 (AHF) がみられたが、全群では 16 及び 22 ヶ月目に認められた。病巣の特殊なタイプの発生率と治療との関連性はみられなかった。22 ヶ月目に、好酸球病巣及び好塩基性球増多症の高発生率が認められた。肝切片の組織化学的染色から、高用量群の少数のラットにグルコース-6-ホスファターゼ欠乏 AHF のみられたことは統計的に有意であった。高用量群の肝結節のみられるラット数では、22 ヶ月目の GGT に関する AHF 染色陽性の発生率に投与関連の増大が示され、これも統計的に有意な増大であった (これ以外の群ではゼロであったのに対し 6/19 ラット)。 離乳後 4 週間からの試験のいずれの時点でも、BHT の投与に起因する肝細胞増殖率の増大はみられなかった。このため、Clayson ら (1993 年) が雄ウィスターラットに対する飼料中 BHT 0.5% 投与開始から 2～4 日目に肝細胞増力の増大を観察したことは興味深いことである。今回の試験で用いたような間隔の開いたサンプリング時間では、このような一過性の増大を検出することは困難であったと考えられる。 異物代謝関連の肝酵素活性及びその他のパラメータの数値は、BHT 投与の結果として変化した。総チトクロム P-450 含有量は、高用量群で生後 21 日目に 30～60% に増大した。また、生後 21 日目からは、エポキシドヒドロラーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ及びペントキシレゾルフィン O-脱ペンチル化 (PROD) の用量依存性の増大も示され、これは中等量群及び高用量群では統計的に有意であった。PROD 活性はきわめて大幅に増大し、中等量群で 10～25 倍、高用量群で 20～80 倍に達した。エトキシレゾルフィン*O-脱エチル化活性の中等度な用量依存性が示されたが、対照群との差は統計的に有意ではなかった。試験期間を通して、肝グルタチオン又はグルコース 6-ホスファターゼ活性に及ぼす作用は示されなかった。 *原文の <i>resomfin</i> は誤記と思われる。 腎の組織病理学的検査から、慢性進行性腎症に罹患していたラット群すべての重篤度が 11 ヶ月目から軽減したことが明らかになった。副腎に及ぼす作用は示されなかったが、同じ試験所で実施したほぼ同一の方法であるが、無効となった 1 件の試験では (Robens 研究所、1989 年)、中等量群及び高用量群で離乳後 4 週間目に副腎皮質束状層の巨細胞が観察されたものの、それは投与後の時点ではなかった。今回の試験では、離乳後 11 ヶ月目から副腎の組織病理学的検査を開始した。中等量

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			群(ラットの 75～82%が罹患した軽度な変化がみられた)及び高用量群(ラットの 100%が罹患した著明な変化がみられた)の両群では、11 ヶ月目に濾胞細胞の大きさの縮小、コロイドの不在又は減少、濾胞細胞外観の不規則性、濾胞細胞の充血ならびに数の増大という特徴を有する甲状腺過活動のエビデンスが示された。この作用は BHT の肝に及ぼす二次的な作用であると考えられた。投与したラット群と対照群との間で血清サイロキシン濃度に差はみられなかった。 中等量群及び高用量群で肝酵素誘発及び持続的な甲状腺過活動に及ぼすことが明らかになった作用及び Olsen 試験からの腫瘍データは共に、NOEL(最大無作用量)が 25 mg/kg 体重/日であることを示唆していた (Price, 1994 年)。
110 週間長期毒性/発癌性試験	ラット	300、1,000、3,000 又は 6,000 mg/kg	試験 1 のいずれのラットも投与期間終了まで生存した (76 週間)。試験 2 では、対照群及び投与群の生存率が 84 週目から低下したが、投与関連の傾向はみられなかった。投与期間の終了時に、BHT 3,000 又は 6,000 又は 12,000 mg/kg を投与したラット群はそれぞれ対照群と比較して体重が有意に低下した BHT 6,000 mg/kg を投与したラット群では、76 週間に肝の絶対重量及び相対重量が対照群と比較して有意に増大した。BHT 12,000 mg/kg を 110 週間投与したラット群では、肝の絶対重量及び相対重量が対照群と比較して有意に減少した。BHT 投与群では、各群の罹患ラット 1 匹あたりの貯蔵鉄欠乏の肝細胞病巣の密度が、48 週目及び 76 週目にわずかではあるが有意に増大したが、BHT 12,000 mg/kg では、110 週目には病巣の発生率及び大きさがやや低下した。肝細胞癌はいずれの群でも検出されなかった。肝細胞腺腫は対照群を含む全群で検出され、発症率に用量依存性の傾向はみられなかった。また、特定の臓器にみられる肉眼で観察可能な腫瘍の発生率に関しては、BHT の投与関連作用はみられなかった。
生殖毒性	マウス	0.1 又は 0.5%濃度の BHT、ラード (10%又は 20%)	0.5%濃度の BHT 群では、生後 12 日目の児マウスの平均体重及び同腹の全マウスの重量が、わずかではあるが有意に低下した。0.1%濃度の BHT 群ではこのような作用は認められなかった。母マウス 144 匹のうち 12 匹を無眼球症の確定診断を受けたマウス株から選択したにも関わらず、生涯での繁殖期全体で出生した 7,754 匹のマウスの中で無眼球症は 1 匹もみられなかった。
生殖毒性	マウス	0.5%	妊娠マウス及びその児マウスに濃度の BHA を慢性的に摂取させたところ、さまざまな行動的变化が生じた。対照群と比較して、BHT 投与群の妊娠マウスには対照群と比較して、探索活動の増大、睡眠の減少、毛繕いの減少、学習の遅滞及び指向反射の低下が示された。BHT 投与群の児マウスには睡眠の減少、社会的ならびに孤立的に誘発される攻撃性の増大及び重篤な学習の欠如が示された。
3 世代試験	マウス	0 、 0.015% 、	1 件のマウスのを実施し、生殖、発達及び行動に及ぼ

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
		0.045%、0.135% 又は 0.405%(それ ぞれ 0、20、70、 200 又は 610 mg/kg 体重/日に 相当)	す作用を評価した。測定されたパラメータのうち 1 つのみに有害な影響を及ぼした。F1 の高用量群では授乳期の 7 日～21 日目にかけて体重増加率が持続的に抑制されたが、F2 の児マウスでは対照群と比較して体重差は示されなかった。F2 の雄児マウス群のうち体重が低値のマウスはオープン・フィールド試験に割り付ける投与群を 180° 変えさせたが、このことによる影響は F2 の雌児マウス群では明らかにならなかった。このため、この試験で用いた飼料中の BHT 濃度では、投与による毒性学的に重大な作用は明らかにならなかった。
生殖毒性	ラット	0、300、1,000 又 は 3,000 mg/kg	飼料中濃度 3,000 mg/kg では、親ラット及び児動物の成長率に 10～20%の低下が観察された。28 週間後に血清コレステロール値の 20%の上昇が観察されたが、10 週間後にはコレステロール値の上昇はみられなかった。42 週後に殺処分したところ、相対肝重量の 10～20%の増大が観察された。3,000 mg/kg 群でのその他の観察及び 1,000 mg/kg 及び 300 mg/kg での観察内容すべてが対照群と類似していた。生殖に関するいずれの基準も正常であった。催奇形性作用は検出されなかった。
生殖毒性	ラット		親ラット及び最初の児動物世代については、2 世代に関して類似の結果が得られた。生後 100 日の 2 世代のラット児の検査から、濃度 3,000 mg/kg での平均体重の低下を除き、作用はみられないことが明らかになった。ラットの児動物世代については、児動物の大きさ、平均体重、死産の発生率、生存率の検査のほか、肉眼的ならびに顕微鏡的病理学検査を実施した (Kennedy ら、1966 年)。
生殖毒性	ラット	0.125%、0.25% 又 は 0.5%	離乳前の児ラットの検査で高用量群では、正面立ち直り反応時間、前肢の遊泳機能の発達遅延及びオープン・フィールド試験での活動性の低下傾向に有意な増大が認められた。離乳後の試験では、0.25%BHT 群の雄では、ショックを与えたコンパートメントに再度入ったラット数が多かったという受動回避に及ぼす作用がみられた。その他の試験ではいずれも統計的な有意差はみられず、BHT の協調運動、能動回避獲得又は消去能力に及ぼす作用はみられなかった。
生殖毒性	ラット	0 又は BHT 500 mg/kg 体重/日に 相当する 0.5 ～ 0.9%BHT	ラットは体重増加率が低値であり、これが妊娠中も持続した。この妊娠期間の平均体重及びその児ラットの大きさについては、試験群と対照群とは類似していた。F ₁ 児ラット群の平均体重及び平均体重増加率は、投与群の母ラットから授乳された児ラット群が有意に低値であった。また、胎児期に BHT に曝露された児ラット群は、母ラットが非投与群であった対照群と比較して発達に相対的な遅れがみられた。胎児期又は母ラットの乳によって BHT に曝露された児ラット群は、行動パターンの変化のほか、脳の死細胞の平均数が高値であった。
生殖試験	ラット	0、25、100 又は 500 mg/kg 体重/ 日	飼料摂取量は全群が同程度であった。高用量群の雄雌ラットは、試験期間を通して持続した体重の有意な低下を示した。妊娠率は全群で同程度であった。500 mg/kg 体重/日群の雄 1 匹あたりの同腹児の大きさ及び数は、対

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			照群と比較して有意に低値であった。授乳期間の生存能力については試験群と対照群は同程度であった。児ラットの出生時の平均体重は 500 及び 100 mg/kg 体重/日群では対照群よりもやや低値であった。授乳期間に、BHT は有意な用量依存性の体重増加率の低下を引き起こした(25、100 及び 500 mg/kg 群が対照群と比較してそれぞれ 5%、7%及び 41%低値となった)。
生殖試験	ラット	0、500、750 又は 1,000 mg/kg 体重/日	妊娠前及び妊娠中に曝露させた雌ラット及び胎児～授乳期にかけて同じように曝露させた児ラットに関して、このような場合に許容される飼料中 BHT の最大許容量を決定するための試験を実施した。雄 3 匹及び雌 16 匹から成るウィスターラットの複数群に、の飼料中 BHT を交配前の 3 週間に投与した。少なくとも各群の雌 8 匹には妊娠中～授乳期まで(産後 21 日まで)投与した。交配後、雄及び残りの雌を剖検した。このラット群には血液凝固時間には投与による作用はみられなかった。投与群の雌の飼料摂取量は、試験の 4 週間前には対照群よりも大幅に高値であった。体重に及ぼす有意な作用はみられなかったが、体重低下に用量依存性の傾向が顕著であった。投与群のラット毛に変色がみられた以外は、全身の健康状態に及ぼす作用は認められなかった。 交配の成功率は 1,000 mg/kg 体重/日の BHT 投与群が他の群よりも低率であった。雌の妊娠ラットには投与群による大きな差は観察されなかった。観察からは 2 つの高用量群のラットは妊娠最終週の体重増加率が抑制されたと考えられた。同腹児数又は児動物の体重には、母ラットの投与群間又は対照群との間で有意差は認められなかったが、同腹児のサイズに体重の用量依存性の減少傾向が明らかであった。同腹児の大きさが小柄であった。BHT の催奇形性作用の徴候は報告されなかった。 同腹児の試験サイズを可能であれば 8 匹まで標準化した。授乳期に、BHT 1,000 mg/kg 体重/日群であった母ラットには剖検時に低体重及びきわめて低い体脂肪が観察された。最低用量群の BHT の母ラットの児動物は成長に著明な抑制がみられたが、外見は健康的であった。2 つの高用量群の母ラットの児動物の成長は重度に抑制され、体毛状態が不良であり、活動量が低いことが示された。BHT 投与群のラットでは同腹児の試験サイズを 8 匹未満としたところ、平均的な児動物体重が相対的に大幅に高くなった。このことは、通常の試験サイズの同腹児にみる体重増加率の抑制は、BHT の毒性というよりも母乳の産出量不足に起因していることを意味している。各用量群からの 2 匹の同腹児を離乳後に 4 週間、対照用飼料で飼育した。BHT 含有の飼料を摂取していた母ラットの児動物は、依然として対照群よりも低体重であった。2 つの高用量群の母ラットの児動物は、引き続き不良な健康状態を示した。BHT はいずれの母ラットにも肝重量の著明な増大をもたらした。その肝重量は体重の約 10%で

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			あり、ラット体内で可能な最大の膨大程度に達していた。 BHT 投与群の母ラットの児動物にみる相対肝重量は、対照群と比べて差がなかった (Robens Institute, 1989 年)。
生殖毒性 34 週間	鶏	0.125%	類似の対照群と比較して、妊娠率、卵の孵化率又は幼鳥の健康状態に関する差はみられなかった。抗酸化処理した鶏の卵には対照群と比較してカロチノイド及びビタミン A が多く含まれていた。
生殖毒性	サル	50 mg BHT と BHA /kg 体重/日	親サル又は児サルに臨床的異常は観察されなかった。被験サルの妊娠期間には合併症はみられず、正常な幼児を出産した。成体雌サルは持続的に正常な児サルを出産した。BHT の曝露期間に生まれた幼児も、投与とは無関係な原因による 1 匹の幼児の死亡を除き、いずれも健康であった。生後 3 ヶ月目のホームケージ観察では行動異常は示されなかった (Allen, 1976 年)。
催奇形性	マウス、ラット	1,000 mg/kg 体重/日、750 mg/kg 体重/日、マウス 250 ~500 mg/kg 体重/日、ラット 500 及び 700 mg/kg 体重/日	BHT の胚毒性に関する試験では次の 3 通りの用量計画を用いた: 妊娠期の特定日の単回投与 ()、交配日から妊娠期間までの反復投与 () 及び交配前 7~10 週間に連日投与 ()、これを交配から妊娠期間を通して被験動物を殺処分するまで継続した。完全に発達した胎児の骨格及び軟組織の検査及びその他の基準では、有意な胚毒性は観察されなかった。生殖後及び出生後の発達にも影響はみられなかった。
遺伝毒性	表5参照		
肝毒性	マウス	200 ~ 800 mg/kg 体重	雄 ddY マウスに、BHT () と合成 GSH の阻害剤、ブチオニンスルホキシミンとの混合物を経口投与したところ (BSO は BHT を投与した 1 時間前及び 2 時間後に 4 mmol/kg 体重を腹腔内投与)、SGPT 活性ならびに小葉中心性壊死の増大という特徴を有する肝毒性が発現した。この肝毒性反応は時間ならびに用量依存性であった。BHT (最大量 800 mg/kg 体重) 単独では肝損傷のエビデンスはみられなかった。この結果は、BHT がチトクロム P-450 依存性の代謝反応によって活性化され、BSO 投与によって肝 GSH が枯渇したマウスにおいて、反応性代謝物の不十分な解毒率による肝毒性作用が引き起こされたことを示している。著者らは、BHT 構造的類似体を用いた試験群に基づき、BHT-キノンメチドがマウスの肝毒性において役割を担っている可能性のあることを示唆している (Mizutani ら、1987 年)。
肝毒性	ラット	0 又は 0.4%	肝重量、ミクロソームタンパク、チトクロム P-450、チトクロム b5、NADPH-チトクロム c レダクターゼ、ビフェニル-4-ヒドロキシラーゼ及びエチルモルフィン N-デメチラーゼの値が有意に増大したが、アニリン-4-ヒドロキシラーゼの値は増大しなかったことが観察された。肝総タンパク、コハク酸デヒドロゲナーゼ及びグルコース-6-ホスファターゼの値はやや低下した。このパターンは試験期間を通してほとんど変化しなかった。試験期間の終了時に BHT を含有した試験食から離脱したラットに、BHT を含有しない飼料を 18 日間摂取させたところ、チトクロム b5、チトクロ

