

(案)

飼料添加物

ブチルヒドロキシアニソール

2017年4月

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会

目 次

	頁
○ 審議の経緯	4
○ 食品安全委員会委員名簿	4
○ 食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会専門委員名簿	4
○ 要 約	6
I. 評価対象飼料添加物の概要	7
1. 用途	7
2. 有効成分の一般名	7
3. 化学名	7
4. 分子式	7
5. 分子量	7
6. 構造式	7
7. 使用目的及び使用状況	8
II. 安全性に係る知見の概要	9
1. 体内動態試験	9
(1) マウス	9
(2) ラット	10
(3) イヌ	13
(4) ヒト	14
(5) 代謝物 TBHQ の体内動態試験	14
2. 残留試験	19
(1) 豚	19
(2) 鶏	20
(3) 鶏卵	21
(4) にじます、こい及びあゆ	21
3. 遺伝毒性試験	22
4. 急性毒性試験	38
(1) BHA に関する試験	38
(2) TBHQ に関する試験	38
5. 亜急性毒性試験	39
(1) 180 日間亜急性毒性試験 (イヌ) <参考資料>	39
(2) 6 か月間亜急性毒性試験 (イヌ)	39
(3) 110 日間亜急性毒性試験 (豚) <参考資料>	40
(4) TBHQ に関する亜急性毒性試験	40
6. 慢性毒性及び発がん性試験	43
(1) 104 週間発がん性試験 (マウス) ①	43
(2) 104 週間発がん性試験 (マウス) ②	44

1	(3) 96 週間慢性毒性及び発がん性試験 (ラット) <参考資料>	45
2	(4) 104 週間慢性毒性及び発がん性試験 (ラット)	45
3	(5) 104 週間発がん性試験 (ラット) ①	46
4	(6) 104 週間発がん性試験 (ラット) ②	47
5	(7) 104 週間発がん性試験 (ラット) ③ <参考資料>	48
6	(8) 104 週間発がん性試験 (ラット) ④ <参考資料>	48
7	(9) 104 週間発がん性試験 (ラット) ⑤ <参考資料>	49
8	(10) 3~24 か月間発がん性試験 (ラット) <参考資料>	49
9	(11) 110 週間発がん性試験 (ラット) <参考資料>	50
10	(12) 104 週間発がん性試験 (ハムスター) ①	51
11	(13) 104 週間発がん性試験 (ハムスター) ② <参考資料>	52
12	(14) 1 年間慢性毒性試験 (イヌ) <参考資料>	52
13	(15) 15 か月間慢性毒性試験 (イヌ)	53
14	(16) TBHQ に関する慢性毒性及び発がん性試験	53
15	7. 生殖発生毒性試験.....	57
16	(1) 生殖毒性試験 (ラット)	57
17	(2) 3 世代生殖毒性試験 (ラット) <参考資料>	57
18	(3) 児動物の行動機能への影響 (マウス) <参考資料>	58
19	(4) 発生毒性試験 (ウサギ)	58
20	(5) 発生毒性試験 (豚) <参考資料>	58
21	(6) 発生毒性試験 (サル) <参考資料>	59
22	(7) TBHQ に関する生殖発生毒性試験.....	59
23	8. その他の毒性試験.....	61
24	(1) 胃に対する BHA の影響に関する試験.....	61
25	(2) ラットの前胃に対する BHA の影響の可逆性に関する試験	67
26	(3) 胃に対する TBHQ の影響に関する試験	70
27	(4) 発がん性に関する促進作用又は抑制作用.....	70
28	(5) 酵素誘導及び遺伝子発現に関する知見	74
29	(6) 細胞毒性に関する知見.....	74
30	(7) 内分泌様作用に関する知見.....	75
31	(8) 免疫反応への影響	77
32	9. ヒトにおける知見.....	78
33	(1) 過敏症及びアレルギーに関する知見	78
34	(2) 胃癌に関する疫学的知見	78
35		
36	III. 国際機関等における評価.....	79
37	1. JECFA における評価.....	79
38	2. EU における評価	79
39	3. 国際がん研究機関 (IARC) における評価	80
40		

1	IV. 食品健康影響評価	81
2		
3	・ 表 36 JECFA、EFSA 及び食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会における無毒性	
4	量等の比較.....	83
5	・ 別紙 1：検査値等略称.....	85
6	・ 別紙 2：代謝物略称.....	87
7	・ 参照	89
8		
9		

1 <審議の経緯>

2005 年 11 月 29 日 暫定基準告示（参照 1） **[厚労告示]**

2012 年 8 月 21 日 厚生労働大臣から残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安第 0821 第 16 号）、関係資料の接受

2012 年 8 月 27 日 第 444 回食品安全委員会（要請事項説明）

2017 年 2 月 24 日 第 119 回肥料・飼料等専門調査会

2017 年 3 月 24 日 第 120 回肥料・飼料等専門調査会

2017 年 4 月 20 日 第 121 回肥料・飼料等専門調査会

2

3 <食品安全委員会委員名簿>

(2015 年 6 月 30 日まで) (2017 年 1 月 7 日から)

熊谷 進 (委員長)	佐藤 洋 (委員長)
佐藤 洋 (委員長代理*)	山添 康 (委員長代理)
山添 康 (委員長代理*)	吉田 緑
三森 国敏 (委員長代理*)	山本 茂貴
石井 克枝	石井 克枝
上安平 洸子	堀口 逸子
村田 容常	村田 容常

* : 2012 年 7 月 2 日から

4

5 <食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会専門委員名簿>

(2016 年 10 月 1 日から)

今井 俊夫 (座長)
山中 典子 (座長代理)
荒川 宜親 菅井 基行
今田 千秋 高橋 和彦
植田 富貴子 戸塚 恭一
川本 恵子 中山 裕之
桑形 麻樹子 宮島 敦子
小林 健一 宮本 亨
佐々木 一昭 山田 雅巳
下位 香代子 吉田 敏則

6

7 <第 119 回肥料・飼料等専門調査会専門参考人名簿>

8 唐木 英明

9

10 <第 120 回肥料・飼料等専門調査会専門参考人名簿>

11 唐木 英明

12

13

- 1 〈第 121 回肥料・飼料等専門調査会専門参考人名簿〉
- 2 唐木 英明
- 3
- 4

要 約

飼料添加物である「ブチルヒドロキシアニソール」(CAS No.25013-16-5) について、JECFA の評価書等を用いて食品健康影響評価を実施した。

[以降は審議後に記載。]

I. 評価対象飼料添加物の概要

1. 用途

抗酸化剤

2. 有効成分の一般名

和名：ブチルヒドロキシアニソール

英名：Butylated Hydroxyanisole

3. 化学名

IUPAC

英名：4-Methoxy-3-(2-methyl-2-propanyl)phenol — 4-methoxy-2-(2-methyl-2-propanyl)phenol (1:1)

CAS (No. 25013-16-5)

英名：(1,1-Dimethylethyl)-4-methoxyphenol (参照 2) [Merck Index]

4. 分子式

$C_{11}H_{16}O_2$ (参照 2) [Merck Index]

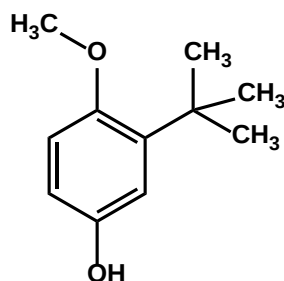
5. 分子量

180.25 (参照 2) [Merck Index]

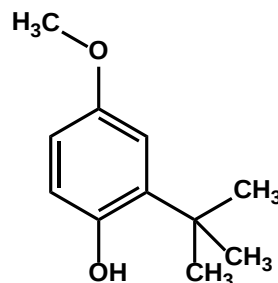
6. 構造式

ブチルヒドロキシアニソール (BHA) は、2-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (2-BHA) と 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (3-BHA) の混合物である。

(2-BHA)



(3-BHA)



(参照 2、3) [Merck Index] [EFSA 2011, 2.1]

7. 使用目的及び使用状況

ブチルヒドロキシアニソール (BHA) は、1949 年に初めて合成された抗酸化剤である。BHA は、2-BHA と 3-BHA の混合物である。

BHA は、油脂を含む食品に風味や香りの悪化を遅らせる目的で食品添加物として使用される。この他に、動物用飼料、化粧品並びにゴム及び石油製品に対して、抗酸化剤又は防腐剤として使用されるが、主に動物用飼料中のビタミン A 及び E、カロチン並びに動物油脂等の酸化を遅くする目的で使用される。

海外では、EU、米国、カナダ等において食品添加物又は飼料添加物として広く使用されている。

日本では、1954 年に食品添加物に指定されている。また、飼料添加物として指定されており、飼料中含有量は飼料 1t 当たり 150 g 以下¹と規定されている。(参照 3～9) [EFSA 2011, 1.Introduction] [Canada, p6] [EC Regulation] [FAS 42] [試験抄録, p1] [食品衛生法施行規則] [飼料添加物省令]

また、BHA の代謝物である TBHQ (*tert*-ブチルヒドロキノン) は、海外では食品添加物として使用されている。(参照 10、11) [EFSA 2004,p2] [FAS 42 TBHQ]

なお、ポジティブリスト制度導入に伴う残留基準値²が設定されている。(参照 1) [厚生労働省告示]

¹ BHA、ジブチルヒドロキシトルエン及びエトキシキンの合計量

² 平成 17 年厚生労働省告示第 499 号によって定められた残留基準値 (参照 1)

II. 安全性に係る知見の概要

本評価書では、JECFA、EFSA の評価書等を基に、BHA の毒性に関する主な知見を整理した。また、BHA の代謝物である TBHQ についても主な知見を整理した。

1. 体内動態試験

(1) マウス

マウス (Slc:ddy 系、4 週齢、雄 4~6 匹/群) に BHA を単回経口投与 (50 又は 500 mg) し、体内動態試験が実施された。投与 48 時間後までの肝臓、腎臓、胃及び腸管、血液並びに排泄物中 BHA 及び代謝物 (グルクロン酸及び硫酸抱合体) を HPLC によって測定した (検出限界不明)。排泄物は、500 mg/kg 体重投与群のみ測定した。

血液、肝臓及び腎臓中 BHA、グルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体濃度を表 1 に示した。500 mg/kg 投与群では、投与 30 分後の肝臓、腎臓及び血液に高濃度の BHA が検出されたが、投与 8 時間後には検出されなかった。投与 30 分後の肝臓では硫酸抱合体がグルクロン酸抱合体より多かったが、投与 1~3 時間後には逆転した。

胃及び腸管から回収された BHA の投与量に対する割合を表 2 に示した。胃及び腸管には BHA が長時間残留し、抱合体は検出されなかった。

投与後 8 時間の尿から投与量の 52% が回収され、48 時間では約 76% (BHA 0.3 ± 0.1%、グルクロン酸抱合体 72.3 ± 7.6%、硫酸抱合体 3.0 ± 2.4%) が回収された。糞からは投与量の 2.3% しか回収されなかった。(参照 3、12) [EFSA 2011, 3.1.2] [Jpn J Toxicol Environ Health 1992] (Hashizume et al., 1992)

表 1 マウスにおける BHA 単回経口投与後の血液、肝臓及び腎臓中 BHA、グルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体濃度 (µg/g(BHA として))

組織	投与量 (mg/kg)	測定対象物 質	投与後時間 (h)				
			0.5	1	3	8	24
血液	50	BHA	2.9 ± 0.9	1.1 ± 0.8	ND	ND	—
		グルクロン 酸抱合体	5.8 ± 2.4	3.5 ± 0.7	ND	ND	—
		硫酸抱合体	0.3 ± 0.2	0.6 ± 0.4	ND	ND	—
	500	BHA	27.5 ± 2.5	27.2 ± 23.6	15.6 ± 12.6	ND	ND
		グルクロン 酸抱合体	29.9 ± 6.7	25.1 ± 9.9	22.8 ± 8.9	2.7 ± 2.2	ND
		硫酸抱合体	4.5 ± 2.5	0.8 ± 1.5	0.2 ± 0.5	0.3 ± 0.5	ND
肝臓	50	BHA	5.3 ± 3.6	3.3 ± 3.4	ND	ND	—
		グルクロン 酸抱合体	7.8 ± 3.3	4.7 ± 1.7	ND	ND	—
		硫酸抱合体	1.3 ± 1.1	1.7 ± 1.4	ND	ND	—
	500	BHA	76.6 ± 36.0	32.0 ± 19.6	27.1 ± 25.6	ND	ND
		グルクロン 酸抱合体	20.2 ± 2.6	52.3 ± 9.3	50.7 ± 28.2	3.3 ± 2.7	ND

		硫酸抱合体	30.3 ± 16.6	3.5 ± 3.1	4.1 ± 4.9	ND	ND
腎臓	50	BHA	1.5 ± 2.6	ND	ND	ND	—
		グルクロン酸抱合体	38.8 ± 17.9	36.9 ± 22.0	2.5 ± 4.3	ND	—
		硫酸抱合体	4.5 ± 1.9	5.8 ± 3.0	6.0 ± 4.8	ND	—
	500	BHA	45.6 ± 4.6	37.4 ± 26.4	40.2 ± 32.1	ND	ND
		グルクロン酸抱合体	92.1 ± 34.3	126.1 ± 50.2	132.6 ± 74.4	28.7 ± 16.4	14.0 ± 24.3
		硫酸抱合体	11.7 ± 15.1	22.8 ± 21.4	29.3 ± 27.8	2.9 ± 0.9	1.6 ± 2.7

n=4~6 平均値 ± 標準偏差 ND：検出限界未満 —：試料採取せず

表2 マウスにおける BHA 単回経口投与後の胃及び腸管から回収された BHA の投与量に対する割合 (%)

組織	投与量 (mg/kg)	投与後時間 (h)					
		0.5	1	3	8	24	48
胃	50	32.0 ± 4.3	42.3 ± 16.8	22.1 ± 5.6	13.0 ± 4.5	—	—
	500	66.9 ± 6.9	60.5 ± 10.3	49.9 ± 8.8	24.8 ± 5.3	4.5 ± 3.3	0.3 ± 0.2
腸管	50	40.9 ± 11.6	18.0 ± 12.9	7.9 ± 2.6	1.0 ± 1.4	—	—
	500	8.6 ± 1.9	5.2 ± 2.4	3.9 ± 1.3	0.6 ± 0.4	0.2 ± 0.1	ND

n=4~6 平均値 ± 標準偏差 ND：0.1%未満 —：測定せず

(2) ラット

ラット (SD 系、雄 39 匹) に [methyl-¹⁴C] 標識 BHA を単回強制経口投与 (1.5 mmol/kg 体重 (270 mg/kg 体重)) し、体内動態試験が実施された。尿、糞、血液及び主な組織を投与 0.5、1、3、6、12、16、17、18、24、48、72、168 及び 240 時間後に採取した。

多くの組織において総放射活性は、時間の経過とともに指数関数的に増加し、投与後 10~24 時間で最大となり、その後指数関数的に減少した。

投与 48 時間後までにほぼすべての被験物質が排泄され、尿には投与量の 41%、糞便には 53% が排泄された。(参照 3、13) [EFSA 2011, 3.1.1] [Drug Metab Dispos 1985] (Ansari and Hendrix, 1985)

ラット (F344 系、雄 3 匹/群) に ¹⁴C 標識 BHA を単回強制経口投与 (1 g/kg 体重) し、体内動態試験が実施された。動物にはメトキシ基又は *tert*-ブチル基のいずれかを標識した 2-BHA 又は 3-BHA の 4 種類の薬物のうちいずれかを投与した。

尿、糞又は呼気への排泄率を表 3 に示した。投与後 48 時間で、投与量の 87~96% が尿、糞便及び呼気に排出された。(参照 3) [EFSA 2011, 3.1.1] (Hirose et al., 1987b)

表3 ラットにおける ^{14}C 標識 BHA 単回強制経口投与後の尿、糞又は呼気中排泄率(%)

投与物質	^{14}C 標識部位	尿	糞	呼気	合計 ^a
2-BHA	メトキシ基	46.5	29.6	8.3	84.4
	<i>tert</i> -ブチル基	69.0	18.1		87.1
3-BHA	メトキシ基	49.8	28.3	13.7	91.8
	<i>tert</i> -ブチル基	63.7	28.8		92.5

n=3

a: 合計は、参照3のデータから算出した。

ラット (F344 系、6 週齢、雄 3 匹/群) に ^{14}C 標識 BHA を単回強制経口投与 (1 g/kg 体重) し、体内動態試験が実施された。動物には、メチル基又は *tert*-ブチル基のいずれかを ^{14}C 標識した 2-BHA 又は 3-BHA の 4 種類の薬物のうちいずれかを投与した。

投与後 2 日間プールした尿及び糞便中代謝物を TLC によって同定し、さらに酵素での加水分解によるさらなる性状解析と同定を実施した。標準品の確認は、陽子核磁気共鳴分光法及び電子衝撃イオン化質量分析によって行った。

尿及び糞から回収した放射活性の投与量に対する割合を表 4 に示した。[butyl- ^{14}C] 標識 2-又は 3-BHA の排泄物中の総放射活性回収率は約 92%であった。

2-BHA 及び 3-BHA の代謝物の多くは、抱合体 (2-BHA 66%、3-BHA 53%) であった。3-BHA を投与した動物の尿の主な代謝物は、3-BHA のグルクロン酸抱合体であった。糞便には、未変化体の 3-BHA とグルクロン酸抱合体の他に、少量の *tert*-ブチルヒドロキノン硫酸抱合体がみられた。

2-BHA を投与した動物の尿における主な代謝物は、2-BHA の硫酸抱合体及びグルクロン酸抱合体並びに 4-*tert*-ブチル-5-メトキシ-1,2-ベンゾキノンであった。糞便には未変化体の 2-BHA がみられた。(参照 3、14) [EFSA 2011, 3.1.1] [Toxicology 1988] (Hirose et al., 1988)

表 4 ラットにおける ^{14}C 標識 BHA 単回強制経口投与後の尿及び糞中排泄率 (%)^a

投与物質	^{14}C 標識部位	尿	糞	合計
2-BHA	メチル基	52.2 ± 8.1 ^b	20.7 ± 6.9 ^b	73.0 ± 6.9
	<i>tert</i> -ブチル基	72.2 ± 7.1	19.3 ± 2.5	91.5 ± 4.6
3-BHA	メチル基	45.6 ± 3.9	35.8 ± 3.8	81.3 ± 1.5
	<i>tert</i> -ブチル基	54.0 ± 0.7 ^b	38.2 ± 4.6	92.2 ± 5.5

n=3 平均 ± 標準偏差

a: 投与量に対する割合

b: 参照 14 の表 3 及び 4 の数値を記載

ラットにおける 2-BHA 及び 3-BHA の代謝について、前胃及び組織中巨大分子への結合の点から検討した。

ラット (F344 系、雄 3 匹/群) に[butyl-¹⁴C]又は[methyl-¹⁴C]標識 3-BHA を単回強制経口投与 (1 g/kg 体重) し、投与 6 時間後に採取した前胃、腺胃及び胃内容物を TLC で比較した。前胃及び腺胃の上皮に有意な量の代謝物はみられなかった。

また、結合試験として、ラット (F344 系、雄 3 匹/群) に[butyl-¹⁴C]又は[methyl-¹⁴C]標識 3-BHA、[butyl-¹⁴C]標識 2-BHA を単回強制経口投与 (1 g/kg 体重) した。それぞれの群はさらに、被験物質の投与前に非標識の 3-BHA を 6 日間混餌投与 (1%) した群と投与しなかった群に分けた。結果から、**BHA は代謝活性化することなく前胃の上皮への結合に代謝活性化は関与せず作用し、その作用は DNA 及び又は RNA への結合は認められなかったと関係ないことが示唆された。**(参照 3) [EFSA 2011, 3.1.1] (Hirose et al., 1987a)

ラット (F344 系、雄、匹数不明) に ¹⁴C 標識 3-BHA を経口投与 (0.01、0.1、1 又は 2%) し、前胃への結合を調べた。¹⁴C 標識 3-BHA の 0.01% は、約 2.25 mg/kg 体重に相当した。

投与 6 時間後の前胃の放射活性は、腺胃、肝臓、腎臓及び血漿より高かった。

0.1% 投与群の前胃のタンパク質への共有結合率は低かったが、1 及び 2% 投与群では高かった。3-BHA の経口投与後の前胃への結合率は、静脈内投与と比較して、54 倍高かった。(参照 3) [EFSA 2011, 3.1.1] (Morimoto et al., 1992)

ラット (Wistar 系、雌 7 匹/群) に 3-BHA を妊娠 6~15 日に強制経口投与 (200、400 又は 800 mg/kg 体重/日) し、最終投与 3 時間後の母動物の肝臓及び血清並びに胎児について、HPLC によって 3-BHA の未変化体及び抱合体を測定した (定量限界: 肝臓 0.10 µg/g、血清 0.03 µg/g、胎児 0.05 µg/g)。

結果を表 5 に示した。全投与群の胎児に 3-BHA が検出されたが、その濃度は肝臓及び血清中濃度より低かった。また、全投与群の肝臓、血清及び胎児において、抱合体と未変化体の比率 (抱合体/未変化体) は、おおそ一定であった (肝臓約 12、血清約 60、胎児約 1.3~1.8)。(参照 3、15) [EFSA 2011, 3.1.1] [Jpn J Toxicol Environ Health 1993] (Yamada et al., 1993)

表 5 ラットにおける 3-BHA 反復経口投与後の母動物の肝臓及び血清並びに胎児中 3-BHA の未変化体及び総 3-BHA^a 濃度 (µg/g)

組織	測定物質	投与群 (mg/kg 体重/日)		
		200	400	800
肝臓	未変化体	1.61 ± 0.75	2.66 ± 2.33	1.90 ± 1.07
	総 3-BHA	19.6 ± 6.1	33.1 ± 22.3	21.7 ± 11.2
血清	未変化体	0.15 ± 0.05	0.52 ± 0.36	0.83 ± 0.40
	総 3-BHA	9.54 ± 2.17	30.8 ± 19.2	50.8 ± 33.0
胎児	未変化体	0.17 ± 0.05	0.57 ± 0.40	0.80 ± 0.20
	総 3-BHA	0.25 ± 0.09	0.72 ± 0.47	1.47 ± 0.51

n=7 平均値 ± 標準偏差 定量限界: 肝臓 0.10 µg/g、血清 0.03 µg/g、胎児 0.05 µg/g

a: 総 3-BHA は、未変化体及び抱合体の合計量

ラット体内における 3-BHA の推定代謝経路を図 1 に示した。(参照 16)
[Carcinogenesis 1991, Figure 1]

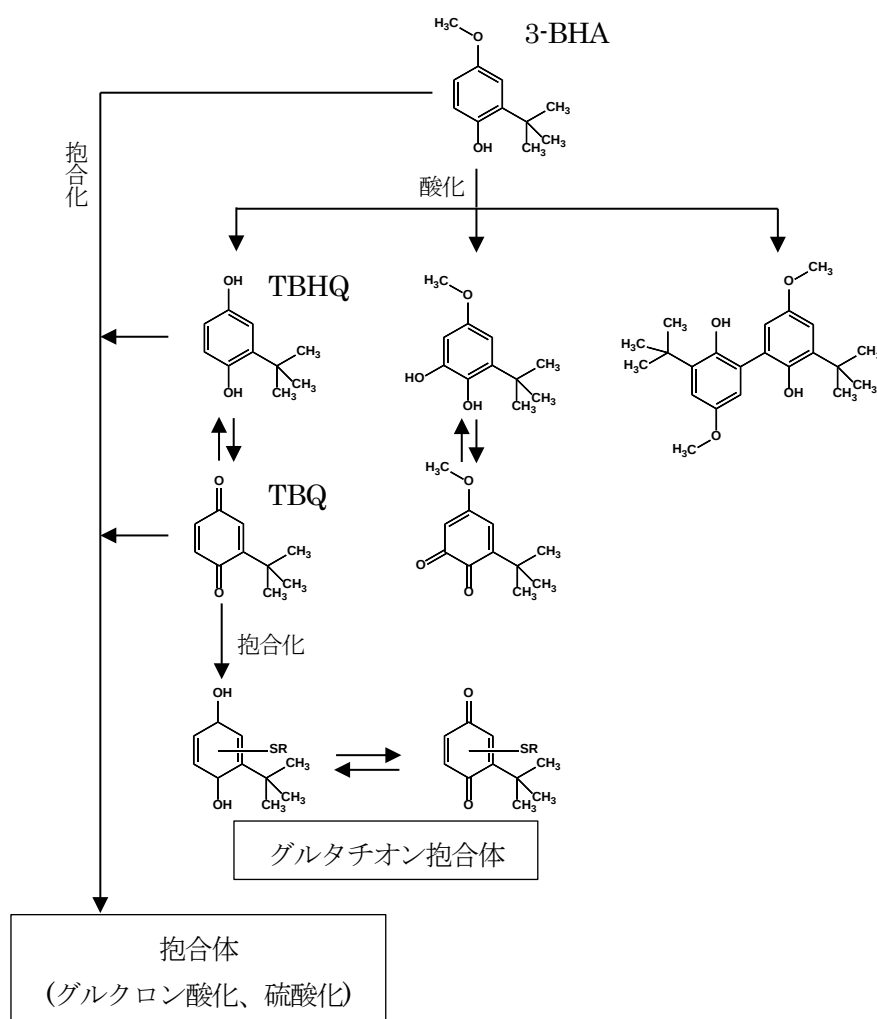


図 1 ラット体内における 3-BHA の推定代謝経路 (参照 16 の改変)

(3) イヌ

イヌ (ビーグル種、5 か月齢、雄 3 頭/群) に BHA を 7 日間混餌投与 (0.03 又は 3%) し、その後[methyl-¹⁴C]標識 BHA を単回腹腔内投与 (5 mg eq/kg 体重) し、全身、血液、尿、糞便及び数種類の組織 (胃の異なる部位を含む) の放射活性を測定した。

最終投与後 48 時間までに、投与した放射標識 BHA の 50~80%が尿に、15~30%が糞便から回収された。

投与 7 日後の胃、肝臓及びその他の組織から回収された放射活性の投与量に対する割合は、それぞれ 0.16~0.19、0.3~1.7 及び 0.02%/g であった。(参照 3、29)

[EFSA 2011, 3.1.3] [Toxicol Lett 1985]

(4) ヒト

健常なヒト（男性、 23 ± 5 歳、8 名）に BHA を 10 日間経口投与（ 0.5 mg/kg 体重/日）し、体内動態試験が実施された。血液は投与 1 及び 8 日の投与 4 時間後まで採血し、尿は投与開始 1 日、4 及び 8 日に投与後 24 時間採取し、動態パラメーター及び関連物質の尿中排泄³について調べられた。

また、BHA の投与前及び投与期間中にアンチピリン及びパラセタモールを経口投与（それぞれ 500 mg/ヒト ）し、唾液及び尿を採取し、肝臓の代謝の第 I 及び II 相における代謝能力について検討した。

BHA の血漿中動態パラメーターは、投与開始直後（1 日）及び 8 日後に測定した。血液、唾液又は尿の BHA 及びその代謝物は、HPLC によって測定した。

BHA 経口投与時の動態パラメーターを表 6 に示した。

尿中から BHA の回収率は、投与 1 日後では $52 \pm 16\%$ 、投与 8 日後では $75 \pm 12\%$ であった。TBHQ の回収率は、投与 1、4 及び 8 日後でそれぞれ、 7.4 ± 1.8 、 $10.5 \pm 3.1\%$ 及び $13.0 \pm 3.9\%$ であった。BHA 及び TBHQ とともに、投与 1 日後より 4 又は 8 日の尿に有意に多く検出された。

このことは、ヒトにおける第 I 又は II 相における代謝酵素の誘導又は阻害によるか、又は体内における BHA とその代謝物の蓄積によるものと考えられた。（参照 3、17） [EFSA 2011, 3.1.4] [Hum Toxicol 1989] (Verhagen et al., 1989b)

表 6 ヒトにおける BHA10 日間経口投与時の動態パラメーター

パラメーター	投与日(日) ^a	
	1	8
$T_{1/2}$ (min)	61 ± 9	56 ± 4
AUC_{0-4h} (ng · h/mL)	161 ± 44	103 ± 49
C_{max} (ng/mL)	141 ± 25	111 ± 48
T_{max} (min)	58 ± 33	80 ± 22
CL (mL/min/kg)	47 ± 11	61 ± 34
Vd (L)	309 ± 139	434 ± 169

n=6 (1 名は採血試験に参加せず、もう 1 名は分析上の問題のためデータを削除した。)

平均 ± 標準偏差

a : 各投与日の投与後に血液を採取した。

(5) 代謝物 TBHQ の体内動態試験

① ラット

ラット（系統、性別及び匹数不明）に ^{14}C 標識 TBHQ を単回投与⁴（15、48、92、383、380 又は 400 mg/kg 体重）した。糞及び尿を毎日採取した。試験期間の終わりに、血液、脳、腎臓、肝臓、消化管並びに腎臓周囲、大網及び皮下脂肪を採取した。

³ 以前実施された別のヒトを用いた試験（BHA 0.5 mg/kg 体重を経口投与）において、投与後の尿に BHA 及び TBHQ の未変化体がみられなかったことから、本試験では抱合体の総量のみを測定した。

⁴ 経口投与と推察される。

1 投与後 24 時間の尿から投与量の 55～82.7%に相当する放射活性が回収され、最
2 終的な総回収率は投与量の 78～88%に相当する放射活性であった。回収された放
3 射活性の 70～76%が *O*-硫酸抱合体に相当し、1～2%が *O*-グルクロン酸抱合体に
4 相当した。糞には、投与量の 2～6%に相当する放射活性が検出された。

5 92 mg/kg 体重投与群の組織にごく僅かの放射活性が検出されたが、92 mg/kg 体
6 重超の投与群では検出されなかった。(参照 18) [FAS 40, 2.1.1.1 の 1 つ目の試験]
7 (Astill et al., 1967a)

8
9 ラット（系統、性別及び匹数不明）に ¹⁴C 標識 TBHQ を 17 日間混餌投与
10 (0.029%(5.7 mg eq/kg 体重/日相当)) し、最終投与後に肝臓、腎臓、脳及び脂肪
11 を採取した。

