

令和 2 年 9 月 23 日

食品安全委員会

委員長 佐藤 洋 殿

肥料・飼料等専門調査会 座長 今井 俊夫

飼料添加物に係る食品健康影響評価に関する審議結果について

平成25年 8 月19日付け厚生労働省発食安0819第28号及び令和元年 9 月 5 日付け厚生労働省発生食0905第6号をもって厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められたジブチルヒドロキシトルエンに係る食品健康影響評価について、当専門調査会において審議を行った結果は別添のとおりですので報告します。

飼料添加物評価書

ジブチルヒドロキシトルエン

2020年9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.....	5
○ 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.....	7
 II. 安全性に係る知見の概要.....	 9
1. 体内動態試験.....	9
(1) 体内動態試験（マウス、単回経口投与）.....	9
(2) 体内動態試験（マウス、反復経口投与）.....	10
(3) 体内動態試験（ラット、単回経口投与①）.....	11
(4) 体内動態試験（ラット、単回経口投与②）.....	11
(5) 体内動態試験（ラット、単回経口投与③）.....	12
(6) 体内動態試験（ラット、反復経口投与①）.....	13
(7) 体内動態試験（ラット、反復経口投与②）.....	14
(8) 体内動態試験（ウサギ）.....	14
(9) 体内動態試験（ヒト、単回経口投与）.....	15
(10) 体内動態試験（ラット及びヒトの比較試験）.....	15
(11) 体内動態試験（ヒト、反復経口投与）.....	17
(12) 体内動態試験（代謝物の概要）.....	17
2. 残留試験.....	18
(1) 残留試験（牛）.....	18
(2) 残留試験（豚）.....	19
(3) 残留試験（鶏①）.....	20
(4) 残留試験（鶏②）.....	21
(5) 残留試験（鶏卵①）.....	22
(6) 残留試験（鶏卵②）.....	23
(7) にじます、こい、うなぎ、あゆ及びまだい.....	23
(8) 残留試験（くるまえば①）.....	24
(9) 残留試験（くるまえば②）.....	25

3. 遺伝毒性試験.....	25
4. 急性毒性試験.....	28
5. 亜急性毒性試験.....	28
(1) 30 日間亜急性毒性試験 (マウス、混餌投与)	28
(2) 7 週間亜急性毒性試験 (マウス、混餌) <参考資料>	29
(3) 10 週間亜急性毒性試験 (マウス、混餌) <参考資料>	29
(4) 6 週間亜急性毒性試験 (ラット①、混餌) <参考資料>	29
(5) 6 週間亜急性毒性試験 (ラット②、混餌) <参考資料>	30
(6) 7 週間亜急性毒性試験 (ラット、混餌) <参考資料>	30
(7) 10 週間亜急性毒性試験 (ラット、混餌) <参考資料>	30
(8) 16 週間亜急性毒性試験 (ラット、混餌) <参考資料>	31
(9) 4 週間亜急性毒性試験 (アカゲザル、経口投与) <参考資料>	31
6. 慢性毒性及び発がん性試験.....	32
(1) 10 か月慢性毒性試験 (マウス、混餌投与)	32
(2) 11 か月間慢性毒性試験 (マウス、1 か月間混餌投与) <参考資料>	33
(3) 10 か月間及び 16 か月間慢性毒性試験 (マウス、混餌投与) <参考資料>	33
(4) 96 週間慢性毒性・発がん性試験 (マウス、混餌投与)	34
(5) 100 週間慢性毒性・発がん性試験 (マウス、混餌投与)	34
(6) 108 週間慢性毒性・発がん性試験 (マウス、混餌投与)	35
(7) 120 週間発がん性試験 (マウス、混餌投与)	37
(8) 76 週間慢性毒性・発がん性試験 (ラット、混餌投与)	38
(9) 24 か月慢性毒性・発がん性試験 (ラット、混餌投与)	39
(10) 104 週間慢性毒性・発がん性試験 (ラット、混餌投与)	39
(11) 105 週間慢性毒性・発がん性試験 (ラット、混餌投与)	40
(12) 110 週間慢性毒性・発がん性試験 (ラット、混餌投与)	41
(13) 繁殖毒性試験及び F1 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験① (ラット、混餌投与)	42
(14) 繁殖毒性試験及び F1 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験② (ラット、混餌投与)	42
7. 生殖発生毒性試験.....	42
(1) 3 世代繁殖毒性試験 (マウス、混餌投与)	42
(2) 繁殖毒性試験 (マウス、混餌投与) <参考資料>	43
(3) 発生毒性試験 (マウス、経口投与)	43
(4) 繁殖毒性試験 (ラット、混餌投与)	44
(5) 繁殖毒性試験 (ラット、混餌投与) ①.....	44
(6) 繁殖毒性試験 (ラット、混餌投与) ②.....	45
(7) 発生毒性試験 (ウサギ) <参考資料>.....	45
(8) 発生毒性試験 (アカゲザル、混餌投与) <参考資料>.....	45
8. 繁殖毒性試験及び F ₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験	45