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			ムcレダクターゼ及びエチルモルフィンN-デメチラーゼの値を除き、多くの肝パラメータが正常値に回復したことが示された。80 週間の飼育の終了時の小葉中心性細胞の膨大を含む組織学的変化は、18 日間の BHT を含有しない飼料によって可逆的であった。唯一の超微細構造変化は平滑小胞体の増殖であった。
肝毒性	ラット	0.4%	BHT を投与して 1 週間後に、薬物代謝活性の増大及び NADP チトクロム c レダクターゼ活性の増大を伴って、肝の相対重量が 35% 増大するという著明な肝膨大が認められた。80 週間の投与から離脱した 18 日後には、肝重量の増大はごくわずかであった。このことから、この作用は可逆的であると考えた。組織学的には、BHT 投与後の肝は、この領域の不均一な外観を伴った小葉中心性肝細胞の膨大という特徴がみられた。超微細構造的には、平滑小胞体の増殖が認められた。この著者らは、肝傷害のエビデンスは不明瞭であるが、グルコース-6-ホスファターゼ活性の低下及び細胞膨大など、多くの肝毒素及び肝癌にみられるような特徴が認められると記している。しかし、細胞傷害に特徴的なリソソーム変化は認められず、作用は可逆的であった。
肝毒性	ラット	0、0.1、0.25、0.5 又は 0.75%	BHT は 30 日後に肝、膀胱又は甲状腺の細胞増殖を誘発しなかった。2 番目の試験では、8 匹のラットから成る複数群に、0.5%BHT を含有する飼料を 2、4、8、10 又は 14 日間給餌した。この投与は時間制限的に肝細胞の [³ H]チミジン標識指数を増大させたが、8 日以内に対照値まで戻った。このような肝の [³ H]チミジン標識指数の増大は、分裂指数の予想外に大幅な増大を伴った。
肝毒性	ラット		BHT の高用量群では高用量群では DNA 損傷作用が生じる可能性があるという結論に達した。
肝毒性	ラット	0、25、250 又は 500 mg/kg 体重/ 日の BHT を 7 日 間、さらに、1 日量 が 1,000 又は 1,250 mg/kg 体重/ 日の BHT を最長 4 日間	48 時間以内に小葉中心性壊死を誘発し、一方、7 日間又は 28 日間投与した 250 又は 500 mg/kg 体重/日の BHT は用量依存性の肝腫脹を引き起こしたほか、最高用量では、進行性の門脈周囲肝細胞壊死を誘発した。門脈周囲の病変は、胆管の増殖、持続的な線維性ならびに炎症性細胞反応、肝細胞過形成、肝細胞ならびに細胞核膨大と関連していた。200 mg/kg 体重/日の用量では、軽度の細胞損傷の証拠が得られたが、25 mg/kg 体重/日では BHT が肝損傷を引き起こすという証拠は認められなかった。生化学的変化には、エポキシドヒドロラーゼの用量依存性の誘発、チトクロム P-450 イソ酵素の比率における用量依存性の変化及びグルコース-6-ホスファターゼの減少などが挙げられた。BHT の測定値は、用量依存性の脂肪中への蓄積を示したが、肝中への蓄積は示さなかった。
肝毒性	ラット	500 mg/kg 体重	ミクロソーム酵素誘発剤の 1 種であるフェノバルビタール (PB) 及びグルタチオン除去剤の 1 種であるブチオニンスルホキシミン (BSO) と併用摂取した場合の急性作用を検討した。この結果は、500 mg/kg 体重の BHT の単回経口投与が閾値を下回る急性肝毒性をもたらすことを示

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			していた。BHT 投与は、凝固因子 IX の濃度のわずかな低下を除き、血清パラメータに作用を及ぼさなかった。BHT の単回投与は 10 匹中 8 匹のラットで肝細胞の有糸分裂活性を増大させ、ミクロソームタンパク含有量又は EROD 活性に影響することなく ECO の肝活性を増大させたほか、肝エポキシドヒドロラーゼ活性の著明な増大に關与していた。最後に、フィロキノンエポキシド・レダクターゼ活性の BHT 誘発性の阻害も仮説として挙げられる。肝 GSH 濃度に及ぼす作用は認められず、チトクロム P-450 1A 及び 2B イソ酵素ファミリーに関する肝細胞の免疫化学的染色においても明白な投与関連の変化はみられず、肺又は腎の組織病理学的変化もみられなかった。PB 又は BSO の前投与は、無条件の肝損傷(肝細胞変性又は凝固壊死)をもたらしたが、約半数のラットでは損傷のほとんどが小葉中心性領域であり、組織損傷の指標として一般に用いられる血清パラメータ(ALT、AST、乳酸デヒドロゲナーゼ)には影響はみられなかった。このような投与は、BHT の反復投与で觀察されたような門脈周囲の細胞損傷を再現したため、この結果を BHT の反復投与で誘発された酵素プロファイルの変化に関する試験モデルとして、利用することはできなかった。
腎毒性	ラット	1,000 mg/kg 体重	雄 F344 肝損傷に加え、腎切片での p-アミノ馬尿酸の蓄積量の低下、タンパク尿及び酵素尿によって測定できるような多少の腎損傷をもたらした。雄ラットに BHT 投与前にフェノバルビタールを投与したところ(80 mg/kg 体重/日×4 日間、腹腔内投与)、わずかな尿細管壊死及び著明な生化学的変化を伴う腎損傷が生じた。雌ラットは BHT 誘発性の腎ならびに肝損傷に対しては雄よりも感受性が低かった。
腎毒性	ラット	1%	雌ラットにみられた BHT 誘発性の腎症はこの飼料の使用とは無関係であった。著明な腎石灰化症が認められたのは、カゼイン酸ナトリウムを含有する飼料を摂取したラットのみであった。このため、腎症の発症と BHT 投与後の腎臓発癌性との間の相関は確認されなかった
腎毒性	マウス	(0、1,570、1,980、2,630、3,300、4,980 又は 5,470 mg/kg 体重/日に相当する)精製飼料中の 0、1.35%、1.75%、2.28%、2.96%、3.85% 又は 5.00%BHT	投与したマウスのいずれの群でも最終体重が対照群よりも低値であり、その体重差の範囲は最低用量群の 15%～最高用量群の 30%であり、最高用量の 3 つの群では統計的に有意であった。腎の絶対重量及び相対重量にはそれぞれ用量依存性の減少及び増大がみられ、これは体重増加率の低下と相関していた。肉眼による病理学的試験の結果からは、高用量群の 10 匹中 7 匹の腎に「不格好な腎」がみられたのに対し、その他の投与群又は対照群にはこの現象はみられなかったことが明らかになった。腎の組織病理学的検査からは中毒性腎症の発症率及び重篤度の劇的な用量依存性の増大(それぞれの投与群の 10 匹中 0、2、3、6、8、10 及び 10 匹に発症)が明らかになり、このことは多くの尿細管病変によって示された(遠位及び近位尿細管変性、遠位尿細管壊死、遠位尿細管新生、尿細管膨張及び囊胞)。このことは投与

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			関連である可能性があるが、このような同じマウスの肝では病理学的変化は示されなかった。健康な雄マウスに飼料中 BHT を 30 日間投与した場合の中毒性腎症の ED ₅₀ (50%有効量)は、2,300 mg/kg 体重/日と計算された。
肺毒性	マウス	63～500 mg/kg 体重	このマウス群に BHT を投与した 1、3 又は 5 日後に殺処分した。発育良好な群に 500 mg/kg 体重を投与した 3 日後に、多数の肺胞細胞の増殖、巨細胞の形成及びマクロファージの増殖などの組織病理学的変化が認められた。このような変化は、肺重量及び DNA ならびに RNA 総量の増大に伴った。この変化は用量依存性であり、最小有効量は 250 mg/kg 体重であった。
肺毒性	マウス	400 mg/kg 体重	試験中に死亡したマウスはなく、いずれのマウスにも呼吸窮迫の徴候はみられなかった。投与した 2 日後に、1 型肺胞上皮の細胞傷害が認められた。有糸分裂で異常な II 型巨細胞が観察されたほか、放射性チミジンの蓄積が多くみられた。6 日後に、小血管及び毛細管で標識内皮細胞がみられたほか、間質及び毛細管で線維芽細胞の増大が認められた。標識が剥がれ落ちた 2～5 日後にチミジンで標識した肺細胞の増大がみられ、9 日後までに対照群の値に近づいた。肺チミジンキナーゼ活性の値は投与の 1～4 日後に急上昇し、その後は急速に下降した。
肺毒性	マウス	500 mg/kg 体重	投与した 4 日後に放射性標識 ¹⁴ C チミジンを投与した。90 分後、被験動物を殺処分し、肺を除去して DNA 濃度を測定した。マウスでは、腹腔内又は経口投与群の DNA 合成が雄と雌とで等しく増大した。肺重量は増大したが、DNA 濃度は影響を受けなかった。雄ラットには作用はみられなかったが、雌ラットには(肺重量の)わずかな増大が認められた。
肺毒性	マウス	63、215 又は 500 mg/kg 体重	3 日後にマウスを殺処分した。BHT 投与後、乾燥重量と同じく、肺の湿重量が対照群と比して 120%増大した。DNA 含有量及び非タンパク・スルフィドリルの濃度が有意に増大した(133～156%)。スペルオキシド不均化酵素及びその他の酸化酵素濃度も上昇した。この著者らは、BHT が肺の炎症過程及び修復増殖過程を明らかに増大させるという結論に至った。
肺毒性	マウス		BHT への急性曝露の後、I 型(扁平)上皮細胞の浸潤に関連する初期の一連の事象に続いて、多発性壊死及び血液閉塞の破壊が生じた。この一連の組織変化及び修復機序に関する詳細な考察が行われた。それによると、扁平上皮の傷害に対する感受性は、酸素曝露、放射線曝露及び血液感染症のブレオマイシンによる治療の後に認められたものと類似していたが、修復パターンはきわめて異なっていた。BHT は細胞膜との相互作用の結果として、細胞溶解及び細胞死を引き起こすと考えられる。
肺毒性	マウス		BHT 注入後のマウスで観察された肺重量の増大及び肺 DNA へのチミジン取込み反応は、シーダーテルペンによる治療によって阻害された。生後 3 週間未満のマウス

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			に BHT を単独投与した場合には、肺重量の増大は観察されなかった。このことは幼児マウスに BHT を代謝する能力のないことに起因していると思われる。
肺毒性	マウス		マウスでの肺毒性試験では、毒性作用に必須の構造的特徴のひとつが 4 位にメチル基及びオルト・アルキル基を有するフェノール環であり、これがヒドロキシ基の束縛作用をもたらす可能性がある。
肺毒性	マウス		BHT の毒性効力が 4-メチル基の重水素化によって低下し、このことは BHT の投与後の肺損傷が代謝物 2,6-ジ・t-[tert-]ブチル・4-メチレン-2,5-シクロヘキサジエノンによって引き起こされることを示唆していた。
肺毒性	マウス		単回投与の BHT を投与した雄マウスが、I 型上皮細胞が選択的に破壊されて II 型立方細胞が取って代わるという特徴を有する、肺の超微細構造変化を示した。このような変化はペルオキシソーム数及びカタラーゼ活性の著明な減少を伴っていた。
肺毒性	マウス		BHA の皮下注射は、BHT を閾値以下で腹腔内に皮下注射したマウスの肺重量/体重の比を有意に増大させた。
肺毒性	マウス		肺重量にみる BHT 誘発性変化を緩和する BHA の能力を試験した。BHA 独では、用量 500 mg/kg 体重(単回皮下注)までは肺重量に作用を及ぼさなかった。閾値以下の用量の BHT (0~250 mg/kg 体重 J.p.)を投与する 30 分前に、BHA を投与した場合、BHA は肺重量を用量依存性に増大させた。このような BHT 誘発性の肺重量の変化を増強する BHA の作用は、時間のほか、相対的に BHT よりも BHA の投与ルートに左右された。
肺毒性	マウス		マウス肺切片を用いた試験では、BHA は BHT とタンパクとの共有結合を増強した。また、CD-1 マウスに対する BHA (250 mg/kg 体重)又はマレイン酸ジエチル (DEM, 1 mL/kg 体重)のいずれかの皮下注射は、BHT 誘発性肺毒性の類似の増強をもたらした。DEM と異なり、BHA の投与 (250 又は 1,500 mg/kg 体重)はマウスの肺グルタチオン濃度を低下させなかった。 <i>In vitro</i> の結果から、過酸化水素の形成及び BHT-キノンメチドの一連のペルオキシダーゼ依存性の形成を増大させた結果として、BHA が BHT の肺での作用を促進することが示唆されている。
肺毒性	マウス		BHT 投与は、雄雌 A/J マウスの肺での細胞質性 Ca^{++} -活性化中性プロテアーゼ(カルパイン)活性を低下させた。このタンパク分解活性の早期(1 日目)及び終了に生じた変化は、肺重量/体重の比(4 日目)で評価した観察可能な肺毒性を引き起こした変化よりも小規模であった。
肺毒性	マウス		同系交配の C57BL/6J マウス 2~3 匹から成る複数群に、用量 10 ~ 200 mg/kg 体重の BHT 又は BHT-BuOH、BHT 代謝物を腹腔内投与した。BHT-BuOH は、肺相対重量の増大、肺細胞質性 Ca^{++} -依存性プロテアーゼ活性の低下及び肺組織病理に及ぼす効力が BHT よりも 4~20 倍強力であった。損傷の性質