12 肝臓、腎臓、脳及び脂肪中濃度はそれぞれ 0.06～0.34、0.09～0.38、0.06～0.56、
13 0.06～0.37 mg eq/g(湿重量)であった。(参照 10、18) [EFSAJ 2004, p8 の 2 段落
14 目] [FAS 40, 2.1.1.1 の 2 つ目の試験] (Astill et al., 1967a)

15
16 ラット（系統及び匹数不明、雌雄）に TBHQ を単回強制経口投与（100、200、
17 300 又は 400 mg/kg 体重）し、尿を投与前 3 日間及び投与後 6 日間採取した。

18 400 mg/kg 体重投与群において、投与後に運動失調がみられたが、2～3 時間後
19 に回復した。

20 全投与群において、投与後 3～4 日間で関連物質の排泄が終了したようであった。
21 投与量の 66%が *O*-硫酸抱合体として、10%未満が *O*-グルクロン酸抱合体として
22 回収された。100 mg/kg 体重投与群では、尿中排泄量がほぼ投与量に相当した。
23 200 mg/kg 体重以上投与群では、投与量の約 33%が尿ではなく、糞から回収され
24 た。

25 100 mg/kg 体重投与群では、TBHQ の未変化体の排泄は投与量の約 12%であっ
26 たが、より高用量では低下し、400 mg/kg 体重投与群では 2%であった。

27 他に主要な代謝物はみられなかった。(参照 18) [FAS 40, 2.1.1.1 の 3 つ目の試
28 験] (Astill et al., 1968)

29
30 ラット（系統、性別及び匹数不明）に TBHQ を長期間混餌投与（0.16 又は 0.5%）
31 した。投与 12 及び 20 か月後に 2 匹から尿を採取した。また、血清を投与 6、12、
32 20 か月後及び剖検時に 5 匹から採取した。また、剖検時に腎臓周囲、大網及び皮
33 下脂肪を採取し、性別及び用量ごとにプールした。

34 投与 12 か月後では、両投与群の雄の尿には、ほぼ等量の *O*-硫酸抱合体及び *O*-
35 グルクロン酸抱合体が検出された。雌では、検出された関連物質のうち約 3 分の
36 2 が *O*-硫酸抱合体で、残りが *O*-グルクロン酸抱合体であった。

37 投与 20 か月後では、雌雄ともに排泄された抱合体のほとんどが *O*-硫酸抱合体
38 であり、*O*-グルクロン酸抱合体はほぼみられなかった。

39 ごく微量の TBHQ が血清及び脂肪に検出された。(参照 18) [FAS 40, 2.1.1.1 の
40 4 つ目の試験] (Astill et al., 1968)

妊娠ラット（SD 系、48 週齢、匹数不明）⁵に帝王切開の前日、¹⁴C 標識 TBHQ を単回経口投与（40 mg/kg 体重）し、糞及び尿を帝王切開時（投与後 7.6～16.7 時間）まで採取し、また胎児、子宮、羊水、消化管、肝臓、腎臓、脳及び脂肪を採取し、放射活性を測定した。

投与後 16.7 時間の尿で投与量の放射活性の約 74%が回収された。

投与後 7.6 時間の消化管から投与量の放射活性の 10%が回収され、16.7 時間後では 8.5%であった。

糞中放射活性は、投与後 7.6 及び 16.7 時間ではそれぞれ投与量の 0.2 及び 0.02%であった。子宮、羊水及び他の臓器でも、同様に低量の放射活性が検出された。

本試験の結果に基いて、ヒトへのばく露の可能性を考えた場合、考えられる最高量（0.1 mg/kg 体重/日）を摂取すると、胎児は TBHQ として 1 日摂取量の 1%に暴露され、またより高濃度の抱合体にばく露されることになるかと推測された。（参照 10、18）[\[EFSAJ 2004, p8 の 2 段落目\]](#) [\[FAS 40, 2.1.1.1 の 6 つ目の試験\]](#) (Astill and Walton, 1968)

ラット（F344 系、雄、匹数不明）に BHA を経口投与（0.01、0.1 又は 1.0%溶液、4 mL）した。投与 3 時間後の 0.01、0.1 及び 1.0%投与群の前胃粘膜に TBQ がそれぞれ 0.00453、0.04504 及び 0.05520 µg/匹検出され、BHA は 1.77、18.84 及び 216.28 µg/匹検出された。（参照 18）[\[FAS 40, 2.1.1.1 の 7 つ目の試験\]](#) (Morimoto et al., 1991)

ラット（F344 系、雄）に ¹⁴C 標識 BHA を経口投与（0.01～2.0%、4 mL）したところ、前胃粘膜のホモジネートには TBHQ が検出されなかったことから、前胃粘膜のホモジネートをドデシル硫酸 Na で処理後、TBQ を TBHQ に還元することで、より容易に検出できるようになった。

前胃粘膜のホモジネートの TBHQ 量は、BHA の投与量に比例していた。前胃の ¹⁴C の共有結合の総量に対する TBHQ の総組織中残留量の割合は、BHA を 0.01～0.03%経口投与した場合では 0.1～2.0%であった。（参照 18）[\[FAS 40, 2.1.1.1 の 8 つ目の試験\]](#) (Morimoto et al., 1992)

②イヌ

イヌ（ビーグル種、体重約 11 kg、雄）に TBHQ を単回経口投与（100 mg/kg 体重、ひき肉とともに投与）し、尿を投与前 3 日間及び投与後 6 日間採取した。

尿への排泄は、投与 48 時間後までにほぼ終了した。

主な尿中排泄物は *O*-硫酸抱合体及び *O*-グルクロン酸抱合体であり、少量の TBHQ が検出された。

⁵ 生殖発生毒性試験の F₂ 母動物の第 3 産から選択した動物を用いた。離乳以降、TBHQ を混餌投与（0.5%）されている。

尿の総回収率は77～98%であり、そのうち約3分の2が*O*-硫酸抱合体で、約3分の1が*O*-グルクロン酸抱合体であった。(参照18) [FAS 40, 2.1.1.2 の1つ目の試験] (Astill et al., 1967b)

イヌ(品種不明、雌雄26匹)にTBHQを長期間混餌投与(0.05、0.1又は0.5%)した。血清及び尿を投与前9日、投与前日並びに投与開始3、6、12、12及び24か月後に採取した。血清は、投与後23時間採取した。投与開始12か月後では各投与群の雌雄各1例から、投与開始24か月後には残りの動物から、腎臓周囲、大網及び皮下脂肪を採取した。

TBHQ全投与群の尿に*O*-硫酸抱合体及び*O*-グルクロン酸抱合体が検出された。雄では*O*-硫酸抱合体及び*O*-グルクロン酸抱合体の比率が2:1であったが、雌ではほとんどが*O*-硫酸抱合体であった。

ごく少量のTBHQが脂肪(最高濃度は雄で7 µg/g、雌で17 µg/gであったが、ほとんどの動物で検出限界未満)及び血清(0.7 µg/mLまで)に検出された。(参照18) [FAS 40, 2.1.1.2 の2つ目の試験] (Astill et al., 1967b)

③ヒト

ヒト(男性、年齢及び人数不明)にTBHQを次の4つの方法で経口投与した。①TBHQ 150 mgを含むゼラチンカプセル、②2% TBHQを含有するコーン油とグラハムクラッカー混合物(TBHQとして125 mg相当)、③綿実油に溶解したTBHQ 100 mgを含有するゼラチンカプセル、④グラハムクラッカーとTBHQ、2%綿実油及び2%粉砂糖の混合物20g(TBHQ投与量は20～70 mg)。①～③では投与物の摂取直後にミルクを摂取し、④ではドーナッツ及びコーヒーを摂取した。血液を投与3、5及び24時間後に、尿を投与前24時間から投与後72時間まで採取し、血清中のTBHQ濃度及び尿中代謝物濃度を測定した。

TBHQは尿に全く検出されず、*O*-硫酸抱合体及び*O*-グルクロン酸抱合体として排泄(比率3:1)された。これらの代謝物は投与後24時間に多く検出された。

TBHQの投与方法が、尿における回収率に大きく影響した。①及び③では、尿からは僅か4～22%しか回収されなかった。②では90～100%回収された。全投与方法の尿に同じ代謝物が検出された。

投与3時間後の血清中TBHQ濃度は、①及び③では4～12 µg/mLであったが、②では31～37 µg/mLであった。投与24時間後には、①及び③では2～12 µg/mL、②では15 µg/mLに低下した。(参照18) [FAS 40, 2.1.1.3] (Astill et al., 1967c)

④代謝試験

ラット(Wistar系)にBHA 400 mg/kg体重又はTBHQ 200 mg/kg体重を腹腔内投与し、尿をGC-MSで分析したところ、2種類の含硫代謝物、3-*tert*-ブチル-5-メチルチオヒドロキノン及び3-*tert*-ブチル-6-メチルチオヒドロキノンが検出された。

肝臓のミクロソーム試料において、NADPH生成系を含む条件で2種類の代謝

物を生成させて精製し、構造を解析したところ、TBHQ の 5-又は 6 位のグルタチオン抱合体であることが確認された。これらの代謝物は、TBHQ のキノン又はセミキノン体のグルタチオン抱合体への代謝変換から生じたと推測された。この反応にグルタチオン S-トランスフェラーゼは関与しなかった。チトクローム P450 の阻害物質は著しく TBHQ のグルタチオン抱合体の形成を低下させることから、チトクローム P450 による酸化が TBHQ の TBQ への活性化に役割を果たしていることを示唆していた。(参照 18、30) [FAS 40, 2.1.2 の 1 段落目] [Drug Metab Dispos 1985] (Tajima et al., 1991)

好氣的条件、NADPH 存在下のラット肝ミクロソームで TBHQ から *tert*-ブチルセミキノンアニオンラジカル(TBQ^{·-})が生成された。スクシニル化チトクローム C の減少を指標として、500 µmol/L TBHQ と 5 µmol/L TBQ から、肝ミクロソーム中で同程度にスーパーオキシドアニオン (O₂^{·-}) が生成されることが示された。キノンから形成されるセミキノンの自動酸化がスーパーオキシド形成の原因であり、ヒドロキノンは自動酸化を通して酸化還元反応に加わると推測された。TBQ はラットの培地への LDH の放出を指標とした肝細胞膜の傷害を誘導したが、TBHQ では傷害はみられなかった。セミキノン依存性スーパーオキシドの形成が BHA の毒性作用に寄与していると推測された。(参照 18、31) [FAS 40, 2.1.2 の 3 つ目の試験] [Toxicology 1992] (Bergmann et al., 1992)

ラット (Wistar 系、雄) に BHA を 14 日間混餌投与 (1.5% 添加) し、同時にプロスタグランジン H 合成酵素の阻害剤であるアセチルサリチル酸 (0.2%) 又はインドメタシン (0.002%) を飲水投与した。両物質の投与によって、対照群と比較して尿への TBQ の排泄量が有意に減少した。BHA 及びその代謝物の TBHQ 及び TBQ の尿への合計排泄量は、各群同様であった (対照群: 46.9%、アセチルサリチル酸投与群: 45.4%、インドメタシン投与群: 43.5%)。これらの結果から TBHQ から TBQ への代謝におけるプロスタグランジン H 合成酵素の *in vivo* での役割が示唆された。(参照 18) [FAS 40, 2.1.2 の 6 つ目の試験] (Schilderman et al., 1993a)

ラット (F344 系、雄) に TBHQ を腹腔内投与 (1.0 mmol/kg 体重) したところ、胆汁に 3 種類のグルタチオン抱合体 (2-*tert*-ブチル-5-グルタチオン-S-イルヒドロキノン、2-*tert*-ブチル-6-グルタチオン-S-イルヒドロキノン及び 2-*tert*-ブチル-3,6-ビスグルタチオン-S-イルヒドロキノン) が検出された。TBHQ の硫黄を含む代謝物が尿に検出された。本試験の結果、ラットを用いた *in vivo* 試験において TBHQ が酸化及びグルタチオン抱合を受けたことが示された。これらの抱合体は胆汁に排泄され、尿排泄の前にはさらに代謝される。TBHQ の硫黄を含む代謝物が腎臓と膀胱に対する TBHQ の毒性に役割を果たすほど十分な量で存在することが示唆された。(参照 18) [FAS 40, p3, 2.1.2 の 7 つ目の試験] (Peters et al., 1996a)

2. 残留試験

(1) 豚

豚（交雑種(LW)、去勢雄 1 頭/時点）に 3-BHA を 91 日間混餌投与（150 又は 600 ppm(334 又は 1,260 mg/頭/日相当⁶)）し、投与開始 6 週間並びに最終投与 0、1、2、3、5 及び 7 日後に肝臓、腎臓、筋肉、脂肪及び小腸を採材し、GC-MS 又は HPLC によって組織中 BHA 濃度を測定⁷した（検出限界：GC-MS 0.025 µg/g、HPLC 0.02 µg/g）。

結果を表 7 に示した。

150 ppm 投与群では、筋肉、脂肪及び小腸において最終投与 1 日後に BHA が検出されたが、その後は全組織とも検出限界未満であった。

600 ppm 投与群では、肝臓及び小腸において最終投与 2 日後まで BHA が検出され、脂肪では最終投与 3 日後まで検出された。最終投与 5 日後以降は、全組織において検出限界未満であった。（参照 19） **【鶏及び豚残留試験】**

表 7 豚における BHA 91 日間混餌投与後の組織中残留濃度 (µg/g) ^a

投与群 (ppm)	組織	投与開始 6 週間 後	最終投与後日数(日)					
			0	1	2	3	5	7
150	肝臓	0.04 <LOD ^c	0.03 <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c
	腎臓	0.03 0.05	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c
	筋肉	0.03 <LOD ^c	0.03 <LOD ^c	0.03 <0.02 ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c
	脂肪	0.05 0.10	0.04 0.04	<LOD ^b 0.02	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c
	小腸	0.05 0.10	<LOD ^b <LOD ^c	0.03 <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c
600	肝臓	0.06 <LOD ^c	0.06 <LOD ^c	0.04 <LOD ^c	0.03 —	<LOD ^b —	<LOD ^b —	<LOD ^b —
	腎臓	0.06 0.23	0.03 ^d 0.02	0.03 <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b —	<LOD ^b —	<LOD ^b —
	筋肉	0.03 ^d <LOD ^c	0.03 ^d <LOD ^c	0.03 <LOD ^c	<LOD ^b —	<LOD ^b —	<LOD ^b —	<LOD ^b —
	脂肪	0.08 0.13	0.12 0.08	0.03 <LOD ^c	0.03 0.04	0.03 0.05	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c
	小腸	0.05 0.48	0.14 0.10	0.04 <LOD ^c	0.03 <LOD ^c	<LOD ^b —	<LOD ^b —	<LOD ^b —

n=1 <LOD：検出限界未満 —：測定せず

a：上段は GC-MS、下段は HPLC の測定値

b：検出限界 0.025 µg/g

c：検出限界 0.02 µg/g

d：参照 17 には「0.02」と記載されているが、LOD (0.025 µg/g) 以上の数値と判断し、「0.03」と記載

⁶ 参照 19 に記載されている豚の被験物質総摂取量を投与期間で除して算出した。

⁷ 分析は 2 施設で実施しており、それぞれ GC-MS 又は HPLC によって測定した。

した。

(2) 鶏

鶏（肉用種、初生、雌 10 羽/時点(投与開始 4 週間後のみ 16 羽)）に 3-BHA を 56 日間混餌投与（150 又は 600 ppm(13 又は 49 mg/羽/日相当⁸)）し、投与開始 4 週間並びに最終投与 0、1、2、3、5 及び 7 日後に肝臓、腎臓、筋肉、脂肪及び皮膚を採材し、GC-MS 又は HPLC によって組織中 BHA 濃度を測定⁹した（検出限界：GC-MS 0.025 µg/g、HPLC 0.02 µg/g）。なお、分析用試料として、5 羽分（投与開始 4 週間後のみ 8 羽分）をまとめて 1 試料とし、2 試料を作製した。

結果を表 8 に示した。

150 ppm 投与群では、肝臓及び腎臓では検出されなかった。筋肉では最終投与 1 日後のみ検出され、その後は検出されなかった。脂肪では最終投与 1 日後まで、皮膚では最終投与 3 日後まで検出されたが、その後は検出限界未満であった。

600 ppm 投与群では、肝臓及び腎臓では最終投与 1 日後以降は検出されなかった。筋肉では全時点で検出されなかった。脂肪及び皮膚では最終投与 2 日後まで BHA が検出された。（参照 19） **【鶏及び豚残留試験】**

表 8 鶏における BHA 56 日間混餌投与後の組織中残留濃度 (µg/g) ^a

投与群 (ppm)	組織	投与開始 4 週間 後	最終投与後日数(日)					
			0	1	2	3	5	7
150	肝臓	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c
	腎臓	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b —	<LOD ^b <LOD ^c
	筋肉	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b 0.04	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c
	脂肪	0.04 <LOD ^c	<LOD ^b 0.11	<LOD ^b 0.02	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c
	皮膚	0.05 <LOD ^c	<LOD ^b 0.04	<LOD ^b 0.02	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b 0.03	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c
600	肝臓	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b 0.02	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b —	<LOD ^b —	<LOD ^b —
	腎臓	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b 0.02	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b —	<LOD ^b —	<LOD ^b —
	筋肉	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b —	<LOD ^b —	<LOD ^b —	<LOD ^b —
	脂肪	0.07 <LOD ^c	0.29 0.62	0.03 0.09	<LOD ^b 0.09	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b —
	皮膚	0.12 0.04	0.19 0.25	<LOD ^b 0.04	<LOD ^b 0.04	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b —

n=1 <LOD：検出限界未満 —：測定せず

a：上段は GC-MS、下段は HPLC の測定値

⁸ 参照 19 に記載されている鶏の被験物質総摂取量を投与期間で除して算出した。

⁹ 分析は 2 施設で実施しており、それぞれ GC-MS 又は HPLC によって測定した。

b : 検出限界 0.025 µg/g

c : 検出限界 0.02 µg/g

(3) 鶏卵

採卵鶏（白色レグホン種、9 か月齢、8 羽/群）に 3-BHA を 21 日間混餌投与（150 又は 600 ppm（それぞれ 17、68 mg/羽/日相当¹⁰））し、投与開始 7、14 日後並びに最終投与 0、1、2、3、5 及び 7 日後に採卵し、GC-MS 又は HPLC によって卵黄及び卵白中 BHA 濃度を測定¹¹した（検出限界：GC-MS 0.025 µg/g、HPLC 0.02 µg/g）。

結果を表 9 に示した。

150 ppm 投与群では、全時点の卵黄に BHA が検出され、投与開始 14 日後に最高濃度（0.10 µg/g）がみられた。卵白では全時点で BHA は検出されなかった。

600 ppm 投与群でも、150 ppm 投与群と同様に、全時点の卵黄に BHA が検出され、投与開始 7 日後に最高濃度（0.34 µg/g）がみられた。卵白では全時点で BHA は検出されなかった。（参照 20）**[鶏卵残留試験]**

表 9 採卵鶏における BHA 21 日間混餌投与後の卵黄及び卵白中残留濃度（µg/g）^a

投与群 (ppm)	試料	投与開始後日数 (日)		最終投与後日数(日)					
		7	14	0	1	2	3	5	7
150	卵黄	0.08 0.04	0.10 0.05	0.09 0.08	0.09 0.07	0.08 0.04	0.08 0.04	0.08 <LOD ^c	0.05 <LOD ^c
	卵白	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c
600	卵黄	0.25 0.34	0.30 0.32	0.31 0.27	0.28 0.29	0.28 0.26	0.27 0.18	0.09 0.07	0.07 0.02
	卵白	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c	<LOD ^b <LOD ^c

n 数不明 <LOD : 検出限界未満

a : 上段は GC-MS、下段は HPLC の測定値

b : 検出限界 0.025 µg/g

c : 検出限界 0.02 µg/g

(4) にじます、こい及びあゆ

にじます、こい又はあゆ（10 尾以上/時点）に BHA をそれぞれ 63、59 又は 57 日間混餌投与（全魚種において 50 又は 150 ppm）し、最終投与 7 日後に筋肉及び内臓（消化管内容物および腎臓を除く。）を採取¹²し、GC-MS によって残留濃度を測定した（検出限界 0.05 µg/g）。なお、50 及び 150 mg/kg 飼料の投与量は、にじますで 0.33 及び 0.98 mg/kg 体重/日相当、こいで 0.60 及び 1.8 mg/kg 体重/日相当、あゆで 0.81 及び 2.6 mg/kg 体重/日相当であった。¹³

¹⁰ 参照 21 に記載されている鶏の被験物質総摂取量を投与期間で除して算出した。

¹¹ 分析は 2 施設で実施しており、それぞれ GC-MS 又は HPLC によって測定した。

¹² 各時点で 10 尾以上から採取しているが、分析した検体数は不明であった。

¹³ 参照 22 のデータから算出した。

結果を表 10 に示した。

筋肉中濃度は、全魚種の両投与群のいずれの時点においても検出限界未満であった。

内臓については、全魚種において残留がみられたが、最終投与 7 日後には検出限界未満であった。(参照 21) **[魚残留試験]**

表 10 にじます、こい及びあゆにおける BHA 混餌投与後の筋肉及び内臓中濃度 (μg/g)

魚種	添加量 (ppm)	組織	最終投与後日数(日)			
			1	2	3	7
にじます	50	筋肉	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
		内臓	0.05	<LOD	<LOD	<LOD
	150	筋肉	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
		内臓	0.13、0.12	0.08	<LOD	<LOD
こい	50	筋肉	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
		内臓	0.07	<LOD	<LOD	<LOD
	150	筋肉	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
		内臓	0.22、0.27	<LOD	<LOD	<LOD
あゆ	50	筋肉	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
		内臓	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	150	筋肉	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
		内臓	0.05、0.07	<LOD	0.06	<LOD

n 数不明

3. 遺伝毒性試験

BHA の遺伝毒性に関する各種の *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果を表 11 に示した。

表 11 BHA の遺伝毒性試験結果

	検査項目	試験対象	用量	結果	参照
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535、TA1537、TA1538	0.00375～0.0150% (w/v)	陰性	25 [FAS 15, p5] (Fabrizio, 1974)
		<i>S. typhimurium</i> TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538	5 ～ 5,000 μg/plate (± S9) ^a	陰性	32 [添付資料 16]
		<i>S. typhimurium</i> TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538	10～1,000 μg/plate (±S9)	陰性	25 [FAS 15, p4] (Joner, 1978)
		<i>S. typhimurium</i> TA98、TA100	1 ～ 100 μg/plate (±S9)	陰性	33 [Food Tech 1980] (Bonin and Baker, 1980)
		<i>S. typhimurium</i>	1 ～ 1,000 μg/plate	陰性	3、34

	TA97、TA100、TA102、TA104	(±S9) ^b		[EFSA 2011, Table 4] [Mutat Res 1988] (Hageman et al., 1988)
	<i>S. typhimurium</i> TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538	1～100 µg/plate (±S9)	陰性	3、35 [EFSA 2011, Table 4] [Food Chem Toxicol 1990] (Williams et al., 1990)
	<i>S. typhimurium</i> TA97、TA98、TA100、TA102	0.5～100 µg/plate (–S9) ^a 1～250 µg/plate (+S9) ^a	陰性	3、36 [EFSA 2011, Table 4] [Mutat Res 1990] (Matsuoka et al., 1990)
	<i>S. typhimurium</i> TA97、TA98、TA100、TA104、TA1535	1～67 µg/plate (–S9) 1～100 µg/plate (+S9、TA97、TA104、TA1535) 1～200 µg/plate (+S9、TA98、TA100)	陰性	53 [Environ Mol Mutagen 1992] (Zeiger et al., 1992)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D7	50～200 µg/mL (–S9、4 時間曝露) 50～150 µg/mL (+S9、4 時間曝露) 1～100 µg/mL (–S9、24 時間曝露)	陰性	3、37 [EFSA 2011, Table 4] [Mutat Res 1992] (Rogers et al., 1992)
遺伝子突然変異試験	チャイニーズハムスター肺由来(CHL) V79 細胞 (<i>hprt</i> 座位)	18～54 µg/mL (±ラット又はハムスター由来の S9)	陰性	3、38 [EFSA 2011, Table 4] [Cancer Lett 1985] (Rogers et al., 1985)
	ラット肝上皮細胞 (<i>hprt</i> 座位)	60～90 µg/mL (–S9) ^a	陰性	3、35 [EFSA 2011, Table 4] [Food Chem Toxicol 1990] (Williams et al., 1990)
	<i>Staphylococcus aureus</i> W46	12.5、25 µg/mL (–S9)	陽性	3、39 [EFSA 2011, Table 4]

					[FEMS Microbiol Lett] (Degré and Saheb, 1982)
		<i>S. cerevisiae</i> D4	0.0625 ～ 0.2500% (w/v)	陰性	25 [FAS 15, p5] (Fabrizio, 1974)
染色体異常試験	ヒト胎児肺由来細胞 WI-38	2.0～200 μg/mL	陰性	25 [FAS 15, p4] (Fabrizio, 1974)	
	チャイニーズハムスター肺由来(CHL)細胞	～0.03 μg/mL (－S9)	陰性	25、40 [FAS 15, p4] [Mutat Res 1977] (Ishidate and Odashima, 1977)	
	チャイニーズハムスター由来 Don 細胞	1×10 ⁻⁶ ～1×10 ⁻³ M (－S9) ^c	陰性	25、41 [FAS 15, p4] [JNCI 1977] (Abe and Sasaki, 1977)	
	チャイニーズハムスター卵巣由来(CHO)細胞	33～300 μM (±S9)	陽性 (100 μM、+ S9)	3、42 [EFSA 2011, Table 4] [Mutat Res 1989] (Phillips et al., 1989)	
		25～500 μM (+S9)	陽性 (50～250 μM、+ S9)		
		62～250 μM (+ラット肝ミクロゾーム、±カタラーゼ、3時間処理)	陽性 (－カタラーゼ > +カタラーゼ)		
	CHL 細胞	0.02～0.08 mg/mL (－S9、24 時間又は 48 時間処理) ^a 0.05～0.125 mg/mL (－S9、6 時間処理後 18 時間培養) ^a 0.05～0.15 mg/mL (+S9、6 時間処理後 18 時間培養) ^a	陽性 (0.125 mg/mL、+S9)	3、36 [EFSA 2011, Table 4] [Mutat Res 1990] (Matsuoka et al., 1990)	
	CHO 細胞	62.5～750 μM (±S9、8 又は 24 時間培養) ^a	陽性 (331 μM、+ S9(－カタラ	3、43 [EFSA 2011, Table 4]	

			33.1～662 μ M (+S9(±カタラーゼ)、8又は24時間培養) ^a	ーゼ)、24時間)	[In Vitro Toxicol] (Murli and Brusick)
不定期 DNA 合成(UDS) 試験	ラット肝初代培養細胞(雄)		0.01～5.0 μ g/mL ^a	陰性	3、35 [EFSA 2011, Table 4] [Food Chem Toxicol 1990] (Williams et al., 1990)
姉妹染色分体交換試験	チャイニーズハムスター由来 Don 細胞		$1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L (–S9)	陰性	25、41 [FAS 15, p4] [JNCI 1977] (Abe and Sasaki, 1977)
	CHL V79 細胞		18～54 μ g/mL (±S9)	陰性	3、38 [EFSA 2011, Table 4] [Cancer Lett 1985] (Rogers et al., 1985)
	CHO 細胞		5～500 μ g/mL (±S9) ^a	陰性	3、35 [EFSA 2011, Table 4] [Food Chem Toxicol 1990] (Williams et al., 1990)
遺伝子変換試験	<i>S. cerevisiae</i> D7		50～200 μ g/mL (–S9、4時間曝露) 50～150 μ g/mL (+S9、4時間曝露) 1～100 μ g/mL (–S9、24時間曝露)	陰性	37 [Mutat Res 1992] (Rogers et al., 1992)
DNA 損傷試験 (8-oxodG 検出)	deoxyguanosine		～0.08 mM (37°C、17時間培養)	陰性	55 [Carcinogenesis 1993] (Schilderman et al., 1993)
DNA 損傷試験 (DNA の生物学的不活化試験)	ϕ X-174 DNA (一本鎖)		0.1 mM (37°C、30時間処理)	陰性	
宿主経路試験	<i>S. typhimurium</i> TA1530、G46 マウス(ICR Swiss 系、雌雄不明)		15～1,500 mg/kg 体重	陰性	25 [FAS 15, p5] (Fabrizio, 1974)
	<i>S. cerevisiae</i> D3		15～1,500 mg/kg 体重	陽性	

		マウス(ICR Swiss 系、雌雄不明)	重		
<i>in vivo</i>	染色体異常試験	ラット骨髓細胞	15～1,500 mg/kg	陰性	25 [FAS 15, p4] (Fabrizio, 1974)
	不定期 DNA 合成 (UDS) 試験	マウス (B6C3F1 系、雌雄各 5 匹/群) 前胃上皮	単回強制経口投与 (300 mg/kg 体重、2、4 時間処理)	陰性	3、45 [EFSA 2011, table 4] [Toxicology 1994] (Benford et al., 1994)
	定期 DNA 合成 (RDS) 試験	マウス (B6C3F1 系、雌雄不明、5 匹/群)前胃上皮	単回強制経口投与 (300 mg/kg 体重、6、8、10、12 時間処理)	陽性 (10、12 時間処理)	3、45 [EFSA 2011, table 4] [Toxicology 1994] (Benford et al., 1994)
	伴性劣性致死試験	ショウジョウバエ (雄)	0.001%液 腹部注入	陰性	3、46 [EFSA 2011, table 4] [Int J Radiat 1974] (Prasad and Kamra, 1974)
		ショウジョウバエ (雄)	0.01 ～ 0.15% 溶液 経口投与	陰性	3、47 [EFSA 2011, table 4] [Mutat Res 1976] (Miyagi and Goodheart, 1976)
	優性致死試験	ラット (SD 系、雄)	単回又は 5 日間反復投与 15 ～ 1,500 mg/kg 体重/日	陰性 ^d	25 [FAS 15, p5] (Fabrizio, 1974)
	DNA 損傷試験 (コメットアッセイ)	マウス (ddY 系、雄 4 匹/群) 腺胃、結腸、肝臓、腎臓、膀胱、肺、脳、骨髓	単回経口投与(100 ～1,000 mg/kg 体重) 投与 3 又は 24 時間後に観察	陽性 (腺胃(1,000 mg/kg 体重(投与 3 時間後)) 及び結腸(500 mg/kg 体重(投与 3 時間後)、1,000 mg/kg 体重(投与 3 及び 24 時間後))	3、48 [EFSA 2011, Table 4] [Mutat Res 2002] (Sasaki et al., 2002)