(1) 繁殖毒性試験及びF ₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験（ラット、混餌投与）①.....	45
(2) 繁殖毒性試験及びF ₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験（ラット、混餌投与）②.....	47
9. その他の毒性試験.....	51
(1) 血液凝固系への影響に関する試験.....	51
(2) 肝臓への影響に関する試験.....	53
(3) 甲状腺への影響に関する試験.....	54
(4) 発がん性に関する促進作用又は抑制作用＜参考資料＞.....	54
10. ヒトにおける知見.....	58
(1) 経口摂取による急性毒性についての知見.....	58
(2) 胃がんに関する疫学的知見.....	59
III. 国際機関等における評価.....	60
1. EU における評価（1987 年）.....	60
2. JECFA における評価（1986 年、1996 年）.....	60
3. 国際がん研究機関（IARC）における評価（1986 年、1987 年）.....	60
4. EFSA における評価（2012 年）.....	60
5. 環境省による環境リスク初期評価.....	61
IV. 食品健康影響評価.....	62
・ 別紙 1：検査値等略称.....	66
・ 別紙 2：代謝物略称.....	69
・ 参照.....	70

〈審議の経緯〉

2005 年 11 月 29 日 暫定基準告示（参照 1）
2013 年 8 月 20 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 0819 第 28 号）、関係資料の接受
2013 年 8 月 26 日 第 486 回食品安全委員会（要請事項説明）
2019 年 9 月 5 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（厚生労働省発生食 0905 第 6 号）、関係資料の接受（対象動物に牛及びくるまえびを追加）
2019 年 9 月 10 日 第 756 回食品安全委員会（要請事項説明）
2019 年 9 月 30 日 第 148 回肥料・飼料等専門調査会
2019 年 11 月 6 日 第 149 回肥料・飼料等専門調査会
2020 年 7 月 28 日 第 785 回食品安全委員会（報告）
2020 年 7 月 29 日から 8 月 27 日まで 国民からの意見・情報の募集
2020 年 9 月 23 日 肥料・飼料等専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告

〈食品安全委員会委員名簿〉

(2015 年 6 月 30 日まで)	(2017 年 1 月 6 日まで)	(2018 年 6 月 30 日まで)
熊谷 進（委員長）	佐藤 洋（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）
山添 康（委員長代理）	熊谷 進	山本 茂貴
三森 国敏（委員長代理）	吉田 緑	吉田 緑
石井 克枝	石井 克枝	石井 克枝
上安平 洌子	堀口 逸子	堀口 逸子
村田 容常	村田 容常	村田 容常

(2018 年 7 月 1 日から)

佐藤 洋（委員長）
山本 茂貴（委員長代理）
川西 徹
吉田 緑
香西 みどり
堀口 逸子
吉田 充

〈食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会専門委員名簿〉

(2019 年 9 月 30 日まで)

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

(2020 年 3 月 31 日から)

今井 俊夫 (座長)
山中 典子 (座長代理)
新井 鐘蔵 佐々木 一昭
荒川 宜親 下位 香代子
井手 鉄哉 中山 裕之
今田 千秋 宮島 敦子
植田 富貴子 森田 健
川本 恵子 山口 裕子
栞形 麻樹子 山田 雅巳
小林 健一

(2020 年 4 月 1 日から)

今井 俊夫 (座長)
山中 典子 (座長代理)
新井 鐘蔵 代田 眞理子
荒川 宜親 下位 香代子
井手 鉄哉 中山 裕之
今田 千秋 宮島 敦子
植田 富貴子 森田 健
川本 恵子 山口 裕子
小林 健一 山田 雅巳
佐々木 一昭

〈第 149 回肥料・飼料等専門調査会専門参考人名簿〉

唐木 英明 (公益財団法人食の安全・安心財団理事長)