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			(I型細胞死)及び変性反応(II型細胞過形成及び分化)については、両化合物は同等であった。また、BHT-BuOH は肝、腎又は心臓に損傷を引き起こした。この著者らは、BHT-BuOH の形成は BHT が、BHT-BuOH-キノンメチドである可能性の高い最終的な肺毒素に変換するために必須の段階である可能性があると示唆した。
肺毒性	マウス		BHTの投与後 0、24 又は 48 時間後に投与した場合、合成コルチコステロイド・メチルプレドニゾロン (MP; 30 mg/kg 体重、2 回/日×3 日間を皮下注射)は部分的に、雄 C57BL/6N マウスを BHT の肺毒性から防護した。
肺毒性	マウス		試験したすべての同系交配のマウス株で BHT 投与後に肺毒性が観察されたが、ラットにはみられなかったこと、さらに、BHT-BuOH がマウス肝及び肺ミクロソームの主要な生成物であったが、ラットのミクロソームでは生成の痕跡のみであったことに基づき、マウスで肺毒性を誘発する t-[tert-]ブチル基 1 個の水酸化 BHT (BHT-BuOH)の代謝物活性試験をした。マウス肺での BHT と BHT-BuOH の質的類似性、代謝物の高力価及び BHT-BuOH の形成と肺毒性との種族間の相関に基づき、BHT-BuOH が BHT の生体内変化における中間体であり、マウスでは毒性代謝物であるという結論に達した(Malkinson ら、1989 年)。
肺毒性	マウス		マウスの肺毒性に関与している代謝物として、t-[tert-]ブチル側基のヒドロキシ化 (QM-OH) の後で形成される BHT のキノンメチド代謝物を試験した。QM-OH は BHT キノンメチドよりも強力な求電子であり、GSH (グルタチオン)を用いた反応時間が 6 倍速いことが示されている。ラット及びマウスの両者由来の肝ならびに肺ミクロソームでは BHT からキノンメチドを生成したが、BHT から迅速に QM-OH が迅速に生成されたのはマウスのミクロソームのみであった。ラット肝由来のミクロソームは QM-OH の痕跡をもたらしたが、肺ミクロソームは全くもたらさなかった。このような結果を利用して、マウスの肺毒性とこの作用の種特異的なキノンメチドの生成とを関連づけた以前の結果を調整した。この著者らは、マウスでの臓器特異的な BHT の毒性は、毒性代謝物を不活化するための GSH が肺では肝よりも低濃度であることに起因しているという仮説を立てた。
肺毒性	マウス		4 種類マウス株で、用量 350～1,700 mg/kg の 50%致死量を用いて、BHT 誘発性の肺傷害の修復に関する経時的变化を試験した。試験した 4 種類のマウス株は、等量では同じ程度の傷害が発生し、肺傷害と致死率との間の相関は確認できなかった。
肺毒性	マウス		いくつかの化合物の生体内活性化に関与する BHT などのイソ酵素を肺毒素として同定するため、特異的なチトクロム P-450 イソ酵素の活性を変化させる多くの化合物を使用した。MF1 非近交系マウスにおいて、O,O,S-トリメ

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			チルホスホロジチオエート、ブロモホス、p-キシレン、β-ナフトフラボン又はピラゾールのマウスへの前投与はいずれも、BHT 投与の 3 日後の肺重量/体重比を低下させることが示されている BHT 400 mg/kg 体重の腹腔内単回投与によって誘発された肺毒性の軽減をもたらした。この最初の 3 剤は、50%致死量の増大で示される BHT のマウスでの致死率を大幅に低下させた。このような薬剤による肺毒性の阻害は BHT の致死率を比例的に低下させた。また、この 3 剤は、ラット肺肺マイクロソームのペントキシレゾルフィン (PROD) 活性及び CYP 2B1 に寄与する作用を著明に阻害した。β-ナフトフラボンはこのような 50%致死量の値及び PROD 活性のほかピラゾール誘発性の PROD 活性に対してやや小規模な作用を及ぼす。この著者らは、この 3 剤がマウスでの BHT の肺毒性を抑制したほか、ラット肺マイクロソームでの PROD 活性を阻害したことから、CYP 2B1 はマウス肺で BHT の生体内活性化を誘発する薬剤である可能性が高かった。しかし、BHT のラット肺への毒性がみられないことから、ラット肺マイクロソームで得た結果はマウスでは必ずしも妥当ではなかった。さらに、この著者らは、マウスへのピラゾールの前投与には言及せず、肺重量/体重比の BHT による増大の抑制のほか、ラット肺マイクロソームの PROD 活性の抑制について言及している。
肺毒性	マウス		マウス肺から分離したクララ (非線毛性上皮) 細胞について、BHT を代謝する能力を試験したほか、このような細胞に及ぼすキノンメチド QM-OH の推定上の毒素を BHT と BHT-BuOH とで比較した。このような細胞は肺の大半のモノオキシゲナーゼ活性、主に CYP 2B1/2B2 を含有する。定量的な代謝物データの分析から、マウス肺クララ細胞の BHT-BuOH を生成する t-[tert-]ブチル基では BHT-MeOH を生成する 4-メチル位置よりも、BHT の水酸化が 5 倍に速まることが明らかになった。また、このデータは、QM-OH が BHT 由来の BHT-QM よりも BHT-BuOH から迅速に生成されることを示唆していた。BHT-BuOH は、BHT よりも培養物中でクララ細胞の生存能力をさらに有効に低下させた。濃度 5~10 μM の BHT-BuOH は、濃度 75~100 μM の BHT と同程度に生存能力を低下させた。SKF 525-A によるチトクロム P-450 の阻害は、BHT 及び BHT-BuOH の両者が誘発したクララ細胞への傷害を軽減した。この著者らは、BHT-BuOH は、QM-OH と考えられている細胞毒性種となる前の BHT の P-450-触媒酸化における中間体のひとつであるという結論に至った。
肺毒性	マウス	0、200、400 又は 800 mg/kg 体重	BHT への曝露後、各群から 5 匹のマウスを 24 時間、48 時間又は 7 日後に殺処分した。肺から洗浄液を採取し、総タンパク含有及び乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 活性を検定した。沈殿物中の細胞数を計算した。肺の組織病理学的検査を実施した。48 時間及び 7 日後に気管支肺胞の洗浄液中の細胞数の時間依存性及び用量依存性の

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			増大のほか、総タンパク含有量及び LDH 活性の増大が示された。毛細管及び小血管のうっ血のほか、肺胞中隔の細胞充実度及びびまん性肥厚の増大で示される組織病理学的病変の重篤度もまた、時間依存性及び用量依存的に増大した (Waseem & kaw, 1994 年)。
出血作用に及ぼす特殊試験	マウス		結合種、2.2.10.3 節を参照
出血作用に及ぼす特殊試験	ラット	0.6%～1.4%	濃度 0.7%以上の群では 40 日以内に死亡が生じた。死亡したラット又は瀕死のラットには胸腔及び腹腔での突発性の大量出血又は外出血が観察された。BHT の 1 日量が増大するにつれてプロトロンビン指数が低下した。4 日後に軽度の下痢が示された。荒れた体毛及び赤みのある尿がみられた。出血に起因する死亡及び中毒から二次的に生じたタイプとして著者らが分類した死亡は、プロトロンビン濃度の低下に起因すると考えられた。著者らによれば、この作用はラット株及び飼料中濃度に左右されると思われる。
出血作用に及ぼす特殊試験	ラット	0.6、0.7、0.8、1.0、1.2 又は 1.4%	9～37 日目に濃度 0.7%以上の BHT では、死亡率に及ぼす用量依存性の作用 (50 匹中 21 匹が死亡) が観察された。このようなラット群には特発性の大量出血が観察された。生存していたラットのプロトロンビン指数が低下し、これは BHT の用量依存性であった。最低濃度でも低下率は約 65%となった (Takahashi & Hiraga, 1978b)。
出血作用に及ぼす特殊試験	ラット	85、170、330、650、1,300、2,500 又は 5,000 mg/kg 体重	170 mg/kg 体重以上の BHT を投与した全群に 1 週目からプロトロンビン指数の有意な低下が観察された。しかし、ラットをこの試験食で 4 週間飼育したところ、プロトロンビン指数の有意な低下がみられたのは濃度 5,000 mg/kg 体重群のみであった。この群では唯一、対照群と比較して肝相対重量の増大が示された。他の試験では、1.2% BHT によって雄 Sprague-Dawley に生じた出血性死亡、出血及びプロトロンビン指数が、0.68 モル/kg 体重/日のフィロキシンの同時添加によって抑制された。オキシドフィロキシンも BHT に起因する低プロトロンビン血症を抑制した (Takahashi & Hiraga, 1979 年)。
出血作用に及ぼす特殊試験	ラット	0 又は 1.2%	BHT を投与したラット群は大部分の臓器に出血が示された。副睾丸内へのエバンスブルーの漏出が有意に増大した。さらに、ADP 誘発性の血小板凝集の阻害及び血小板因子 3 のアベイラビリティの低下が観察された。血漿プロトロンビン因子は低下したが、線維素溶解活性は変化しなかった
出血作用に及ぼす特殊試験	ラット	380、760、1,520 mg/kg 体重/日	出血のエビデンスは示されなかった。しかし、BHT は 380 mg/kg 体重/日群でプロトロンビン時間の用量依存性の増大をもたらし、プロトロンビン時間には作用を及ぼさなかった。
出血作用に及ぼす特殊試験	ラット	0.25%	肝のビタミン K 濃度の低下及びビタミン K の糞中排泄率の増大を示した。
出血作用に及ぼす特殊試験	ラット	1.2%	濃度での飼料中 BHT は血小板の形態(分布幅)に作用するほか、血小板脂質の脂肪酸組成に変化を引き起こすことが示された。

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
出血作用に及ぼす特殊試験	ラット		雄 Sprague-Dawley ラット(生後 5～6 週)4～5 匹を 1.2% BHT 含有の飼料で 1～7 日間飼育し、血液凝固因子 II(プロトロンビン)、VII、VIII、IX、X 及び血小板凝集を測定した。BHT の平均投与量は約 1,000 mg/kg 体重/日であった。BHT を投与すると 2～7 日以内に、凝固因子 II、VII、IX 及び X の血漿中濃度は時間依存性に有意に減少し、BHT を投与したラットの副辜丸に 4～7 日以内に出血が認められた。これに対して、トロンビン誘発性及びカルシウムを必要とする洗浄血小板の凝集は、試験期間中に変化しなかった。このような結果は、BHT の投与直後に凝固因子 II、VII、IX 及び X が急速に減少したことを示唆しているが、血小板の過剰凝集能は出血によって引き起こされた二次的作用である可能性がある。
出血作用に及ぼす特殊試験	ラット		雄 Sprague-Dawley ラット(生後 5～6 週)4～10 匹から成る複数群に、単回経口投与で 800 mg/kg 体重の BHT を投与し、0.5～72 時間後に血液凝固因子 II(プロトロンビン)、VII、IX 及び X のほか、BHT 及び BHT キノンメチドの肝中濃度を測定した。凝固因子の濃度は BHT の投与の 36～60 時間後に低下したが、72 時間までには回復が生じた。BHT の肝中濃度は BHT を投与した 3 時間後(大天井)及び 24 時間後に最大に達し、BHT-キノンメチドは 6 時間後及び 24 時間後(大天井)に最大に達した。BHT を用量 200、400 又は 800 mg/kg 体重で投与したところ、最高用量を投与したラット群のみで因子 II、VII 及び X が 48 時間後に低下したが、因子 IX は BHT に対してさらに感受性が高く、用量依存性の低下を示した。フェノバルビタールによる 3 日間の前投与も 1%システインの飼料中の添加も、用量 800 mg/kg 体重での試験期間を通してのビタミン K 依存性の因子の低下を抑制することはできなかった。これに対して、塩化コバルト又は SKF 525A による前投与は、血中凝固因子の低下を部分的に抑制した。この結果は抗凝固作用には BHT の代謝活性が必要である可能性があることを示唆している。
出血作用に及ぼす特殊試験	ラット		上述の試験及び同じ試験施設での以前の試験に使用した飼料にはビタミン K を添加していないため、被験動物はややビタミン K 欠乏であることが明らかであった
出血作用に及ぼす特殊試験	ラット		ビタミン K を欠乏させた飼料で飼育した雄 Sprague-Dawley ラットでは、BHT は合成レチノイドよりもプロトロンビン時間の上昇及び出血死を引き起こす効果が低かった(McCarthy ら、1989 年)。
出血作用に及ぼす特殊試験	ラット	1.2%	血小板凝集に及ぼす BHT の作用を試験した。In vitro 試験では、BHT は約 10^{-3} M 以上の濃度では、ADP ならびにコラーゲン誘発性の血小板凝集を阻害したが、アラキドン酸誘発性の場合には阻害しなかった。BHT-キノンメチドもやや小規模ではあるが、ADP ならびにコラーゲン誘発性の血小板凝集を阻害した。別の試験では、雄 Sprague-Dawley ラットを濃度 BHT (650～

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			740 mg/kg 体重/日)含有の飼料で4日間又は7日間飼育した。投与したラット群では対照群と比して著明な体重増加率の低下がみられた。飼料中に BHT を投与した全ラットの精巣上体脂肪組織で、出血が検出された。このようなラットから採取した血小板の豊富な血漿中で ADP 及びコラーゲンによって誘発された血小板凝集能は、正常であると考えられた。3.9 mM のアラキドン酸によって誘発された凝集は、1.2%BHT を7日間投与したラットの血小板では著明に阻害されたが、至適濃度のアラキドン酸塩(2.0 mM)によって誘発された血小板凝集は正常であった。このような結果は、BHT を投与したラット群と対照群との間の血漿又は血小板の特性の差を示していた。この著者らは、ラットの BHT 誘発性の出血は、BHT が血小板凝集に及ぼす直接作用に起因するものではなかったという結論に達した。 <i>In vitro</i> の結果と <i>in vivo</i> の結果の差は、 <i>in vivo</i> に存在していた BHT 又は BHT-キノメチドの血漿中濃度が低かったことが原因であった
出血作用に及ぼす特殊試験	ラット	1.2%	全種の雄ラット及び Fischer 雌ラットに出血死が発生した。Donryu 及び Sprague-Dawley の雌ラット群には明らかな出血はみられなかった
出血作用に及ぼす特殊試験	マウス	1.2%	明らかな出血はみられなかった
出血作用に及ぼす特殊試験	ウサギ	170 又は 700 mg/kg 体重/日	出血作用は報告されなかった
出血作用に及ぼす特殊試験	ビーグル犬	173,400 又は 760 mg/kg 体重/日	出血作用は報告されなかった
出血作用に及ぼす特殊試験	ウズラ	1%	出血作用は報告されなかった
出血作用に及ぼす特殊試験	ラット		精製飼料中の 0.5%、1.0%又は 2.0%BHT (660、1,390 又は 2,860 mg/kg 体重/日に相当)の 21 日間の投与は、ワイヤー底のケージで飼育された雄 ddY マウスで、肺の大量出血に起因する死亡率の用量依存性の増大をもたらした。生き残ったマウスには、終了時に肺ならびに肝の絶対重量及び相対重量の両者に用量依存性の増大が示された。出血死及び肺ならびに肝の絶対重量及び相対重量の増大は、1.35%、5%BHT を含有する飼料を 30 日間摂取させ、柔らかいウッドチップ床敷きのケージで飼育した ddY マウス雄、又は 0.125%～2.0%BHT を含有する飼料を 14～17 日間摂取させた Hartley モルモットには観察されなかった。濃度 1.0%以上の飼料中 BHT の投与を受けていた ddY マウスの全群で、プロトロンビン時間が有意に増大した(濃度 2.0%ワイヤー底のケージ群を除く)。この作用は、柔らかいウッドチップ床敷きのケージで飼育した投与群でも、用量に関係なく同程度であった(約 25%)。カオリン加トロンボプラスチン時間に関する結果も同程度であった。モルモットでの凝固に及ぼす作用はあいまいであった。この著者らは、用量依存性の相関のみられないマウスでの凝固傷害は肝胆汁機能の小規模な損傷及び又は脂肪肝及び