		マウス (ddY 系、雄 3 匹/群) 骨髓、肝臓、腎臓及び胃	単回強制経口投与 (800 mg/kg 体重)	陽性 (胃(投与 3 及び 24 時間後) 及び腎臓(投与 3 時間後))	49 [J Am Sci 2012] (Ramadan and Suzuki, 2012)
	DNA 付加体形成試験	ラット (F344 系、雄 5 匹/群) 前胃、腺胃、肝臓、腎臓	[<i>tert</i> - ¹⁴ C]標識 3-BHA : 1.6 mg 又は 1 g/kg 体重、[methyl- ¹⁴ C]標識 3-BHA : 1 g/kg 体重、[<i>tert</i> - ¹⁴ C]標識 2-BHA : 1 g/kg 体重 単回強制経口投与	陰性	51 [Toxicology 1987] (Hirose et al., 1987)
		ラット (F344 系、雄 6 匹/群) 前胃上皮	5 日間反復強制経口投与 (1,000 mg/kg 体重)	陰性	3 [EFSA 2011, Table 4] (Ito et al., 1991)

a : 最高濃度で生育阻害がみられた。

b : 500 µg/plate 以上で生育阻害がみられた。

c : 1×10^{-4} M 以上で生育阻害がみられた。

d : 単回投与でみられた優性致死率の増加は、陰性対照群の低値のために陽性とみなされなかった。反復投与では第 6 及び 7 週に着床前胚損失率の有意な増加がみられたが、この影響が単独でみられていることから、陽性と判断されなかった。

表 12 3-BHA の遺伝毒性試験結果

	検査項目	試験対象	用量	結果	参照
<i>in vitro</i>	DNA 損傷試験 (8-oxodG 検出)	ヒト末梢血リンパ球	3-BHA 10~100 µM (50 時間培養)	陽性 (100 µM)	3、44 [EFSA 2011, p22] [Carcinogenesis 1995] (Schilderman et al., 1995a)
<i>In vivo</i>	DNA 損傷試験 (アルカリ溶出試験)	ラット (F344 系、雄、匹数不明) 前胃上皮	3-BHA 単回強制経口投与 (およそ 220 mg/kg 体重相当)	陰性	3、16 [EFSA 2011, Table 4] [Carcinogenesis 1991] (Morimoto et al., 1991)
	DNA 損傷試験 (8-oxodG 検出)	ラット(Wistar 系、雄、6 匹/群/時点) 肝臓、腺胃上皮、結腸・直腸上皮	3-BHA 3、7 又は 14 日間 混餌投与(1.5%(1.2 ~1.5 g/kg 体重/日))	陽性 (肝臓(投与 14 日後)及び腺胃上皮(投与 3、7 及び 14 日後))	3、50 [EFSA 2011, p22] [Food Chem Toxicol 1995] (Schilderman et al., 1995b)
	DNA 付加	ラット ((F344、雄	3-BHA	陰性	3、52

	体形成試験	6 匹/群) 前胃	単回又は 5 日間反 復強制経口投与 (1,000 mg/kg 体重/ 日)		[EFSA 2011, Table 4] [Cancer Lett 1989] (Saito et al., 1989)
--	-------	--------------	---	--	---

BHA の代謝物である TBHQ、TBQ、BHA-o-O、diBHA、BHA-OH 及び TBQO の
遺伝毒性に関する各種の *in vitro* 及び *in vivo* 試験の結果を表 13～18 に示した。

表 13 TBHQ の遺伝毒性試験結果

	検査項目	試験対象	用量	結果	参考
<i>in vitro</i>	復帰突然変異 試験	<i>Salmonella typhimurium</i> TA98、TA100、 TA1535、 TA1537、TA1538	～5.0 µg/mL (TA1535)、 ～15 µg/mL (TA1537) ～50 µg/mL (TA98、TA100、 TA1538)	陰性	10、18 [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, Table 2] (Société Kemin Europa, 1982a)
		<i>S. typhimurium</i> TA98、TA100、 TA1535、 TA1537、TA1538	～450 µg/plate (－S9) ～2,700 µg/plate (+S9)	陰性	10、18 [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, Table 2] (Mueller and Lockhart, 1983)
		<i>S. typhimurium</i> TA97、TA100、 TA102、TA104	1～1,000 µg/plate (±S9) ^a	陰性	10、18、34 [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, Table 2] [Mutat Res 1988] (Hageman et al., 1988)
		<i>S. typhimurium</i> TA97、TA98、 TA100、TA102	3～166 µg/plate (－S9) 3～3,333 µg/plate (+ラッ ト又はハムスター由来の S9)	陰性	10、18、53 [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, Table 2] [Environ Mol Mutagen 1992] (Zeiger et al., 1992)
		<i>S. typhimurium</i>	0.5～100 µg/plate (－S9)	陰性	10、18、36

	TA97、TA98、TA100、TA102	5~1,000 µg/plate (+S9) ^b		[EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, Table 2] [Mutat Res 1990] (Matsuoka et al., 1990)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D7	100~500 µg/mL (−S9) 50~200 µg/mL (+S9)	陰性	10、18、37 [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, Table 2] [Mutat Res 1992] (Rogers et al., 1992)
遺伝子突然変異試験	マウスリンパ腫細胞 L5178Y (<i>Tk</i> ^{+/−})	~31.3 µg/mL (±S9)	陽性 (+ S9)	10、18 [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, Table 2] (Litton Bionetics, 1982a)
	CHO 細胞 (<i>hprt</i> 座位)	~6 µg/mL (−S9) ~250 µg/mL (+S9)	陰性	10、18 [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, Table 2] (Beilman and Barber, 1985)
	CHL V79 細胞 (<i>hprt</i> 座位)	0.17~3.40 µg/mL (±ラット又はハムスター肝細胞)	疑陽性 ^c	3、10、18、37 [EFSA 2011, 3.2.3.1 の 3 段落目] [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, Table 2] [Mutat Res 1992] (Rogers et al., 1992)
染色体異常試験	CHL V79 細胞	~330 µg/mL (±S9)	陽性 (−S9)	10、18 [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, Table 2] (Société

					Kemin Europa, 1982 c)
		CHO 細胞	100～335 μ M (－S9、高細胞密度) 15～62 μ M (－S9、通常の細胞密度)	陽性 (150～335 μ M、高細胞密度) (31、62 μ M、通常の細胞密度) ^d	10、18、42 [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, Table 2] [Mutat Res 1989] (Phillips et al., 1989)
		CHO 細胞	5～25.2 μ g/mL (－S9) 100.5～300 μ g/mL (+S9)	陽性 ^e (+ S9)	10、18 [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, Table 2] (NTP, 1995)
		CHL 細胞	0.0125～0.05 mg/mL (－S9、24 時間又は 48 時間処理) 0.02～0.04 mg/mL ($\pm$ S9、6 時間処理後 18 時間培養)	陰性 陽性 (+ S9)	10、18、36 [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, Table 2] [Mutat Res 1990] (Matsuoka et al., 1990)
	小核試験	CHL V79 細胞	120～720 μ M (－S9) 720 μ M (単独、±カタラーゼ又は+グルタチオン)	陽性 TBHQ により増加した小核の減少 ^f	10、18、54 [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, p15、5 段落目] [Environ Mol Mutagen 1994] (Dobo and Eastmond, 1994)
	遺伝子転換試験	<i>S. cerevisiae</i> D7 (<i>trp5</i> 座位)	100～500 μ g/mL (－S9) 50～200 μ g/mL (+S9)	陰性	10、18、37 [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, Table 2] [Mutat Res 1992] (Rogers et al., 1992)
	姉妹染色分体交換試験	CHO 細胞	0.5～16.7 μ g/mL (－S9) 5～166.7 μ g/mL (+S9)	陽性 ^g (+ S9)	10、18 [EFSA 2004,

					Table 2] [FAS 40, Table 2] (NTP, 1995)
		CHL V79 細胞	0.17～3.40 µg/mL (±ラット又はハムスター肝細胞) ^h	疑陽性 ^c	3、10、18、37 [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, Table 2] [Mutat Res 1992] (Rogers et al., 1992)
	DNA 損傷試験 (8-oxodG 検出)	deoxyguanosine	～0.1 mM (37°C、17 時間処理)	陽性 ⁱ	10、18、55 [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, p 15 の 2 段落目] [Carcinogenesis 1993] (Schilderman et al., 1993)
		ヒト末梢血リンパ球	10～100 µM (37°C、50 時間処理)	陽性 ^j	10、18、44 [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, p 15-16 の 7 段落目] [Carcinogenesis 1995] (Schilderman et al., 1995)
		子牛胸腺 DNA	10 ⁻⁶ ～10 ⁻² M (37°C、1 時間処理、±CuCl ₂)	陽性 ^k	10、18、56 [EFSA 2004, Table 2] [FAS 40, p 16 の 2 段落目] [Toxicol Lett 1996] (Nagai et al., 1996)
		ラット肝細胞 (F344 系、雌由来)	10 及び 50 µM (37°C、1 時間処理)	陽性 ^l	10、57 [EFSA 2004, Table 2] [Mutat Res 2002] (Li et al.,

					2002)
	DNA 鎖切断試験	φ X-174 RF I DNA(二本鎖)	1 ~ 100 μM (± Cu(II) 、 37°C、 30 分処理)	陽性 ^m (+Cu(II))	10、 57 [EFSA 2004, Table 2] [Mutat Res 2002] (Li et al., 2002)
	DNA 損傷試験 (コメットアッセイ)	ヒト由来肺腫瘍細胞(A549)	0.5 mM (24 時間処理)	陽性	59 [Food Chem 2014] (Eskandani et al., 2014)
	DNA 損傷試験 (DNA 断片化)	ヒト肺がん由来細胞(A549)	1 mM (24 時間処理)	陽性	
	DNA 損傷試験 (DNA の生物学的不活化試験)	φ X-174 DNA(一本鎖)	0.1 mM (37°C、 30 時間)	陽性	55 [Carcinogenesis 1993] (Schilderman et al., 1993)
<i>in vivo</i>	染色体異常試験	マウス骨髄細胞	単回腹腔内投与 (~ 200 mg/kg 体重) ⁿ	陰性	10、 18 [EFSA 2004, Table3, p48] [FAS 40, Table2] (Litton Bionetics, 1985)
		マウス骨髄細胞 (雄 5 匹)	単回腹腔内投与 (200 mg/kg 体重)	陽性 ^o	10、 18、 60 [EFSA2004, Table3] [FAS 40, Table2] [Food Chem Toxicol 1984] (Giri et al., 1984)
		マウス骨髄細胞 (雄 5 匹)	30 日間強制経口投与 (2 mg/kg 体重/日)	陽性 ^p	
	小核試験	マウス骨髄細胞	経口投与 (162、 325 又は 650 mg/kg 体重、 24 時間以内に 2 回投与)	陰性	10、 18 [EFSA 2004, Table3] [FAS 40, Table2] (Litton Bionetics, 1982b)

		マウス骨髄細胞	経口投与 (250 mg/kg 体重、投与 24、48、72 時間後に採取)	陽性 (投与 24 時間後のみ)	10、18 [EFSA 2004, Table3] [FAS 40, Table2] (Société Kémin Europa, 1982 b)
		マウス骨髄細胞 (雄 5 匹/群)	3 日間腹腔内投与 (9.38～300 mg/kg 体重/日) ^a	陰性	10、18 [EFSA 2004, Table3] [FAS 40, Table2] (NTP, 1995)
	優性致死試験	ラット(SD 系)	83 日間混餌投与 (～565 mg/kg/日)	陰性 ^r	10、18 [EFSA 2004, Table3] [FAS 40, Table2] (Krasavage and Faber, 1983)
	姉妹染色分体交換試験	マウス骨髄細胞 (スイス系、雄 20 匹/群)	腹腔内投与 (0.5～200 mg/kg 体重) ^s	陽性	10、18、61 [EFSA 2004, Table3] [FAS 40, Table2] [Environ Mol Mutagen 1989] (Mukerjee et al., 1989)
	DNA 損傷試験 試験 (アルカリ溶出試験)	ラット(F344 系、雄、匹数不明) 前胃上皮	単回強制経口投与 (0.001～1.0%、投与 3 時間後採取)	陰性	10、16 [EFSA 2004, Table3] [Carcinogenesis 1991] (Morimoto et al., 1991)

1 a : S9 非存在下の TA97 及び TA104 では最高用量、TA100 では 500 µg/plate 以上、TA102 では 200
2 µg/plate 以上で生育阻害がみられた。S9 存在下では、TA102 及び TA104 の最高用量で生育阻害が
3 みられた。

4 b : S9 非存在下では 25 µg/plate 以上、S9 存在下では 500 µg/plate 以上で生育阻害がみられた。

5 c : 複数回の実験のうち陽性の結果もみられたが、一貫した結果ではなく、再現性がなかった。

6 d : カタラーゼによって染色体異常細胞数は減少した。

7 e : S9 存在下では最低用量以外の用量において ≤25 細胞数しか観察されなかった。

8 f : CREST 抗体による標識が陰性の細胞数はカタラーゼによって減少し、陽性及び陰性の細胞数がグ
9 ルタチオンによって減少した。

10 g : TBHQ 添加によって僅かであるが有意な増加 (添加 : 14.4 SCEs/細胞、対照 : 8.3 SCEs/細胞) が
11 みられた。

- 1 h: 最高用量においても播種効率の減少が 50%に達しておらず、肝細胞の非存在下で細胞への毒性を測
2 定していることから、最高用量が毒性限界までに達しているか不明である。
- 3 i: スーパーオキシドジスムターゼ、tert-ブチルアルコール、カタラーゼ、ジエチレントリアミン五酢
4 酸、デスフェリオキサミンメシル酸塩及び Fe³⁺によって減少したが、Fe²⁺では増加した。
- 5 j: アセチルサリチル酸 (0.0004%) によって抑制された。
- 6 k: CuCl₂によって増大し、EDTA、BCS・2Na、メチオニン、グルタチオン還元型及びカタラーゼに
7 よって抑制され、FeCl₂、マンニトール、安息香酸ナトリウム及びアジ化ナトリウムによっては変化
8 しなかった。
- 9 l: BCS 及びネオオクプロインによって抑制された。
- 10 m: Cu 存在下で DNA 鎖切断が生じた。その切断はカタラーゼ及び BCS によって抑制された。
- 11 n: 最高用量の妥当性が示されておらず、採取時間が投与後 24 時間のみであった。
- 12 o: 観察された染色体異常の型が示されておらず、対照群 (溶媒のみ) の染色体異常頻度が 4.67%だっ
13 た。
- 14 p: 観察された染色体異常の型が示されておらず、対照群 (溶媒のみ) の染色体異常頻度が 4.33%だっ
15 た。
- 16 q: 複数回投与の妥当性が示されておらず、毒性用量を動物の生存率のみで設定した。
- 17 r: 着床後胚損失率に用量相関性がみられなかった。
- 18 s: 参照 61 の用量設定の根拠から、体重当たりの用量と判断した。

20 表 14 TBQ の遺伝毒性試験結果

	検査項目	試験対象	用量	結果	参考
in vitro	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> TA97、TA98、TA100、TA102	0.05~10 µg/plate (−S9) 2.5~500 µg/plate (+S9) ^a	陰性	3、36 [EFSA 2011, 3.2.3.1 の 2 段落目] [Mutat Res 1990] (Matsuoka et al., 1990)
		<i>S. typhimurium</i> TA98、TA100	10~200 µg/plate (±S9) ^b	陰性	3、62 [EFSA 2011, 3.2.3.1 の 7 段落目] [Food Addit Contam 1990] (Kalus et al., 1990)
		<i>S. typhimurium</i> TA98、TA100	10~100 µg/plate (±S9) ^c	陰性	3、63 [EFSA 2011, 3.2.3.1 の 8 段落目] [Environ Health Perspect 1994] (Kalus et al., 1994)
	染色体異常	CHO 細胞	2.5~7.5 µM (−S9)	陽性	42 [Mutat Res

	試験				1989] (Phillips et al., 1989)
		CHL 細胞	0.0015～0.003 mg/mL (－S9、24 時間処理) 0.002～0.003 mg/mL (－S9、48 処理) 0.001～0.003 mg/mL (－S9、6 時間処理後 18 時間培養) 0.005～0.02 mg/mL (+S9、6 時間処理後 18 時間培養)	陽性 (+ S9)	3、36 [EFSA 2011, 3.2.3.1 の 11 段落目] [Mutat Res 1990] (Matsuoka et al., 1990)
	DNA 損傷試験 (8-oxodG 検出)	ヒトリンパ球	10～100 μM (37℃、50 時間培養)	陽性	3、44、 [EFSA 2011, 3.2.3.1 の 9 段落目] [Carcinogenesis 1995] (Schilderman et al., 1995)
		deoxyguanosine	～0.08 mM (37℃、17 時間培養)	陰性	55 [Carcinogenesis 1993] (Schilderman et al., 1993)
	DNA 損傷試験 (DNA の生物学的不活化試験)	φ X-174 DNA (一本鎖)	0.1 mM (37℃、30 時間処理)	陰性	55 [Carcinogenesis 1993] (Schilderman et al., 1993)
<i>in vivo</i>	DNA 付加体形成試験 (³² P ポストラベル試験)	ラット (F344 系、雄 6 匹/群) 前胃	単回又は 5 日間強制経口内投与(125 mg/kg 体重/日)	陰性	3、52 [EFSA 2011, 3.2.3.1 の 4 段落目] [Cancer Lett 1989] (Saito et al., 1989)
	DNA 損傷試験 (アルカリ溶出試験)	ラット (F344、雄、匹数不明) 前胃上皮	単回強制経口投与 (0.00001～0.1 %、投与 3 時間後採取)	陽性	3、16 [EFSA 2011, 3.2.3.1 の 5 段落目] [Carcinogenesis 1991] (Morimoto et al., 1991)

1 a : TA98(－S9)では 5 μg/plate 以上、それ以外は最高用量で生育阻害がみられた。

2 b : TA98(－S9)では 30 μg/plate 以上、TA100(－S9)では 100 μg/plate 以上で生育阻害がみられた。

c : TA98(−S9)では 30 µg/plate 以上、TA100(−S9)では 100 µg/plate で生育阻害がみられた。

表 15 BHA-*o*-O の遺伝毒性試験結果

	検査項目	試験対象	用量	結果	参考
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験 (Ames 試験)	<i>S. typhimurium</i> TA98、TA100	10～300 µg/plate (±S9) ^a	陰性	3、62 [EFSA 2011, 3.2.3.1 の 7 段落目] [Food Addit Contam 1990] (Kalus et al., 1990)
	染色体異常試験	CHL 細胞	0.01～0.02 mg/mL (−S9、24 又は 48 時間処理) 0.01、0.02 mg/mL (−S9、6 時間処理後 18 時間培養) 0.005～0.02 mg/mL (+S9、6 時間処理後 18 時間培養)	陽性 (0.02 mg/mL、−S9、6 及び 24 時間処理)	3、36 [EFSA 2011, 3.2.3.1 の 11 段落目] [Mutat Res 1990] (Matsuoka et al., 1990)
<i>in vivo</i>	DNA 損傷試験(アルカリ溶出試験)	ラット(F344、雄、匹数不明) 前胃上皮	単回強制経口投与 (0.01～0.1 %、投与 3 時間後採取)	陽性	3、16 [EFSA 2011, 3.2.3.1 の 5 段落目] [Carcinogenesis 1991] (Morimoto et al., 1991)
	DNA 付加体形成試験	ラット(F344 系、雄 6 匹/群) 前胃	単回又は 5 日間強制経口投与 (250 mg/kg 体重/日)	陰性	3、52 [EFSA 2011, 3.2.3.1 の 4 段落目] [Cancer Lett 1989] (Saito et al., 1989)

a : TA98(−S9)の最高用量及び TA100(−S9)の 200 µg/plate 以上で毒性がみられた。

表 16 diBHA の遺伝毒性試験結果

	検査項目	試験対象	用量	結果	参考
<i>in vitro</i>	復帰突然変異試験 (Ames 試験)	<i>S. typhimurium</i> TA97、TA98、TA100、TA102	25～5,000 µg/plate (±S9)	陰性	3、36 [EFSA 2011, 3.2.3.1 の 2 段落目] [Mutat Res 1990] (Matsuoka et al., 1990)
	染色体異常試験	CHL 細胞	0.1～0.2 mg/mL (−S9、24)	陰性	3、36

	験		又は 48 時間処理) 0.1～0.2 mg/mL (±S9、6 時間処理後 18 時間培養)		[EFSA 2011, 3.2.3.1 の 2 段落目] [Mutat Res 1990] (Matsuoka et al., 1990)
--	---	--	---	--	---

表 17 BHA-OH の遺伝毒性試験結果

	検査項目	試験対象	用量	結果	参考
<i>in vitro</i>	染色体異常 試験	CHL 細胞	0.01～0.02 mg/mL (－S9、 24 又は 48 時間処理) 0.005～0.02 mg/mL (± S9、6 時間処理後 18 時間 培養)	陽性 (0.015 mg/mL 以 上、－ S9、24 時 間処理) (0.02 mg/mL、 －S9、6 時間処理)	3、36 [EFSA 2011, 3.2.3.1 の 2 段落目] [Mutat Res 1990] (Matsuoka et al., 1990)

表 18 TBQO の遺伝毒性試験結果

	検査項目	試験対象	用量	結果	参考
<i>in vitro</i>	染色体異常 試験	CHL 細胞	0.0005～0.002 mg/mL (－ S9、24 又は 48 時間処理) 0.002～0.006 mg/mL (± S9、6 時間処理後 18 時間 培養)	陽性 (0.002 mg/mL、 －S9、24 時間処理) (0.006 mg/mL、 －S9、6 時 間処理)	3、36 [EFSA 2011, 3.2.3.1 の 2 段落目] [Mutat Res 1990] (Matsuoka et al., 1990)

【参考データ】 *In vitro* の CHL 細胞を用いた小核試験において、BHA 及び TBHQ は S9 存在下で陽性、TBQ 及び TBQO は S9 非存在下で陽性であったとの報告がある。

~~14 (参照 64；講演要旨のため用量等の詳細データがない)~~

~~【遺伝毒性のまとめ】~~

BHA については、*in vitro* の遺伝子突然変異試験において 1 試験だけ陽性であったが、その他の遺伝子突然変異試験及び復帰突然変異試験では陰性であり、*in vivo* の伴性劣性致死試験も陰性であった。*in vitro* の染色体異常試験（代謝活性化条件）で陽性であったが、*in vivo* の染色体異常試験及び優性致死試験では陰性であった。*in vitro* の DNA 損傷試験は陰性であったが、*in vivo* の DNA 損傷試験は陽性であった。

14 参照 64 が講演要旨のため用量等の詳細データがないことから、参考資料とした。

代謝物 TBHQ については、*in vitro* で遺伝子突然変異を調べた試験は 1 試験を除いて陰性であった。*in vitro* の染色体異常試験及び小核試験は陽性であり、~~多くの~~*in vivo* の染色体異常試験及び小核試験でも陽性であったが、*in vivo* の優性致死試験は陰性であった。DNA 損傷試験は *in vitro* は陽性であったが、*in vivo* では陰性であった。

代謝物 TBQ については、*in vitro* の復帰突然変異試験は陰性であったが、*in vitro* の染色体異常試験は陽性であった。DNA 損傷試験は *in vitro* では陽性と陰性の結果が得られているが、*in vivo* では陽性であった。

代謝物 BHA-o-O 及び diBHA について、*in vitro* の復帰突然変異試験は陰性であった。*In vitro* の染色体異常試験は、BHA-o-O、BHA-OH 及び TBQO では陽性であったが、diBHA では陰性であった。

また、BHA 及び代謝物の TBQ と BHA-o-O について、ラットを用いた DNA 付加体形成試験（経口投与）では、いずれも前胃で陰性の結果が得られている。これは、一連の復帰突然変異試験及び遺伝子突然変異試験が陰性であることの *in vivo* における裏付けになるものと考え。山田専門委員修文

以上から、BHA 及び TBHQ 等の代謝物には遺伝子突然変異誘発性はないが、染色体異常誘発性は有すると考えられた。しかしながら、TBHQ の試験において、カタラーゼ等の抗酸化酵素やグルタチオン等の抗酸化物質によって染色体異常等が抑制されたこと、BHA は体内で代謝され、キノン化合物が生成する（参照 16）ことから、BHA 及び TBHQ 等の代謝物の染色体異常誘発性は、BHA の代謝物として生成されたキノン化合物によって活性酸素種が生じたことによる二次的な影響と考えられた。

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、BHA 及び TBHQ 等の代謝物は生体にとって特段問題となる遺伝毒性は示さないと考えた。

4. 急性毒性試験

（１）BHA に関する試験

マウス及びラットにおける BHA の急性毒性試験の結果を表 19 に示した。（参照 3、22） [EFSA 2011, 3.2.1] [FAS 10, p5]

表 19 BHA の急性毒性試験結果

動物種	雌雄	投与経路	LD ₅₀ (mg/kg 体重)	参照
マウス	不明	経口	>2,000	3、22
	不明	経口	1,500～1,700	3
ラット	不明	経口	2,200～5,000	3、22
	不明	経口	2,900～3,000	3

（２）TBHQ に関する試験

マウス、ラット、モルモット及びイヌにおける TBHQ の急性毒性試験の結果を表 20 に示した。（参照 18） [FAS 40, 2.2.1]

表 20 TBHQ の急性毒性試験結果

動物種	雌雄	投与経路	LD ₅₀ (mg/kg 体重)	参照
マウス (絶食)	不明	経口	1,040	18
ラット (給餌)	不明	経口	955 (コーン油中 10%) 890 (コーン油中 5%)	
ラット (絶食)	不明	経口	756 (コーン油中 10%) 802 (コーン油中 5%)	
モルモット	不明	経口	790	
イヌ	不明	経口	> 400 ^a	

a : 本投与量では動物は嘔吐を繰り返したが、投与後約 10 時間まではみられなかった。

5. 亜急性毒性試験

【事務局より】

前回の専門調査会の評価書案では、ラットの 13 週間亜急性毒性試験を本項目に記載していましたが、その試験内容は前胃の病変の可逆性を調べている試験でしたので、「8. その他の毒性試験 (2) ラットの前胃に対する BHA の影響の可逆性に関する試験」に移しました。

(1) 180 日間亜急性毒性試験 (イヌ) <参考資料¹⁵> 1986 年

イヌ (ビーグル種、雄 29 匹及び雌 30 匹/群) に BHA を混餌投与 (0、1.0 又は 1.3%(それぞれ雄/雌 : 0/0、247/243、303/269 mg/kg 体重/日相当¹⁶)) し、亜急性毒性試験が実施された。

1.3%投与群では、摂餌量と体重増加量が減少した。また、両投与群において肝臓の絶対重量が増加した。両投与群の肝臓の電子顕微鏡検査によって、肝細胞の滑面小胞体及びミエロイド小体が増殖した。

光学又は電子顕微鏡検査では、胃と食道下部に増殖性又は過形成病変及び細胞数の変化はみられなかった。(参照 23、24、26) [FAS 24, p7 の一番下の段落] [FAS 21, p6, Dogs の一つ目の試験] [Food Chem Toxicol 1986a](Ikeda et al., 1986)

(2) 6 か月間亜急性毒性試験 (イヌ) 1986 年

イヌ (ビーグル種、雄又は雌 3~4 匹/群) に BHA を 6 か月間混餌投与 (0、0.25、0.5 又は 1.0%(それぞれ雄/雌 : 0/0、54/62、111/112、219/231 mg/kg 体重/日相当)) し、亜急性毒性試験が実施された。

用量依存的に体重増加抑制がみられた。摂餌量については、0.5%以上投与群で対照群より有意に低かった。BHA 全投与群の肝臓重量が増加したが、肝臓及びその他

¹⁵ 試験の検査項目が特殊であることから、参考資料とした。

¹⁶ 参照 26 のデータから体重 1kg 当たりの BHA 摂取量を算出した。

の器官に病理組織学的変化はみられなかった。胃粘膜に変化はなく、食道遠位部の扁平上皮の有糸分裂像にも変化はなかった。

投与1、3及び6か月後の血液生化学的検査では、1.0%投与群にAlbの僅かな減少並びにAP及びロイシンアミノペプチダーゼ活性の増加がみられた。(参照23、24、27) [FAS 24, p8の2段落目] [FAS 21, p6, Dogsの2つ目の試験] [Food Chem Toxicol 1986b] (Tobe et al., 1986)

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、1.0%投与群で体重増加抑制がみられたことから、本試験におけるNOAELを飼料添加濃度として0.5% (111 mg/kg体重/日相当) と判断した。

(3) 110 日間亜急性毒性試験 (豚) <参考資料¹⁷> 1986 年

妊娠豚 (デンマークランドレース種、妊娠豚、9～13 頭/群) に BHA を妊娠期間の 110 日間混餌投与 (0、0.5、1.9 又は 3.7%(0、50、200 又は 400 mg/kg 体重/日相当)) し、亜急性毒性試験が実施された。