要 約

抗酸化剤である「ジブチルヒドロキシトルエン」(CAS No.128-37-0) について、JECFA 及び EFSA の評価書等を用いて食品健康影響評価を実施した。

遺伝毒性については、*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験とも概ね陰性の結果が示されている。一部の *in vitro* 及び *in vivo* 試験において陽性結果が認められたが、ジブチルヒドロキシトルエン (BHT) の生体内代謝過程で生成される酸化代謝物やキノン化合物から生じる活性酸素種による間接的な影響の可能性があり、閾値があるものと考えた。したがって BHT には特段問題となる遺伝毒性はないと考えられ、ADI を設定することは可能であると判断した。

亜急性毒性試験及び慢性毒性試験では、主に血液凝固系、肝臓及び甲状腺に毒性影響が認められている。血液凝固系への影響は、BHT のビタミン K 拮抗作用によるビタミン K 依存性凝固因子の阻害に起因するものであり、短期の試験では、マウス及びラットにおいて出血傾向がみられ、その NOAEL は 125 mg/kg 体重/日であると判断された。一方、長期の試験では血液凝固系に関する毒性影響は認められなかった。肝臓及び甲状腺に対する生化学的変化又は組織学的変化を伴う毒性影響は、主にラットで認められた。

発がん性については、マウスの発がん性試験の一部で肺腫瘍又は肝腫瘍の増加が、ラットの繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験では肝腫瘍の増加がみられた。これらの腫瘍発生に至る機作は明らかではないが、前述したとおり BHT には特段問題となる遺伝毒性はないことから、腫瘍発生は非遺伝毒性メカニズムによるものと考えられ、その用量には閾値があるものと考えられた。

生殖発生毒性では、出生児及び哺育児において、1 腹当たりの胎児数の減少や体重増加抑制がみられた。ラット及びウサギを用いた発生毒性試験では催奇形性は認められなかった。

各種毒性試験のうち、最も低い NOAEL は、ラット繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験における 25 mg/kg 体重/日であった。この NOAEL 25 mg/kg 体重/日に安全係数 100 を適用し、BHT の ADI を 0.25 mg/kg 体重/日と設定した。

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：ジブチルヒドロキシトルエン

英名：Dibutylhydroxytoluene

3. 化学名

IUPAC：2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol

CAS (No. 128-37-0)

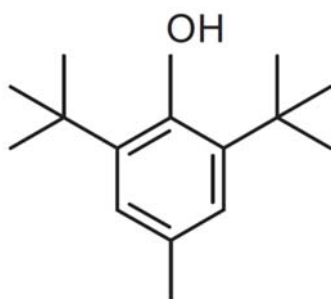
4. 分子式

$C_{15}H_{24}O$

5. 分子量

220.36

6. 構造式



(参照1)

7. 使用目的及び使用状況

ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）は、抗酸化剤であり、主に工業用原料（ゴム、燃料、インク等の添加剤）、飼料添加物、食品添加物等として抗酸化作用を目的に広く使用されている。

飼料添加物としての使用目的は、品質保持の他に、船舶輸送時の油脂の酸化反応による火災の防止がある。特に魚粉は油脂分が多く、火災の危険が高ことから、海上輸送においては、国際海事機関において策定された1974年の海上における人命の安全のための国際条約及び同条約に基づく国際海上危険物規程により、BHT、エトキシキン又はトコフェロール（ビタミンE）のいずれかの酸化防止剤の添加が求められており、日本では同規定を取り入れた危険物船舶運送及び貯蔵規則（昭和32年運輸省令第30号）に基づく告示により、これを国内法的

に担保している。

BHT を飼料添加物として使用する際の国内法に基づく規制については、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和 28 年法律第 35 号）第 3 条第 1 項に基づき、飼料中含有量がエトキシキン及びブチルヒドロキシアニソールとの有効成分の合計量で飼料 1 t 当たり 150 g 以下と規定されている。

なお、BHT は食品添加物として使用する際の国内法に基づく規制については、食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）により、油脂、魚介乾製品、チューインガム、乾燥裏ごしいも等の添加可能な食品が定められており、食品中の含有量に関する規定が設けられている。