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			臓器に傷害をもたらす肺の出血に起因していると考えた。この出血及び凝固障害は必然的に、ラットで観察されたものとは同じ原因によるものではなかった。マウス及びモルモットの肝では用量依存性の濃度 (0.2~4/ μ g/組織 1g) で BHT を検出した。このような種には BHT キノンメチドは検出されなかったが、Takahashi らの試験ではラット肝で (7~40/ μ g/組織 1g) 以前に検出されている (1980 年) (Takahashi, 1992 年)。
甲状腺に及ぼす作用に関する特殊試験	ラット		雄 MOL/WIST SPF ラットの非近交系株 (約 200 g) を試験に用いた。BHT は、ヨード含有量を約 12/ μ g/100 g (ラットの栄養的必要量は 15/ μ g/100 g) に調整した半合成飼料に添加した。1 件の試験では、ラットに 0、500 又は 5,000 mg/kg 体重を 8、26 又は 90 日間投与したところ、甲状腺で ¹²⁵ I の取り込みが測定された。飼料中 BHT の存在は、試験中のいつの時期でも ¹²⁵ I の取り込みの著明な増大をもたらした。さまざまな量のヨウ素 (12、150 又は 300/ μ g/100 g) を含有する飼料中に BHT を投与し、ラットに 30 日間摂取させたところ、BHT 投与群のラットに対照群と比して甲状腺重量の有意な増大が認められた。飼料中の BHT の投与は飼料中 5,000 mg/kg 体重で肝及び甲状腺の重量を増大させたが、500 mg/kg 体重群の甲状腺の重量のみは増大しなかった。BHT は血中の T3 及び T4 濃度を変化させなかった。チロキシン (甲状腺ホルモン) の生物学的半減期は、BHT を含有する飼料で飼育した 13 日後に増大したが、75 日後に正常に戻った。5,000 mg/kg 体重の BHT に 28 日間曝露させたラット甲状腺の電子顕微鏡検査では、濾胞細胞数の増大が示された (Sondergaard & Olsen, 1982 年)。
免疫系に及ぼす作用に関する特殊試験	マウス		Mishell & Dulton の方法で測定したところ、BHT (50/ μ g/培養物) は <i>in vitro</i> でマウス脾臓細胞培養のプラーク形成細胞反応を抑制した (Archer ら、1978 年)。 BHT への環状 GMP (ジブチル又は 8-ブロモ形態として添加した cGMP) の添加は Mishell -Dulton 培養を抑制し、抗体産生の BHT 抑制の逆転に作用した (Wess & Archer, 1982 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験	マウス		雄 A 株マウスに腹腔内投与で 500 mg/kg 体重のウレタンを注入し、その 1 週間後にトウモロコシ油に溶解した 300 mg/kg 体重の BHT、500 mg/kg 体重の BHA 又は 1,000 mg/kg 体重のビタミン E のいずれかを反復投与した (週 1 回×8 週間)。試験終了時に、BHT のみが腫瘍の発生に有意な増大をもたらすことが示された。BHA 投与群で発生した腫瘍数は通常よりも増大していたが、統計的に有意ではなかった。3-メチルコラントレン又はジメチルニトロソアミンを投与した A/J マウスに、次に BHT (腹腔内投与) を投与したところ、腫瘍発生の増大をもたらした (Witschi ら、1981 年)。
癌の増強又は阻害に関する	ラット		Charles River ラット (雌雄各 20 匹) の複数群に、BHT 6,600 mg/kg 体重及び又は分子比 30:1 の発癌物質

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
特殊試験			(N-2-フルオレニルアセトアミド又は N-ヒドロキシ-N-2-フルオレニル-アセトアミド)を含有する飼料を摂取させ(雄 24 週、雌 36 週)、その後、さらに 12 週間の対照食で飼育を持続した。N-ヒドロキシ-N-2-フルオレニルアセトアミドによって、雄の 60%に肝細胞癌、雌の 70%に乳腺腺腫が生じた。試験した発癌物質が N-2-フルオレニルアセトアミドの場合には BHT は雄の肝細胞癌の発生率を 20%に抑制し、N-ヒドロキシ-N-2-フルオレニルアセトアミドの場合には 15%に抑制した。Fischer 株ラットでも類似の結果が得られた。濃度が飲料水中 55 mg/L のジメチルニトロソアミンの 24 週間の摂取による肝腫瘍及び食道腫瘍の発生率は、BHT による影響を受けなかった(Ulland ら、1973 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験	ラット		雄 F344 ラット 20 匹から成る複数群に、単回胃内投与による 100 mg/kg 体重の MNNG、750 mg/kg 体重の EHEN、皮下注×2 回投与による 0.5 mg/kg 体重の MBN 又は皮下注×4 回投与による 40 mg/kg 体重の DMH を投与した。同時に、このラット群に 0.1%DBN を 4 週間投与した後、0.1%DHPN を飲料水中に 2 週間投与し、発癌物質への総曝露期間を 6 週間とした。このような投与が終了した 3 日後に、このラット群に 0 又は 0.7%BHT を 36 週間、飼料中に投与した。10 匹又は 11 匹のラットから成る複数の対照群には 0.7%BHT を単独又は基本飼料を単独で摂取させた。両者の BHT 投与群の最終体重はそれぞれの対照群よりも有意に低値であり(発癌物質投与の対照群と比して 7%、基本飼料の対照群と比して 13%低値)、このことは腎相対重量を強く反映していた。肝相対重量は約 60～75%増大した。発癌物質の投与後の飼料中 BHT は、小腸癌の外観を縮小したほか、腎の一部の前腫瘍性病変及び腫瘍性病変の発生率及び多重度を低下させた。BHT 投与は甲状腺の過形成、腺腫及び癌の発生率を増大させたが、舌、食道、前胃、腺胃、十二指腸、小腸、肝、肺又は膀胱には作用を及ぼさなかった(Hirose ら、1993 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(膀胱)	ラット		雄 F344 ラットに飲料水中の 0.01 又は 0.05%N-ブチル-N(4-ヒドロキシ-ブチル)ニトロソアミン(BBN)を 4 週間投与した後、0 又は 1%BHT を含有する飼料を 32 週間摂取させた。飼料中の BHT は、0.05%群のラットでは膀胱の癌及び乳頭腫の有意な増大と相関していたが、0.01%群では相関がみられなかった(Imaida ら、1983 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(膀胱)	ラット		ラット群の飼料中に 200 mg/kg の N-2-フルオレニルアセトアミド(FAA)を単独又は 6,000 mg/kg の BHT と併用して 25 週間投与した。膀胱腫瘍は FAA 単独投与では生じなかったが、FAA と BHT とを併用した結果、17/41 匹に乳頭種、3/41 匹に癌がそれぞれ膀胱に発生した(Williams ら、1983 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(膀胱)	ラット		4 通りの飼料中濃度(300、1,000、3,000 又は 6,000 mg/kg 体重)の BHT と 200 mg/kg の FAA とを 25 週間同時投与した。FAA の

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
膀胱)			投与は単独では腫瘍を生じさせなかったが、3,000 又は 6,000 mg/kg 体重の BHT と併用したところ、膀胱腫瘍の発生率がそれぞれ 18% 及び 44% となった。膀胱腫瘍の発生率は 300 及び 1,000 mg/kg の BHT 群では低値であり、FAA 単独群との間に有意差はみられなかった(肝に及ぼす作用についても参照) (Maeura & Williams, 1984 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(膀胱)	ラット		雄 F344 ラットにメチルニトロソ尿素(MNU)を2回/週×4 週間注入した後、1%BHT を含有する基本食を 32 週間摂取させた。BHT は膀胱の乳頭種及び腺癌又は結節性過形成の発生率のほか、甲状腺の腺腫(腺癌ではない)の発生率を有意に増大させた (Imaida ら、1984 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(膀胱)	ラット		雄 F344 ラット 20 匹から成る複数群(生後 6 週)に、飲料水中の 0.05%N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミンを 2 週間前投与した後、0、0.25、0.5 又は 1%BHT を含有する飼料を2週間摂取させた。試験の 22 日目に、各ラットの左尿管の下部を結紮した。このラット群を試験の 24 週目に殺処分した。BHT は用量依存性に膀胱の前腫瘍性病変、乳頭腫又は結節性過形成の発生数を増大させた。膀胱の病変の発生率は特に 1%BHT 群で増大した (Fukushima ら、1987a 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(膀胱)	ラット		雄 F344 ラット 20 匹から成る複数群(生後 6 週)に、飲料水中の 0.05%N,N-ジブチルニトロソアミンを16週間投与すると同時に、0 又は 0.7%BHT を含有する飼料を摂取させた。この BHT の同時投与は、肝病変の高発生率を引き起こした。膀胱の移行上皮癌、乳頭状過形成又は結節性過形成の発生率あるいは食道の乳頭腫又は癌の発生率は変化しなかった。前胃では過形成結節の減少が認められた (Imaida ら、1988 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(膀胱)	ラット		雄 F344 ラット 20 匹から成る複数群(生後 6 週)に、飲料水中の 0.05%N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミンを 4 週間前投与した後、0、0.4%BHA+0.4%BHT+0.4%TBHQ 又は 0.8%BHT を含有する飼料を摂取させた。この試験は 36 週間後に終了した。BHT 含有の飼料を摂取した全群で、尿中結晶の増大及び膀胱上皮の乳頭状過形成又は過形成結節の発生率ならびに密度の増大が観察された。膀胱乳頭腫及び膀胱癌は増大せず、腎盂の増殖性変化は認められなかった。0.8%BHT 投与群では肝細胞膨大が誘発された (Hagiwara ら、1989 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(膀胱)	ラット		雄 F344 ラット 10 匹の群(生後 6 週)に、7 mg/kg のビタミン K と共に 1%BHT を含有する飼料を摂取させた。体重の低下が観察された。光学顕微鏡では 4 週間後に膀胱上皮の DNA 合成が増大したが、8 週間後も形態学的変化はみられなかった。電子顕微鏡では、多形成又は短縮、均一な微絨毛及び粘着性又は葉状の微細リッジなど、形態学的な表面の変化が認められた (Shibata ら、1989 年)。

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(膀胱)	ラット		膀胱腫瘍プロモータに応答した腎盂上皮の早期の増殖関連反応を試験するため、1 件の試験を実施した。雄 F344 ラット 10 匹の複数群に 0 又は 1%BHT を投与した。4 週間目に、5 ラット/群からの 1,000 細胞で腎盂上皮細胞の DNA 標識指数を測定した。8 週間後に、SEM 試験のために腎切片を用意した。投与群のラットの体重は 4 週間目に 18%、8 週間目に 25%、それぞれ対照群よりも低値であった (Shibata ら、1989 年)。投与の 4 週間後の腎盂上皮にみる平均 DNA 標識指数は対照群よりやや高値であったが、統計的に有意ではなかった。SEM (走査型電子顕微鏡) では投与の 8 週間後に細胞表面の変化は観察されなかった (Shibata ら、1991 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(膀胱)	ラット		雄 F344 ラット 20 匹から成る複数群(生後 4 週又は 54 週)に、多臓器発癌物質の 1 種である 50 mg/kg の 3,2'-ジメチル-4-アミノビフェニル (DMAB) を 1 回/週×10 週間皮下注投与した。同時にこのラット群に飼料中 1%BHT を 11 週間投与した。この試験は初回投与の 55 週後に終了した。DMAB と BHT の併用投与は、ラットの若年、老年の両者の 95% 以上に膀胱の乳頭腫ならびに癌の発生をもたらした。 DMAB による肝病巣及び膵臓腺房細胞病巣の誘発は、BHT の同時投与によって抑制された。BHT を投与したラットの膀胱上皮細胞では、免疫組織学的染色で検出された DMAB-DNA 付加体形成の増大が免疫組織学的染色で検出された。BHT の投与は肝でこのような付加体の形成を抑制したが、小腸、膵臓又は前立腺での付加体形成には作用をもたらさなかった。この著者らは、BHT のこのような作用が薬物代謝酵素数を誘発する能力と関連しているため、特定の組織での活性代謝物の量を変化させると示唆している (Shirai ら、1991 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(膀胱)	ラット		F344 ラットのこの化合物の最小有効発癌量である 6,000 mg/kg の BHT と 50 mg/kg の AAF との 76 週間の同時投与は、癌を含む膀胱腫瘍の発生率及び多重度を増大させた。3,000 mg/kg 及び 6,000 mg/kg の BHT の両群と AAF との併用投与は、BHT の飼料中濃度 300 mg/kg 以下で、膀胱の結節過形成の発生率の増大のほか、この病変の発生の陽性傾向をもたらしたことが報告された。同じ試験では、100～6,000 mg/kg の BHT の飼料中投与が、変性肝病病変の誘発 (鉄貯蔵欠乏及び GGT 陽性) の用量依存性の抑制、AAF 誘発性の腺腫の多重度のほか、肝癌及び癌の発生率を抑制をもたらした。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(消化管)	マウス		雄 BALB/c マウスに直腸内投与でメチル-nitrosurea を投与した後、BHT を含有する飼料で飼育したところ、BHT 無添加の飼料で飼育した対照群と比して消化管腫瘍の発生率及び多重度に著明な増大が示された。別の試験では、BALB/c マウスにジメチルヒドラジンを注入し (6 週間の注入)、次に対照食 (BHT 無添加) 又は 0.05% 又は 0.5%BHT を含有する飼料で飼育した。結腸腫瘍の