その結果、3.7%投与群で体重増加量の有意な低下がみられた。肝臓と甲状腺の絶対重量と相対重量に関して用量依存性の増加がみられた。

BHA 全投与群及び対照群において、胃の重層扁平上皮の増殖性変化及び錯角化症がみられた。さらに、1.9%以上投与群の数頭に食道上皮の増殖性変化及び錯角化症がみられた。胃の腺部に乳頭腫又は他の組織学的変化はみられなかった。1.9%以上投与群の数頭の食道の全長に渡って、肉眼的に線状、黄褐色かつ粗造な上皮構造がみられた。(参照 3、91) [EFSA 2011, 3.2.2.3 Pigs] [Food Chem Toxicol 1986](Würzen and Olsen, 1986)

~~食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、1.9%以上投与群において、食道上皮の増殖性変化及び錯角化症がみられたことから、本試験における NOAEL を飼料添加濃度として 0.5% (50 mg/kg 体重/日相当) と判断した。~~

【事務局より】

本試験は、参照 23 (JECFA 評価書(FAS 24)、p8) にも記載されていますが、参照 23 の p9 の「COMMENTS」に、BHA 投与による豚の食道における過形成に関するエビデンスは疑わしい旨の記載がありましたが、その理由を記載していませんでした。原報を確認したところ、当初の試験プロトコールに食道の検査は含まれておらず、BHA 投与による影響とは考えられなかったことから、病理組織学的検査のために適切に保存されなかった旨の記載がありました。

従いまして、本試験は参考資料といたしました。

(4) TBHQ に関する亜急性毒性試験

①13 週間亜急性毒性試験 (マウス) 1995 年

マウス (B6C3F1 系、雌雄各 10 匹/群) に TBHQ を 13 週間混餌投与 (0、2,500、

¹⁷ 病理組織学的検査が適切に実施されなかったことから、参考資料とした。

5,000、10,000、20,000 又は 40,000 mg/kg 飼料(雄/雌 : 0/0、440/500、870/1,075、1,950/2,175、4,000/4,630 又は 8,425/9,040 mg/kg 体重/日相当) し、亜急性毒性試験が実施された。

試験期間中に TBHQ 投与群の雌 2 例が死亡したが、TBHQ 投与とは関連がないと考えられた。

10,000 mg/kg 飼料以上投与群の雌雄に、試験終了時の体重及び体重増加量に用量相関的な有意な減少がみられた。摂餌量は TBHQ 投与群及び対照群で同様であったが、10,000 mg/kg 飼料以上投与群では飼料をまき散らす傾向がみられたことから、これら 3 群の実際の摂餌量は少ないことが示唆された。脱毛及び被毛の変色に投与との関連性がみられたが、おそらくこぼれた飼料に皮膚が接触したためと考えられた。

血液生化学的検査において BUN の用量相関的な減少が全測定時点の雌雄にみられたこと以外には、毒性学的に重要な変化はみられなかった。血液学的検査では、20,000 mg/kg 飼料以上投与群の雌雄に RBC、網状赤血球、血小板、リンパ球及び分葉核好中球数の増加が全測定時点でみられた(雌でより高頻度)が、分葉核好中球の増加を除き、体重増加量の減少とこれに関連した脱水によるものと考えられた。また、得られた血液学的及び血液生化学的検査値は CRC 毒性学ハンドブック (1995) に掲載された B6C3F1 系マウスの参照値の範囲内であった。

臓器の絶対重量について、10,000 mg/kg 飼料以上投与群の雌雄では対照群より低かったが、相対重量は対照群より高かったことから、体重の減少に起因した二次的な変化と考えられた。生殖器についても同様の傾向がみられ、10,000 及び 40,000 mg/kg 飼料投与群の左側精巣上体尾部、左側精巣及び左側精巣上体でみられた。40,000 mg/kg 飼料投与群の雌では対照群に比べて発情周期が有意に長くなったが、体重減少による二次的なものと考えられた。

TBHQ 全投与群の雌及び 20,000 mg/kg 飼料以上投与群の雄に前胃の粘膜過形成の頻度及び重症度の用量相関的な増加がみられた。10,000 mg/kg 飼料以上投与群の雌雄では、鼻の化膿性炎症並びに皮膚の慢性炎症及び表皮過形成の発生頻度の用量相関的な増加がみられた。10,000 mg/kg 飼料投与群において体重増加量の減少、前胃の粘膜過形成並びに鼻及び皮膚の炎症の頻度の増加がみられたことから、本試験における NOEL は 5,000 mg/kg 飼料 (870 mg/kg 体重/日相当) と考えられた。(参照 18) [FAS 40, 2.2.2.1 Mice] (NTP, 1995)

②6 か月間亜急性毒性試験 (ラット) 1968 年

ラット (SD 系、雌雄各 15 匹/群) に TBHQ を 6 か月間混餌投与 (0、10、50 又は 250 mg/kg 飼料) し、亜急性毒性試験が実施された。TBHQ は 0、0.02、0.1 又は 0.5%濃度となるよう油に溶解 (非加熱又は加熱(1 時間で 190℃にし、その後 4 時間 190℃に保温)) し、飼料にその溶液を 5%濃度で添加した。

試験期間中に死亡が 3 例みられたが、投与による影響とは考えられなかった。

250 mg/kg 飼料 (非加熱油) 投与群の雄で体重増加の軽度の抑制がみられ、10 mg/kg 飼料 (非加熱油) 投与群の雄では対照群に比べて有意な体重増加がみられた。

このような影響は TBHQ 投与群（加熱油）の雌にはみられなかった。TBHQ 全投与群の雌では対照群と同様の体重増加がみられた。

投与群の摂餌量は、対照群と同等又は増加していた。

血液学的検査では、250 mg/kg 飼料（非加熱油）投与群で投与 3 か月後に WBC の増加がみられた以外、対照群と同様であった。250 mg/kg 飼料（非加熱油）投与群の WBC 増加は投与 6 か月後にはみられなかった。

臓器の相対重量については、250 mg/kg 飼料（加熱油）投与群の雄の精巣と肝臓、50 mg/kg 飼料以上投与群（加熱油）投与群の雌の肝臓に僅かな増加がみられたが、TBHQ の影響よりも加熱油と非加熱油の違いに関連しているようであった。

病理組織学的検査では、投与に関連した影響はみられなかった。（参照 18）**[FAS 40, 2.2.2.2 の 2 つ目の試験]**（Terhaar and Krasavage, 1968b）

③13 週間亜急性毒性試験（ラット） 1995 年

ラット（F344/N 系、雌雄各 10 匹/群）に TBHQ を 13 週間混餌投与（0、2,500、5,000 又は 10,000 mg/kg 飼料（雄/雌：0/0、190/190、370/360 又は 780/750 mg/kg 体重/日相当）し、亜急性毒性試験が実施された。本試験に供試した動物は、[II. 7. (8) ⑥] の児動物であり、妊娠及び哺育期間中に TBHQ にばく露されており、さらに離乳後 13 週間に本試験が実施された。

試験期間中に死亡はみられなかった。

体重について、対照群と比較すると、試験開始時点では 5,000 及び 10,000 mg/kg 飼料投与群の雄/雌でそれぞれ 10/5 及び 28/22% 低く、試験終了時点ではそれぞれ 6/7 及び 15/12% 低かった。試験開始時の 10,000 mg/kg 飼料投与群及び試験終了時の 5,000 mg/kg 飼料以上投与群における体重の差は有意であった。体重増加量については、10,000 mg/kg 飼料投与群の雄で対照群より 0.9% 低かったことを除き、TBHQ 全投与群及び対照群で同等であった。

摂餌量は、5,000 mg/kg 飼料以上投与群の雄で投与開始 2 週後に対照群より低下したが、13 週後では同等であった。10,000 mg/kg 飼料投与群の雌では、試験期間を通して対照群と比較して摂餌量が少ない傾向がみられた。

一般状態では、2,500 mg/kg 飼料投与群の雌を除いて、被毛の変色のみがみられた。

平均精子細胞数、精巣当たりの精子細胞頭部数及び精巣 1 g 当たりの精子細胞頭部数については、5,000 mg/kg 飼料投与群で有意な低下がみられたが、10,000 mg/kg 飼料投与群では影響はみられなかった。精巣上体の精子の濃度又は運動性に投与による影響はみられなかった。5,000 mg/kg 飼料投与群でみられた所見は、用量相関性がみられず、毒性学的な意義は不明であった。

発情周期は 5,000 mg/kg 飼料以下投与群で対照群より有意に長かった。10,000 mg/kg 飼料投与群の発情周期の長さは対照群と同等であったが、10,000 mg/kg 飼料投与群の 2/10 例は発情周期が不明瞭であった。

血清中胆汁酸について、5,000 mg/kg 飼料以上投与群の雌雄で投与開始 5 日及び 3 週後並びに試験終了時に有意に上昇した。ALT 活性は、10,000 mg/kg 飼料投与群の

雌で投与開始 5 日後に上昇した。投与開始 3 週間には TBHQ 全投与群の雌で対照群より高い ALT 値を示したが、その値は正常値の範囲内であった。試験終了時の ALT 値は TBHQ 投与群及び対照群で同等であった。

臓器の絶対重量及び相対重量に変化がみられたが、体重減少に伴う二次的なものようであった。5,000 mg/kg 以上投与群の雌雄の心臓の絶対重量は、対照群より低かった。TBHQ 全投与群の雄及び 10,000 mg/kg 飼料投与群の雌の肺の絶対重量は、対照群より低かった。TBHQ 全投与群において精巢の相対重量が、対照群より有意に高かった。肝臓及び腎臓の相対重量について TBHQ 全投与群の雄で対照群より有意に高かったが、絶対重量では 2,500 mg/kg 飼料投与群の雄の肝臓のみで高かった。TBHQ 全投与群の雌の肝臓の相対重量が対照群より有意に高かったが、絶対重量に違いはみられなかった。これらの臓器重量の変化に伴う病理学的な所見はみられなかった。鼻呼吸器上皮の過形成の発生頻度の増加が、5,000 mg/kg 飼料投与群の雄及び 10,000 mg/kg 飼料の雌雄にみられた。鼻腔滲出液が 10,000 mg/kg 飼料投与群の雄でより高頻度にみられた。

脾臓の色素沈着の発生頻度の用量相関的な増加がみられた（対照群、2,500、5,000 及び 10,000 mg/kg 飼料投与群の雄でそれぞれ 0/10、1/10、3/10 及び 5/10 例、雌で 0/10、5/10、8/10 及び 10/10 例）。加えて、赤脾髄の萎縮の発生頻度が、5,000 及び 10,000 mg/kg 投与群の雌でそれぞれ 8/10 及び 10/10 例であった。腎臓の鉍質沈着の発生頻度には TBHQ 投与群の雌において用量相関性の減少がみられた。

脾臓の色素沈着の発生頻度の増加が TBHQ 全投与群の雌でみられたことから、本試験における NOEL は設定できなかった。本試験における LOEL は 2,500 mg/kg 飼料（190 mg/kg 体重/日相当）であった。（参照 18）**[FAS 40, 2.2.2.2 の 3 つ目の試験]**（NTP, 1995）

6. 慢性毒性及び発がん性試験

（1）104 週間発がん性試験（マウス）① 1986 年

マウス（B6C3F 系、雄、匹数不明）に BHA を 104 週間混餌投与（0、0.5 又は 1%（0、約 750 又は 1,500 mg/kg 体重/日相当¹⁸））し、発がん性試験が実施された。

対照群、0.5 及び 1%投与群の投与 96 週以降の生存動物のうち前胃の病変がみられた動物数を表 21 に示した。扁平上皮癌の発生は両投与群にはみられなかった。（参照 3、65）**[EFSA 2011, 3.2.4.3 の 1 段落目]** **[Toxicol Pathol 1986]**（Ito et al., 1986b）

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、0.5%投与群で前胃に過形成がみられたことから、本試験における LOAEL を飼料添加濃度として 0.5%（BHA として約 750 mg/kg 体重/日相当）と判断した。本試験において、発がん性はみられなかった。

¹⁸ 参照 3 に記載されている体重 1kg 当たりの用量

表 21 マウスを用いた 104 週間発がん性試験における前胃に病変がみられた動物数

添加量 (%)	生存動物数 ^a	前胃の病変		
		過形成	乳頭腫	扁平上皮癌
0	16	0	0	0
0.5	21	8 (38) ^b	0	0
1	22	21 (96) ^c	1 (5)	0

括弧内の数値は、生存動物数に占める前胃の病変がみられた動物数の割合(%)

a : 投与 96 週以降の生存動物数

b : 対照群と有意差あり (p<0.01)

c : 対照群と有意差あり (p<0.001)

(2) 104 週間発がん性試験 (マウス) ② 1986 年

マウス (B6C3F₁ 系、雄 150 匹/群) に BHA を 104 週間混餌投与 (0、0.5 又は 1%(0、約 750 又は 1,500 mg/kg 体重/日相当¹⁹)) し、発がん性試験が実施された。投与開始 8 週以降 8 週毎に各群 10 匹を、104 週後には各群 30 匹を剖検及び病理組織学的検査に供試した。

その結果、投与開始 72 週までは BHA 投与に関連した前胃の顕著な増殖性病変はみられなかった。過形成は 1% BHA 投与群で投与開始 64 及び 72 週にそれぞれ 30、40% の動物にみられた。投与 80 週目から両投与群で乳頭腫がみられ、また扁平上皮癌は投与 88 週では両投与群、96 週では 1%投与群でみられ、これらの扁平上皮癌は全て高分化型であった。

投与開始 88 週以降に前胃に病変がみられた動物数を表 22 に示した。対照群及び両投与群において、腺胃の病変はみられなかった。(参照 3、66) [EFSA 2011, 3.2.4.3 の 2 段落目] [Jpn J Cancer Res 1986] (Masui et al., 1986)

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、0.5%以上投与群において乳頭腫がみられたことから、本試験における LOAEL を飼料添加濃度として 0.5% (BHA として約 750 mg/kg 体重/日相当) と判断した。また、BHA は、本試験においてマウスの前胃に対して発がん性を有すると判断した。

表 22 マウスを用いた 104 週間発がん性試験における前胃に病変がみられた動物数

添加量 (%)	生存動物数 ^a	前胃の病変		
		過形成	乳頭腫	扁平上皮癌
0	39	0	0	0
0.5	37	10 (27.0) ^b	5 (13.5) ^c	1 (2.7)
1	43	35 (81.4) ^b	5 (14.3) ^c	2 (4.7)

括弧内の数値は、生存動物数に占める前胃の病変がみられた動物数の割合(%)

a : 癌腫が最初にみられた投与 88 週以降の生存動物数

b : 対照群と有意差あり (p<0.001)

c : 対照群と有意差あり (p<0.05)

¹⁹ 参照 3 に記載されている体重 1kg 当たりの用量

(3) 96 週間慢性毒性及び発がん性試験 (ラット) <参考資料²⁰> 1982 年

ラット (F344 系、雌雄 20~30 匹/群) に BHA を 96 週間混餌投与 (0、0.04、0.2 又は 1.0%) し、慢性毒性及び発がん性試験が実施された。

その結果、摂餌量、摂水量、生存率、体重及び器官重量に投与による影響はみられなかった。

血液学的及び血清生化学的検査では、0.2 及び 1.0%投与群で LDH が対照群より増加していること以外は、各パラメーターに投与による影響はみられなかった。

前胃の乳頭腫が 1%投与群の雄及び雌でそれぞれ 3/15、2/18 例にみられたが、対照群 (雄 0/9 例、雌 0/13 例) ではみられなかった。雌雄の乳頭腫の発生頻度の合計は、統計学的に有意に高かった。また、その他にみられた腫瘍は、下垂体腺腫及び皮下肉腫 (対照群及び投与群)、肝血管腫 (投与群のみ)、腎癌 1 例 (0.2%投与群の雌)、腺胃腺癌 1 例、甲状腺腺腫 1 例、精巣間細胞腫 1 例 (0.04%投与群の雄) であった。(参照 71)

[FAS 18, p2 の一番下の段落] (Tomii and Aoki, 1982)

(4) 104 週間慢性毒性及び発がん性試験 (ラット) 1982、1983 年

ラット (F344 系、雌雄各 50~52 匹/群) に BHA を 104 週間投与 (0、0.5 又は 2%(雄/雌 : 0/0、98/108、414/474 mg/kg 体重/日相当²¹)) し、慢性毒性及び発がん性試験が実施された。BHA 投与終了後、112 週まで BHA 無添加飼料を給与した後、検査が実施された。

その結果、BHA 投与終了時点の対照群、0.5 及び 2%投与群の生存率は、それぞれ雄では 68.6、68.6 及び 67.3%、雌では 64.7、66.7 及び 78.4%であった。

試験期間を通じて一般症状に投与による影響はみられなかった。

体重については、2%投与群の雌雄に対照群と比べて約 10%の低下がみられた。

血液学的及び血液生化学的検査において、投与群に血小板数の増加及び Alb/Glb 比の減少がみられたが、背景データ内であることから、毒性学的意義はないと考えられた。尿検査では投与に関連した影響はみられなかった。

臓器重量では、投与群の雄で脳の絶対重量の有意な減少、投与群の雌で唾液腺と心臓の相対重量の有意な増加が認められた。

投与群において、慢性間質性腎炎の用量依存性の増加がみられた。(表 23)

前胃以外の器官における腫瘍発生頻度は、BHA 投与によって増加しなかった。

投与群の前胃に過形成、乳頭腫及び扁平上皮癌がみられ、その発生頻度は有意に増加した (表 23)。扁平上皮癌の初発は 2%投与群の雄及び雌でそれぞれ 59、82 週目に確認された。また、2%投与群の雄 2 例及び雌 1 例でリンパ節への転移が、2%投与群の雌 1 例で肝臓への転移がみられた。扁平上皮癌では高分化型と低分化型がみられた。(参照 3、23、67、68) [EFSA 2011, 3.2.4.1 の 1 段落目] [FAS 24, p5 の 2 段落目] [Jpn J

²⁰ 試験の用量が飼料への添加濃度で記載されており、体重 1kg 当たりの BHA 摂取量が不明であることから、参考資料とした。

²¹ 参照 68 に記載されている体重 1kg 当たりの用量を記載した。

Cancer Res 1982] [JNCI 1983] (Ito et al., 1982) (Ito et al., 1983)

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、0.5%以上投与群に慢性間質性腎炎及び前胃の過形成がみられたことから、本試験における LOAEL を飼料添加濃度として 0.5% (BHA として 98 mg/kg 体重/日相当) と判断した。また、BHA は、本試験においてラットの前胃に対して発がん性を有すると判断した。

表 23 ラットを用いた 104 週間慢性毒性及び発がん性試験における前胃に病変がみられた動物数

添加量 (%)	性別	BHA 摂取量 (mg/kg 体重/日)	生存動物数 ^a	前胃の病変			間質性 腎炎
				過形成	乳頭腫	扁平上皮癌	
0	雄	0	51	0	0	0	33
	雌	0	51	0	0	0	21
0.5	雄	98	50	13 (26.0) ^c	1 (2.0)	0	42 ^d
	雌	108	51	10 (19.6) ^b	1 (2.0)	0	30
2	雄	414	52	52 (100) ^c	52 (100) ^c	18 (34.6) ^c	46 ^b
	雌	474	51	50 (98.0) ^c	49 (96.1) ^c	15 (29.4) ^c	48 ^c

括弧内の数値は、生存動物数に占める前胃の病変がみられた動物数の割合(%)

a : 投与 41 週以降の生存動物数

b : 対照群と有意差あり (p<0.01)

c : 対照群と有意差あり (p<0.001)

d : 対照群と有意差あり (p<0.05)

(5) 104 週間発がん性試験 (ラット) ① 1986 年

ラット (F344 系、雄 50 匹/群) に BHA を 104 週間混餌投与 (0、0.125、0.25、0.5、1 又は 2%(0、54.8、109.6、230.4、427.6 又は 1,322.6 mg/kg 体重/日相当)) し、発がん性試験が実施された。

その結果、投与に関連した臨床所見はみられなかった。

投与群の体重増加量に用量依存性の低下がみられた。摂餌量及び生存率に投与による影響はみられなかった。

病理組織学的検査において、前胃に過形成、乳頭腫及び扁平上皮癌がみられ、増殖性及び腫瘍病変の発生頻度に用量依存性がみられた (表 24)。また、前胃以外にも良性又は悪性の腫瘍がみられたが、対照群と投与群間で発生頻度は有意な差はみられなかった。(参照 3、69) [EFSA 2011, 3.2.4.1(p23 の一番下の段落)] [JNCI 1986] (Ito et al., 1986a)

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、0.25%以上投与群において前胃の過形成がみられたことから、本試験における NOAEL を飼料添加濃度として 0.125% (BHA として 54.8 mg/kg 体重/日相当) と判断した。また、BHA は本試験においてラットの前胃に対して発がん性を有すると判断した。

表 24 ラットを用いた 104 週間慢性毒性及び発がん性試験における前胃に病変がみられた動物数

添加量 (%)	生存動物数 ^a	前胃の病変		
		過形成	乳頭腫	扁平上皮癌
0	50	0	0	0
0.125	50	1 (2)	0	0
0.25	50	7 (14) ^b	0	0
0.5	50	16 (32) ^c	0	0
1.0	50	44 (88) ^c	10 (20) ^b	0
2.0	50	50 (100) ^c	50 (100) ^c	11 (22) ^c

括弧内の数値は、生存動物数に占める前胃の病変がみられた動物数の割合(%)

a : 投与 50 週以降の生存動物数

b : 対照群と有意差あり (p<0.01)

c : 対照群と有意差あり (p<0.001)

(6) 104 週間発がん性試験 (ラット) ② 1986 年

ラット (F344 系、雄、匹数不明) に BHA を 104 週間混餌投与 (0、1 又は 2%(0、約 500 又は 1,000 mg/kg 体重/日相当²²)) し、発がん性試験が実施された。

対照群、1 及び 2%投与群の投与 96 週以降の生存動物のうち前胃に病変がみられた動物数を表 25 に示した。2%投与群では扁平上皮癌の発生もみられた。(参照 3、65) [EFSA 2011, 3.2.4.1(p24 の 2 段落目) [Toxicol Pathol 1986] (Ito et al., 1986b)]

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、1%以上投与群の前胃に乳頭腫がみられたことから、本試験における LOAEL を飼料添加濃度として 1% (BHA として約 500 mg/kg 体重/日) と判断した。また、BHA は、本試験においてラットの前胃に対して発がん性を有すると判断した。

表 25 ラットを用いた 104 週間発がん性試験における前胃に病変がみられた動物数

添加量 (%)	生存動物数 ^a	前胃の病変		
		過形成	乳頭腫	扁平上皮癌
0	23	0	0	0
1	25	24 (96) ^b	21 (84) ^b	0
2	26	26 (100) ^b	26 (100) ^b	9 (35) ^c

括弧内の数値は、生存動物数に占める前胃の病変がみられた動物数の割合(%)

a : 投与 96 週以降の生存動物数

b : 対照群と有意差あり (p<0.001)

c : 対照群と有意差あり (p<0.01)

²² 参照 3 に記載されている体重 1kg 当たりの用量

(7) 104 週間発がん性試験 (ラット) ③ <参考資料²³> 1986 年

ラット (F344 系、雄 150 匹/群) に BHA を 104 週間混餌投与 (0、1 又は 2%) し、発がん性試験が実施された。投与開始 8 週以降 8 週毎に各群 10 匹を、104 週後には各群 30 匹を検査した。

前胃の過形成は、投与 8 週目からの両投与群で観察され、2%投与群では投与 16 週以降、1%投与群では投与 40 週以降、ほぼ全ての動物でみられた。

乳頭腫は、2% BHA 投与群では 8 週で初発 (発生頻度 20%) し、その後次第に増加し、32 週ではほぼ全動物でみられた。1% BHA 投与群では、48 週まではみられなかったが、56 週に 90%の発生頻度であり、その後 104 週まで 80~90%で推移した。

扁平上皮癌は、2%BHA 投与群のみにみられ、48 週で 1 例、80 週で 1 例みられ 96 週以降増加した。104 週で確認された扁平上皮癌 1 例は、低分化型で漿膜まで浸潤がみられたが、本例以外は高分化型で、粘膜下織又は粘膜筋層への浸潤がみられた。

投与開始 48 週以降に前胃に病変がみられた動物数を表 26 に示した。いずれの動物においても、腺胃の病変はみられなかった。(参照 23、66) [FAS 24, p4 一番下の段落] [Jpn J Cancer Res 1986] (Masui et al., 1986b)

表 26 ラットを用いた 104 週間発がん性試験における前胃病変がみられた動物数

添加量 (%)	生存動物数 ^a	前胃の病変がみられた動物数		
		過形成	乳頭腫	扁平上皮癌
0	92	1 (1.1)	0	0
1	94	92 (97.9) ^b	71 (75.5) ^b	0
2	94	93 (98.9) ^b	86 (91.5) ^b	13 (13.8) ^b

括弧内の数値は、生存動物数に占める前胃の病変がみられた動物数の割合(%)

a : 癌が最初にみられた投与 48 週以降の生存動物数

b : 対照群と有意差あり (p<0.001)

(8) 104 週間発がん性試験 (ラット) ④ <参考資料²⁴> 1997 年

ラット (F344 系、雄 30 又は 31 匹/群) に BHA を 104 週間混餌投与 (0 又は 0.4%(0 又は約 200 mg/kg 体重/日相当²⁵)) し、発がん性試験が実施された。

投与群の体重は、対照群と比較して有意に減少した。投与群の肝臓及び腎臓の相対重量も対照群と比較して減少した。

投与群の前胃及び腺胃に過形成、乳頭腫、腺腫及び癌の発生はみられなかった。また、食道、肝臓及び腎臓における腫瘍の発生頻度にも有意な変化はなかった (参照 3、70)

[EFSA 2011, 3.2.4.1(p25 の一番下の段落) [Carcinogenesis 1997] (Hirose et al., 1997)

²³ 試験の用量が飼料への添加濃度で記載されており、体重 1kg 当たりの BHA 摂取量が不明であることから、参考資料とした。

²⁴ 一用量の試験であることから、参考資料とした。

²⁵ 参照 3 に記載されている体重 1kg 当たりの用量

(9) 104 週間発がん性試験 (ラット) ⑤ <参考資料²⁶> 1998 年

ラット (F344 系、SHR 系、SD 系及び Lewis 系、雄 30 匹/群) に BHA を 104 週間混餌投与 (0 又は 2%(0 又は約 1,000 mg/kg 体重/日相当²⁷)) し、発がん性試験が実施された。

各系統の投与群の体重は、それぞれの対照群より有意に低かった。

前胃に病変がみられた動物数を表 27 に示した。扁平上皮癌の発生頻度は系統によって異なっていた。(参照 3、74) [EFSA 2011, 3.2.4.1(p26 の 2 段落目) [Food Chem Toxicol 1998](Tamano et al., 1998)]

表 27 ラットを用いた 104 週間発がん性試験における前胃に病変がみられた動物数

系統	BHA 投与	生存動物数 ^a	BHA 摂取量 (mg/kg 体重/日)	前胃の病変		
				扁平上皮癌	乳頭腫	肉腫
F344 系	+	30	974	8 (26.7) ^b	30 (100)	1 (3.5)
	—	30	0	0	1 (3.3)	0
SHR 系	+	30	1,375	23 (76.7) ^c	30 (100)	1 (3.3)
	—	29	0	0	0	0
SD 系	+	30	956	11 (36.7) ^c	30 (100)	2 (2.7)
	—	30	0	0	0	0
Lewis 系	+	30	1,041	2 (6.7)	30 (100)	0
	—	30	0	0	0	0

括弧内の数値は、生存動物数に占める前胃の病変がみられた動物数の割合(%)

a : 投与 40 週以降の生存動物数

b : 対照群と有意差あり (p<0.01)

c : 対照群と有意差あり (p<0.001)

(10) 3~24 か月間発がん性試験 (ラット) <参考資料²⁸>

ラット (F344 系、雄 44~54 匹/群) に BHA を 3、6、12 又は 24 か月間混餌投与 (約 1,000 mg/kg 体重/日相当²⁹) し、その後 BHA 無添加飼料を通算 24 か月間になるまで給餌し、発がん性試験が実施された。対照群には 24 か月間 BHA 無添加飼料を給餌した。

腫瘍に関して、前胃の他に、肝臓、腎臓、肺、心臓、脾臓、膵臓、十二指腸、空腸、回腸、結腸、甲状腺、副腎及び剖検で異常がみられた器官を検査した。

標識率の測定は、投与開始 24 か月後に BHA 全投与群及び対照群の各 6 匹ずつに [methyl-³H]標識チミジンを腹腔内投与して実施した。さらに、BHA 各投与群及び対照群に動物を追加し、無添加飼料への切り替え時及び投与開始 15 か月後に各群 6 匹ずつの標識率を測定した。

²⁶ 一用量の試験であることから、参考資料とした。

²⁷ 参照 3 に記載されている体重 1 kg 当たりの用量

²⁸ 一用量の試験であることから、参考資料とした。

²⁹ 参照 3 に記載されている体重 1 kg 当たりの用量

投与開始 24 か月後の前胃に病変がみられた動物を表 28 に示した。BHA の 24 か月投与群の全動物に過形成及び乳頭腫がみられ、また 2 例に癌がみられた。

BHA 投与群及び対照群において、前胃以外の複数の器官に腫瘍がみられたが、それら腫瘍の種類に特定のパターンはみられず、BHA 投与によって腫瘍の発生に影響はみられなかった。BHA 投与群の甲状腺に C 細胞腺腫又は癌並びに濾胞細胞腺腫又は癌がみられたが、その発生頻度に BHA 投与の明らかな影響傾向 はみられなかった。吉田専門委員修文

BHA 添加飼料から無添加飼料への変更時の BHA 投与群の前胃の標識率は、対照群より高く、その程度は小弯部において顕著であつた（投与群/対照群：2.24～5.42）。吉田専門委員修文しかし、無添加飼料に変更後に測定した場合、標識率は低くなっていた（投与群/対照群：1.02～1.33）。膀胱上皮の標識率も同様の傾向であった。

（参照 3、78）[EFSA 2011, 3.2.4.1 の 6 つ目の試験(p25 の 2 段落目)] [Toxicology 1988] (Nera et al., 1988)