飼料添加物として使用する際の際の国内法に基づく食品中の残留基準については、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（平成 17 年 11 月 29 日厚生労働省告示第 499 号）により、豚肉、鶏肉、鶏卵（卵白中）、魚類の肉等において、ポジティブリスト制度導入に伴う残留基準値が設定されており、これについては、2013 年に食品安全基本法（平成 15 年法律第 48 号）第 24 条第 2 項に基づき評価要請が行われている。また、2019 年 9 月に牛（乳肉等）及び甲殻類について新たに残留基準値を設定するために、別途、食品安全基本法第 24 条第 1 項に基づき評価要請が行われた。

II. 安全性に係る知見の概要

本評価書では、JECFA 及び EFSA の評価書等を基に BHT の毒性に関する主な知見を整理した。

検査値等略称及び代謝物略称をそれぞれ別紙 1 及び 2 に示した。

1. 体内動態試験

(1) 体内動態試験（マウス¹、単回経口投与）

マウス（DDY 系、6 週齢、雌雄各 4 匹/時点）に ¹⁴C 標識 BHT²を単回経口投与（20 又は 500 mg/kg 体重）する体内動態試験が実施された。投与後 7 日まで全身オートラジオグラフィーを行い、経時的に採取した排泄物（尿、糞及び呼気）及び投与 7 日後に採取した各臓器及び組織について、液体シンチレーションカウンター（LSC）を用いて放射活性が測定された。また、採取した尿及び糞について薄層クロマトグラフィー（TLC）及び高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による代謝物分析が実施された。さらにマウス（DDY 系、6 週齢、雄 50 匹）に ¹⁴C 標識 BHT を単回経口投与（500 mg/kg 体重）後 3 日まで採取した尿及び糞中の代謝物について、核磁気共鳴法による構造推定が実施された。

20 mg/kg 体重投与群の雄の全身オートラジオグラフィーでは、投与 3 及び 16 時間後に胃、腸、胆嚢及び膀胱で最も高い放射活性がみられ、次いで肝臓、腎臓、脾臓及び唾液腺で高く、副腎、肺、心臓及び血液は低く、脳、脊髄、眼球、筋肉、骨、皮膚及び精巣ではみられなかった。投与 24 及び 48 時間後では、胆嚢、膀胱、肝臓、腎臓、脾臓及び消化器に痕跡程度の放射活性が検出されたが、これらは投与 168 時間後には非検出となった。

単回経口投与（20 mg/kg 体重）後の血液又は組織の C_{max} 、 T_{max} 及び $T_{1/2}$ を表 1 に示した。

放射活性は肝臓、腎臓及び血液では投与 3 時間後に、肺及び精巣では投与 16 時間後にピークに達し、その後速やかに減少した。

尿、糞及び呼気への累積排泄率を表 2 に示した。

20 mg/kg 体重投与群では、投与後 2 日までに投与量の 62.5～63.6%が糞中に、25.0～25.3%が尿中に排泄され、呼気中への排泄は僅かであった。投与後 7 日までの糞、尿及び呼気への総排泄量は、20 mg/kg 体重投与群では 97.2～97.7%、500 mg/kg 体重投与群では 96.0～97.3%であった。性差はみられなかった。

¹⁴C 標識 BHT を単回経口投与（20 又は 500 mg/kg 体重）後 1 日までの尿中及び 3 日までの糞中の代謝物分析では、BHT を含め 43 種類を超える代謝物が検出された。BHT の主要な代謝は、*tert*-ブチル基の酸化及びベンゼン環の *p*-

¹ 本評価書において、原則として実験動物種及び人はカタカナ、飼料添加物の使用対象となる動物等は漢字又はひらがなで記載する。

² *p*-メチル基を ¹⁴C で標識した BHT

メチル基の酸化であった。マウスでは *tert*-ブチル基の酸化物が主要代謝物であり、*p*-メチル基酸化の主要代謝物である BHT の安息香酸体 (BHT-COOH) はグルクロン酸抱合体として主に尿中へ、遊離酸として糞中へそれぞれ排泄された。(参照2、3、4)

表 1 マウス (雄) における ^{14}C 標識 BHT 単回経口投与 (20 mg/kg 体重) 後の血液又は組織の $C_{\max}$ 、 $T_{\max}$ 及び $T_{1/2}$