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			発生率はそれぞれの群で 10%、0%及び 32%であった。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(消化管)	ラット		1,2-ジメチルヒドラジンを投与したラットの結腸クロマチンで観察された腫瘍特異的な抗原活性の増大が、BHT の同時投与によって消失した。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(消化管)	ラット	1.0%	雄 F344 ラットに単回投与の N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)を投与した後、BHT 無添加、1.0%BHT、5%NaCl 又は 5%NaCl+1.0%BHT を含有する飼料を 51 週間摂取させた。前胃での扁平細胞癌の発生率はそれぞれの群で 11%、16%、3%及び 53%であった (Shirai ら、1984 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(消化管)	ラット		1,2-ジメチルヒドラジンの 4 回の注入の後(1 回/週)、ラットに飼料中 BHT 0.5%を 36 週間摂取させた場合、BHT は結腸腫瘍に罹患したラット数には影響しなかったが、ラット 1 匹当たりの遠位結腸に生じた腫瘍数を有意に減少させた。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(消化管)	ラット	1.0%	ウィスターラットに N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)を投与し(飲料水中に濃度 1.0 mg/mL で投与)、この投与期間に飼料中 BHT を 25 週間摂取させた後、試験食でさらに 14 週間飼育したところ、BHT 無添加の飼料を摂取させていたラット群と比して、胃癌の発生率の有意な低下が示された(82%に対して 37%) (Tatsuta ら、1983 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(消化管)	ラット	1%	生後 7 週の雄ウィスターラット(20 匹/群)に対し、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)を飲料水中に 8 週間投与し(100 mg/L)、飼料には 10%塩化ナトリウムを補給した。その後、ラットを BHT を含有する飼料で 32 週間飼育した。癌対照群には BHT を添加しない基本食を摂取させた。この試験は MNNG の投与を開始してから 40 週後に終了した。BHT は腺胃又は前胃の腫瘍の発生率を増大させなかった (Takahashi ら、1986 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(消化管)	ラット	1%	雄 F344 ラット 21 匹から成る複数群に、飲料水中の 0.5 g/L の N,N-ジブチル-ニトロソアミンを 4 週間投与した後、BHT 及び 7 mg/kg のビタミン K を含有する基本食を 32 週間摂取させた。BHT は食道癌発生を増強したが(乳頭腫: 16/21 匹に対して 3/21 匹; 癌 9/21 匹に対して 0/21 匹)、前胃癌の発生は増強しなかった。BHT は膀胱の乳頭過形成又は結節過形成及び乳頭腫の発生率の増大を誘発したが、肝病変の統計的に有意な増大はみられなかった。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(消化管)	ラット	0 又は 0.7%	雄 F344 ラット 5 匹から成る複数群に、BHT 飼料を 4 週間摂取させた。前胃の組織学的検査から、BHT が前胃上皮では過形成を誘発しなかったことが示された (Hirose ら、1987 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(消化管)	ラット	1.0%	雄 Fisher 344 ラット群に、最初に DMH(40 mg/kg 体重)を 2 又は 4 回皮下注射し、その直後に 0 又は 0.5% 又は BHT を含有する飼料を 5~6 ヶ月間摂取させたところ、BHT 投与群に BHT 無添加の飼料の対照群と比して、結腸腫瘍の有意に高い発生率(5 ヶ月間試験)及び

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			小腸(十二指腸、空腸及び回腸)腫瘍の有意に高い発生率が認められた。N-ニトロソ-N-メチル尿素の投与(NMU;90 mg/kg 体重を経口投与)は、胃及び結腸腫瘍を発生させたが、飼料中の 0.5%BHT は腫瘍の発生率に作用しなかった。飼料中 BHT は DMH がもたらす消化管腫瘍の発生を増強する可能性があるが、発癌物質への曝露後に BHT に曝露させた場合には、NMU がもたらす発生は増強しないと結論づけた
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(消化管)	ハムスター		雄シリアンゴールデンハムスターに、1%BHT を含有する飼料を摂取させた。第 1、2、3、4 及び 16 週目に前胃の過形成及び前腫瘍性病変の誘発を組織病理学的及びオートラジオグラフによって検査した。BHT 投与群のハムスターでは対照群よりも、軽度の過形成がやや多く発生していた。BHT は重篤な過形成又は乳頭腺腫病変を誘発した。標識指数の有意ではない増大が試験期間を通して観察された
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肝)	ラット	0 又は 0.5%	93 匹のラット(生後 22 日)から成る複数群に、AAF (0.02%)の 18 日間の投与後、BHT を含有する飼料を 407 日間摂取させた。AAF 後の BHT 食の摂取は肝腫瘍の有意な増大をもたらした
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肝)	ラット	200 mg/kg の AAF を飼料中に単独投与 又は 6,000 mg/kg 体 重 の BHT	。AAF 単独では肝腫瘍の発生を 100%誘発した。BHT の同時投与は、良性腫瘍、腫瘍性結節及び悪性腫瘍及び肝細胞癌の発生率を低下させた
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肝)	ラット	BHT 300、1,000、3,000 又は 6,000 mg/kg 体重、200 mg/kg の AAF	BHT は用量依存性の腫瘍の発生率の低下をもたらした (BHT の不在下では 100%の発生率に対し、6,000 mg/kg 体重の BHT 投与下では 56%) (膀胱に及ぼす作用についても参照)
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肝)	ラット		ラット群に 200 mg/kg 体重の AAF を 8 週間摂取させた後、濃度 300、1,000、3,000 又は 6,000 mg/kg 体重の BHT を含有する飼料を 22 週間まで摂取させた。AAF の投与によって誘発された鉄排除及びガンマ-グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) 活性によつて判別される変性肝細胞病変の領域では、最高用量の BHT 群で病変の高い発生が示された(病巣の数、GGT 陽性の前腫瘍が占める領域及び腫瘍性病変のほか、腫瘍発生率が増大した)。このようなパラメータは低用量の BHT では影響を受けなかった(Maeura & Williams 1984)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肝)	ラット		ラットに単回腹腔内投与によってジエチルニトロソアミン 200 mg/kg 体重を注入した後、1%BHT を含有する飼料で 6 週間飼育した。3 週間目に、ラットに部分的肝切除を実施した。BHT 投与群のラットの肝のガンマ-グルタミルトランスフェラーゼ陽性病巣の数は、対照群と比して有意に減少した
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肝)	ラット		開始-選択-促進プロトコルを用いて、雄ウィスターラットの肝癌発生に及ぼす作用について、BHT をフェノバルビツール(PB)及び DDT と比較した。ラット群に対し、ジエチルニトロソアミン(DEN;200 mg/kg 体重)の単回投

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			与で開始した。2 週間後、AAF を選択的に 2 週間摂取させた後、致死量の四塩化炭素を 1 週間投与した。さらに何週間か、発癌促進物質又は濃度 0.5%BHT を添加した飼料で飼育した。この飼料を開始した 3、6、14 又は 22 週間後に、8～10 匹のラットから成る複数群を試験した。 BHT は PB 及び DDT と同様、14 週目に肝の GGT 陽性病変の発生頻度を強力に増大させたが、PB 及び DDT とは異なり、BHT は 22 週目の肝細胞癌の発生を増強しなかった。このことは、BHT が投与開始後には、雄ウィスターラットの肝癌の促進物質ではなかったことを示唆していた
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肝)	ラット		ジエチルニトロソアミン(DEN)の単回投与による肝癌発生の開始のほか、増殖刺激と結び付いた AAF の選択(CCl₄ 投与)の後、PB 又は BHT(飼料中 0.5%)を最大 22 週間投与した。対照群には開始及び選択プロセス後は投与を実施しなかった。開始及び選択(I-S)及び 3 週間の基本食を摂取させた被験動物の推定前腫瘍病変では、2N 核の数量的増大がみられた。飼料に(I-S の後)PB を添加させたところ、2 倍体核の増大が早期に開始された。癌が発現した時点(PB 投与の 22 週間後)では、2N 核の発生頻度の低下が認められた。BHT 投与群のうち、予想されたタイムスパン内に癌を発症しなかった被験動物では、投与のわずか 14 週間後に前癌病巣での 2N 核の明確な増量が示された
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肝)	ラット		雄ウィスターラットに対し、週 1 回ののアザセリン(30 mg/kg 体重)の腹腔内投与を 2 回実施している最中又はその直後に、1%BHT の 26 週間の飼料中投与を開始した。アザセリンの後の BHT の投与は、膵臓の GST-A 陽性腺房病巣の発生頻度を増強したが、GST-P 陽性肝細胞病変は有意に抑制した。BHT をアザセリンと併用した場合、肝には作用はみられなかったが、膵臓での前腫瘍病変の発生頻度は有意に抑制された
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肝)	ラット		1 件の試験を実施し、食物脂肪及び BHT の AAF 誘発性肝癌発生に及ぼす調節作用と核膜(NE)中のチトクロム P-450 の濃度との関係の有無を確認した。離乳ラットに飼料中 0.3%BHT を 2 週間投与した後、最大 16 週間まで飼料中に 0.05%AAF を添加した。BHT による前投与は、最高量の飽和脂肪量の飼料群では 9 週間、高用量のポリ不飽和脂肪の飼料群では 3 週間にわたって、AAF 誘発性の NE チトクロム P-450 含有量の減少から肝細胞を保護した。この BHT のチトクロム P-450 含有量に及ぼす作用は明らかに、高脂肪食中の AAF を摂取したラットの腫瘍減少作用と相関していた。低脂肪食のラットの結果では、BHT は AAF 誘発性の発癌性に対して有意な作用を示さず、高用量群の飼料を摂取したラットとは差がみられた。低脂肪食のラットでは、AAF は投与して 9 週目になるまでチトクロム P-450 含有量を減少させず、BHT による投与を開始する前の時点では、部分的にこの作用の逆戻りが生じた。最初の 3 週間以内に、AAF を

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			投与したラットのチトクロム P-450 含有量は対照群のラットと同程度になり、BHT による前投与は、AAF 投与を受けたラットに、このような誘発を引き起こす結果となった
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肝)	ラット		濃度 1~14mM の BHT はラット肝ミクロソーム標本の存在下では、AAFと仔牛胸腺 DNAとの結合を対照値の 20%に低下させた。N-水酸化 2-AAF の場合、チトクロム P-450 は、使用された AAF の酸化生成物を活性化し、BHT(0.1~8.0 mM)は DNA との結合を対照群の濃度のわずか 80%に低下させた。ラット肝細胞培養では、濃度 0.01~0.10 mM の BHT が AAF と DNA との結合を対照群の濃度の約 85%に低下させた。このような結果は、BHT の抗癌作用に関与する可能性のある <i>in vivo</i> で示された機序(解毒酵素の誘発など)に追加的な機序を示した(Richer ら、1989 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肝)	マウス	5,000 mg/kg	雄 B6C3F ₁ マウスに 100 又は 200 µmol/kg 体重のジエチルニトロソアミン(DEN)を 1 回/週×10 週間、腹腔内投与した。4 週間の回復期間後、このマウスに BHT 又は 500 mg/kg のフェノバルビツール(陽性対照)を含有する飼料を 24 週間摂取させた。この終了時に、DEN 単独群は、用量依存性の変性肝病巣及び肝細胞腺腫の発生が誘発された。DEN 後に BHT を投与した群は、このような病変の発生又は多重度に作用がみられず、フェノバルビツール投与群はこの作用が DEN 群の 2~3 倍に強化された(Tokumo ら、1991 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肝)			50mg/kg の AAF の飼料中投与は、76 週後に肝腫瘍の 100%の発生を誘発することが認められた。100~6,000 mg/kg の濃度の飼料中 BHT との同時投与では、変性肝病巣の誘発が阻害され、肝細胞腺腫ならびに癌の多重度のほか、癌発生率が抑制された
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肝)		5、25 又は 125 mg/kg	濃度の飼料中 BHT の 42 週間の投与と、アフラトキシン B ₁ (5 µmol/kg 体重、3 回/週)の強制経口投与との同時投与では、最高用量の BHT で最後の 40 週目に胎盤型グルタチオン S-トランスフェラーゼに関する肝病巣の染色陽性濃度の低下がもたらされた
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肺)	マウス	250 mg/kg	雄 Swiss-Webster マウスに、単回、腹腔内投与した 1,000 mg/kg 体重のウレタンの腫瘍原性は、その後の BHT 250 mg/kg 体重、1 回/週の反復投与によって有意に増大した。このマウス数を 9~22 匹/群とし、9~13 週間投与した。肺表面の腫瘍のみを計算した。投与群のマウスの約 90%に、ウレタン単独によって誘発された肺腫瘍が発生した。マウス 1 匹当たりの腫瘍数は BHT の投与後 11 週以上経過してから有意に増大した。BHT 単独投与の群では肺腫瘍の発生はみられなかった。A/J 株マウスにも BHT の同じ注入投与を 10 週間実施した。マウス 1 匹当たりの肺腫瘍の数は、ウレタンに BHT を加えた群ではウレタン単独群と比して有意に増大した。マウスの両株において、ウレタンの前投与なしで BHT を反復注入した場合は、トウモロコシ油のみを投与した対照群と比して、肺腫瘍のみられるマウスの数又はマウス 1 匹当たりの腫

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			瘍数の増大をもたらさなかった。両マウス株では、BHTを投与したマウス群がトウモロコシ油のみを投与した対照群と比して、肺腫瘍の数が少なくなった。上記の結果とは異なり、ウレタン注入の0～7日前にBHTを注入したマウスでは、マウス1匹当たりの肺腫瘍の数が増大しなかった(Witschi & Cote, 1976 年)
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肺)	マウス	50、250 又は 1,000 mg/kg 体重のウレタン又は 0.9%NaCl を投与した。7 日後、ウレタン投与群の半数のマウス及び対照群の半数のマウスに 300 mg/kg 体重の BHT	マウスには13回注入/週を投与した。初回のウレタン投与の14～24 週後に認められた腫瘍数/肺の数は BHT 投与群で有意に増大していた。別の試験では、ウレタン投与と初回の BHT 投与との間の間隔を 6 週間に遅らせたところ、BHT 投与はさらに多くの腫瘍をもたらした。ウレタン投与の1 週間後に開始した BHT の注入回数は13 回から4 回に減少させたが、13 回投与した試験と同程度の腫瘍発生の増大が観察された。しかし、BHT の1 又は2 回の投与は有意な作用をもたらさなかった。マウスに BHT を13 回前投与し、その1 週間後にウレタンを投与した場合、腫瘍発生の増強はみられなかった。BHT とウレタンとの同時投与は、ウレタン単独群と比して腫瘍数が減少した。肺腺腫の自然発生率の低いマウス株(C57BL、C3H 及び BALB/C)にウレタンを投与した後、BHT を多数回投与したところ、BHT 投与は腫瘍の発生率又は肺腫瘍の平均数を有意に増大させなかった(Witschi & Lock, 1979 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肺)	マウス	ウレタンを単回、腹腔内投与した後、飼料中に 0.75%BHT、BHA のいずれか又はエトキシシン	肺腫瘍発生はウレタン投与の 4 ヶ月後に計算した。両試験条件下で、飼料中 BHT は肺腫瘍形成を増強したが、BHA 又はエトキシシンは作用しなかった。 マウスにウレタンを投与する前に、BHA 又は BHT を含有する飼料を 2 週間摂取させ、その後は従来の試験飼料で 4 ヶ月間飼育した。BHT 含有食は腫瘍発生に作用しなかったが BHA 投与は腫瘍の平均数を有意に減少させた
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肺)	マウス	400 mg/kg 体重	A/J マウスに、肺に 6～7 日間で急性肺損傷及び肺細胞増殖を生じさせるのに十分な量の BHT を単回、腹腔内投与した。この期間に、留置したミニポンプでウレタンを持続的に投与した。細胞分裂の時期にウレタンが持続的に存在することは、腫瘍数の増大に影響しなかった。ウレタンを注入したマウスに、腹腔内投与により SKF525A(2-ジエチルアミノエチル・2',2'-ジ-塩酸フェニルバレレート)及び BHT(通常、BHT の投与後に SKF による肺細胞分裂の阻害がみられる)又は BHT 単独投与した場合、両者の投与はウレタン投与のみの対照群と比して、肺腫瘍発生をきわめて有意に増大させた。95～100%酸素など、その他の投与によって反復された肺細胞分裂は、腫瘍発生の増強を示さなかった(Witschi & Kehrer, 1982 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肺)	マウス	50 mg/kg 体重以上のウレタン、BHT0.75%、0.1%	マウスにを投与した場合には、BHT は肺腫瘍の発生を増強することが示された。これよりも低用量のウレタン(発癌用量以下)では、BHT は腫瘍発生を増強しなかった。別の試験では、マウスにウレタンを投与した後で腫瘍の