表 28 ラットを用いた 24 か月間発がん性試験における試験終了時に前胃に病変がみられた動物数

投与期間 (か月間)		動物数 (匹)		前胃の病変							
				過形成	基底細胞の増殖		<u>表皮嚢胞角嚢腫</u>	粘膜皺襞	偽粘膜皺	乳頭腫	癌
BHA 添加	無添加	開始時	終了時		粘膜固有層	粘膜下組織	吉田専門委員修文				
0	24	50	40	0	0	0	0	0	0	0	0
3	21	54	48	0	0	0	0	0	0	0	0
6	18	50	46	0	20 ^a	0	0	0	0	0	0
12	12	46	35	1 ^a	24 ^a 3 ^b	0	17 ^a	9 ^a	10 ^a	3 ^a 1 ^b	0
24	0	44	37	37 ^{a, b}	37 ^{a, b}	37 ^{a, b}	37 ^{a, b}	0	0	37 ^{a, b}	1 ^{a, b}

a：前胃の小弯部に病変がみられた動物数

b：前胃の大弯部に病変がみられた動物数

【事務局より】

「Mucosal folds」を「粘膜皺襞」と、「Pseudo-Rugae」を「偽粘膜皺」と訳しました。訳のご確認をお願いいたします。

(11) 110 週間発がん性試験（ラット） <参考資料³⁰⁾>

ラット（F344 系、雄 27 匹/群）に BHA を 110 週間混餌投与（0 又は 12,000 ppm(0 又は約 600 mg/kg 体重/日相当³¹⁾）し、発がん性試験が実施された。

³⁰⁾一用量の試験であることから、参考資料とした。

³¹⁾ 参照 3 に記載されている体重 1kg 当たりの用量

BHA 投与群では、前胃に中等度の過形成及び乳頭腫がみられた。(表 29)。

BHA 投与群の胃以外の器官における腫瘍の発生頻度は、精巣、副腎、造血器官、脾臓の順に高かったが、対照群と違いはみられなかった。(参照 3、77) [EFSA 2011, 3.2.4.1(p25 の 4 段落目)] [Food Chem Toxicol 1990] (Williams et al., 1990b)

表 29 ラットを用いた 110 週間発がん性試験における胃に病変がみられた動物数

添加量 (ppm)	動物数 ^a	前胃				腺胃		
		過形成			乳頭腫	異形成		
		軽度	中等度	重度		軽度	中等度	重度
0	25	12(48)	0	0	0	0	0	0
12,000	27	19(70)	5(19)	0	9(33)	1(4)	2(7)	0

括弧内の数値は、動物数に占める病変がみられた動物数の割合(%)

a : 器官の病理組織学的検査が可能であった動物数

(1240) 104 週間発がん性試験 (ハムスター) ① 1986 年

ハムスター (シリアンゴールデン、雄、匹数不明) に BHA を 104 週間混餌投与 (0、1、2%(0、約 1,200 又は 2,400 mg/kg 体重/日相当³²)) し、発がん性試験が実施された。

対照群、1 及び 2%投与群の投与 96 週以降の生存動物のうち前胃に病変がみられた動物数を表 30 に示した。1%投与群の 1 例に扁平上皮癌がみられたが、2%投与群にはみられなかった。(参照 3、65) [EFSA 2011, 3.2.4.2 の 1 段落目] [Toxicol Pathol 1986] (Ito et al., 1986b)

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、1%投与群の前胃に過形成及び乳頭腫がみられたことから、本試験における LOAEL を飼料添加濃度として 1% (BHA として約 1,200 mg/kg 体重/日相当) と判断した。また、BHA は、本試験においてハムスターの前胃に対して発がん性を有すると判断した。

表 30 ハムスターを用いた 104 週間発がん性試験における前胃に病変がみられた動物数

添加量 (%)	生存動物数 ^a	前胃の病変		
		過形成	乳頭腫	扁平上皮癌
0	12	5 (42)	2 (17)	0
1	13	11 (85) ^b	12 (92) ^c	1 (8)
2	4	3 (75)	4 (100) ^d	0

括弧内の数値は、生存動物数に占める前胃の病変がみられた動物数の割合(%)

a : 投与 96 週以降の生存動物数

b : 対照群と有意差あり (p<0.05)

c : 対照群と有意差あり (p<0.001)

d : 対照群と有意差あり (p<0.01)

³² 参照 3 に記載されている体重 1 kg 当たりの用量

(1344) 104 週間発がん性試験 (ハムスター) ② <参考資料³³> 1986 年

ハムスター (シリアンゴールデン、雄 150 匹/群) に BHA を 104 週間混餌投与 (0、1 又は 2%) し、発がん性試験が実施された。投与開始 8 週以降 8 週間毎に各群 10 匹を、104 週後に各群 30 匹を検査した。しかし、2%投与群は 56 週以降生存動物が減少したため、69 週と 104 週に検査した。

その結果、前胃の過形成は投与 8 週～104 週の間に両投与群の全動物に観察された。対照群においても 56 週まではみられなかったが、56～80 週の間に 10%の動物に観察された。

乳頭腫は、2%投与群では 8 週目からみられ、48 及び 56 週以外は全動物にみられた。1%投与群でも 8 週目から乳頭腫がみられ、32 週以降はほぼ全動物にみられた。これらの乳頭腫については、角化亢進及び粘膜下層への腫瘍の下方成長が高頻度に観察された。

扁平上皮癌は 64 週目から両投与群でみられた。扁平上皮癌は高分化型であり、肝臓への浸潤が 1 例でみられた。

投与開始 64 週以降に前胃に病変がみられた動物数を表 31 に示した。両投与群の過形成、乳頭腫及び扁平上皮癌の発生頻度は対照群と比較して有意に増加した。いずれの動物においても、腺胃の病変はみられなかった。(参照 23、66) [FAS 24, p7 の 4 段落目] [Jpn J Cancer Res 1986] (Masui 1986b)

表 31 ハムスターを用いた 104 週間発がん性試験における前胃に病変がみられた動物数

添加量 (%)	生存動物数 ^a	前胃の病変		
		過形成	乳頭腫	扁平上皮癌
0	52	9 (17.3)	0	0
1	55	53 (96.4) ^b	54 (98.2) ^b	4 (7.3) ^c
2	40	40 (100) ^b	38 (95.0) ^b	4 (10.0) ^c

括弧内の数値は、生存動物数に占める前胃の病変がみられた動物数の割合(%)

a : 癌が最初にみられた投与 64 週以降の生存動物数

b : 対照群と有意差あり (p<0.001)

c : 対照群と有意差あり (p<0.05)

(14) 1 年間慢性毒性試験 (イヌ) <参考資料³⁴> 1964 年

イヌ (ビーグル種、雌雄、3 匹/群) に BHA を 1 年間混餌投与 (0、0.3、3.0、30 又は 100 mg/kg 体重/日) し、慢性毒性試験が実施された。

体重、臓器重量に投与による影響はみられなかった。尿検査、血液学液検査及び病理組織学的検査において異常はみられなかった。肝臓、腎臓、脂肪及び脳に BHA の蓄積はみられなかった。(参照 25、75) [FAS 15, p8, Dog] [Toxicol Appl Pharmacol 1964] (Hodge et al., 1964)

³³ 体重 1 kg 当たりの BHA 摂取量が不明であることから、参考資料とした。

³⁴ 供試した動物数が少ないことから、参考資料とした。

(15) 15 か月間慢性毒性試験 (イヌ) 1960 年

イヌ (コッカースパニエル種、雌雄、離乳直後、4 匹/群) に BHA を 15 か月間混餌投与 (0、5、50 又は 250 mg/kg 体重/日) し、慢性毒性試験が実施された。0、5 及び 50 mg/kg 体重/日投与群は雄 1 匹及び雌 3 匹/群、250 mg/kg 体重/日投与群は雌雄各 2 匹/群であった。

一般状態に異常はみられなかった。

体重増加量の低下が 250 mg/kg 体重/日投与群にみられたが、これは BHA の味によって動物が餌を忌避し、摂餌量が低下したことによるものと考えられた。

血液学的検査に投与による影響はみられなかった。

尿検査において、250 mg/kg 体重/日投与群の全例に尿糖がみられた。尿中総硫酸塩の無機硫酸塩に対する比率が、対照群と比較して 50 mg/kg 体重/日投与群では僅かに、250 mg/kg 体重/日投与群では大きく増加した。また、尿中グルクロン酸濃度の増加も BHA 全投与群にみられた。

病理組織学的検査では、250 mg/kg 体重/日投与群の 4 例中 3 例の肝臓に肝細胞変性及び散在性の顆粒球浸潤がみられた。肝臓の小葉構造は正常であり、~~過度の~~結合組織の増殖はみられなかった。洞様血管の狭窄を伴った実質肝細胞変性がみられた。クッパー細胞にはヘモジデリンが多く含まれ、門脈周囲では胆汁色素の蓄積がみられた。肝臓に異常所見がみられなかった動物は、BHA の低摂取量 (183 mg/kg 体重/日) によるものと考えられた。(参照 25、76) [FAS 15, p8, Dog] [J Agric Food Chem 1960] (Wilder et al., 1960) 吉田専門委員修文

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、250 mg/kg 体重/日投与群の肝臓に病理組織学的検査において異常所見がみられたことから、本試験における NOAEL を 50 mg/kg 体重/日と判断した。

(16-14) TBHQ に関する慢性毒性及び発がん性試験

①104 週間慢性毒性及び発がん性試験 (マウス) 1995 年

マウス (B6C3F₁ 系、雌雄各 60 匹/群) に TBHQ を 104 週間混餌投与 (0、1,250、2,500 又は 5,000 ppm (雄/雌 : 0/0、130/150、290/300 又は 600/680 mg/kg 体重/日相当)) し、慢性毒性試験及び発がん性試験が実施された。投与開始 15 か月後で雌雄各 6 ~10 匹/群を中間検査した。

各投与群の生存率は、対照群と同等であった。

摂餌量は投与群と対照群で差がなかったが、5,000 ppm 投与群の体重は対照群と比較して約 10%低かった。

臨床所見に TBHQ 投与に関連した影響はみられなかった。

中間検査の血液学的検査において 5,000 ppm 投与群の雄で網状赤血球が対照群より有意に高値であったこと以外は、血液学的検査に異常はみられなかった。

中間検査における肝臓の絶対重量は、全投与群の雌雄で対照群より高値であったが、5,000 ppm 投与群の雌の相対重量のみが対照群と有意な差がみられた。他の臓器重量に影響はみられなかった。

中間検査では、腫瘍及び非腫瘍病巣の発生頻度に投与に関連した影響はみられなかった。

投与終了時では、5,000 ppm 投与群の雄で肝細胞腺腫及び肝細胞腺腫・癌の発生頻度が有意に低かった。雌でも同様の傾向がみられたが、統計学的な有意な差ではなかった。

投与終了時の 1,250 ppm 投与群の雌で肝細胞腺腫及び肝細胞腺腫・癌の発生頻度が有意に高かったが、肝細胞腺腫・癌の発生頻度は過去の対照群のデータ範囲内であり、投与による影響ではないと考えられた。

投与群の雌では、甲状腺の濾胞細胞腺腫の発生頻度が対照群より高値（対照群、1,250、2,500 及び 5,000 投与群：1/51、3/51、2/50、5/54）であったが、その発生頻度の差は統計学的に有意でなく、米国国家毒性プログラム（National Toxicology Program）の 2 年間混餌投与試験の過去の対照群のデータ範囲内（0～9%）であった。投与群の雌の甲状腺の濾胞細胞の過形成の発生頻度は、対照群より高値（対照群、1,250、2,500 及び 5,000 ppm 投与群：12/51、19/51、24/50、24/54）であったが、重篤度は対照群と同様であった。過形成病変は中間検査ではみられなかった。

本試験において、発がん性はみられなかった。

JECFA は、甲状腺の濾胞細胞の過形成は毒性学的意義があるとし、本試験における LOEL を 150 mg/kg 体重/日と判断した。また、本試験において発がん性はないと判断した。（参照 10、18） [\[EFSA 2004, p16-17\]](#) [\[FAS 40, 2.2.3.1, p20 の上から 4 段落目\]](#)（NTP 1995）

②20 か月間慢性毒性試験（ラット） 1968 年

ラット（系統不明(アルビノ)、雌雄各 55 匹/群）に TBHQ を 20 か月間混餌投与（0、0.016、0.05、0.16 又は 0.5 %）し、慢性毒性試験が実施された。

投与開始 6 か月及び 12 か月後に、雌雄各 10 匹/群を検査し、20 か月後に残りの動物を検査した。

試験期間中、死亡率は対照群及び投与群で同程度であり、また臨床所見に異常はみられなかった。

成長率、摂餌量、飼料効率、尿検査並びに血液学的及び血液生化学的検査について、投与群と対照群で同様であった。

臓器重量について、投与終了時の 0.05 及び 0.16%投与群の雄において脾臓及び脳の絶対重量が減少したが、相対重量には統計学的な有意な違いはみられなかった。

TBHQ の投与に関連した肉眼的及び病理組織学的変化はみられなかった。（参照 10、18） [\[EFSA 2004, p14～15\]](#) [\[FAS 40, 2.2.3.1, p20 の上から 4 段落目\]](#)（Terhaar et al., 1968）

③30 か月間慢性毒性及び発がん性試験（ラット） 1995 年

ラット（F344/N 系、雌 60 匹/群；F₀ 世代）に TBHQ を雄との交配 2 週間前から F₁ 児動物の離乳まで混餌投与（0、1,250、2,500 又は 5,000 ppm）し、離乳後の F₁ 動物（雌雄各 68～70 匹/群）に母動物の添加濃度と同一濃度の TBHQ を 30 か月間又は投

与群の生存率が 20%未満になるまでの期間、混餌投与（0、1,250、2,500 又は 5,000 ppm(雄/雌：0/0、50/60、110/120 又は 225/240 mg/kg 体重/日)）し、慢性毒性及び発がん性試験が実施された。投与開始 3 か月後に雌雄各 10 匹/群を中間検査した。

生存率について、5,000 ppm 投与群は対照群よりも高く、雌では統計学的に有意な差がみられた。

摂餌量は対照群及び投与群で同程度であったが、5,000 ppm 投与群の体重が対照群より約 10%低かった。

TBHQ 投与に関連した臨床所見として、全投与群で被毛の変色がみられた。

中間検査では血液学的検査に投与の影響はみられず、また腫瘍もみられなかった。脾臓のヘモジデリン沈着の発生頻度は雌では用量相関的に増加（対照群、1,250、2,500 及び 5,000 ppm：24/60、27/60、33/57、41/60 例）したが、5,000 ppm 投与群のみが対照群と有意な差がみられており、雄ではヘモジデリン沈着はみられなかった。中間検査では、他に病理組織学的検査に異常はみられなかった。

投与終了時の検査では、5,000 ppm 投与群の雄で肝細胞癌（2/60 例(3%)）がみられたが、他の投与群ではみられなかった。この発生頻度は、統計学的に有意な差はみられず、文献上の過去のデータ範囲内（0～6%）であったことから、偶発的な所見と考えられた。肝細胞腺腫又は変異細胞巣の発生頻度には TBHQ 投与の影響はみられなかった。

2,500 ppm 以上投与群の雄で両側の精巣に間細胞腫の発生頻度の増加がみられたが、文献上の過去のデータ範囲内であり、統計学的に有意差はみられなかった。

甲状腺の C 細胞（濾胞傍細胞）及び濾胞細胞腺腫の発生頻度に対照群と投与群で同程度であった。対照群ではみられなかった C 細胞癌及び濾胞細胞癌が 5,000 ppm 投与群の雄でみられた（それぞれ 2/60 及び 3/60 例）が、統計学的に有意な差ではなかった。雌では甲状腺腺腫及び癌の発生頻度は対照群及び投与群で同様であった。甲状腺の過形成は対照群及び投与群でみられなかった。文献上の C 細胞癌及び濾胞細胞癌の発生頻度は、それぞれ 0.5%（0～2%）及び 3.8%（0～12%）と報告されており、5,000 ppm 投与群における発生頻度が低いこと及び前がん病巣がみられないことから、5,000 ppm 投与群の雄でみられた C 細胞癌及び濾胞細胞癌は TBHQ 投与と関連性はないと考えられた。

TBHQ の投与と関連して、雄の下垂体前葉の腺腫、雌の副腎皮質腺腫、雌雄の乳腺線維腺腫、雌の乳腺線維腺腫、腺腫又は癌（複合）の発生頻度の低下がみられた。これらの腫瘍発生頻度の低下は体重減少と関連していると推察された。

胆管の過形成は、雌では 5,000 ppm 投与群のみが対照群より高頻度にみられたが、雄では用量に依存して発生頻度の低下がみられた。肝細胞の細胞質空胞化の発生頻度は、雌では用量に依存性の低下がみられたが、雄では差がみられなかった。

雄の腎臓では、囊腫（対照群、1,250、2,500 及び 5,000 ppm：2/60、3/60、7/58、11/60 例）及び化膿性炎症（対照群、1,250、2,500 及び 5,000 ppm：9/60、8/60、9/58、20/60 例）の発生頻度が増加した。雌の腎臓では、慢性腎炎の発生頻度が増加した（対照群、1,250、2,500 及び 5,000 ppm：1/60、1/60、3/57、5/60 例）が、化膿性炎症の発生頻度には変化がみられなかった。

JECFA は、5,000 ppm 投与群の雄における腎臓の囊腫及び化膿性炎症並びに雌にお

ける脾臓のヘモジデリン沈着の発生頻度の増加が毒性学的に意義のある影響と判断し、本試験における NOEL を 2,500 ppm (110 mg/kg 体重/日) と判断した。また、本試験において発がん性はないと判断した。(参照 10、18) [EFSA 2004, p15-16] [FAS 40, 2.2.3.2, p20 の上から 4 段落目] (NTP 1995)

④117 週間慢性毒性試験 (イヌ) 1968 年

イヌ (ビーグル種、雌雄各 4 又は 6 匹/群) に TBHQ を 1 日 1 時間、1 週 6 日の自由採餌で 117 週間混餌投与 (0、500、1,580 又は 5,000 ppm (雄/雌 : 0/0、21/22、72/73 又は 260/220 mg/kg 体重/日相当)) し、慢性毒性試験が実施された。網状赤血球の増加が 104 週目にも認められたことから、観察を継続するために試験期間が 117 週まで延長された。投与開始 1 年後に雌雄各 1 匹/群を検査した。

試験期間中に死亡例はなく、一般状態、行動及び理学的検査に投与の影響はみられなかった。体重は、5,000 ppm 投与群の雌雄で対照群より低い傾向がみられたが、統計学的に有意な差はみられなかった。

摂餌量、血液生化学的及び尿検査に投与による影響はみられなかった。

血液学的検査において、5,000 ppm 投与群の雄の Hb が 52、104 及び 112 週で、同群の雌では 26 週と 112 週で対照群に比べて有意に低値であった。Ht は 5,000 ppm 投与群の雄の 52、104 及び 112 週で対照群より有意に低値であり、同群の雌の 52、78 及び 112 週でも低値であったが、統計学的に有意な差はみられなかった。網状赤血球 (%) は、TBHQ 投与群の雌雄の 99、104/105 及び 112 週で高い傾向がみられたが、用量相関性がなく、統計学的検定が示されなかった。RBC は、112 週の結果のみであるが、5,000 ppm 投与群の雌雄で対照群より有意に低値であった。

末梢血塗抹標本では、TBHQ 投与群で正赤芽球及び赤血球の好塩基性化 (erythrocyte basophilia) の出現頻度の増加がみられた。正赤芽球は、雄では 1,580 及び 5,000 ppm 投与群で各 1 例、雌では 500、1,580 及び 5,000 ppm 投与群でそれぞれ 1、2 及び 1 例であった。赤血球の好塩基性化は、雄では 5,000 ppm 投与群で 1 例、雌では 1,580 及び 5,000 ppm 投与群でそれぞれ 1 及び 2 例であった。

臓器重量では、肝臓の絶対及び相対重量が 5,000 ppm 投与群の雌雄で対照群より高い傾向がみられたが、雄の相対重量のみ有意な差がみられた。TBHQ 投与群の雄の精巣の相対重量は有意な増加傾向を示したが、5,000 ppm 投与群では対照群と有意な差がみられなかった。腎臓の相対重量は TBHQ 投与群の雌で高い傾向がみられたが、1,580 ppm 投与群のみ有意に高かった。他の臓器の重量には、投与に関連した影響はみられなかった。

肉眼的及び病理組織学的検査では、投与に関連した変化はみられなかった。投与群の肝臓及び腎臓の電子顕微鏡検査において、細胞構造の異常はみられなかった。投与群の肝細胞で小胞体増加はみられなかった。臓器重量は過去のデータ範囲内であること、及び臓器重量の変化は病理組織学的所見を伴っていないことから、体重の変動を反映したものにすぎない可能性がある。

JECFA は、5,000 ppm 投与群の Hb 及び Ht の減少、RBC の減少に基づき、本試験における NOEL を 72 mg/kg 体重/日と判断した。(参照 10、18) [EFSA 2004, p19]

[FAS 40, 2.2.3.3, p20 の上から 5 段落目]

7. 生殖発生毒性試験

(1) 生殖毒性試験（ラット） 1979、1981 年

ラット (SD 系、雌雄、匹数不明) に BHA を混餌投与 (0、0.125、0.25 又は 0.5%) し、生殖毒性試験が実施された。親動物には交配前及び交配期間の 2 週間投与した。さらに、雌ラットには妊娠期間から児動物の離乳まで、児動物には試験終了まで BHA を投与した。児動物の中から選択した動物について、生後 21 日に脳のニューロン数測定、また 90 日に眼の大きさ及び脳の部位別重量の測定及び体性運動野の組織学的検査を実施した。

交配前及び交配期間中、妊娠期間中及び哺育期間中の各期間の BHA 投与量は、0.125%投与群で 110、100 及び 220 mg/kg 体重/日、0.25%投与群で 220、210 及び 420 mg/kg 体重/日、0.5%投与群でそれぞれ 420、410 及び 800 mg/kg 体重/日に相当した。児動物の行動試験は 3～90 日齢の間に標準的なバッテリーテストが実施された。

その結果、生殖に関するパラメーターへの影響は認められず、母動物の体重変化もみられなかった。

児動物では、離乳前最終週で発育抑制がみられた。

生後 30 日までの離乳時死亡率は、生後 30 日の生存児数を基にして 0.5%投与群では 13.5%と増加し、0.25%投与群では 8.3%と僅かに増加した。0.5%投与群の児動物の離乳前体重に有意な減少がみられ、これは離乳後の生後 42 日まで持続したが、0.25%投与群の児動物の体重は対照群より高値であった。生後 90 日の体重においては、投与に関連する有意な影響はみられなかった。行動試験では驚愕反射の遅延が 0.25%以上投与群でみられた。眼の大きさ、脳の部位別重量又は脳組織構造に投与に関連する影響はみられなかった。

ANS パネルは、本試験における生殖発生毒性に対する NOAEL を飼料中 BHA 濃度として 0.125% (BHA として少なくとも 100 mg/kg 体重/日相当) と判断した。(参照 3、25) [EFSA 2011, 3.2.5.1] [FAS 15, p5 の一番下の試験] (Vorhees et al., 1979) (Vorhees et al., 1981)

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、母動物に対する毒性がみられなかったことから、本試験における母動物に対する NOAEL を飼料中 BHA 濃度として 0.5% (BHA として 410 mg/kg 体重/日相当) と判断した。0.25%投与群の児動物において死亡率の増加及び驚愕反射の低下がみられたことから、児動物に対する NOAEL を飼料中 BHA 濃度として 0.125% (BHA として 100 mg/kg 体重/日相当) と判断した。

(2) 3 世代生殖毒性試験（ラット）＜参考資料³⁵＞ 1962 年

ラット (系統及び匹数不明) に BHA を 1 年間混餌投与 (0 又は 500～600 mg/kg 体

³⁵ 用量の詳細が不明であることから、参考資料とした。

重/日、LD₅₀の1/5量に相当)し、3世代生殖発生毒性試験を実施した。F₁及びF₂世代に6か月間混餌投与した。BHAは、同腹児数、出生児体重、切歯萌出日及び眼瞼開裂日への影響はみられなかった。試験終了時の親動物及び児動物の剖検及び病理組織学的検査では、投与による影響はみられなかった。(参照25) [FAS 15, p9の一番下の段落] (Karplyuk, 1962)

(3) 児動物の行動機能への影響 (マウス) <参考資料³⁶> 1974年

マウス (Swiss Webster 系、雌雄、匹数不明) に BHA を混餌投与 (0 又は 0.5%(0 又は 750 mg/kg 体重/日相当)) し、試験が実施された。出産時に同腹児数を 8 匹に調整し、21 日齢で離乳させた。離乳した児動物には母動物と同様に継続して給餌した。児動物が 6 週齢から行動試験を実施した。

その結果、帰巢反応 (orientation reflex)、睡眠時間の減少、身づくろいの低下、学習能力の低下及び探索行動の亢進が認められた。(参照 3) [EFSA 2011, 3.2.5.2] (Stokes and Schudder, 1974)

(4) 発生毒性試験 (ウサギ) 1978年

ウサギ (ニュージーランド白色種、雌、匹数不明) に BHA を妊娠 7~18 日に強制経口投与 (0、50、200 又は 400 mg/kg 体重/日) し、発生毒性試験が実施された。妊娠 28 日に帝王切開した。

その結果、観察項目 (体重、内臓及び骨格異常発現率、生存胎児数及び死亡胎児数、黄体数及び着床数、一般的な生殖パラメーター) に投与による影響はみられなかった。

ANS パネルは、本試験における発生毒性に対する NOAEL を 400 mg/kg 体重/日と判断した。(参照 3、25) [EFSA 2011, 3.2.5.3] [FAS 15, p5 の下から 2 段落目] (Hansen and Meyer, 1978)

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、本試験において投与による影響がみられなかったことから、母動物及び胎児毒性に対する NOAEL を 400 mg/kg 体重/日と判断した。催奇形性はみられなかった。

(5) 発生毒性試験 (豚) <参考資料³⁷> 1982年

豚 (品種不明、雌 10 頭/群) に BHA を人工授精の 3 週間前から妊娠 110 日まで混餌投与 (0、50、200 又は 400 mg/kg 体重/日) し、発生毒性試験が実施された。妊娠 110 日に帝王切開した。

摂餌量に影響はみられなかった。400 mg/kg 体重/日投与群の母動物の体重が、対照群に比べて著しい影響がみられた。

肝臓と甲状腺の絶対及び相対重量が用量依存性に増加し、全 BHA 投与群は対照

³⁶ 試験の詳細が不明であることから、参考資料とした。

³⁷ 胎児の観察項目がなく、胎児に対する NOAEL 及び催奇形性を判断できないことから、参考資料とした。

群より有意に高値であった。

生殖及び発生毒性に関するパラメーターに BHA の影響はみられなかった。

ANS パネルは、本試験における母動物毒性に対する NOAEL を 200 mg/kg 体重/日、発生毒性に対する NOAEL を 400 mg/kg 体重/日と判断した。(参照 3) [EFSA 2011, 3.2.5.4] (Hansen et al., 1982)

(6) 発生毒性試験 (サル) <参考資料³⁸> 1976 年

サル (アカゲザル、雌 6 頭/群) に BHA 及びジブチルヒドロキシトルエン (BHT) 混合物を混餌投与 (BHA/BHT : 0/0、50/50 mg/kg 体重/日) し、発生毒性試験が実施された。投与は交配前の 1 年間と交配後の 1 年間 (妊娠期間 165 日間を含む) に渡って実施された。血液生化学的検査を 1 か月毎に実施し、月経周期の記録は試験期間を通じて行われた。投与開始 1 年後に通常飼料を給与されている雄と交配させた。妊娠 40 日、80 日、120 日及び 160 日、分娩後 30 日及び 60 日に血液検査が実施された。

妊娠に伴う異常はみられず、正常な児動物が分娩された。投与群では 5 頭、対照群では 6 頭の児動物が出生した。児動物の血液検査は出生 1、5、15、30 及び 60 日に実施され、観察は 2 歳まで実施された。3 か月齢で投与及び対照群の各 2 頭の児動物は母動物から隔離され、1 か月間のホームケージ観察に供試された。

試験期間中に母動物及び児動物に一般状態に異常はみられなかった。母動物はその後正常な児動物を出産した。投与期間中に出生した児動物については、投与に関連しない要因による死亡 1 例を除き、健康であった。3 か月齢でのホームケージ観察において行動異常はみられなかった。

ANS パネルは、本試験における NOAEL を BHA 及び BHT の混合物として 100 mg/kg 体重/日と判断した。(参照 3) [EFSA 2011, 3.2.5.5] (Allen, 1976)

(7) TBHQ に関する生殖発生毒性試験

① 3 世代生殖発生毒性試験 (ラット) 1968 年

ラット (SD 系、雌雄各 15 匹/群) に TBHQ を混餌投与 (0 又は 0.5%) し、3 世代生殖発生毒性試験が実施された。雌雄を 1 対 1 で交配させ、2 産するまで交配し、第 2 産の離乳児動物から次世代動物を選抜した。F_{3b} 胎児は F₂ 母動物が妊娠 19 日の帝王切開によって得た。

各世代の 2 産とも、交配及び妊娠率、出産率及び同腹児数は正常であった。

F_{1a} 及び F_{2a} の同腹児において、生後から離乳までの死亡数が対照群より多かったが、F_{1b} 及び F_{2b} 世代にはみられなかった。

F₀ 親動物は、対照群より摂餌量が少なく、体重増加量も低かった。

離乳後の各測定時点における投与群の児動物の体重は、対照群より低かった。

離乳から離乳 5 週間までの死亡率 (総動物数中の死亡数の割合) は、対照群において高かった。F_{3b} 親動物の胎児 22 匹に異常所見がみられたが、このうち 13 匹は対

³⁸ BHA 及び BHT の混合物の投与であり、一用量の試験であることから、参考資料とした。

照群であった。投与群の 2 匹に軽微な骨格異常がみられた。

投与に関連した病理組織学的所見はみられなかった。(参照 18) [FAS 40, p12, 2.2.4 の 2 つ目の試験] (Terhaar & krasavage, 1968a)