血液又は組織	$C_{\max}$ ($\mu\text{g eq/g}$)	$T_{\max}$ (h)	$T_{1/2}$ (日)
血液	2.2	3	0.4
肝臓	5.8	3	1.9
腎臓	2.5	3	3.2
肺	3.2	16	2.3
精巣	0.6	16	5.1

n=4

表 2 マウスにおける ^{14}C 標識 BHT 単回経口投与後の尿、糞及び呼気中累積排泄率 (%) ^a

投与量 (mg/kg 体重)	性別	試料	投与後日数 (日)					
			0.4	1	2	3	5	7
20	雄	尿	4.2	23.9	25.3	25.6	25.8	25.9
		糞	39.8	61.1	62.5	62.8	63.0	63.1
		呼気	6.0	7.4	7.9	8.2	8.5	8.7
		合計	50.0	92.4	95.7	96.6	97.3	97.7
	雌	尿	10.6	23.9	25.0	25.4	25.6	25.7
		糞	37.7	62.6	63.6	64.1	64.4	64.6
		呼気	5.0	6.1	6.4	6.6	6.8	6.9
		合計	53.3	92.6	95.0	96.1	96.8	97.2
500	雄	尿	21.5	36.6	41.0	41.9	42.4	42.6
		糞	28.4	42.5	46.8	47.1	47.3	47.5
		呼気	2.6	4.6	5.2	5.5	5.8	5.9
		合計	52.5	83.7	93.0	94.5	95.5	96.0
	雌	尿	26.1	47.0	49.3	49.7	50.0	50.1
		糞	16.7	38.8	40.2	40.4	40.6	40.7
		呼気	3.2	5.5	6.0	6.2	6.4	6.5
		合計	46.0	91.3	95.5	96.3	97.0	97.3

n=4

a: 総投与放射活性に対する割合

(2) 体内動態試験 (マウス、反復経口投与)

マウス (DDY 系、6 週齢、雄 4 匹/時点) に ^{14}C 標識 BHT³ を 10 日間経口投与 (20 mg/kg 体重/日) する体内動態試験が実施された。投与開始 2 日後から

³ *p*-メチル基を ^{14}C で標識した BHT

最終投与 21 日後まで、経時的に採取した血液及び組織の放射活性が LSC を用いて測定された。

血液、肝臓、腎臓、肺及び精巣の放射活性は、投与期間中に漸増し、最終投与 1 及び 2 日後にも軽度の増加がみられたが、その後速やかに減少した。消失半減期は、血液で 14.7 日、肝臓で 4.6 日、腎臓で 5.3 日、肺で 7.1 日及び精巣で 7.6 日であった。(参照 2、3、4)

(3) 体内動態試験（ラット、単回経口投与①）

ラット（SD 系、6 週齢、雄 4 匹/時点）に ^{14}C 標識 BHT⁴を単回経口投与（20 又は 500 mg/kg 体重）する体内動態試験が実施された。経時的（投与 1、2 及び 3 日後）に採取した排泄物（尿及び糞）について、LSC による放射活性の測定並びに TLC 及び LSC による代謝物分析が実施された。

尿及び糞中への累積排泄率を表 3 に示した。

投与後 1 日までの尿中及び 3 日までの糞中の代謝物分析では、BHT を含め 43 種類を超える代謝物が検出された。ラットでは *tert*-ブチル基の酸化は乏しく、ベンゼン環の *p*-メチル基の酸化による BHT-COOH が主要代謝物であり、主に糞中に遊離酸として、尿中に遊離酸及び抱合体として排泄された。（参照 2、3、4）

表 3 ラット（雄）における ^{14}C 標識 BHT 単回経口投与後の尿及び糞中累積排泄率 (%) ^a

投与量 (mg/kg 体重)	試料	投与後日数 (日)		
		1	2	3
20	尿	9.2	13.6	16.1
	糞	46.9	64.1	69.8
	合計	56.1	77.7	85.9
500	尿	12.2	16.9	19.2
	糞	37.9	59.4	63.7
	合計	50.1	76.3	82.9

n=4

a : 総投与放射活性に対する割合

(4) 体内動態試験（ラット、単回経口投与②）

ラット（Wistar 系、雌雄各 3 匹）に ^{14}C 標識 BHT⁵を単回経口投与（1 mg (2.4 mCi) /匹又は 2.4 mg (5.8 mCi) /匹）し、尿及び糞中の放射活性が測定された。

結果を表 4 及び表 5 に示した。

1 mg/匹投与群では、投与後 4 日までに、雄で約 66%（尿：24%、糞：42%）、雌で約 72%（尿：37%、糞：35%）が、2.4 mg/匹投与群では、投与後