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			発生を増強するには、飼料中 0.75%BHT では 2 週間の曝露が十分な用量であり、0.1%BHT では 8 週間投与した場合に有効な増強剤であった。BHT を 24 時間以内に後投与し、8 週間摂取させた場合には、一度、3-メチルコラントレン、ベンゾピレン又は N-ニトロソジメチルアミンを投与したマウスの腫瘍発生を増強した。マウスに毎週 BHT を注入投与した場合、細胞増殖のほか、累積標識指数(³ H-チミジンの取り込み)及び標識 II 型細胞数の両者に迅速な増大がみられた。このような作用は毎回の投与後には小規模であり、5 回目の投与までは増大は認められなかった(Witschi & Morse, 1985 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肺)	マウス	ウレタンの単回注入(1,000 mg/kg 体重)の 6 時間前に BHT (200 mg/kg 体重)	種々のマウス株及び年齢のマウスの肺腫瘍発生にさまざまな作用を及ぼした。マウス株はウレタンの腫瘍形成に対して高感受性を示す群(A/J, SWR/J)及び低感受性を示す群(BALB/cByJ, 129/J, C57BL/6J)の両者を試験した。BHT 投与は、成体 A/J マウスでは腫瘍の多重度を平均して 32%低下させたが、発癌補助物質として成体 SWR/J では腫瘍数を 48%増大させ、成体 C57BL/6J では 240%増大、成人 129/J では 655%に増大させ、老齢の A/J マウスでは 14 日間に 38%増大させた。肺胞 II 型細胞由来及び気管支クララ細胞由来の両者の肺腺腫は、同程度に BHT の投与による影響を受けた。BALB/cByJ マウスでは幼若、成体の両者で BHT の前投与は腺腫の多重度には作用を及ぼさなかった。BALB/cByJ の幼若マウスの多重度は、ウレタンの投与後の慢性的な BHT の投与(6 回注入/週)によっても影響を受けなかったが、このような投与は、このマウス株の成体マウスでは多重度の数倍の増大をもたらした(Maokinson & Thaete, 1986 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肺)	マウス	1,000 mg/kg 体重のウレタンを投与した後で 400 mg/kg 体重の BHT	肺腫瘍の発生がウレタン単独投与のマウスよりも 40%増大した。3-メチルコラントレンを投与したマウスに BHT (300 mg/kg 体重)を反復注入したところ、腫瘍の多重度がさらに大規模な因子によって増大した(500~800)。マウスの BHT による前投与は、メチルコラントレンによって生じた腫瘍数を減少させた。肺腫瘍発生に及ぼす BHT の増強作用は、広範性の肺胞細胞過形成の発生が原因ではなかった(Witschi, 1986 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肺)	マウス	50 又は 200 mg/kg 体重	BHT 及び BHT の 3 つの代謝物による肺腫瘍促進を同種交配マウス株 MA/MyJ で比較した。MA/MyJ マウスはウレタン(50 mg/kg 体重)の単回注入の後、BHT、BHT-BuOH、2,6-ジ-t-[tert-]ブチル-4-ヒドロキシメチル・フェノール(BHT-MeOH)又は 2,6-ジ-t-[tert-]ブチル-1,4-ベンゾキノン(DBQ)を 6 回/週、腹腔内投与した。肺腫瘍形成を増強した唯一の代謝物は BHT-BuOH であり、この代謝物は BHT の有効用量の 1/4 で有効であった。この試験は BHT-BuOH 形成が、肺腫瘍の促進をもたらす一連の事象の重要な段階であることを意味している
癌の増強又は	マウス		BHT の肺腫瘍-促進作用に対する種々のマウス株の感

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
阻害に関する特殊試験(肺)			受性は、BHT、t-[tert-]ブチル基のひとつが水酸化された BHT-BuOH の代謝物を産生するための各株由来の肝ミクロソーム標本の能力と相関している。腫瘍促進と BHT-MeOH(メチル基が水酸化された)のミクロソーム産生又は DBQ(キノン代謝物)との間には相関は存在しなかった。MA/MyJ 株は、ウレタン誘発性の肺腫瘍の BHT による促進に対する感受性が最も高く、BHT 代謝物である BHT-BuOH の 50 mg/kg 体重の 6 回/週の腹腔内投与では、200 mg/kg 体重の BHT と同程度の促進作用がもたらされたが、200 mg/kg 体重の BHT 代謝物である BHT-MeOH 又は DBQ には促進作用はみられなかった。この著者らは、BHT による肺腫瘍促進における t-[tert-]ブチルの水酸化経路を意味する別のエビデンスを挙げている:この代謝物以外の BHT の代謝生成物と比して優先的な <i>in vitro</i> 形成は、BHT による肺腫瘍促進に対するマウス種(ラット対マウス)及び株の感受性と相関し、肺腫瘍形成と相関している BHT の反復投与レジメンもまた、t-[tert-]ブチル基での水酸化の誘発及びマウス肺の主要な代謝経路と相関している
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(肺)	マウス		BHT による肺腫瘍促進に対する感受性を調整する遺伝子は、一部のマウス近交系が肺腫瘍の発生に素因を有する pas(肺腺腫への感受性)遺伝子とは異なることを示すエビデンスが挙げられている。BHT の作用に応答する株による差は、遺伝子によって介在され、特異的な経路に沿って BHT を代謝する能力を調整していることが示唆されている
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(乳腺)	ラット		雌 Sprague-Dawley ラットの複数群に 7,12-ジメチルベンツアントラセン (DMBA) 又はニトロソメチル尿素 (NMU) を投与した後、0 又は 0.3%BHT を含有する飼料で 30 週間飼育した。DMBA を投与したラットは対照食で飼育したところ、27 週までに(乳腺)腫瘍の 100% 発生率が生じたが、BHT 補助食のラット群の試験終了時の発生率は 54% であった。飼料中 BHT は NMU 投与が誘発した腫瘍の発生に作用しなかった
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(乳腺)	ラット		雌ラットに 0、0.25 又は 0.5%BHT を含有する飼料を摂取させた。この試験食の投与は(a)DMBA の投与の 2 週間前～1 週間後又は(b)DMBA の投与の 1 週間後～試験終了(30 週間)のいずれかとした。DMBA は 8 mg を単回投与した。BHT は、このような時間枠のいずれかに投与した場合には、乳癌発生の有効な阻害剤であった(レジメン(a)では 20%、レジメン(b)では 50% 阻害した)
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(乳腺)	ラット		飼料性 BHT は、DMBA によって誘発された雌 Sprague-Dawley ラットの乳腺腫瘍の発生率を低下させたが、NMU を投与したラットには作用しなかった
癌の増強又は阻害に関する特殊試験(乳腺)	ラット		BHT の阻害作用は、癌を発生させる用量及び BHT を投与する飼料の種類による影響を強く受けた。BHT の AIN-76A 飼料への投与は BHT を NIH-07 飼料へ投与した場合とは著明に異なった作用を示した。AIN-76A 飼

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			料では、6,000 mg/kg 体重の BHT でも、15 mg の DMBA によって誘発された乳腺腫瘍の発生への作用は認められなかったが、類似の濃度の BHT が NIH-07 飼料中では腫瘍形成の 40%阻害をもたらした
癌の増強又は阻害に関する特殊試験（乳腺）	ラット	300、1,000、3,000 又は 6,000 mg/kg 体重	飼料性 BHT への長期の曝露後に、雌 Sprague-Dawley ラットには DMBA 誘発性の乳腺腫瘍形成に対する用量依存性の阻害が認められた。BHT は発癌物質の投与の 14 日前から 210 日目の終了時まで投与した。ラット群にシリアルベースの NIH-07 飼料を給餌し、低用量の DMBA (5 mg/ラット)を投与したところ、300、1,000、3,000 又は 6,000 mg/kg 体重の BHT の投与群の腫瘍形成率に有意な全体的な阻害傾向がみとめられた。BHT が乳腺腫瘍に及ぼした最大阻害率は最高用量群の約 50%であった。BHT の乳腺腫瘍形成率に及ぼす阻害作用は、最高用量の発癌物質を投与されたラットに BHT を投与した場合にやや不明瞭であった。15 mg の DMBA/ラットでは、最大阻害率は BHT の最高用量でもわずか 20%であった。BHT をカゼインベースの AIN-76A 飼料中に投与した場合にも、類似の結果が得られた。この試験でみられた阻害作用は、BHT への短期曝露を用いた以前の試験の結果よりもやや不明瞭であった
癌の増強又は阻害に関する特殊試験（乳腺）	ラット		酢酸レチニル（RA）及び BHT は、雌 Sprague-Dawley ラットでの乳腺腫瘍形成の阻害において相加効果がみられた。RA+BHT への慢性曝露は、肝線維症及び胆管過形成の高発生率を誘発し、このような変化は、RA 単独又は BHT 単独に曝露させた対照群及び低用量群のラットには観察されなかった
癌の増強又は阻害に関する特殊試験（乳腺）	ラット		雌 Sprague-Dawley ラットで BHT の飼料中投与が DMBA による乳腺の DNA 付加体の形成に及ぼす作用を試験した。生後 39 日のラット群に、32 mg/kg の DMBA の経口投与後に、0.4%又は 0.8%BHT を含有する飼料を 2 週間摂取させた。BHT の投与は、DMBA 由来の DNA 付加体のいずれのタイプの形成も 22 時間後に DMBA 投与した対照群と比して、それぞれ 42%又は 36%減少させた。飼料中 BHT はシン・ジアステレオマーとして、DMBA の抗ジアステレオマー由来の付加体の形成を選択的に阻害した。この試験で用いた BHT の飼料中濃度は、DMBA 誘発性の癌発生の開始を有意に阻害することが報告されている
癌の増強又は阻害に関する特殊試験（乳腺）	ラット		この試験では、BHT 及び BHT の代謝物である BHT-MeOH 及び DBQ (BHT-キノン)の DMBA 誘発性のラット乳腺癌発生に及ぼす作用のほか、ラット乳腺 DMBA-DNA 付加体の <i>in vivo</i> での形成を試験した各化合物を 33 mg/kg 体重の DMBA の経口投与の 2 週間前及び 1 週間後に投与した。200 mg/kg 体重の腹腔内投与の BHT 及び (BHT-MeOH ではなく) DBQ はそれぞれ乳腺腫瘍形成を 39%及び 25%阻害した。BHT 及び DBQ による乳腺腫瘍形成の阻害と DMBA-DNA

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
			付加体形成の阻害との間には適切な定量的相関が認められた。用量 100 及び 200 mg/kg 体重の BHT は DMBA-DNA の結合を同程度に阻害した。BHT と DBQ とは、特異的な付加体の阻害の選択性に差がみられた。DMBA の抗ジヒドロジオレボキシドとデオキシグアノシンとの付加体の形成の減少は、BHT 及び DBQ の乳腺腫瘍形成を阻害する能力と関連していた
癌の増強又は阻害に関する特殊試験（膵臓）	ラット	30 mg のアザセリンを1回/週×3週間注入した後、0 又は 0.45%BHT	BHT 投与は1 膵臓当たりの好酸性病巣数を 32%減少させたが、病巣サイズには作用しなかった。BHT は好塩基性病巣の発生率には作用を及ぼさなかった (Roebuck ら、1984 年)。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験（皮膚）	マウス		促進物質として 12-O-テトラデカノイル・ホルボール-13-アセテート(TPA)を用い、2 段階のマウス皮膚癌発生モデルで試験した場合、BHT には腫瘍・初発活性はみられなかった。BHT は 2 回/週×5 週で計 100 mg を投与した。
癌の増強又は阻害に関する特殊試験（皮膚）	マウス		ODC(オルニチン・デカルボキシラーゼ)活性の最大誘発は、BHTOOH の単回投与の 12 時間後に観察された。DMBA による誘発の前に BHTOOH を 2 回/週×50 週投与したマウスには、乳頭腫ならびに癌の形成が観察された。用量 2、8 及び 20 μ mol の BHTOOH は最大の乳頭腫反応をもたらした。乳頭腫から癌への進行が 60 週間後に生じた。このデータは、BHTOOH が BHT とは異なり、マウス皮膚での有効な腫瘍促進物質であることを示唆している。BHTOOH のみを投与し、BHT を投与しなかったマウスには乳頭腫及び癌は観察されなかった。
その他			ADI(JECFA 基準):0-0.3 mg/kg 体重

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
FAO	Food and Agriculture Organization	国連食糧農業機関
WHO	World Health Organization	世界保健機関
JMPR	Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues	FAO/WHO 合同残留農薬専門家会議
LD ₅₀	50% Lethal Dose	半数致死量

ジブチルヒドロキシトルエン 評価書和訳及び情報整理

JECFA 1999

ウェブサイト:<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v042je24.htm>
Butylated hydroxytoluene (BHT) (WHO Food Additives Series 42)