②生殖毒性試験 (ラット) (a) 1970 年

ラット (SD 系、雌雄各 20 匹/群) に TBHQ を交配前 66 日間混餌投与 (0、0.015、0.15 又は 0.5%) し、試験が実施された。

F₀ 動物は 2 産するまで交配した。F_{1a} 児動物は、継続して添加飼料を投与された。F_{1b} 児動物は、生後 10 日まで F_{1a} 児動物と同様に処置され、10 日齢で、母動物を無添加飼料を与える組と添加飼料を継続して与える組に分けられた。対照群の母動物及び哺育児については、半数は無添加飼料を与え、残りの半数は 0.5%TBHQ 添加飼料を与えた。生後 5 週齢で児動物は解剖した。

親動物の死亡がみられた (投与開始後 5 日間: 0.5%投与群の雄 1 例、対照群 1 例、投与 6 日以降: 各投与群の雄 1 例、対照群の雌 1 例) が、投与による影響とは考えられなかった。

親動物の摂餌量は、0.5%投与群で試験開始時に僅かな減少がみられた以外、対照群と同様であった。0.5%投与群の雄では、対照群より僅かな体重増加抑制がみられた。

性周期、交尾率、妊娠率、妊娠期間、一腹内児数、出生時死亡率、哺育期間中及び離乳後の生存率に投与による影響はみられなかった。

投与群の F_{1a} 児動物の同腹児体重は、対照群と同様であった。

対照群において無添加飼料から 0.5%TBHQ 添加飼料に変更した F_{1b} の児動物の体重は、無添加飼料群に比較して、離乳後 2 週間までやや低かったが、これは摂餌忌避によるかもしれない。 (参照 18) [FAS 40, 2.2.4 の 3 つ目の試験] (Krasavage & Terhaar, 1970)

③生殖毒性試験 (ラット) (b) 1995 年

ラット (F344/N 系、雌 16 匹) に TBHQ を交配前 2 週間から F₁ 児動物の離乳まで TBHQ を混餌投与 (0、2,500、5,000、10,000、20,000 又は 40,000 mg/kg 飼料 (0、125、250、500、1,000 又は 2,000 mg/kg 体重/日相当)) した。

20,000mg/kg 飼料以上投与群の母動物は出産しなかった。10,000 mg/kg 飼料以下投与群では、妊娠期間、同腹児数、死産児のいる母動物数及び哺育 4 日の児動物体重に投与による影響はみられなかった。

10,000 mg/kg 飼料投与群において児の哺育 4 日生存率と離乳時 (生後 28 日) の生存率は、対照群より低かった。

5,000 mg/kg 飼料投与群においても離乳時の児の生存率は対照群より低かったが、有意な差ではなかった。

F₁ 児動物から選抜した児動物を 13 週間亜急性毒性試験に用いた。(参照 18) [FAS 40, 2.2.4 の最後の試験] (NTP, 1995)

④発生毒性試験（ラット） 1977 年

ラット（SD 系、雌 20 匹/群）に TBHQ を妊娠 6～16 日に混餌投与（0、0.125、0.25 又は 0.5%）し、発生毒性試験が実施された。交配及び妊娠 6～16 日以外の期間には無添加飼料を給餌した。妊娠 20 日に帝王切開した。

その結果、各投与群の TBHQ の総投与量は 970、1880 又は 3600 mg/kg 体重となったが、母動物の体重増加及び摂餌量に影響はみられなかった。黄体数、着床数、生存胎児数、吸収胚数、胎児重量及び死亡率は、投与群と対照群で違いはみられなかった。全ての群で骨格検査において骨格変異（過剰肋骨痕跡）がみられたが、その頻度は投与群よりも対照群で 2 倍高かった。本試験で用いた TBHQ の投与量ではラットに催奇形性を示さないと結論された。（参照 18） [FAS 40, 2.2.5 の一つ目の試験] (Krasavage, 1977)

⑤in vitro の発生毒性に関する試験 1988 年

BHA とその代謝物（TBHQ 及び TBQ）の催奇形性を評価するため、細胞培養法を用いて試験を実施した。ラット胎児細胞分化試験では、TBQ > TBHQ > BHA の順で肢芽細胞及び中脳細胞の分化に対して用量相関性の阻害作用を示した。TBQ はヒト胚口蓋間葉系細胞増殖試験において最も強い阻害作用を示した。TBHQ の阻害作用は BHA よりも強いが、TBQ より弱かった。（参照 18） [FAS 40, 2.2.5 の二つ目の試験] (Tsuchiya et al., 1988)

8. その他の毒性試験

【事務局より】

（1）～（3）の試験のタイトルを「〇〇日間（又は週間等）亜急性毒性試験」と記載していましたが、亜急性毒性試験の投与期間ではない試験もあったことから、「〇〇日間投与毒性試験」に変更しました。

（1）胃に対する BHA の影響に関する試験

①28 日間投与亜急性毒性試験（マウス）＜参考資料³⁹＞ 1986 年

マウス（NMRI 系、雄 10 匹）に BHA を 28 日間強制経口投与（0 又は 1,000 mg/kg 体重、落花生油に溶解）した。試験終了時にマウスの前胃に肉眼で病変がみられ、これはラットの病変と類似していた。（参照 23、24） [FAS 24, p2] [FAS 21, p6] (Altmann et al., 1986)

②2 週間投与亜急性毒性試験（ラット） 1990 年

ラット（Wistar 系、5 週齢、雄 10 匹/群）に BHA を 2 週間混餌投与（0、0.25、0.50、0.75、1.0 又は 2.0% (0、125、250、375、500 又は 1,000 mg/kg 体重/日相当)）し、亜急性毒性試験が実施された。BHA 無添加の対照群の他に、2%投与群と同量の

³⁹ 1 用量の試験であることから、参考資料とした。

1 対照飼料を給餌する群 (Pair-fed control : 制限給餌対照群) を設けた。BHA を投与
2 した後、DNA 合成の際に DNA に取り込ませるためにチミジン類似体である 5-ブロ
3 モ-2'-デオキシウリジン (BrdU) をラットに腹腔内投与し、標識率を測定した。

4 その結果、各組織における標識率は、2%BHA 投与群の前胃、腺胃、小腸、結腸/
5 直腸において無添加対照群及び制限給餌対照群に比べて有意に高く、食道では制限
6 給餌対照群より有意に高いが、無添加対照群とは有意な差はみられなかった。前胃に
7 加えて、食道、腺胃、小腸、結腸/直腸も BHA の細胞増殖増強効果の標的組織にな
8 りうることが示唆された。実験終了時の血漿中の BHA 濃度は投与量に依存して増
9 加していた。(参照3) [EFSA 2011, 3.2.2.1 の New studies] (Verhagen et al., 1990)

10 食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、2%投与群の前胃、腺胃、小腸、結腸
11 /直腸に標識率の増加がみられたことから、本試験における NOAEL を飼料添加濃度
12 として 1.0% (500 mg/kg 体重/日相当) と判断した。

13 14 ③9 及び 27 日間投与亜急性毒性試験 (ラット) 1986 年

15 ラット (F344系、雄5匹/群) にBHAを9又は27日間混餌投与 (0、0.1、0.25、0.5、
16 1又は2%(0、50、125、250又は1,000 mg/kg体重/日相当)、飼料: コーン油、ペレッ
17 ト又は粉末) した。投与後、前胃の扁平上皮の増殖変化を組織学的検査した。また、
18 同じ混餌投与計画によるラット (5~15匹/群) に放射標識チミジンを検査直前に注射
19 し、前胃の扁平上皮の標識体取り込みを調べた。

20 0.25%以下投与群の9日間投与したラットでは、標識率への影響はみられなかった。

21 病理組織学的には、0.5%以上投与群のみ過形成が観察され、影響がみられた前胃
22 の領域の大きさは用量依存的であった。ペレット飼料による2%投与群では、投与開
23 始9日後に前胃の小彎に沿って粘膜が局所的に4倍に肥厚していた。乳頭突起及び不
24 規則な間隔に並んだ乳頭間隆起、粘膜肥厚及び角化症が観察された。多くの有糸分裂
25 像が正常な基底層でみられた。粘膜下層では急性の炎症性細胞浸潤もみられた。投与
26 開始27日後には、肥厚は6倍に拡大しており、前胃-胃底腺部境界縁周辺の結合部隣
27 接部で最も顕著であった。ペレット飼料による2%投与群の投与開始9及び27日後に
28 は、標識率は前胃後部基底領域 (pre-fundic region) でおよそ8倍に増加していた。
29 コーン油飼料によるBHA投与群では、投与開始27日後の標識率は4倍に増加したに
30 すぎなかったが、前胃後部基底領域での肥厚は12倍以上に増加していた。前胃中
31 部の中間領域では、標識率に対するコーン油又はペレット飼料によるBHA投与の影
32 響は同様 (2倍) であったが、肥厚はコーン油飼料の方が小さかった (コーン油飼料
33 4倍、ペレット飼料9倍)。ペレット飼料又は粉末飼料によるBHAの影響に意義のあ
34 る違いはみられなかった。中山専門委員修文

35 ANSパネル(EFSAの食品添加物及び食品に添加される栄養源に関する科学パネ
36 ル)は、0.5%以上投与群において前胃に過形成がみられたことから、本試験におけ
37 るNOAELを飼料添加濃度として0.25% (125 mg/kg体重/日相当) と判断した。(参
38 照3、23、90) [EFSA 2011, 3.2.2.1の一つ目の試験、3.2.2.4の次の段落] [FAS 24, p2
39 の一番下の段落] [Food Chem Toxicol 1986] (Clayson et al; 1986)

40 食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、0.5%以上投与群において前胃に過形

成等の病変がみられたことから、本試験におけるNOAELを飼料添加濃度として0.25% (125 mg/kg体重/日相当) と判断した。

④4週間投与亜急性毒性試験（ラット）＜参考資料⁴⁰＞ 1987年

ラット（F344系、雄、5匹/群）にBHA（粉末状）を4週間混餌投与（2%（1000 mg/kg体重/日相当））し、亜急性毒性試験が実施された。

その結果、体重増加の有意な低下や相対肝重量の有意な増加がみられた。食道開口部（Oesophageal orifice）付近の前胃基底部領域には重度の過形成がみられた。また、食道開口部及び前胃との境界縁では、上皮の白色肥厚がみられ、中央領域では斑状の病変が散見された。（参照3、23）[EFSA 2011, 3.2.2.1の3つ目の試験] [FAS 24, p3の2段落目]（Hirose et al., 1987）

⑤4週間投与亜急性毒性試験（ラット）＜参考資料⁴¹＞ 1993年

ラット（F344系、雄5匹/群）にBHAを4週間混餌投与（0、0.5、1又は2%（0、350、710又は1,400 mg/kg体重/日相当））し、亜急性毒性試験が実施された。実験終了の24時間前に、BrdUを投与するために浸透圧ミニポンプをラットに装着した。前胃における細胞増殖はDNAへ取り込まれたBrdUの免疫組織学的検出によって評価した。切片長1 mmあたりの細胞数及び増殖細胞の割合（標識率）を前胃の3か所（盲嚢、中間部位、前基底部領域）について測定した。

その結果、前胃における過形成病変の数と大きさの用量依存的な増加及び標識率の有意な増加が観察された。（参照3）[EFSA 2011, 3.2.2.1のNew studies]（Cantoreggi et al., 1993）

⑥10週間投与亜急性毒性試験（ラット）＜参考資料⁴²＞ 1962年

ラット（系統、性別及び匹数不明）にBHAを10週間混餌投与（0又は500～600 mg/kg体重/日（LD₅₀の1/5量相当））し、亜急性毒性試験が実施された。

その結果、発育速度の低下がみられ、血中酵素、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ及びコリンエステラーゼの活性の低下がみられた。対照群と比較して、肝臓のリン脂質量の減少がみられたが、脂質の蓄積はみられなかった。組織及び器官の組織学検査では、投与に関連した影響はみられなかった。（参照25）[FAS 15, p8の3段落目]（Karplyuk, 1962）

⑦3か月間投与亜急性毒性試験（ラット）＜参考資料⁴³＞ 1986年

ラット（SD系、雄30匹）にBHAを3か月間混餌投与（1%）し、試験が実施された。投与終了後には、動物の66%に前胃の過形成、乳頭腫が26%、癌が6%にみられた。投与群では、活発なDNA合成をしている前胃の細胞の標識率は対照群の11倍以

⁴⁰ 1用量の試験であることから、参考資料とした。

⁴¹ 試験の詳細が不明なことから、参考資料とした。

⁴² 試験の詳細が不明なことから、参考資料とした。

⁴³ 1用量の試験であることから、参考資料とした。

上であった。

別の試験においてBHAを強制経口投与したところ、混餌投与よりも投与の影響が重度であり、癌が強制経口投与では12/18例に、混餌投与では2/20例にみられた。(参照23) [FAS 24, p6の一番下の段落] (Newberne et al., 1986)

⑧3 か月間投与亜急性毒性試験（ラット、肝臓の部分切除）＜参考資料⁴⁴＞ 1986 年

ラット（Wistar 系、10 匹、肝臓の 2/3 を部分的切除）に BHA を混餌投与（2%）したところ、前胃の病変部は有意に速く進行した。癌は 3 か月後に初めてみられた。体重増加抑制はみられなかった。肝臓の部分切除をしていない動物の前胃では一部で過形成がみられたのみであったが、肝臓の部分切除を実施した動物では前胃に腫瘍がみられ、前胃粘膜は白色で肥厚し、密集した小結節がみられた。また、10 例全てに過形成がみられ、顕著な過角化を伴う乳頭腫もみられた。さらに、半数において癌がみられた。癌細胞には異型、核異型及び有糸分裂像が認められたが、分化度は高かった。

筋層及び脂肪組織への癌の浸潤もみられた。顆粒球系細胞、リンパ球及びマクロファージの粘膜下組織への浸潤もみられた。他の全ての器官は正常であった。（参照23） [FAS 24, p6 の 3 段落目] (Abraham et al., 1986)

⑨24 週間投与亜急性毒性試験（ラット）＜参考資料⁴⁵＞ 1986、1987 年

ラット（F344系、雄10匹）にBHAを24週間混餌投与（2%、ペレット飼料）した。また、別のラット（F344系、雄20匹）に24週間BHA混餌飼料を給餌し、その後BHA無添加飼料を72週間給餌し、BHAばく露による影響の消失を調べた。

24週間投与群の前胃では上皮の肥厚がみられ、特に前胃と腺胃の境界縁において顕著であった。

しかしながら、BHAの24週間投与後に72週間無添加飼料を給餌した動物では境界縁付近にごく軽度の肥厚がみられた。

24週間投与群の前胃には、過形成及び乳頭腫がみられた。これらの変化には、重層扁平上皮の上方及びしばしば間質での増殖、加えて基底細胞の下方への増殖による上皮脚の伸長がみられた。粘膜固有層及び粘膜下組織には急性の炎症もみられた。

投与を終了した動物では、過形成及び乳頭腫は完全に消失したが、基底細胞の下方増殖は全投与動物において継続していた。検査した動物のうち3例で乳頭腫がみられた。この群において炎症、基底細胞の異形成及び癌はみられなかった。（参照23）

[FAS 24, p4の1段落目] (Masui et al., 1986a; Ito & Hirose, 1987)

⁴⁴ 供試動物が肝臓を部分切除した動物であることから、一般的な毒性試験と異なることから、参考資料とした。

⁴⁵ 1 用量の試験であることから、参考資料とした。

⑩32 週間投与亜急性毒性試験（ラット）＜参考資料⁴⁶＞ 1986 年

ラット（Wistar 系、雄 10 匹/群）に BHA（粉末）を 32 週間混餌投与（1 又は 2%）し、亜急性毒性試験が実施された。

BHA 全投与群に体重増加抑制の他に、前胃粘膜で扁平上皮の肥厚と扁平上皮乳頭腫がみられた。

2%投与群でみられた腫瘍は、前胃の大部分にみられた。これらの病変は絨毛状で灰白色であった。表面には、壊死を伴う過角化がみられた。本投与群では、乳頭腫の発生頻度は 100%であった。乳頭腫病変は 4 例（発生頻度 20%）で粘膜下組織へ下方伸長していた。

1%投与群では、前胃に単一又は複数のポリープ様腫瘍がみられ、乳頭腫の発生頻度は 40%であった。

被験物質の全投与群の腺胃又は十二指腸に病変はみられなかった。（参照 23）[FAS 24, p6 の 2 段落目] (Takahashi et al., 1986)

⑪1～4 週間投与亜急性毒性試験（ハムスター）＜参考資料⁴⁷＞ 1984 年

ハムスター（シリアンゴールデン、匹数不明）に BHA（2-BHA、3-BHA 又は粗精製 BHA(3-BHA 98%、2-BHA 2%)）を 1～4 週間混餌投与（0 又は 1%）したところ、3-BHA 及び粗精製 BHA 投与群の前胃粘膜の過形成が、2-BHA 投与群よりも進行しており、重度であった。（参照 24）[FAS 21, p6, Hamsters の 2 つ目の試験] (Ito et al., 1984)

⑫1 又は 3 日間並びに 1、2、3、4 又は 16 週間投与毒性試験（ハムスター）＜参考資料⁴⁸＞ 1986 年

ハムスター（シリアンゴールデン、約 30 匹/群）に BHA を 1 又は 3 日間並びに 1、2、3、4 又は 16 週間混餌投与（1%）し、放射標識チミジンを注射し、標識率を測定した。

BHA 投与群では体重が減少したが、肝臓の絶対重量は増加した。

少なくとも 1 週間投与した動物では、前胃上皮の巣状肥厚が潰瘍とともに又は潰瘍を伴わずにみられ、時には密なケラチン状灰白色物質で覆われていた。他の器官には異常はみられなかった。

過形成の重症度は投与期間とともに次第に増した。乳頭腫は投与 4 週から観察され始めた。好中球浸潤もまた観察された。標識率は観察された病変の重症度に比例して増加した。（参照 23）[FAS 24, p7 の 2 段落目] (Hirose et al., 1986d; Ito et al., 1986b)

⁴⁶ 試験の用量が飼料への添加濃度で記載されており、体重 1kg 当たりの BHA 摂取量が不明であることから、参考資料とした。

⁴⁷ 試験の詳細が不明であり、1 用量の試験であることから、参考資料とした。

⁴⁸ 1 用量の試験であることから、参考資料とした。

⑬16 週間投与亜急性毒性試験（ハムスター）＜参考資料⁴⁹＞ 1986 年

ハムスター（シリアンゴールデン、7 週齢、雄 26～32 匹/群）に 2-BHA、3-BHA 又は粗精製 BHA を 16 週間混餌投与（1%（1,200 mg/kg 体重/日相当））し、亜急性毒性試験が実施された。

投与開始 1 日～16 週後（7 時点）に 3 匹ずつ組織学的検査及びオートラジオグラフィ検査に供試した。

2-BHA 投与群では、投与 4 週以降前胃粘膜に重度の過形成がみられ、投与 16 週後に最も重度となり、乳頭腫もみられた。

3-BHA 及び粗精製 BHA 投与群では、投与 1 週以降前胃粘膜に過形成がみられ、投与 4 週後に最も重度となり、それ以降病変は軽減した。乳頭腫は投与 16 週後に最も重度となった。2-BHA、3-BHA 及び粗精製 BHA のいずれも過形成及び乳頭腫を惹起するが、3-BHA 及び粗精製 BHA による病変には可逆的なものがあること、また粗精製 BHA の催腫瘍性は主として 3-BHA によるものであった。（参照 3）[EFSA 2011, p18, 3.2.2.2]（Hirose et al., 1986b）

⑭20 週間投与亜急性毒性試験（ハムスター）＜参考資料⁵⁰＞ 1986 年

ハムスター（品種系統不明、15 匹）に BHA を 20 週間混餌投与（1%）した。そのうち 3 匹に放射標識チミジンを注射した。

BHA 投与群に体重増加の抑制がみられた。白色のケラチン状物質を伴った前胃上皮の肥厚がみられた。全例で重度の過形成がみられ、60%にさらに乳頭腫の病変もみられた。前胃の標識率は対照動物のほぼ 3 倍であった。他の器官では変化はみられなかった。（参照 23）[FAS 24, p7 の 3 段落目]（Hirose et al., 1986b）

⑮5～76 日間投与亜急性毒性試験（ウサギ）＜参考資料⁵¹＞ 1957 年

ウサギ（ニュージーランド白色種、性別及び匹数不明）に BHA を 5～7 日間強制経口投与（1,000 mg/羽/日）し、亜急性毒性試験が実施された。

Na の尿中排泄が 10 倍に、K の排泄が 20%増加した。細胞外液の容積の低下によって血漿中 Na 濃度の著しい変化が防がれた。投与開始 6 日後に血清 K が投与前の約半分に低下し、骨格筋の K 濃度は低下し、Na 濃度は上昇した。心筋の K 及び Na 濃度の変化は、骨格筋より遅く起こり、その程度は軽度であった。BHA は腎臓に直接影響した可能性があった。副腎皮質では球状帯の変化がみられ、Na 及び K の喪失と関連したアルドステロンの尿中排泄の増加がみられた。（参照 25、73）[FAS 15, p8, Rabbit] [Br J Exp Pathol]（Denz & Llauro, 1957）

⑯28 日間投与亜急性毒性試験（モルモット）＜参考資料⁵²＞ 1986 年

モルモット（品種、性別及び匹数不明）に BHA を 28 日間強制経口投与（0 又は

⁴⁹ 1 用量の試験であることから、参考資料とした。

⁵⁰ 1 用量の試験であることから、参考資料とした。

⁵¹ 1 用量の試験であることから、参考資料とした。

⁵² 試験の詳細が不明であることから、参考資料とした。

1,000 mg/kg 体重/日) したところ、胃に肉眼的変化はみられなかった。(参照 24)
[FAS 21, p6, Guinea pigs] (Altmann, 1986)

①85 日間投与亜急性毒性試験 (サル) <参考資料⁵³> [1986 年]

サル (カニクイザル、雌 8 頭/群) に BHA を 1 週間に 5 日間で 4 週間強制経口投与 (0、125、500 mg/kg 体重/日、コーン油に溶解) し、その後投与量を半分にして計 85 日間投与して、亜急性毒性試験が実施された。

その結果、一般状態及び血液生化学的検査において投与に関連した影響はみられず、胃に増殖性変化もみられなかった。投与に関連した病理組織学的変化はみられなかった。統計学的に有意な所見として、500 mg/kg 体重/日投与群において食道遠位部の扁平上皮の基底細胞層の分裂指数 (mitotic index) の上昇 (1.9 倍) がみられた。試験終了時点には、両投与群において肝臓の相対重量が増加した (125 及び 500 mg/kg 体重/日投与群、対照群で $2.64 \pm 0.26\%$ 、 $2.89 \pm 0.39\%$ 、 $2.19 \pm 0.11\%$)。(参照 3) [EFSA 2011, 3.2.2.4 Monkeys] (Iverson et al., 1986)

(2) ラットの前胃に対する BHA の影響の可逆性に関する試験

①1、2 又は 4 週間投与亜急性毒性試験 (ラット) <参考資料⁵⁴> [1985 年]

ラット (Wistar Han/BGA、雌雄) に BHA を 1、2 又は 4 週間混餌投与 (2%) した。対照群には、投与群と同量の BHA 無添加飼料を与えた。

1 週間投与群では、前胃粘膜で上皮の損傷、軽度な過形成及び過角化症がみられた。2 及び 4 週間投与群では、過形成及び過角化症の重症度が増したが、他の所見は軽度であった。過形成は、境界縁の領域で生じた。BHA 無添加飼料を給餌する 4 週間の回復期間を設けると、1 週間投与群でみられた上皮の変化及び軽度の過形成は完全に消失し、境界縁においてごく僅かな細胞数の増加とこれら細胞の好塩基性化がみられただけであった。

2 及び 4 週間投与群でみられた過形成変化は、4 週間の回復期間で部分的に回復した。

別の試験において、ラット (雄) に BHA を 1、2、4、8、16 又は 32 日間強制経口投与 (1 g/kg 体重/日、落花生油溶液) した。前胃の変化は、おもに境界縁より遠位で生じた。

1 日間投与の前胃に軽度の炎症、僅かな上皮損傷及び有糸分裂の増加がみられた。2 日間投与の前胃には軽度の過形成及び過角化症並びに有糸分裂の著明な増加がみられた。

4 及び 8 日間投与では、上皮の過形成は著しかったが、4 日間投与で明らかに増加していた有糸分裂は 8 日間投与では少なくなっていた。

16 又は 32 日間投与では、前胃の過形成病変は回復しているようにみられた。(参照 24) [FAS 21, p5 の 2 段落目] (Altmann et al., 1985)

⁵³ 被験物質の投与が 1 週間に 5 日間であったことから、参考資料とした。

⁵⁴ 1 用量の試験であることから、参考資料とした。

②90 日間投与亜急性毒性試験（ラット） 1986 年

第 1 試験として、ラット（Wistar 系、雌雄各 10 匹/群）に BHA（結晶形）を 90 日間混餌投与（0、0.125、0.5 又は 2%（0、約 62.5、250 又は 1,000 mg/kg 体重/日相当⁵⁵））した。2%投与群の前胃には明らかな変化として、基底部の上皮異形成とともに過角化症及び巨大な乳頭状過形成がみられた。0.5%投与群では 2%投与群ほど明瞭ではなかったが、これらの病変がみられ、0.125%投与群においても軽度な病変としてみられた。

別の群（Wistar 系、雌雄各 5 匹）に BHA を 90 日間混餌投与（2%）し、その後 4 週間の回復期間を設けた。回復期間後には、前胃に軽度な過角化症及び中等度の過形成がみられた。

第 2 の試験として、ラット（Wistar、雌雄各 20 匹/群）に BHA を 90 日間混餌投与（0.025、0.125、又は 2%（約 12.5、62.5 又は 1,000 mg/kg 体重/日相当）、落花生油に溶解）した。投与開始 90 日後に各群 10 匹を検査し、残りの動物は回復試験に供試し、4 週間又は 8 週間の回復期間を設けた。2%投与群の前胃粘膜に、明らかな過形成、さらに 3 例に乳頭状過形成がみられた。結晶形の BHA を用いた試験に対して、本試験の病変は境界縁に限定されていた。0.125%以下投与群には、前胃に病変はみられなかった。

回復試験では、4 週間の回復期間後に 2%投与群の雌 1/10 例に前胃粘膜に軽度な過形成がみられ、8 週間の回復期間後には雌雄各 1 例に同様の病変がみられた。

これらの試験のいずれの動物においても、食道に変化はみられなかった。

JECFA は、本試験における無毒性量（Level causing no toxicological effect）を 0.125%（62.5 mg/kg 体重/日）と判断した。

ANS パネルは、第 1 試験においては BHA 全投与群の前胃粘膜に過形成がみられたことから、第 1 試験における LOEL を 62.5 mg/kg 体重/日と判断した。また第 2 試験では 2%投与群に前胃粘膜の過形成がみられたことから、第 2 試験における NOAEL を 62.5 mg/kg 体重と判断した。（参照 3、24、28）
[EFSA 2011, 3.2.2.1 の 2 つ目の試験、3.2.2.4 の下の段落] [FAS 21, p5 の 3 段落目] [Food Chem Toxicol 1986c] (Altmann et al., 1986)

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、第 1 試験において BHA 全投与群の前胃粘膜に過形成がみられたことから、第 1 試験における LOAEL を約 62.5 mg/kg 体重/日と判断した。第 2 試験では、2%投与群の前胃粘膜に過形成がみられたことから、第 2 試験における NOAEL を約 62.5 mg/kg 体重/日と判断した。

③13 週間投与亜急性毒性試験（ラット）(a) <参考資料⁵⁶> 1985 年

ラット（F344 系、雄、匹数不明）に BHA を 13 週間混餌投与（0、0.1、0.25、0.5

⁵⁵ 参照 3 に記載されている体重 1 kg 当たりの用量

⁵⁶ 試験の用量が飼料への添加濃度で記載されており、体重 1kg 当たりの BHA 摂取量が不明であることから、参考資料とした。

又は2%、粉末飼料) した。

2%投与群では、他の投与群及び対照群より摂餌量及び体重増加量が低く、試験終了時には2%投与群のみ前胃粘膜に増殖性変化がみられた。³H 標識チミジンの標識率の増加が用量依存性でみられ、NOELは0.25%であった。2%投与群のみ前胃に組織学的変化がみられた。

投与13週間後にBHAを休薬し、無添加飼料を給餌すると、標識率は急速に低下し、1週間後には全投与群と対照群は同等になった。無添加飼料の9週間給餌後には、2%投与群の粘膜の状態は、ほぼ正常に戻った。(参照24) [FAS 21, p4 一番下の段落] (Iverson et al., 1985)

④13週間投与亜急性毒性試験(ラット) (b) 1986年

ラット(F344系、雄5匹/群)にBHA(粉末)を13週間混餌投与(0、0.1、0.25、0.5又は2%(0、50、125、250又は1,000 mg/kg体重/日相当))し、亜急性毒性試験が実施された。

2%投与群において、著しい体重増加抑制がみられた。また、本投与群の前胃上皮に増殖性変化がみられ、これらの動物では扁平上皮の肥厚及び基底細胞の下方への増殖(downward proliferation)がみられた。角化症に加えて、真皮乳頭(papillae)及び上皮脚(rete pegs)の伸長もみられたが、前胃の筋層は正常であった。0.5%投与群の動物では標識率(labeling index)⁵⁷は投与開始9日後には2.5倍になり、2%投与群では投与開始91日後には5.3倍であった。投与終了1週間後には、被験物質の全投与群において動物は正常に戻ったが、粘膜病変の回復はより緩慢で、投与終了9週間後においても観察された。

上述の追跡試験として、ラットに①BHAを3か月混餌投与(2%)し、その後基礎飼料を12か月投与又は②BHAを6か月混餌投与(2%)し、その後基礎飼料を9か月投与して、前胃を検査した。両投与群の前胃は組織学的にはほぼ正常で、6か月投与群は上皮の下方伸長が少数みられた。しかし、2%BHAを12か月投与した後に3か月基礎飼料を投与したラットの2例は、前胃に扁平上皮癌がみられ、その他の動物には、標識率で示されるように、高い増殖率の乳頭状増殖がみられた。(参照23) [FAS 24, p3の3段落目] (Clayson et al, 1986)

ANSパネルは、0.5%以上投与群で過形成がみられたことから、本試験におけるNOAELを飼料添加濃度として0.25%(125 mg/kg体重/日相当)と判断した。(参照3) [EFSA 2011, 3.2.2.1の最初の試験、3.]