⁴ *p*-メチル基を ^{14}C で標識した BHT

⁵ *tert*-ブチル基を ^{14}C で標識した BHT

8 日までに、雄で約 68～73%（尿：24～29%、糞：44%）、雌で約 65～80%（尿：43～48%、糞：21～32%）が、それぞれ排泄された。（参照 2、3、5）

表 4 ラットにおける ^{14}C 標識 BHT 単回経口投与（1mg（2.4 μCi ））後の尿及び糞中累積排泄率（%）^a

		投与後日数（日）					合計		
		1	2	3	4	5～7	小計	小計の 平均	合計
雄	尿	5.8	5.1	2.7	2.4	0.6	16.6	24	66.1
		6.7	8.3	3.8	1.4	0.6	20.8		
		6.3	11.6	6.6	3.0	0.6	28.1		
		6.7	12.4	8.3	2.4	0.6	30.4		
	糞 ^b	5.2	20.2	11.7	5.0	—	42.1		
雌	尿	19.8	13.7	5.6	2.4	0.3	41.8	37.2	72.1
		28.6	15.8	9.3	3.4	0.3	57.4		
		4.8	5.0	1.7	0.6	0.3	12.4		
	糞 ^b	7.9	13.5	11.5	2.0	—	34.9		

a：総投与放射活性に対する割合

b：雌雄各々のプール試料

表 5 ラットにおける ^{14}C 標識 BHT 単回経口投与（2.4 mg（5.8 μCi ））後の尿及び糞中累積排泄率（%）^a

		投与後日数(日)								合計 ^b	
		1	2	3	4	5	6	7	8	小計	合計
雄	尿	7.3	10.5	2.0	1.4	2.1	0.34	0.32	0.05	24.0	67.6
		10.5	18.0	8.5	4.1	1.6	0.7	0.06	0.16	43.6	
	糞	6.2	11.5	6.4	2.6	1.1	0.46	0.82	0.21	29.3	72.8
		7.1	21.2	10.0	2.7	1.7	0.65	0.03	0.09	43.5	
雌	尿	16.3	18.2	7.4	2.9	1.3	0.58	0.57	0.28	47.5	79.7
		0.0	19.6	6.2	3.45	1.47	1.37	0.05	0.04	32.2	
	糞	17.2	17.8	3.6	2.8	1.0	0.54	0.26	0.08	43.3	64.5
		0.0	15.1	0.0	3.1	2.2	0.7	0.05	0.02	21.2	

a：総投与放射活性に対する割合

b：投与後 8 日までの尿及び糞中排泄率の合計

（5）体内動態試験（ラット、単回経口投与③）

ラット（Wistar 系、雌雄匹数不明）に ^{14}C 標識 BHT⁶を単回経口投与（1.16 mg（2.8 mCi）/匹）し、投与 2 日後及び 4 日後における主要臓器及び組織中の放射活性が測定された。

投与 2 日後における主要臓器及び組織中の放射活性は、合計で投与量の 14.8%で、そのうち消化管は 11.3%、投与 4 日後には合計で 3.8%に減少したが、そのうち 2.1%が消化管で保持されていた。

また、ラット（Wistar 系、雌雄各 1 匹）に、 ^{14}C 標識 BHT を単回経口投与（雄：1.75 mg（4.2 μCi ）/匹、雌：2.25 mg（5.4 μCi ）/匹）後の胆汁中の放

⁶ *tert*-ブチル基を ^{14}C で標識した BHT

射活性（投与量に対する割合）は、投与 40 時間後においても、雄で 53%/20 mL、雌で 17%/30 mL であった。

試験実施者は、BHT の排出が比較的遅延しているのは、組織内残留よりも腸肝循環が原因であると考察している。（参照 2、3、5）

（6）体内動態試験（ラット、反復経口投与①）

ラット（Nelson 系、雌雄各 1 匹/群）に ^{14}C 標識 BHT⁷（0.2 mmol/kg 体重（44 mg/kg 体重相当））を 1～5 回反復経口投与する体内動態試験が実施された。それぞれ投与後 24 時間ごとに尿及び糞中の放射活性が測定され、最終投与 24 時間後（5 回投与動物のみ最終投与 8 日後）に剖検し、胃腸管（内容物を含む）、肝臓、腎臓、脳、肺、心臓、生殖腺（精巣・卵巣）、副腎、脾臓、血液、皮膚、筋肉及び脂肪の各組織及び躯体の放射活性が測定された。