ジブチルヒドロキシトルエン評価書和訳及び情報整理 JECFA (1999) 目次

1.	序論 (原文 P.1)	249
2.	収支法によるジブチルヒドロキシトルエンのスクリーニング (原文 P.2)	250
3.	ジブチルヒドロキシトルエンの摂取の評価 (原文 P.3)	250
3.1	歩合(消失)のデータに基づく評価 (原文 P.3)	250
3.2	家計経済調査又は販売のデータに基づく評価(原文 P.3)	250
3.3	食生活モデルによるデータに基づく評価 (原文 P.3)	251
3.3	食生活モデルのデータに基づく評価(原文 P.4)	251
3.5	ジブチルヒドロキシトルエンの主な起源である食品群 (原文 P.4)	251
4.	ジブチルヒドロキシトルエンの摂取量の推定値評価 (原文 P.5)	252
5.	結論及び提言 (原文 P.5)	252
	ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要 (評価書:JECFA 1999)	257
	略称.....	257

原文 目次

原文ページ

1. 序論(原文 p.1)	1
2. 収支法によるジブチルヒドロキシトルエンのスクリーニング (原文 p.2)	2
3. ジブチルヒドロキシトルエン摂取の評価 (原文 p.3)	3
3.1 歩合(消失)のデータに基づく評価 (原文 p.3)	3
3.2 家計経済調査又は販売のデータに基づく評価 (原文 p.3)	3
3.3 食生活モデルのデータに基づく評価 (原文 p.3)	3
3.3 個人の食事記録に基づく評価 (原文 p.4)	4
3.5 ジブチルヒドロキシトルエンの主な起源である食品群 (原文 p.4)	4
4. ジブチルヒドロキシトルエンの摂取量の推定値評価 (原文 p.5)	5
5. 結論及び提言 (原文 p.5)	5
6. 参考文献 (原文 p.6)	6

1. INTRODUCTION	1
2. SCREENING OF BUTYLATED HYDROXYTOLUENE BY THE BUDGET METHOD	2
3. ASSESSMENTS OF INTAKE OF BUTYLATED HYDROXYTOLUENE	3
3.1 Assessments based on data on poundage (disappearance)	3
3.2 Assessments based on data from household economic surveys or sales	3
3.3 Assessments based on data from model diets	3
3.3 Assessments based on individual dietary records	4
3.5 Food groups that are major sources of butylated hydroxytoluene	4
4. EVALUATION OF ESTIMATES OF INTAKE OF BUTYLATED HYDROXYTOLUENE	5
5. CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	5
6. BIBLIOGRAPHY	6

国際化学物質安全性計画
世界保健機関

SAFETY EVALUATION OF CERTAIN FOOD ADDITIVES

世界保健機関(WHO)食品添加物シリーズ: 42

作成

食品添加物のFAO/WHO合同食品添加物専門家会議(JECFA)第51回審議会

世界保健機関, ジュネーブ 1999

IPCS. 国際化学物質安全性計画

ジブチルヒドロキシトルエン(BHT)の全国摂取調査の評価

原案

Dr Philippe Verger

Observatory of Food Consumption, パリ

1. 序論 (原文 p.1)

審議会は、ジブチルヒドロキシトルエン(BHT)の摂取を調査し、その最大限界はGeneral Standard for Food Additives(GSFA)の草案において様々な固形食について提案され、the Codex Committee on Food Additives and Contaminants(CCFAC)によって精査された。BHTのADIは0-0.3 mg/kg 体重と割り当てられた(添付 1, 参照 116)。

BHTは、一般的に脂肪や油を含んでいる製品において酸化防止剤として使用される。ブチルヒドロキシアニソール、ターブチル化ヒドロキノン及びプロピルガレートと併用し、抗酸化剤の相乗作用が得られる。

オーストラリア、ブラジル、中国、フィンランド、フランス、日本、ニュージーランド、スペイン、英国、及び米国の10カ国が情報提供した。合同審査は、オーストラリア、ニュージーランド(Aus-NZ)によって供された。報告された摂取評価は、「歩合」、家計経済調査、販売データ、食事モデル又は個人食事記録に基づいた。表1は、提出された概要を示す。

表1. ジブチルヒドロキシトルエンに関する申請書類のまとめ

国	収支 法	歩合 データ	FBS/HES/ 販売データ	食事 モデル	個人食事 記録
オーストラリア・ニュージーランド	X			X	X
ブラジル	X		X		
中国	X	X		X	
フィンランド		X			
フランス			X		X
日本				X	
スペイン	X	X	X		
英国		X		X	X
米国		X		X	

FBS, 食料需給表. HES、世帯経済調査 販売, 小売店

2. 収支法によるジブチルヒドロキシトルエンのスクリーニング (原文 p.2)

収支法により得られ国が提案した摂取量は、BHTが固形食に使用されるかどうかを表す。GSFA委員会は、様々な固形食におけるBHTの許可を提案する。表2は、BHTの使用を許可したパターンにおける各国のデータで、BHTが含まれていそうな固形食の供給割合比較、許容できるBHTの最大値及び収支法により算出されたその国の理論上の最大値との比較を要約する。

固形食においてBHTを使用した理論上の最大値は、提出された4カ国の国の最大許容基準よりも小さく、またGSFA基準の1000 mg/kgよりも小さかった。そのため、固形食に使用されるBHTからの摂取に関する詳細な評価が求められる。

3. ジブチルヒドロキシトルエンの摂取の評価 (原文 p.3)

3.1 歩合(消失)のデータに基づく評価 (原文 p.3)

歩合のデータに基づく一人あたりが摂取しているBHT量の推定は、表3において5カ国について示され、JECFAのBHTのADI 0-0.3 mg/kg 体重と比較した。推定摂取量は全てADIを下回っているが、近年の試験においては0.003～0.11 mg/kg 体重/日(ADIの1-40%)と変動している。歩合法によって得られた結果は、1987～1995年の間に米国においてこの添加剤の使用が大幅に減少したことを示す。

3.2 家計経済調査又は販売のデータに基づく評価(原文 p.3)

4カ国は国内の最大使用基準を各国全体に想定し、世帯調査又は販売調査に基づくデータを提出した。データは表4にまとめる。推定摂取量は全てADIを下回り、ブラジルの0.052 mg/kg 体重/日から、スペインの

0.1 mg/kg 体重/日にわたった(それぞれADIの17%及び33%)。一般的に高消費者は家計経済調査又は販売データから識別できないが、フランスの提出は、家計消費を人数で割り、個人消費者から摂取が多いものを見積もった。

3.3 食生活モデルによるデータに基づく評価 (原文 p.3)

5カ国は、食事モデルに基づくデータを提出した(その詳細を表5にまとめる)。測定結果を直接比較できないのは、別の仮定を作ったからである。Aus-NZ及び英国で使用された食生活モデルは、高消費者のBHT摂取の推定のために作られ、添加剤の最大許容量とみなした。米国の食事モデルは、アメリカの市場調査会社による1982-88年の食事出現頻度データに由来する摂餌量データと、米農務省により1987-88年に行われた3日間の国家消費調査から得た平均個人摂取量を用いて、長期消費によるBHT摂取を予測するために作られた。最大添加物基準が想定された。日本の食事モデル(全食事調査に基づく)は国の摂餌量データを伴う食品添加物の解析濃度を含む、平均的な消費者の実質的BHT摂取量の推定を導きだした。

国の標準的な添加物水準を想定した時(0.02及び0.09 mg/kg 体重/日はそれぞれADIの10及び30%)、Aus-NZ及び英国のモデルに基づくBHT摂取の推定はADIを超えず、しかしGSFAの使用基準想定の場合には、ADIを大いに上回った(5.3及び6 mg/kg 体重/日はそれぞれADIの1800及び2000%に相当)。最終結果は、GSFA基準による中国及び米国のモデルに基づくBHT摂取の推定と一致しており、平均的消費者でそれぞれ0.7 mg/kg 体重/日 (ADIの230%) 及び0.99 mg/kg 体重/日 (ADIの330%)、高消費者でそれぞれ4.4 mg/kg 体重/日 (ADIの1600%) 及び2.0 mg/kg 体重/日 (ADIの660%)である。BHTの国の標準が米国のモデルに使用される時、ADIはさらに上回る。日本のBHT摂取の推定が他の食事モデルに由来するものよりはるかに低いのは、実際に検出されたBHT濃度を用いるためであり、最大許容摂取量よりはるかに低い。

3.3 食生活モデルのデータに基づく評価(原文 p.4)

個人の食事記録に基づくBHT摂取の推定は、3カ国から提出された。その都度、平均及びパーセンタイルを、個人の体重で調整した個々の推定摂取から算出した(英国以外)。これらの推定から導かれた仮定及び推定自体を表6にまとめる。推定では、全ての国において平均的及び高消費者の双方で摂取量はADIより低いことを示す。Aus-NZのGSFA基準に基づく推定は、国の使用基準に基づくそれらより高くなり、平均的消費者(0.7 mg/kg 体重/日 及びADIの240%) 及び高消費者(1.8 mg/kg 体重/日 及びADIの580%)の双方でADIを上回った。

表7はGSFAの使用基準に基づいた摂取評価の結果の概要を示す。Aus-NZ、中国及び英国の結果は、ADIを超える可能性がみられる点で一致した。

3.5 ジブチルヒドロキシトルエンの主な起源である食品群 (原文 p.4)

BHTのGSFA基準に基づく摂取の評価を、国から与えられた摂餌量のデータと併せると、全体的なBHT摂取の主な摂取源としていくつかの食品を指す。200 mg/kg以上のBHTを含む食品どれでも90g/日、400 mg/kg以上のBHTを含む食品どれでも45g/日、あるいは1000 mg/kg以上のBHTを含む食品どれでも18 g/日を摂取した際はADIを上回るだろう。いくつかのGSFA基準は、全体の許容使用基準を想定以上の高水準まで引き上げる食品群に含まれるある種の食品の許容基準の高さの結果である。これは、食用油脂及び油(75-200

mg/kg)、菓子(200-750 mg/kg)及び冷凍魚、魚切身及び魚製品(100-1000 mg/kg)の場合だ。

4. ジブチルヒドロキシトルエンの摂取量の推定値評価 (原文 p.5)

収支法によるBHTのスクリーニングは、添加物としてのBHTの使用はさらなる評価が必要であることを示した。スクリーニングの収支法においてBHTが含まれる可能性がある食料供給の国民割合を含む場合も、この判断は変わらなかった。

BHT摂取の推定は、10カ国から提出された。全ての推定はGSFA使用基準と食事モデルもしくは個人消費データの併用に基つき、一貫してADIを超えることを示す。平均摂取量は0.70～0.99 mg/kg 体重(中国及び米国のADIの230及び240%)と推定され、高消費者の摂取量は2.0-6.0 mg/kg 体重(ADIの690-2000%)と推定される。

国の使用基準に基づく推定は比較的一貫していて、歩合に基づくと0～0.11 mg/kg 体重/日(ADIの0-30%)、家計調査及び販売データに基づくと0.052～0.1 mg/kg 体重/日(ADIの20-40%)、食事モデル及び国の使用基準(米国を除く)に基づくと0.02～0.09 mg/kg 体重/日(ADIの10-30%)、そして個人消費データに基づくと0.02-0.1 mg/kg 体重/日(ADIの0.1-30%)の範囲にわたる。

2つの例外について記さねばならない。まず1つは、食事モデルに基づき、米国の使用基準の根拠とした平均的及び高消費の推定(0.39及び0.78 mg/kg 体重/日で、それぞれADIの130及び260%)である。この結果は、その国で認められたBHT基準が高いことで説明できる。2つめは、日本から提供された、全食事調査でみられたBHT濃度に基づいた試験における推定の低さ(0.00089 mg/kg 体重/日で、ADIの0.003%)である。

5. 結論及び提言 (原文 p.5)

審議会は、データが利用できそうな10カ国における推定摂取量に基づくBHTのADIは上回りそうになるが、GSFAにおける上限値の提案が想定される場合は上回る可能性があると認めた。

BHTと相乗的に働くtert-ブチルヒドロキノン及びブチルヒドロキシアニソールなどの他の抗酸化剤とBHTが併用される可能性が高いと、委員は認めた。結果的に、実際に使用されるBHTの量は低く、推定で仮定したよりも使用される食品は少ないだろう。日本以外の全ての推定は、BHTは使用が認められた食品中に使用される唯一の抗酸化剤であり、それらの食品全てで最大許容量まで含まれているという仮定に基づいている。実際のBHTの摂取量は、食品中に使用されている抗酸化剤の相対比率、そして添加剤を含むカテゴリーにおける食品の割合に依存するだろう。

食品添加物及び汚染に関する規格委員会への提言 (原文 p.6)

審議会は、BHTの大量摂取に寄与する可能性のある特定の食品群を特定した。Codex Committeeは、下記の食品群でBHTの適切な濃度を見直すことを望むだろう カテゴリー2.1、「食用油及び脂肪」。カテゴリー9.2、「魚及び水産製品」。そして、カテゴリー5.3、「チューインガム」。

表2. 収支法によるジブチルヒドロキシトルエン(BHT)の理論上の最大値の推定

国	BHTを含む食糧		GSFA最大 濃度 ^a (mg/kg)	理論上の最大 濃度(mg/kg)
	供給の%	国内最大 濃度(mg/kg)		
オーストラリア-ニュージー ランド	50	70	1000	24
ブラジル	25	200	1000	48
中国	20	200	1000	60
スペイン	5	400	1000	240

GSFA、食品添加物の一般基準

^a 提案される最大使用量は、9.2.1「軟体動物、甲殻類及び棘皮動物を含む、凍結魚、魚、肉及び魚製品」で1000 mg/kgである。

表3. 歩合データに基づくジブチルヒドロキシトルエン(BHT)の摂取の推定

国	日	消費者(百万)	BHT推定摂取量 (1日あたりのmg/kg 体重)	% ADI ^a
中国	1992	1200	0.016	5
			全母集団の70%	
フィンランド	1980	4.9	0	0
	1994	5.1	0	0
スペイン	?	0.07	23	
			全母集団の85%	
英国	1984-86	56	0.003	1
米国	1987	240	0.056(平均)	19
			0.11(90パーセンタイル)	37
	1995	260	0.023 (平均)	7
			0.046 (90パーセンタイル)	14

a JECFAのADI 0-0.3 mg/kg 体重

b 消費者の100%がBHTを摂取し、そのうち90パーセンタイルの消費者の摂取は平均の2倍であると想定

表4. 家計経済調査及び販売データに基づくジブチルヒドロキシトルエン(BHT)摂取量の推定

国	日	調査	仮定	BHT 推定 摂% ADI ^a 取量 (1日における mg/kg)	
ブラジル ^b	1992-96	AC Nielsanブラジ ル; 販売データ	すべての食品に国の最大使用基 準	0.052	17
	1984-94	Datamark社	すべての食品に国の最大使用基 準	0.08	26
フランス		販売データ	欧州連合の最大使用基準 家庭外のケータリングを調整	0.089	30
スペイン	1993	世帯調査	許可類における食品は、すべて BHTを含有	0.1	33

a JECFAのADI 0-0.5 mg/kg 体重

b たとえ、ココナッツにおける使用水準は脂肪含有量60%に基づき、チューインガムはゴム含有量20%に基づくとしても、ココナッツ及びチューインガムの最終製品において最大基準とみなし、BHT摂取の過大評価を招いた