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、0.5%以上投与群で過形成がみられたことから、本試験におけるNOAELを125 mg/kg体重/日と判断した。

⑤④6、12又は15か月間投与亜急性毒性試験(ラット) <参考資料⁵⁸> 1986年

⁵⁷ ある特定の物質を動物に投与し、免疫組織学的染色によって測定した器官中の細胞数および増殖割合

⁵⁸ 1 用量の試験であることから、参考資料とした。

ラット（系統、性別及び匹数不明）に BHA を 6、12 又は 15 か月間混餌投与（2%、落花生油に溶解）した。その後、2 又は 7 か月間の回復期間を設けた群と設けない群を設定した。

組織学的検査は、(1)噴門部付近の食道、(2) 境界縁に隣接する大弯部の前胃及び腺胃、(3)食道開口部付近の前胃及び腺胃に対して実施した。粘膜に過角化症又は錯角化症がみられたが、特に境界縁の近傍にみられた。

12 か月間投与では、3/10 例の前胃粘膜上皮に限局性異形成がみられ、4/10 例の前胃粘膜上皮に広範な異形成がみられた。病変のタイプと程度は、前胃の異なる領域においても同様であった。

12 か月間の投与後に 2 か月間の回復期間を設けた場合、大弯部の病変はほぼ完全に消失したが、食道開口部付近の胃の病変は残存した。

15 か月間の投与後に 7 か月間の回復期間を設けた場合、広範な過形成、乳頭腫、異形成及び侵襲性増殖（本試験条件では、粘膜筋板までは達していなかった。）といった前胃の変化はほぼ完全に消失した。（参照 24）[\[FAS 21, p5, 4 段落目\]](#) (Altmann et al., 1986)

(3) 胃に対する TBHQ の影響に関する試験

①4 週間投与亜急性毒性試験（ラット）1994 年

ラット（系統、性別及び匹数不明）に TBHQ を単独又は前胃の発がんプロモーター物質である亜硝酸 Na の飲水投与と組み合わせて、4 週間混餌投与（2%）し、亜急性毒性試験が実施された。

TBHQ 単独投与群では前胃の前基底部及び中間領域の粘膜の肥厚がみられた。TBHQ と亜硝酸 Na の同時投与群では前胃粘膜の厚さは、TBHQ 単独、亜硝酸 Na 単独又は対照群の 10 倍以上に増加した。腺胃及び食道にも軽度の粘膜の肥厚がみられた。粘膜の肥厚に関する影響は BrdU の標識率の増加を伴っていた。（参照 10）[\[EFSA 2004, p13 の一番下の試験\]](#) (Kawabe et al., 1994, Yoshida et al., 1994)

②20 週間投与亜急性毒性試験（ハムスター）1986 年

ハムスター（[品種系統](#)、性別及び匹数不明）に TBHQ を 20 週間混餌投与（0.5%）し、亜急性毒性試験が実施された。

その結果、TBHQ 投与による前胃、腺胃及び膀胱に過形成又は腫瘍性病変は生じず、検査した組織において標識率の増加はみられなかった。（参照 10）[\[EFSA 2004, p14 の一番上の試験\]](#) (Hirose et al., 1986)

(4) 発がん性に関する促進作用又は抑制作用

既知の発がん性物質等の発がん性に対する BHA 及び TBHQ の促進又は抑制作用を[それぞれ表 32 及び 33](#)に示した。

BHA 及び TBHQ ともに、促進又は抑制作用を示す試験結果であった。（参照 10、[18](#)、24、65、71）[\[EFSA 2004, p20～21\]](#) [\[FAS 40 TBHQ, 2.2.11\(p18～19\)\]](#) [\[FAS 18, p3～4\]](#) [\[Toxicol Pathol 1986\]](#) [\[FAS 21, p3～4\]](#)

1
2

表 32 BHA の発がん性に対する促進又は抑制作用

動物	発がん性物質	BHA の投与	対象 病変	結果	参照
マウス (ICR/Ha 系、雌)	ベンゾ(a)ピレン:強 制経口(1 mg/匹/回、 2 回/週、4 週間)	混餌投与(0.03、0.06 mmol/g 飼料) (投与 8 日前から最終投 与 3 日後まで) ^a	前胃腫 瘍	抑制	71 [FAS 18, p4] (Wattenberg et al., 1980)
マウス (CF1 系、雌)	メチルアゾメタノ ール酢酸塩: 2 回 注射(4 日間隔)	2 週間混餌投与(300、 1,000、3,000、6,000 ppm) (投与前) ^a	死亡数 肝臓等 の器官 の病理 組織学 的所見	減少 抑制	71 [FAS 18, p3] (Reddy et al., 1982)
ラット (F344系、 雄)	N-メチル-N'-ニト ロ-N-ニトロソグア ニジン(MNNG): 単 回強制経口投与 (150 mg/kg 体重)	32 週間混餌投与(0.5%) (投与 1 週間後から) ^a	<u>前胃及 び腺胃 の癌</u> (前胃、 腺胃) 吉田専 門委員 修文	促進(前胃 のみ)	65 [Toxicol Pathol 1986] (Ito et al., 1986)
ラット (系統不 明)	N-メチルニトロソ ウレア(MNU): 腹 腔内投与(20 mg/kg 体重、2 回/週、4 週 間)	32 週間混餌投与(2%) (最終投与後から) ^a	前胃の 乳頭 腫、癌	促進 (乳頭腫、 癌)	
ラット (系統不 明)	MNU: 4 週間投与	32 週間混餌投与(2%) (投与後) ^a	前胃の 癌及び 乳頭腫 膀胱の 乳頭 腫、乳 頭状及 び結節 性過形 成	促進 促進	24 [FAS 21, p3] (Imaida et al., 1984)
ラット (F344系、 雄)	<u>1,2-ジメチルヒドラ ジン(DMH)</u> : 皮下 投与(20 mg/kg 体 重、1 回/週、4 週間)	36 週間混餌投与(0.5%) (最終投与 1 週間後か ら) ^a	結腸癌	影響なし	65 [Toxicol Pathol 1986] (Ito et al., 1986)

ラット (F344系、雄)	<u>N-エチル-N-ヒドロキシエチルニトロソアミン(EHEN)</u> : 2週間飲水投与(0.1%)	29週間混餌投与(2%) (最終投与後 1週間から) ^a	肝臓の過形成、肝細胞癌	抑制 (過形成の数及び肝細胞癌)	65 [Toxicol Pathol 1986] (Ito et al., 1986)
ラット (F344系、雄)	N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン(BBN) : 4週間飲水投与(0.05%)	3週間混餌投与(2%) (最終投与後) ^a	膀胱の過形成、乳頭腫、癌	促進 (乳頭腫、癌)	65 [Toxicol Pathol 1986] (Ito et al., 1986)
	BBN : 2週間飲水投与(0.05%)	22週間混餌投与(0.5、1、2%) (最終投与後) ^a	膀胱の過形成、乳頭腫、癌	促進 (過形成)	
ラット (系統不明)	MNU : 腹腔内投与(20 mg/kg 体重、2回/週、4週間)	32週間混餌投与(2%) (最終投与後から) ^a	膀胱の過形成、乳頭腫、癌	促進 (過形成、乳頭腫)	
ラット (系統不明)	BBN : 4週間投与	32週間混餌投与(2%) (最終投与後から) ^a	膀胱癌腫、乳頭腫、乳頭状又は結節性過形成 吉田専門委員 修文	促進	24 [FAS 21, p4] (Imaida et al., 1983)
ラット (SD系、雌)	<u>7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン(DMBA)</u> : 強制経口投与(0.25 mg/kg 体重)	33週間混餌投与(1%) (投与 1週間後から) ^a	乳腺腫瘍	抑制	65 [Toxicol Pathol 1986] (Ito et al., 1986)
ラット (F344系、雄)	EHEN : 2週間飲水投与(0.1%)	29週間混餌投与(2%) (最終投与後 1週間から) ^a	腎臓の腺腫、腺癌	影響なし	65 [Toxicol Pathol 1986] (Ito et al., 1986)
ラット (系統不明)	MNU : 腹腔内投与(20 mg/kg 体重、2回/週、4週間)	32週間混餌投与(2%) (最終投与後から) ^a	甲状腺の腺腫、腺癌	影響なし	65 [Toxicol Pathol 1986]

					(Ito et al., 1986)
--	--	--	--	--	--------------------

a : 発がん性物質の投与に対する BHA の投与時期

b : DEN 投与の 3 週間後に切除した。

c : 胎盤型 GST 融合の病巣

表 33 TBHQ の発がん性に対する促進又は抑制作用

動物	発がん性物質	TBHQ の投与	対象 病変	結果	参照
ラット (SD 系、 雌 20 匹/ 群)	DMBA : 強制経口 投与(50 mg/kg 体 重/日)	51 週間混餌投与(0.8%) (投与 1 週間後から) ^a	乳腺腫 瘍	抑制	18 [FAS 40 TBHQ, 2.2.11(p18)] (Hirose et al.,1988)
			耳管及 び前胃 の腫瘍	影 響 なし	
ラット (SD 系、 10 匹/群)	ジメチルニトロソ アミン(亜硝酸 Na(125 mg/kg 体 重)とジメチルアミ ン(1,000 mg/kg 体 重)を強制経口投与	強制経口投与(25、75、 225 mg/kg 体重) (投与直後) ^a	肝細胞 壊死	抑制	18 [FAS 40 TBHQ, 2.2.11.1(p18)] (Astill & Mulligan et al.,1977)
ラット (F344/Du lrj 系、雄 20 匹/群)	BBN : 4 週間飲水 投与(0.05%)	36 週間混餌投与(2%) (投与後) ^a	膀胱の 乳頭状 又は結 節性過 形成	促進	10、18 [EFSA 2004, p20] [FAS 40 TBHQ, 2.2.11.2(p19)] (Tamano et al., 1987)
			膀胱癌 又は乳 頭腫	影 響 なし	
ラ ッ ト (F344 系、 雄 20 匹/ 群)	BBN : 4 週間飲水投 与(0.05%)	32 週間混餌投与(TBHQ 単独 0.8%、BHA 又は BHT との併用で各 0.4%) (投与後) ^a	膀胱の 乳頭様 又は結 節様過 形成	促進	10、18 [EFSA 2004, p20-21] [FAS 40 TBHQ, 2.2.11.2(p19)] (Hagiwara et al., 1989)
			膀胱癌 又は乳 頭腫	影響 なし	
ラ ッ ト (F344 系、 雄 20 匹/ 群)	MNNG : 単回単回 強制経口投与(100 mg/kg 体重)	36 週間混餌投与(1%) (最終投与 3 日後から) ^a	結腸癌	抑制	18 [FAS 40 TBHQ, 2.2.11(p18)] (Hirose et al.,1993)
	EHEN : 単回単回 強制経口投与(750		腎臓の 前腫瘍 性病変 及び腫 瘍	抑制	

	mg/kg 体重)		食道の 乳頭様 又は結 節様過 形成及 び乳頭 腫、 前胃の 乳頭腫	促進	
	<u>N-メチルベンジル ニトロソアミン</u> MBN : 2 回皮下投 与(0.5 mg/kg 体重)				
	DMH : 4 回皮下投 与(40 mg/kg 体重/ 日)				
	上述の投与と同時 に、 <u>N-ジブチルニ トロソアミン</u> DBN を 4 週週間飲水投 与(0.1%)し、その後 <u>N-ビス(2-ヒドロキ シプロピル)ニトロ ソアミン</u> DHPN を 2 週間飲水投与 (0.1%)				

a : 発がん性物質の投与に対する BHA の投与時期

(5) 酵素誘導及び遺伝子発現に関する知見

BHA の投与後のマウス又はラットの肝臓において、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、エポキシドヒドラーゼ、カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ等の酵素活性の上昇といった酵素誘導が生じたという知見がある。(参照 3、24、25、71) **[EFSA 2011, 3.2.7.5(p34)] [FAS 21, p1~2] [FAS 15, p1~3] [FAS 18, p1]**

また、TBHQ についても同様に酵素誘導の報告があり **[FAS 40, 2.1.3(p4)]**、BHA 及び TBHQ の酵素誘導のメカニズムについては、解毒化酵素等の上流域にある抗酸化剤応答配列 (Antioxidant Responsive Element (ARE)) への転写因子 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2 related factor 2) の結合を介した遺伝子の転写促進によると報告されている。 **[EFSA 2011, 3.2.7.2(p31, Nair et al., 2006)] [Toxicol Appl Pharmacol 2010]**。TBHQ に関しては、*in vivo* 又は *in vitro* の試験で芳香族炭化水素受容体 (AhR) を介して酵素 (チトクローム p450、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、UDP-グルクロン酸トランスフェラーゼ等) の誘導がみられた (参照 18、88) **[FAS 40, 2.1.3(p4)] [Drug Metab Dispos 2005]**が、TBHQ の酵素誘導に AhR は関与していないとの報告もある。(参照 18) **[FAS 40, 2.1.3(p5, Liu et al., 1994)]**

(6) 細胞毒性に関する知見

BHA の細胞毒性について複数の試験が実施されている。(表 34) それらの結果から BHA は細胞毒性を有し、ミトコンドリア活性の阻害及び活性酸素種の誘導が主な要素と考えられた。(参照 3) **[EFSA 2011, 3.2.7.3(p32)]**

表 34 BHA の細胞毒性に関する試験

使用した物質	使用した細胞	結果
BHA	ヒト由来培養細胞 (皮膚線維芽細胞、ケラチノサイト、メラノサイト、黒色腫瘍細胞)	供試した細胞全種で細胞毒性が観察されたが、唯一異物代謝能を維持しているケラチノサイトではさらに毒性が顕著であった。
BHA	ヒト単球性白血病細胞 (U937)	BHA 濃度 0.75 mM で細胞毒性を誘発し、カスパーゼの活性化、核の凝縮と断片化、ミトコンドリアの構造的損傷、ミトコンドリアの膜電位の低下及びヌクレオソーム単位での切断を惹起したことから、ヒト単球性白血病細胞 (U937) の細胞死はアポトーシス経路に関連していると推察。
BHA	サル腎臓由来細胞 (Vero 細胞)	低用量の BHA でミトコンドリア機能が の 喪失し、BHA 濃度が上昇するにつれて、リソゾーム、ミトコンドリア及び細胞骨格(アクチンフィラメント)の形態変化を伴った。アポトーシスの誘導に先行して細胞増殖能の不可逆的な喪失が観察されたことから、BHA の用量依存性の作用は細胞毒性作用であり、かつ細胞増殖抑制作用のようであった。
BHA、TBHQ、BHA-OH、	ラット肝細胞	時間依存的に細胞死がみられた。ミトコンドリアの呼吸抑制がみられた(BHA-OH において最も顕著な呼吸抑制が観察された)ことから、細胞の呼吸系が重要な標的と考えられた。
BHA、BHT	ヒト前骨髄球性白血病細胞 (HL-60)、 ヒト扁平上皮癌細胞 (HSC-2)	BHA 単独及び BHT との併用によって細胞毒性が認められ、BHT との併用ではより顕著であった。同様の傾向が、ヌクレオソーム間 DNA 断片化、マンガンスーパーオキシドジスムターゼ mRNA 発現解析及びカスパーゼ 3、8 及び 9 活性化でも認められた。本研究において BHA は BHT との併用によって細胞毒性及びアポトーシス誘発因子としてより強い作用を発揮することが示された。 著者らは、BHA と BHT の併用による強い細胞毒性とアポトーシスの誘発は BHA フェノキシラジカルと BHT 又は BHT フェノキシラジカルの相互作用に由来する反応中間物による可能性があるとして述べている。
BHA	マウス結合組織細胞 (L929)	BHA の活性酸素種捕捉活性について、L929 細胞のミトコンドリア電子伝達系酵素複合体活性の阻害反応及びリポキシゲナーゼ活性の阻害反応によって調べた結果、BHA は活性酸素種捕捉作用を持つと共にミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I の活性阻害能及びリポキシゲナーゼ活性の阻害能を有することから、 壊死による細胞壊死 をもたらす可能性が示された。

3 (7) 内分泌様作用に関する知見

BHA の内分泌様作用に関する知見を表 35 に示した。In vitro では、エストロゲン作用又は抗アンドロゲン作用がみられたが、in vivo の試験では抗エストロゲン作用がみられた。(参照 3、79、80、81) [EFSA 2011, 3.2.7.4] [薬学雑誌] [Clujul medical]

表 35 BHA の内分泌様作用 小林専門委員修文

試験系	使用した動物等	結果	参照
in vitro	ヒト乳癌由来細胞 (MCF-7)	細胞は、17β-エストラジオール及び BHA によって増殖したが、TBHQ では増殖しなかった。 また、17β-エストラジオールと同様に、BHA はヒトエストロゲン α 受容体及びプロゲステロン受容体遺伝子の発現量をそれぞれ低下抑制及び上昇促進した。	3、79 [EFSA 2011, 3.2.7.4] [薬学雑誌] (Okubo and Kano, 2003)
	ヒト乳癌由来細胞 (MCF-7) ^a	エストロゲン様のように、細胞増殖作用を示した。	3、80 [EFSA 2011, 3.2.7.4] [Clujul medical] (Soto et al., 1995)
	ヒト前立腺癌由来細胞 (組換えヒト PC-3)	デヒドロテストステロンの転写活性の阻害を測定する試験系において、アンドロゲンのアンタゴニストとして作用した。	3 [EFSA 2011, 3.2.7.4] (Schrader and Cooke, 2000)
	ヒト ER 欠失骨芽細胞 (U2-OS) ^b	エストロゲン作用がみられたが、その程度は $ER\beta$ と比べて、 $ER\alpha$ のほうが弱かった。また、BHA とエストラジオールの併用によって ER に対する相加的な作用がみられた。	80 [Clujul medical] (ter Veld et al., 2006)
	ヒト乳癌由来細胞 (MDA-kb2) ^c	単独ではアンドロゲン作用を示さなかったが、 5α-DHT ジヒドロテストステロンの存在下で抗アンドロゲン作用を示した。	81 [Toxicol In Vitro 2016] (Pop et al., 2016)
in vivo	マウス (CD-1 系、雌)	【投与】 18 日間又は 3 週間混餌投与(0.75%(約 1,125 mg/kg 体重/日相当)) 【結果】 3 週間投与によって、肝ミクロソームによるエストラジオール及びエストロンのグルクロン酸抱合化が増大した。 BHA18 日間投与後のエストラジオール及びエストロンの腹腔内投与による血清及び子宮中濃度が 30～60%低下した。ま	3、80 [EFSA 2011, 3.2.7.4] [Clujul medical] (Zhu et al., 1997))

		た、エストラジオール及びエストロンの刺激による ^3H 標識チミジンの子宮 DNA への取り込みを阻害した。		
	ラット (SD 系、 <u>未成熟</u> 雌 及び去勢 雄)	【投与】 (エストロゲン作用) <u>未成熟</u>雌に 3 日間皮下投与(50、100、250、500 mg/kg 体重/日、±エストラジオール) (アンドロゲン作用) 去勢雄に 10 日間経口投与(50、100、250、500 mg/kg 体重/日、±テストステロンプロピオン酸エステル) 【結果】 (エストロゲン作用) BHA 全投与群で子宮の絶対及び相対重量の低下がみられ、17β-エストラジオールの刺激による子宮及び膈重量の増加が抑制された。 (アンドロゲン作用) <u>毒性学的意義はのめる影響</u>なし	抗エストロゲン作用	3、80 [EFSA 2011, 3.2.7.4] [Clujul medical] (Kang et al., 2005)
	ラット (SD 系、 雌雄)	【投与】 妊娠前～哺育期間及び児動物が 13 週齢になるまで強制経口投与(0、10、100、500 mg/kg 体重/日) 【結果】 100 mg/kg 体重/日以上投与群の膈重量の減少及び 500 mg/kg 体重/日投与群の膈開口遅延がみられた。	抗エストロゲン作用	80 [Clujul medical] (Jeong et al., 2005)
	【小林専門委員コメント】 【結果】の欄で、雌の記述しかないので、削除したらいかがでしょうか。			

- 1 a : エストロゲンの発現調節を受けるルシフェラーゼ遺伝子を導入
2 b : ER 依存性のルシフェラーゼ遺伝子及び ER α 又は ER β 発現遺伝子を導入
3 c : AR 依存性のルシフェラーゼ遺伝子を導入
4

5 (8) 免疫反応への影響

6 BHA に関して *in vitro* で脾臓細胞の免疫応答を抑制 (参照 25) [FAS 15, p6]、グ
7 アニル酸シクラーゼ機能阻害によって免疫応答を抑制 (参照 24) [FAS 21, p2]する
8 ことが報告されている。

9 また、TBHQ については、*in vivo* の試験 (マウス) では、TBHQ の経口投与後に
10 補体第 3 因子の軽度の増加、腹膜由来付着細胞の Fc 領域を介した付着能及び貪食能
11 の軽度の増加及び NK 細胞活性の軽度の増加がみられた。これらの免疫応答の増強
12 は、TBHQ 投与による生理学的な反応と考えられた。(参照 10) [EFSA 2004, p23]
13 (NTP Study Number: IMM87036)
14

9. ヒトにおける知見

(1) 過敏症及びアレルギーに関する知見

参照 3 及び 25 に、過敏症~~及びアレルギー~~に関して複数の試験が記載されている。それらのうち主な試験を以下に記載した。(参照 3、25) [EFSA 2011, 3.2.6 (p30-31)] [FAS 15, p6]

これらの試験結果から、BHA の経口摂取が過敏症~~又はアレルギー~~に関与しているかどうか明確な結論は得られていない。

132 名を対象に、二重盲検プラセボ対照経口投与試験が実施され、低用量 (1 mg BHA 及び BHT) 及び高用量 (50 mg BHA 及び BHT) が投与 (カプセル) された。それらの食品添加物の摂取と症状には関連性が見いだされなかった。(参照 3) [EFSA 2011, 3.2.6 (p31)] (Young, 1997)

合計 112 人の継続患者 (consecutive patients) について、接触性皮膚炎に関して BHA 及び BHT のパッチ試験 (2%、ワセリンに溶解) が実施された。2 名が両化合物に陽性であり、1 名が BHA のみ、別の 1 名が BHT のみに陽性であった。湿疹治療~~の処置~~を受けている患者のうち 2 名は、抗酸化剤無添加の食事の摂取では無症状であったが、毎日 5 又は 10 mg BHA の経口投与を行った際には湿疹の再発を起こした。合計 83 人の継続患者について、BHA 及び BHT をアルコールに 5%濃度で溶解した試験を実施した結果、全ての試験において陰性であった。(参照 25) [FAS 15, p6] (Roed-Petersen and Hjorth, 1976)

(2) 胃癌に関する疫学的知見

BHA の食物を介した摂取と胃癌発症リスクの関連性が「オランダコホート研究」において調べられた。~~本研究は、1986 年に 55～69 歳の男女 120,852 名を対象として開始された。半定量的な食事頻度アンケート (a semi-quantitative food frequency questionnaire) が食物摂取量の調査に用いられた。調理用油脂、マヨネーズ及びクリーム状のサラダドレッシング並びに乾燥スープ中の BHA 含有量は、化学分析、食品添加物データベース等から得られた。~~

本研究において、胃癌発症リスクと日常の食事由来通常の低~~レベル~~の BHA 摂取との間に有意な関連性は見いだされなかった。(参照 3) [EFSA 2011, 3.2.7.1 (p31)] (Botterweck et al., 2000)

Ⅲ. 国際機関等における評価

1. JECFA における評価

1961～1999 年の間に複数回評価している。現在の ADI (0.5 mg/kg 体重/日) は 1989 年に設定しており、それまで暫定的な ADI を設定していた。

遺伝毒性に関しては、変異原性を有しないと判断された。

発がん性については、ラット前胃に扁平上皮癌が生じるためには、BHA の 6～12 か月間の混餌投与 (2%) が必要であった。0.125%混餌投与で前胃に軽度の過形成が生じたが、0.1%では生じなかった。豚の試験を再度評価したところ、食道にみられた過形成は疑わしいと判断した。また、豚におけるこの影響は、ラットの前胃に影響する BHA 濃度よりも有意に高い濃度で生じた。イヌの試験では、投与による悪影響はみられなかった。

ヒトには前胃がないことから、ラットの試験結果をヒトに関連付けることは本質的に疑問であるが、ラットの試験を容易に無視することはできないと考えた。1986 年にも議論し、近年の試験でも確認されているラットに生じる用量依存性と可逆性のある病変に基づき、ADI を設定することは可能であると結論した。

ADI は、ラットの長期毒性試験で得られた無毒性量 (Level causing no toxicological effect) の 0.1% (50.0 mg/kg 体重/日相当) に安全係数 100 を適用して、0.5 mg/kg 体重/日と設定した。(参照 23、24、92) [FAS 24] [FAS 21] [TRS 776, p14-15]

2. EU における評価

食品科学委員会 (SCF) は、1978、1983 及び 1989 年に評価している。1989 年の評価では、ラットを用いた 90 日間毒性試験における前胃の過形成に基づく無作用量の 62.5 mg/kg 体重/日に安全係数 100 を適用すること、またラットを用いた慢性毒性試験で得られた無影響量の 250 mg/kg 体重に安全係数 500 を適用することを考慮した上で、暫定的に ADI を 0.5 mg/kg 体重/日と設定した。(参照 82) [SCF 1989, p20]

ANS パネルは、新たに入手されたデータに基づき、2011 年に食品添加物としての BHA の再評価を実施した。遺伝毒性については、BHA の *in vitro* の染色体異常誘発性は活性酸素種の形成による二次的な影響のようであり、閾値が設定できると判断した。また、実施された多くの長期毒性試験及び発がん性試験では、前胃を有する動物のみに胃の過形成、乳頭腫及び癌がみられたことに留意した。この時点で得られている試験結果等から、SCF が設定した 0.5 mg/kg 体重/日を改正する根拠はあると判断した。

マウス及びラットを用いた長期毒性試験から、前胃の過形成に対する BMDL₁₀ は、マウスでは 245 mg/kg 体重/日、ラットでは 115 及び 83 mg/kg 体重/日と推定したが、齧歯類における前胃の過形成はヒトのリスク評価には関連がないと判断した。

ラットを用いた生殖発生毒性試験で児動物における発育遅延、死亡率増加及び行動への影響が観察され、NOAEL として 0.1% (100 mg/kg 体重/日) が得られた。こ

1 の NOAEL は、ラット前胃における過形成に対する 2 つの BMDL₁₀ の範囲内である
2 ことから、ラット前胃における過形成に対する BMDL₁₀ をカバーしていると判断し
3 た。NOAEL 100 mg/kg 体重/日に安全係数 100 を適用し、ADI を 1.0 mg/kg 体重/
4 日とした。(参照 3、10) [EFSA 2011, 4.Discussion, Conclusion(p335,36)] [EFSA
5 2004, Discussion, Conclusion and recommendations(p24~28)]
6

7 3. 国際がん研究機関 (IARC) における評価

8 グループ Group 2B (ヒトに対して発がん性がある可能性がある (possibly
9 carcinogenic to humans))⁵⁹実験動物への発がん性については十分なエビデンスがあ
10 るが、ヒトに対する十分なエビデンスがない) に分類している (1983 及び 1989 年)
11 が、2003 年の評価において、実験動物の前胃に BHA によって腫瘍が発生するメカ
12 ニズムには、前胃における長い貯留時間に生じたフリーラジカルの生成が関与して
13 おり、その後の細胞毒性及び過形成に発展していると考えた。BHA の慢性摂取によ
14 って過形成が維持され、前胃に特異的な腫瘍の形成につながっていくと考えた。(参
15 照 83、84) [IARC 1987, p59] [IARC 2003]
16
17

⁵⁹ 参照 93 から定義を引用した。

IV. 食品健康影響評価

体内薬物動態試験において、経口投与後には動物体内に速やかに吸収された。体内に吸収された後の代謝において、BHA が酸化されて生じた TBHQ、TBQ 等の他に、グルクロン酸又は硫酸抱合体がみられた。排泄では、未変化体及び代謝物が主に尿に排泄される他、糞便にも排泄された。

残留試験について、豚及び鶏において 150 ppm 投与群では投与直後では残留がみられたが、休薬期間の経過とともに残留はみられなくなった。鶏卵においては、卵黄に残留する傾向がみられ、150 ppm 投与群の最終投与 7 日後で 0.05 µg/g であった。魚類の残留試験では、筋肉には検出されなかった。

遺伝毒性については、BHA 及びその代謝物である TBHQ 等には遺伝子突然変異誘発性はないが、染色体異常誘発性は有すると考えられた。しかしながら、この染色体異常誘発性は、代謝物として生成されたキノン化合物によって活性酸素種が生じたことによる二次的な影響と考えられたことから、BHA 及び TBHQ 等の代謝物は生体にとって特段問題となる遺伝毒性は示さない~~なく、ADI を設定することは可能である~~と考えられた。

発がん性については、BHA を投与したマウス、ラット及びハムスターの前胃において発がんがみられたが、前胃以外の器官に BHA に関連した発がんはみられなかった。~~前胃を持たない動物（イヌ、豚及びサル）にはみられなかった。~~代謝物である TBHQ の投与では、マウス及びラットの前胃に発がんはみられなかった。さらに、ラットの前胃に生じた増殖性変化が投与中止後に回復したといった知見も得られている。また、前胃を持たない動物（イヌ、豚及びサル）に発がんはみられなかった以上のことから、前胃を有する動物の前胃に認められた発がん性は、前胃に特異的なものであり、ヒトとの~~には~~関連性がないと判断した。