表5. 食生活モデルを用いたジブチルヒドロキシトルエン(BHT)の推定摂取量

国	日	調査	仮定	モデル	BHT 摂 取% ADI 量 (1日あたり の mg/kg 体重)	
Aus-NZ	1983	国、24時間リコー ル 成人、25-64年; サンプル, 6254	2つのモデル: Aus-NZ/GSFA -- 最大濃度 (Aus-NZ 又は GSFA) -- 高消費レベル の95パーセンタイ ル -- 改変したGSFA 分類システム	高い消費者 ^b / Aus-NZ許可	0.02	10
				高い消費者 ^b / Aus-NZ許可	5.3	1800
中国	1992	全国世帯調査, 24時間リコール。 30省; サンプル, 91 818	1つのモデル -- 最大GSFAレベ ル	平均的消費者/ GSFA許可	0.7	230
				高消費者/ GSFA許可	4.9	1600

日本	1994	国民栄養摂取調査	1つのモデル: 日本 -- 分析された食品添加物の濃度(検知されなかった時は0)	平均的消費者レベル/測定されたBHT	0.00085	0.003
英国			3つのモデル: UK 成人/子供、GSFA -- 最高添加物水準(EU) -- 単位量食糧(GSFAレベルの規格のモデル) -- 97.5パーセンタイル高消費レベル(英国 大人/子供モデル) -- GSFA分類システム	高消費者 ^{b/} 英国許可/成人 高消費者 ^{b/} 英国許可/子供 高消費者 ^{b/} GSFA許可	0.09 0.17 6.0	30 60 2000
	1986-87	成人、16-64年				
	1992	国; 7日間の計量記録 子供、1.5-4.5年				
米国	1982-88	MRCAからの食品出現頻度データ(1982-87)とUSDA/NFCSからの一人前分量(1987-88)を併せて14日メニューを入力。 > 2年	2つのモデル: US 及びGSFA -- 最高添加物水準(US又はGSFA) -- 90パーセンタイル高消費レベル 平均的消費者の2倍 -- 回答者は、すべて消費者 -- GSFA分類システム	長期消費者/米国許可/平均 長期消費者/米国許可/90パーセンタイル 長期消費者/GSFA許可/平均 長期消費者/GSFA許可/90パーセンタイル	0.39 0.78 2.0	130 260 660
						0.99330

表5(継続的)

Aus-NZ、オーストラリアニュージーランド。GSFA、食品添加物の一般基準。EU、欧州連合。MRCA、アメリカの市場調査会社。USDA/NFCS、米国農務省/国の摂取量測定。

a JECFAのADI 0-0.3 mg/kg 体重

b 全ての回答者のうち97.5パーセンタイル(英国)又は95パーセンタイル(Aus-NZ)において2つの主な食品群から、BHT最高摂取の可能性のある食品1つ、及び平均基準において他の主な食品群それぞれからBHT最高摂取の可能性を備えた食物1つを消費すると見なす

表6. 個々の記録に基づくジブチルヒドロキシトルエン(BHT)の摂取の推定

国	日	調査	モデル	BHT摂取 (mg/kg bw 日あたり)	% ADI ^a
Aus-NZ	1983	全国調査; 24時間リコール; 成人、25-64年; サンプル, 6254	平均摂取(母集団=消費者)Aus-NZ	0.02	7
			平均(母集団=消費者)GSFA	0.7	240
			95パーセンタイル(消費者)Aus-NZ	0	0
			95パーセンタイル(消費者)GSFA	1.8	580
フランス	1993-94	全国調査; 7日記録; 5-75 年; サンプル, 1116	平均摂取量(母集団) EU	0.033	11
			90パーセンタイル EU	0.071	24
			95パーセンタイル EU	0.089	30
			修正平均摂取(母集団) EU	0.001	00.3
英国	1986-87	全国調査; 7日間計量記録 成人、16-64年; サンプル, 3000	平均摂取(母集団=消費者) EU	0.04	13
			97.5パーセンタイル(消費者)EU	0.1	33

Aus-NZ、オーストラリアニュージーランド。GSFA、食品添加物の一般基準。EU、欧州連合。
JECFAのADI、0-0.3 mg/kg 体重

表7. 食品添加物の一般的な基準内で認められる添加物水準に基づくジブチルヒドロキシトルエン(BHT)の摂取の推定のまとめ

国	モデル	BHTの摂取		% ADI ^a
		1日あたりの mg/ヒト	1日あたりの mg/kg 体重	
オーストラリア ニュージーランド	個人記録, 平均摂取量	51	0.85	240
	個人記録, 95パーセンタイル消費者	125	2.1	690
中国	食事モデル, 平均摂取量	41	0.7	230
	食事モデル, 高消費者	290	4.9	1600
米国	MRCA、平均摂取	59	0.99	330
	MRCA、疑似90パーセンタイル消費者	120	2.0	660

MRCA, アメリカの市場調査会社
JECFAのADI 0-0.3 mg/kg 体重

ジブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要（評価書：JECFA 1999）

該当する記載なし

ADI(JECFA 基準) 0-0.3 mg/kg 体重

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
FAO	Food and Agriculture Organization	国連食糧農業機関
WHO	World Health Organization	世界保健機関
JECFA	FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives	FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
IPCS	International Program on Chemical Safety	国際化学物質安全性計画
ADI	Acceptable Daily Intake	1 日摂取許容量

ブチルヒドロキシトルエン 評価書和訳と情報整理

IARC 1986

ウェブサイト:<http://www.inchem.org/documents/iarc/vol40/butylatedhydroxytoluene.html>
BUTYLATED HYDROXYTOLUENE (BHT), Summaries & Evaluations, vol. 40, 1986

ブチルヒドロキシトルエン 評価書和訳と情報整理 IARC (1986) 目次

5. 報告されたデータの概要と評価 (原文 P.1)	263
5.1 暴露 (原文 P.1)	263
5.2 試験データ (原文 P.1)	263
5.3 ヒトのデータ (原文 P.2)	264
5.4 評価 (原文 P.2)	264
別名 (原文 P.2)	264
ブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要 (評価書:IARC 1986)	266
略称.....	267

原文 目次

原文ページ

ブチルヒドロキシトルエン	1
5. 報告されたデータの概要と評価	1
5.1 暴露	1
5.2 実験データ	1
5.3 ヒトのデータ	2
5.4 評価	2
 BUTYLATED HYDROXYTOLUENE (BHT)	1
5. Summary of Data Reported and Evaluation	1
5.1 Exposure	1
5.2 Experimental data	1
5.3 Human data	2
5.4 Evaluation	2

VOL.: 40(1986)(p.161)

CAS No.: 128-37-0

Chem. Abstr. Name : 2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol

5. 報告されたデータの概要と評価 (原文 p.1)

5.1 暴露 (原文 p.1)

ブチルヒドロキシトルエン (BHT) は、1947年以来、ゴム製品及び石油製品の一般的な酸化防止剤として使用されてきており、つい最近においてはプラスチック製品にも使用されている。1949年以来、多くの油脂含有食品、食用脂肪及び食用油、そして化粧品に酸化防止剤として使用されている。こうしてヒトは広範囲にわたりこの化合物の暴露を受けている。

5.2 試験データ (原文 p.1)

マウス及びラットを用い、飼料での経口投与によるブチルヒドロキシトルエンの発がん性試験を実施した。マウスにおける試験では、投与群と対照群との間に腫瘍発生率における違いはなかった。マウスでの他の試験では、雌の低用量群で肺腫瘍発生率の上昇を示したが、高用量での上昇はみられなかった。単一用量で、少数のマウスを使用したその他の試験では、ブチルヒドロキシトルエンの飼料により肺腫瘍を持つマウスの数が増えた；この所見は、多数の動物を使用した同研究者による詳細検討での確認がなされなかった。ラットにおける試験では、腫瘍発生率の上昇はみられなかった。別の試験では、低用量の雌ラットで、下垂体腺腫の発生率が上昇したが、高用量では上昇はみられなかった。ラットの追加試験で、肝腫瘍が観察された；しかし、この試験は、対照群と投与群との間における生存の違いのため、評価することができなかった。

マウスとラットを用い、ブチルヒドロキシトルエンの、選択された化学薬品の発がん性を変化させる能力について試験した。既知の発がん性物質と共に投与した時、ブチルヒドロキシトルエンは、発がん性を強化、阻害又は影響を及ぼさなかった。

試験動物に対する、ブチルヒドロキシトルエンの繁殖毒性又は胎児毒性を評価するのに十分なデータは得られなかった。

マウスにおいて、ブチルヒドロキシトルエンの単回腹腔内投与又は、飼料投与が、肺胞細胞壊死及び増殖を引き起こした。またブチルヒドロキシトルエンは、ラット肝細胞において、肝腫脹を引き起こす滑面小胞体の増殖を誘導した。

ブチルヒドロキシトルエンは、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) においてDNA損傷を、又は、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) において突然変異を誘導しなかった。植物において染色体異常を、又、キイロシヨウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) において突然変異又は染色体異常を誘導しなかった。ある研究で

は、外因性の代謝システム存在下で、チャイニーズハムスターの培養細胞に変異原性をもたらすと報告があった。*In vivo*で処理されたラットの肝臓のDNAとブチルヒドロキシトルエンが結合するという報告がある。マウスにおいて骨髄の小核を、又は優性致死突然変異を引き起こさなかった。マウスにおいて精子異常を誘導した。

他の化学物質(通常変異原性物質又は発がん性物質として知られている)との組み合わせで試験した際、多くの場合ブチルヒドロキシトルエンは、DNA損傷、変異原性及び染色体異常誘発活性を改変した。ほとんどの試験で、ブチルヒドロキシトルエンは、間接的に作用する変異原性物質又は発がん性物質の活性を減じた。

5.3 ヒトのデータ (原文 p.2)

ヒトに対するブチルヒドロキシトルエンの発がん性を評価するデータは得られなかった。

5.4 評価 (原文 p.2)

試験動物において、ブチルヒドロキシトルエンの発癌性についての限られた証拠 (*limited evidence*) がある。

ヒトに対するブチルヒドロキシトルエンの発がん性の評価はされなかった。

イタリック体を使用された用語の定義については、Preamble Evaluation参照。

次の評価: Suppl. 7(1987)(p.59: グループ 3)

別名 (原文 p.2)

- 3.2 Advastab 401
- 3.3 Agidol
- 3.4 Alkofen BP
- 3.5 Antioxidant 4 (抗酸化物質 4)
- 3.6 Antioxidant 29 (抗酸化物質 29)
- 3.7 Antioxidant 30 (抗酸化物質 30)
- 3.8 Antioxidant DBPC (抗酸化物質 DBPC)
- 3.9 Antioxidant 4K (抗酸化物質 4K)
- 3.10 Antioxidant KB (抗酸化物質 KB)
- 3.11 Buks
- 3.12 Butylhydroxytoluene (ブチルヒドロキシトルエン)
- 3.13 CA0-1
- 3.14 CA0-3
- 3.15 Catalin CA0-3
- 3.16 Chemanox 11
- 3.17 Dalpac
- 3.18 DBPC

3.19 Deenax
3.20 Dibunol
3.21 Dibutylate hydroxytoluene
3.22 Di-*tert*-butyl-*para*-cresol
3.23 *ortho*, *orto*'Di-*tert*-butyl-*para*-cresol
3.24 1,3-Di-*tert*-butyl-2-hydroxy-5-methylbenzene
3.25 3,5-Di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene
3.26 3,5-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol
3.27 E 321
3.28 Impruvol
3.29 Ionol
3.30 Ionole
3.31 Kerabit
3.32 4-Methyl -2,6-di-*tert*-butylphenol
3.33 NCI-CO3598
3.34 Nocrac 200
3.35 Nonox TBC
3.36 Parabar 441
3.37 Paranox 441
3.38 Stavox
3.39 Sumilizer BHT
3.40 Sustane BHT
3.41 Swanox BHT
3.42 Tenamene 3
3.43 Tenox BHT
3.44 Topanol
3.45 Toxolan P
3.46 Vanlube PC
3.47 Vanlube PCX
3.48 Vianol
3.49 Vulkanox KB

ブチルヒドロキシトルエンの毒性試験と結果の概要（評価書:IARC 1986）

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
急性毒性(経口又は腹腔内)	マウス	単回腹腔内、単回経口	肺胞細胞壊死及び増殖 ラット肝細胞:滑面小胞体の増殖を誘導
90 日間亜急性経口毒性			該当する試験なし
90 日間亜急性経口毒性			該当する試験なし
発がん性試験	マウス、ラット	記載なし(飼料での経口)	腫瘍発生率に違いなし
発がん性試験	マウス	記載なし	雌低用量群:胚腫瘍発生率上昇(高用量では上昇なし)
発がん性試験	マウス	単一用量(飼料)	肺腫瘍を持つマウス数増加(追試験での詳細検討されず)
発がん性試験	ラット	記載なし	腫瘍発生率の上昇なし
発がん性試験	ラット	記載なし	雌低用量群:下垂体腺腫の発生率上昇(高用量では上昇なし) 追加試験:肝腫瘍が観察された。 しかし differential survival のため評価できず。
2 年間慢性毒性/発がん性			該当する試験なし
繁殖毒性/胎児毒性	記載なし	記載なし	十分なデータ得られず
催奇形性			該当する試験なし
変異原性	枯草菌、ネズミチフス菌、植物、キイロショウジョウバエ	記載なし	枯草菌:DNA 損傷なし ネズミチフス菌:突然変異なし 植物:染色体異常なし キイロショウジョウバエ:突然変異なし、染色体異常なし
変異原性:小核試験	マウス骨髓細胞	記載なし	小核又は優性致死突然変異なし
変異原性(外因性代謝システムあり)	チャイニーズハムスター培養細胞	記載なし	変異原性あり
その他	ラット	記載なし	<i>In vivo</i> で処理されたラット肝臓の DNA と結合した
その他 発がん性物質の 活性への影響	マウス、ラット	記載なし(発がん性物質との組み合わせ)	発がん性物質の活性へ影響はなかった。

試験の種類	供試動物等	投与量	結 果
その他 発がん性物質の 活性への影響	記載なし	記載なし(変異原性 物質/発がん性物質 との組み合わせ)	DNA 損傷、変異原性、染色体異常誘発活性を改変。 ほとんどの場合、活性を低減。
			ADIについて記載なし

略称

略称	正式名称(英語)	日本語訳
IARC	International Agency for Research on Cancer	国際がん研究機関