以上のことから、BHA の ADI を設定することは可能であると判断した。

亜急性毒性及び慢性毒性試験で認められた影響は、前胃の増殖性変化の他には、ラットで慢性間質性腎炎、イヌで体重増加抑制、肝細胞変性であった。

生殖発生毒性では、児動物に対する毒性（離乳時死亡率の増加、行動への影響）がみられたが、催奇形性はみられなかった。

各種毒性試験からのうち前胃の増殖性変化以外の毒性所見をエンドポイントとして得られた最も低い NOAEL は、イヌを用いた 15 か月間慢性毒性試験で得られた 50 mg/kg 体重/日であった。この NOAEL は、通常、試験に用いる品種とは異なる品種のイヌを用いた試験で得られている。しかしながら、ラットの 104 週間慢性毒性及び発がん性試験では 98 mg/kg 体重/日の LOAEL が得られていることから、イヌの試験で得られた NOAEL 50 mg/kg 体重/日を ADI の設定に用いることが適当と判断した。

BHA の ADI の設定に当たっては、この NOAEL に安全係数 100 を適用し、0.5 mg/kg 体重/日と設定することが適当であると判断した。

以上から、BHA の食品健康影響評価については、ADI として次の値を採用することが適当と考えられる。

1 BHA ~~ブチルヒドロキシアニソール~~ 0.5 mg/kg 体重/日

2
3 暴露量については、当評価結果を踏まえ暫定基準値の見直しを行う際に確認することとする。

5 **【事務局より】**

ADI の算出に、イヌの 15 か月間慢性毒性試験で得られた NOAEL (50 mg/kg 体重/日) を用いましたが、本試験は古く (1960 年)、用量設定も 50 mg/kg 体重/日を超える用量は最高用量の 250 mg/kg 体重/日となっています。

一方、ラットの生殖毒性試験で得られた NOAEL 100 mg/kg 体重/日は、イヌの試験の 50 mg/kg 体重/日と 250 mg/kg 体重/日の間の用量となります。また、EFSA は、このラットの生殖毒性試験から ADI を設定しています。(イヌの 15 か月間慢性毒性試験は EFSA の評価書(参照 3)には記載されていません。)

ADI の設定根拠とすべき試験について、ご検討お願いいたします。

6 **【事務局より】**

イヌの 15 か月間慢性毒性試験に用いた品種が通常の試験に用いる品種ではないこと、発がん性に関する記載をより分かりやすくすることを考慮して、上記のように修文しました。

1 表 36 JECFA、EFSA 及び食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会における無毒性量
2 等の比較

動物種	試験	投与量 (mg/kg 体重/ 日)	無毒性量等 (mg/kg 体重/日)		
			JECFA	EFSA	肥料・飼料等専門調査会
マウス	104 週間 発がん性 ①	0、約 750、約 1,500	—	—	約 750 前胃の過形成
	104 週間 発がん性 ②	0、約 750、約 1,500	—	245 (BMDL ₁₀)	約 750 前胃の乳頭腫
ラット	104 週間 慢性毒性 及び発がん性	雄 / 雌 : 0/0、 98/108、414/474	—	115 (BMDL ₁₀)	98 (LOAEL) 前胃の過形成、慢 性間質性腎炎
	104 週間 発がん性 ①	0、54.8、109.6、 230.4、427.6、 1322.6	—	83 (BMDL ₁₀)	54.8 前胃の過形成
	104 週間 発がん性 ②	0、約 500、約 1,000	—	—	約 1,000 前胃の乳頭腫
	生殖毒性	交配前及び交配期 間 : 0、110、220、 420 妊娠期間 : 0、100、 210、410 哺育期間 : 0、220、 420、800	—	生殖発生毒性 : 少 なくとも 100	母動物 : 410 異常なし 児動物 : 100 死亡率の増加及 び驚愕反射の遅 延
	2 週間投 与毒性	0、125、250、375、 500、1,000	—	—	500 胃及び腸管にお ける増殖性変化 (標識率の増加)
	9 及び 27 日間投与 毒性	0、50、125、250、 1,000	—	125 前胃の過形成	125 前胃の過形成
	90 日間投 与毒性	0、約 62.5、約 250、 約 1,000	62.5	第 1 試験 : 62.5 (LOAEL) 第 2 試験 : 62.5	第 1 試験 : 約 62.5 (LOAEL) 第 2 試験 : 約 62.5
	13 週間投 与毒性	0、50、125、250、 1,000	—	125 前胃の過形成	125 前胃の過形成
ハムス ター	104 週間 発がん性	0、約 1,200、約 2,400	—	—	約 1,200 前胃の過形成及 び乳頭腫
ウサギ	発生毒性	0、50、200、400	—	発生毒性 : 400	母動物 : 400 胎児 : 400
イヌ	6 か月間 亜急性	雄/雌 : 0/0、54/62、 111/112、219/231	—	—	111 体重増加抑制
	15 か月間	0、5、50、250	—		50

	慢性毒性				肝細胞変性及び顆粒球浸潤、洞様血管の狭窄を伴った肝細胞実質変性
豚	発生毒性	0、50、200、400	－	母動物：200 体重への影響 発生毒性：400	－
サル	発生毒性	BHA/BHT：0/0、 50/50	－ 影響なし	100(BHAとBHT の混合) 影響なし	－
毒性学的 ADI (mg/kg 体重/日)			0.5 NOEL：50 安全係数：100	1.0 NOAEL：100 安全係数：100	[審議後記載]
毒性学的 ADI 設定根拠資料			ラットの長期毒性試験 (0.125 % 投与群で軽度の過形成がみられ、 0.1%(50 mg/kg 体重/日)にはみられ なかった)	ラットを用いた生殖毒性試験	[審議後記載]
ADI (mg/kg 体重/日)			0.5	1.0	[審議後記載]

1
2
3
4

1 〈別紙 1：検査値等略称〉

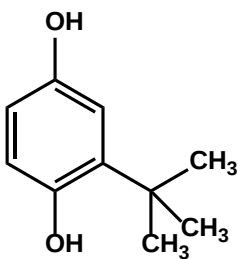
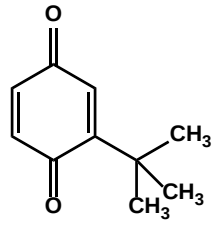
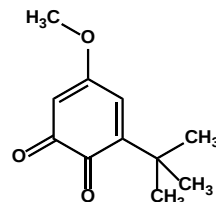
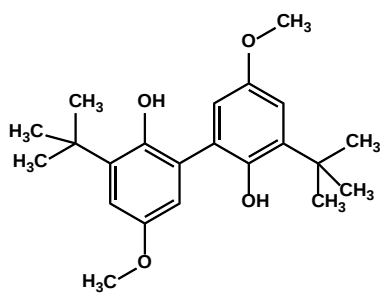
略称等	名称
ADI	一日摂取許容量
Alb	アルブミン
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ [=グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)]
ANS パネル	(欧州食品安全機関) 食品添加物及び食品に添加される栄養源に関する科学パネル
AP	アルカリホスファターゼ
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ [=グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)]
AUC _{0~t}	投与 t 時間後までの血(漿)中濃度時間曲線下面積
BBN	N-ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン
BCS	バソクプロインジスルホン酸
<u>BMDL</u>	<u>Benchmark Dose Lower Confidence Level : ベンチマーク用量信頼下限値</u>
BrdU	5-ブロモ-2'-デオキシウリジン
BUN	血液尿素窒素
CL	クリアランス
C _{max}	血(漿)中最高濃度
DEN	ジエチルニトロソアミン
DMBA	7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン
DMH	1,2-ジメチルヒドラジン
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
EFSA	欧州食品安全機関
EHEN	N-エチル-N-ヒドロキシエチルニトロソアミン
GC	ガスクロマトグラフィー
GC-MS	ガスクロマトグラフィー・質量分析
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
JECFA	FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
LD ₅₀	半数致死量
LOAEL	最小毒性量
LOEL	最小影響量
MNNG	N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン
MNU	N-メチルニトロソウレア
NADPH	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (還元型)
NOAEL	無毒性量
NOEL	無作用量
RBC	赤血球

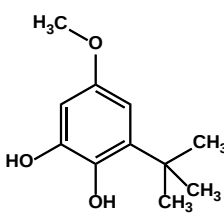
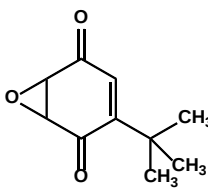
SCE	姉妹染色分体交換
SOD	スーパーオキシドジスムターゼ
$T_{1/2}$	血(漿)中半減期
TLC	薄層クロマトグラフィー
$T_{\max}$	最高血(漿)中濃度到達時間
Vd	分布容積
WBC	白血球

1

2

1 <別紙 2：代謝物略称>

略称	代謝物名
TBHQ	<i>tert</i>-ブチルヒドロキノン (BHA の脱メチル体)  (参照 22) [EFSA J 2004, p3]
TBQ	<i>tert</i>-ブチルキノン  (参照 16) [Carcinogenesis 1991]
BHA-o-O	3-<i>tert</i>-ブチルアニソール-4,5-キノン  (参照 16) [Carcinogenesis 1991]
diBHA (BHA dimer)	2,2'-ジヒドロキシ-3,3'-ジ-<i>tert</i>-ブチル-5,5'-ジメトキシ-1,1'-ビフェニル  (参照 16) [Carcinogenesis 1991]

BHA-OH	3-<i>tert</i>-ブチル-4,5-ジヒドロキシアニソール  (参照 16) [Carcinogenesis 1991]
TBQO	<i>tert</i>-ブチルキノンオキシド  (参照 36) [Mutat Res 1990]

1

2

1 <参照>

- 2 1. 食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）の一部を改正する件
3 （平成 17 年 11 月 29 日厚生労働省告示第 499 号） [\[厚労告示\]](#)
- 4 2. The Merck Index, 15th Edition [\[Merck Index\]](#)
- 5 3. EFSA: Scientific opinion on the re-evaluation of butylated hydroxyanisole – BHA
6 (E 320) as a food additive. EFSA Journal 2011; 9(10): 2392-2440 [\[EFSA 2011\]](#)
- 7 4. Environment Canada and Health Canada: Phenol, (1,1-dimethylethyl)-4-
8 methoxy-(Butylated hydroxyanisole), Screening assessment for the challenge.
9 2010 [\[Canada\]](#)
- 10 5. EC: European Union Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No
11 1831/2003. [\[EC Regulation\]](#)
- 12 6. WHO: Butylated hydroxyanisole. WHO Food Additives Series 42 1992 [\[FAS 42\]](#)
- 13 7. 厚生労働省：暫定基準見直し資料 BHA 飼料添加物に関する試験抄録（非公表）[\[試](#)
14 [験抄録\]](#)
- 15 8. 食品衛生法施行規則 別表第一[\[食品衛生法施行規則\]](#)
- 16 9. 飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）[\[飼料](#)
17 [添加物省令\]](#)
- 18 10. EFSA: Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing
19 aids and materials in contact with food on a request from the commission related
20 to tertiary-butylhydroquinone (TBHQ). EFSA Journal 2004; 84: 1-50 [\[EFSA 2004\]](#)
- 21 11. WHO: tert-Butylhydroquinone. WHO Food Additives Series 42 1999 [\[FAS 42](#)
22 [TBHQ\]](#)
- 23 12. Hashizume K, Toda C, Yasui T and Nagano H: Determination of butylated
24 hydroxyanisole and its conjugated metabolites in the organs, blood and excreta of
25 mice by high-performance liquid chromatography. Japanese Journal of Toxicology
26 and Environmental Health 1992; 38(5): 397-402 [\[Jpn J Toxicol Environ Health](#)
27 [1992\]](#)
- 28 13. Ansari GAS and Hendrix PY: Tissue distribution and pharmacokinetics of 3-t-
29 [methyl-14C]butyl-4-hydroxy-anisole in rats. Drug Metab Dispos 1985; 13(5): 535-
30 541 [\[Drug Metab Dispos 1985\]](#)
- 31 14. Hirose M, Hagiwara A, Inoue K, Ito N, kaneko H, Saito K et al.: Metabolism of 2-
32 and 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole in the rat (III): Metabolites in the urine and
33 feces. Toxicology 1988; 53(1): 33-43 [\[Toxicology 1988\]](#)
- 34 15. Yamada T, Yamamoto M, Yoshihira K, Kawashima K, Tanaka S and Takanaka A:
35 Distribution of 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) orally administered in liver,
36 serum and fetus in rats. Japanese Journal of Toxicology and Environmental
37 Health 1993; 39(1): 68-71 [\[Jpn J Toxicol Environ Health 1993\]](#)
- 38 16. Morimoto K, Tsuji K, Iio T, Miyata N, Uchida A, Osawa R et al.: DNA damage in
39 forestomach epithelium from male F344 rats following oral administration of *tert*-
40 butylquinone, one of the forestomach metabolites of 3-BHA. Carcinogenesis 1991;

- 12(4): 703-708 [Carcinogenesis 1991]
17. Verhagen H, Maas LM, Beckers RHG, Thijssen HHW, ten Hoor F, Henderson PT et al.; Effect of subacute oral intake of the food antioxidant butylated hydroxyanisole on clinical parameters and phase-I and -II biotransformation capacity in man. Hum Toxicol 1989; 8(6): 451-459 [Hum Toxicol 1989]
18. WHO: tert-Butylhydroquinone (TBHQ). Food Additives Series 40 (1998) [FAS 40]
19. 厚生労働省：暫定基準見直し資料 BHA 及び BHT の残留試験報告書（肉用鶏及び肥育豚）（非公表） [鶏及び豚残留試験]
20. 厚生労働省：暫定基準見直し資料 BHA 及び BHT の残留試験報告書（鶏卵への移行）（非公表） [鶏卵残留試験]
21. 厚生労働省：暫定基準見直し資料 養殖水産動物における BHA の残留試験報告（にじます、こい及びあゆ）（非公表） [魚残留試験]
22. WHO: Butylated hydroxyanisole. WHO Food Additives Series 10, 1976 [FAS 10]
23. WHO: Butylated hydroxyanisole. WHO Food Additives Series 24, 1989 [FAS 24]
24. WHO: Butylated hydroxyanisole. WHO Food Additives Series 21, 1987 [FAS 21]
25. WHO: Butylated hydroxyanisole (BHA). Food Additives Series 15, 1980 [FAS 15]
26. Ikeda GJ, Stewart JE, Sapienza PP, Peggins JO, Michel TC and Olivito V: Effect of subchronic dietary administration of butylated hydroxyanisole on canine stomach and hepatic tissue. Food Chem Toxicol 1986; 24(10/11): 1201-1221 [Food Chem Toxicol 1986a]
27. Tobe M, Furuya T, Kawasaki Y, Naito K, Sekita K, Matsumoto K et al.; Six-month toxicity study of butylated hydroxyanisole in beagle dogs. Food Chem Toxicol 1986; 24(10/11): 1223-1228 [Food Chem Toxicol 1986b]
28. Altmann HJ and Grunow W: Effects of BHA and related phenols on the forestomach of rats. Food Chem Toxicol 1986; 24(10/11): 1183-1188 [Food Chem Toxicol 1986c]
29. Takizawa Y, Matsuda Y and Yamasita J: The absorption and excretion of butylated hydroxyanisole in beagle dogs. Toxicolo Letters 1985; 27(1-3): 27-34 [Toxicol Lett 1985]
30. Tajima K, Hashizaki M, Yamamoto K and Mizutani T: Identification and structure characterization of S-containing metabolites of 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole in rat urine and liver microsomes. Drug Metab Dispos 1991; 19(6): 1028-1033 [Drug Metab Dispos 1985]
31. Bergmann B, Dohrmann JK and Kahl R: Formation of the semiquinone anion radical from tert-butylquinone and from tert-butylhydroquinone in rat liver microsomes. Toxicology 1992; 74 (2-3): 127-133 [Toxicology 1992]
32. 厚生労働省：暫定基準見直し資料 BHA 添付資料 16（非公表） [添付資料 16]
33. Bonin AM and Baker RSU: Mutagenicity testing of some approved food additives with the Salmonella microsome assay. Food technology in Australia 1980; 32(12): 608-611 [Food Tech 1980]

34. Hageman GJ, Verhagen H and Kleinjans JCS: Butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene and ter.-butylhydroquinone are not mutagenic in the Salmonella/microsome assay using ner tester strains. *Mutat Res* 1988; 208(3-4): 207-211 [*Mutat Res* 1988]
35. Williams GM, McQueen CA and Tong C: Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. I. Genetic and cellular effects. *Food Chem Toxicol* 1990; 28(12): 793-798 [*Food Chem Toxicol* 1990]
36. Matsuoka A, Matsui M, Miyata N, Sofuni T and Ishidate M: Mutagenicity of 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) and its metabolites in short-term tests in vitro. *Mutat Res* 1990; 241(2):125-132 [*Mutat Res* 1990]
37. Rogers CG, Boyes BG, Matula TI and Stapley R: Evaluation of genotoxicity of *tert*-butylhydroquinone in an hepatocyte-mediated assay with V79 Chinese hamster lung cells and in strain D7 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 1992; 280(1): 17-27 [*Mutat Res* 1992]
38. Rogers CG, Nayak BN and Heroux-Metcalf C: Lack of induction of sister chromatid exchanges and of mutation to 6-thioguanine resistance in V79 cells by butylated hydroxyanisole with and without activation by rat or hamster hepatocytes. *Cancer Lett* 1985; 27: 61-69 [*Cancer Lett* 1985]
39. Degré R and Saheb SA: Butylated hydroxyanisole as a possible mutagenic agent. *FEMS Microbiol Lett* 1982; 14(3): 183-186 [*FEMS Microbiol Lett*]
40. Ishidate M Jr and Odashima S: Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – a screening for chemical carcinogens. *Mutat res* 1977; 48: 337-354 [*Mutat Res* 1977]
41. Abe S and Sasaki M: Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58(6): 1635-1641 [*JNCI* 1977]
42. Phillips BJ, Carroll PA Tee AC and Anderson D: Microsome-mediated clastogenicity of butylated hydroxyanisole (BHA) in cultured Chinese hamster ovary cells: The possible role of reactive oxygen species. *Mutat Res* 1989; 214: 105-114 [*Mutat Res* 1989]
43. Murli H and Brusick D: Induction of Chromosomal aberrations by high concentrations of butylated hydroxyanisole (BHA) in Chinese hamster ovary (CHO) cells in the presence of washed microsomes. *In Vitro Toxicol* 1992; 5(2): 93-101 [*In Vitro Toxicol*]
44. Schilderman PA, Rhijnsburger E, Zwingmann I and Kleinjans JC: Induction of oxidative DNA damage and enhancement of cell proliferation in human lymphocytes in vitro by butylated hydroxyanisole. *Carcinogenesis* 1995; 16(3): 507-512 [*Carcinogenesis* 1995]

45. Benford DJ, Price SC, Lawrence JN, Grasso P and Bremmer JN: Investigations of the genotoxicity and cell proliferative activity of dichlorvos in mouse forestomach. *Toxicology* 1994; 92: 203-215 [*Toxicology* 1994]
46. Prasad OM and Kamra OP: radiosensitization of *Drosophila* sperm by commonly used food additives – butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1974; 25(1): 67-72 [*Int J Radiat* 1974]
47. Miyagi MP and Goodheart CR: Effects of butylated hydroxyanisole in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 1976; 40(1): 37-41 [*Mutat Res* 1976]
48. Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K et al.: The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res* 2002; 519: 103-119 [*Mutat Res* 2002]
49. Ramadan AMA and Suzuki T: Detection of genotoxicity of phenolic Antioxidants, butylated hydroxyanisole and tert-butylhydroquinone in multiple mouse organs by the alkaline comet assay. *J Am Sci* 2012; 8(1): 722-727 [*J Am Sci* 2012]
50. Schilderman PA, ten Vaarwerk FJ, Lutgerink JT, van der Wurff A, ten Hoor F and Kleijnans JCS: Induction of oxidative DNA damage and early lesions in rat gastro-intestinal epithelium in relation to prostaglandin H synthase-mediated metabolism of butylated hydroxyanisole. *Food Chem Toxicol* 1995; 33(2): 99-109 [*Food Chem Toxicol* 1995]
51. Hirose M, Asamoto M, Hagiwara A, Ito N, Kaneko H, Saito K et al.: Metabolism of 2- and 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole (2- and 3-BHA) in the rat (II): Metabolism in forestomach and covalent binding to tissue macromolecules. *Toxicology* 1987; 45(1): 13-24 [*Toxicology* 1987]
52. Saito K, Nakagawa S, Yoshitake A, Miyamoto J, Hirose M and Ito N: DNA-adduct formation in the forestomach of rats treated with 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole and its metabolites as assessed by an enzymatic ³²P-postlabeling method. *Cancer Lett* 1989; 48: 189-195 [*Cancer Lett* 1989]
53. Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T and Mortelmans: Salmonella mutagenicity tests: V. results from the testing of 311 chemicals. *Environ Mol Mutagen* 1992; 19(Suppl 21): 2-141 [*Environ Mol Mutagen* 1992]
54. Dobo KL and Eastmond DA: Role of oxygen radicals in the chromosomal loss and breakage induced by the quinone-forming compounds, hydroquinone and *tert*-butylhydroquinone. *Environ Mol Mutagen* 1994; 24: 293-300 [*Environ Mol Mutagen* 1994]
55. Schilderman PA, van Maanen JMS, ten Vaarwerk FJ, Lafleur MVM, Westmijze EJ, ten Hoor F et al.: The role of prostaglandin H synthase-mediated metabolism in the induction of oxidative DNA by BHA metabolites. *Carcinogenesis* 1993; 14(7): 1297-1302 [*Carcinogenesis* 1993]
56. Nagai F, Okubo T, Ushiyama K, Satoh K and Kano I: Formation of 8-

- hydroxydeoxyguanosine in calf thymus DNA treated with tert-butylhydroquinone, a major metabolite of butylated hydroxyanisole. *Toxicol Lett* 1996; 89(2): 163-167 [Toxicol Lett 1996]
57. Li Y, Seacat A, Kuppusamy P, Zweier JL, Yager JD and Trush MA: Copper redox-dependent activation of 2-tert-butyl(1,4)hydroquinone: formation of reactive oxygen species and induction of oxidative DNA damage in isolated DNA and cultured rat hepatocytes. *Mutat Res* 2002; 518(2): 123-133 [Mutat Res 2002]
58. Li Y and Trush MA: Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Research* 1994; 54: 1895s-1898s [Cancer Research 1994]
59. Eskandani M, Hamishehkar H and Ezzati Nazhad Dolatabadi J: Cytotoxicity and DNA damage properties of *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food Chemistry* 2014; 153: 315-320 [Food Chem 2014]
60. Giri AK, Talukder SSG and Sharma A: Mutachromosomal effects of *tert*-butylhydroquinone in bone-marrow cells of mice. *Food Chem Toxicol* 1984; 22(6): 459-460 [Food Chem Toxicol 1984]
61. Mukherjee A, Talukder G and Sharma A: Sister chromatid exchanges induced by tertiary butyl hydroquinone in bone marrow cells of mice. *Environ Mol Mutagen* 1989; 13: 234-237 [Environ Mol Mutagen 1989]
62. Kalus WH, Münzner R and Filby WG: isolation and characterization of some products of the BHA-nitrite reaction: examination of their mutagenicity. *Food Addit Contam* 1990; 7(2): 223-233 [Food Addit Contam 1990]
63. Kalus WH, Münzner R and Filby WG: The reaction of butylated hydroxyanisole and its metabolites with some arylamines: investigations of product mutagenicity. *Environ Health Perspect* 1994; 102: 96-99 [Environ Health Perspect 1994]
64. Suzuki T, Matsuoka A, Sawada M, Hayashi M, Miyata N and Sofuni T: Cytotoxicity and micronucleus induction by 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole and its metabolites in menadione- and H₂O₂-resistant cells. *Mutat Res* 1991; 253(3): 278-279 [Mutat Res 1991]
65. Ito N, Hirose M, Fukushima S, Tsuda H, Tatematsu M and Asamoto M: Modifying effects of antioxidants on chemical carcinogenesis. *Toxicol Pathol* 1986; 14(3): 315-323 [Toxicol Pathol 1986]
66. Masui T, Hirose M, Imada K, Fukushima S, Tamano S and Ito N: Sequential changes of the forestomach of F344 rats, Syrian golden hamsters, and B6C3F1 mice treated with butylated hydroxyanisole. *Japanese Journal of Cancer Research* 1986; 77: 1083-1090 [Jpn J Cancer Res 1986]
67. Ito N, Hagiwara A, Shibata M, Ogiso T and Fukushima S: Induction of squamous cell carcinoma in the forestomach of F344 rats treated with butylated hydroxyanisole. *Japanese Journal of Cancer Research* 1982; 73: 332-334 [Jpn J Cancer Res 1982]

68. Ito N, Fukushima S, Hagiwara A, Shibata M and Ogiso T: Carcinogenesis of butylated hydroxyanisole in F344 rats. J Natl Cancer Inst 1983; 70(2): 343-352 [JNCI 1983]
69. Ito N, Fukushima S, Tamano S, Hirose M and Hagiwara A: Dose response in butylated hydroxyanisole induction of forestomach carcinogenesis in F344 rats. J Natl Cancer Inst 1986; 77(6): 1261-1265 [JNCI 1986]
70. Hirose M, Takesada Y, Tanaka H, Tamano S, Kato T and Shirai T: Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model. Carcinogenesis 1997; 19(1): 207-212 [Carcinogenesis 1997]
71. WHO: Butylated hydroxyanisole. WHO Food Additives Series 18, 1983 [FAS 18]
72. Ito N and Hirose M: The role of antioxidants in chemical carcinogenesis. Jpn J Cancer Research 1987(78): 1011-1026 [Jpn J Cancer Res 1987]
73. Denz FA and Liaurado JG: Some effects of phenolic anti-oxidants on sodium and potassium balance in the rabbit. Br J Exp Pathol 1957; 38: 515-524 [Br J Exp Pathol 1957]
74. Tamano S, Hirose M, Tanaka H, Hagiwara A and Shirai T: Variation in susceptibility to the induction of forestomach tumours by butylated hydroxyanisole. Food Chem Toxicol 1998; 36: 299-304 [Food Chem Toxicol 1998]
75. Hodge HC, fassett DW, Maynard EA, Downs WL and Coye Jr RD: Chronic feeding studies of butylated hydroxyanisole in dogs. Toxicol Appl Pharmacol 1964; 6: 512-519 [Toxicol Appl Pharmacol 1964]
76. Wilder OHM, Ostby PC and Gregory BR: Effect of feeding butylated hydroxyanisole to dogs. J Agric Food Chem 1960; 8: 504-506 [J Agric Food Chem 1960]
77. Williams GM, Wang CX and Iatropoulos MJ: Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. II. Chronic feeding studies. Food Chem Toxicol 1990; 28(12): 799-806 [Food Chem Toxicol 1990]
78. Nera EA, Iverson F, Lok E, Armstrong CL, Karpinski K and Clayson DB: A carcinogenesis reversibility study of the effects of butylated hydroxyanisole on the forestomach and urinary bladder in male Fischer 344 rats. Toxicology 1988; 53: 251-268 [Toxicology 1988]
79. 大久保智子、加納いつ: ヒト乳がん由来 MCF-7 細胞を用いた食品添加物等の内分泌かく乱作用の検索と BHA、OPP を中心とした機構の解析. 薬学雑誌 2003; 123(6): 443-452 [薬学雑誌]
80. Pop A, Kiss B and Loghin F: Endocrine disrupting effects of butylated hydroxyanisole (BHA-E320). Clujul medical 2013; 86(1): 16-20 [Clujul Medical]
81. Pop A, Drugan T, Gutleb AC, lupu D, Cherfan J, Loghin F et al.: Individual and combined in vitro (anti)androgenic effects of certain food additives and cosmetic

- preservatives. *Toxicol In Vitro* 2016; 32: 269-277 [*Toxicol In Vitro* 2016]
82. SCF: Reports of the Scientific Committee for Food (twenty-second series). 1989 [SCF 1989]
83. IARC: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monograph volume 1-42 suppl 7. 1987 [*IARC* 1987]
84. IARC: Predictive value of rodent forestomach and gastric neuroendocrine tumours in evaluating carcinogenic risks to humans. IARC Technical Publication No.39 2003 [*IARC* 2003]
85. Rockwell CE, Zhang M, Fields PE and Klaassen CD: Th2 skewing by activation of Nrf2 in CD4+T cells. *J Immunol* 2012; 188(4): 1630-1637 [*J Immunol* 2012]
86. Zagorski JW, Turley AE, Dover HE, VanDenBerg KR, Compton JR and Rockwell CE: The Nrf2 activator, tBHQ, differentially affects early events following stimulation of Jurkat cells. *Toxicol Sci* 2013; 136(1): 63-71 [*Toxicol Sci* 2013]
87. Turley AE, Zagorski JW and Rockwell CE: The Nrf2 activator tBHQ inhibits T cell activation of primary human CD4. *Cytokine* 2015; 71: 289-295 [*Cytokine* 2015]
88. Gharavi N and EI-Kadi AOS: *tert*-Butylhydroquinone is a novel aryl hydrocarbon receptor ligand. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 365-372 [*Drug Metab Dispos* 2005]
89. Kwak MK and Kensler TW: Targeting NRF2 signaling for cancer chemoprevention. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 244: 66-76 [*Toxicol Appl Pharmacol* 2010]
90. Clayson DB, Iverson E, Nera E, Lok E, Rogers C and Rodrigues C: Histopathological and radioautographic studies on the forestomach of F344 rats treated with butylated hydroxyanisole and related chemicals. *Food Chem Toxicol* 1986; 24(10/11): 1171-1182 [*Food Chem Toxicol* 1986]
91. Würtzen G and Olsen P: BHA study in pigs. *Food Chem Toxicol* 1986; 24(10/11): 1229-1233 [*Food Chem Toxicol* 1986]
92. WHO: Evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Technical Report Series 776, 1989 [*TRS* 776]
93. 食品安全委員会：食品の安全に関する用語集（第5版）（平成27年4月）