結果を表 6 及び表 7 に示した。

総排泄率（雄：92.0～103.5%、雌：92.6～98.6%）は、投与回数及び性別による顕著な差はみられず、雌雄とも主に糞中（雄：57.8～82.5%、雌：22.6～50.6%）及び尿中（雄：2.8～15.1%、雌：18.6～43.1）に排泄されたが、それぞれの排泄率にやや性差がみられた。反復投与による各組織への蓄積傾向はみられなかった。（参照 2、3、6）

表 6 ラットにおける ^{14}C 標識 BHT 経口投与後の放射活性の分布（%）^a

投与回数	糞		尿		胃腸管		躯体		総排泄量	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
1	57.8	22.6	2.8	18.6	27.5	35.5	4.4	15.9	92.0 ^b	92.6
2	69.6	30.9	6.2	36.5	23.2	17.5	4.5	8.8	103.5	93.7
3	79.5	45.9	4.0	25.4	12.9	18.5	2.3	6.8	98.7	98.6 ^b
4	82.5	-	3.9	-	10.0	-	2.5	-	98.9	-
5	76.9	50.6	15.1	43.1	0.4	3.7	0.3	0.6	92.7	98.0

a：総投与放射活性に対する割合

b：合計値と異なるが、原著の数値のママ記載

-：逃走によりデータなし

⁷ *tert*-ブチル基を ^{14}C で標識した BHT

表7 ラットにおける ^{14}C 標識 BHT 経口投与後の放射活性の分布 (%) ^a

組織	投与回数				
	1	2	3	4	5
肝臓	0.050	0.100	0.086	0.088	0.008
	0.137	0.162	0.135	-	0.011
腎臓	0.012	0.025	0.014	0.023	0.003
	0.039	0.042	0.038	-	0.007
脳	0.0017	0.0034	0.0017	0.0057	0.0004
	0.0095	0.0091	0.0095	-	0.0010
肺	0.013	0.011	0.015	0.023	0.004
	0.059	0.045	0.067	-	0.013
心臓	0.006	0.016	0.010	0.013	0.003
	0.039	0.040	0.033	-	0.005
生殖腺（精巣、卵巣）	0.004	0.007	0.005	0.006	0.0003
	0.056	0.150	0.077	-	0.016
副腎	0.021	0.016	0.033	0.022	0.012
	0.065	0.089	0.196	-	0.012
脾臓	0.005	0.009	0.008	0.009	0.006
	0.015	0.016	0.016	-	0.010
血液	0.010	0.015	0.015	0.017	0.012
	0.051	0.066	0.052	-	0.021
皮膚	0.017	0.025	0.019	0.042	0.004
	0.120	0.117	0.185	-	0.018
筋肉	0.003	0.009	0.004	0.005	0.001
	0.020	0.033	0.019	-	0.002
脂肪	0.023	0.069	0.044	0.065	0.009
	0.161	0.123	0.243	-	0.054

a：組織 1 g 当たりの総投与放射活性に対する割合（値は上段が雄、下段が雌）

-：逃走によりデータなし

（7）体内動態試験（ラット、反復経口投与②）

ラット（SD 系、雄、匹数不明）に、BHT を 2 週間混餌投与（1.2%）する体内動態試験が実施された。投与後、肺、腎臓、肝臓、脾臓、脳及び精巣上体周囲脂肪を採取し、GC-MS による各組織中（アセトン抽出物）の代謝物分析が行われた。

非抱合型 BHT が、肺、腎臓、脾臓、脳及び精巣上体周囲脂肪でみられたが、肝臓ではみられなかった。肝臓のマスペクトルでは、2,6-di-*tert*-butyl-4-methylene-2,5-cyclohexadienone と一致するピークがみられ、試験実施者は、BHT-QM（キノンメチド）の生成が示唆されたと考察している。（参照 7）

（8）体内動態試験（ウサギ）

ウサギ（NZW 系、1.33～2.0 kg）に BHT を単回経口投与又は 4 日間若しくは 5 日間反復経口投与（0.8 g/匹）する体内動態試験が実施され、尿中の代謝物が測定された。

投与量の 54.1%が代謝物として排泄され、そのうち 16.0%がエステルグルクロナイド（BHT-COOH のグルクロン酸抱合体）として、19.4%がエーテルグルクロナイド（BHT-BuOH のグルクロン酸抱合体）として排泄された。また、非抱合フェノール体として 8.4%、エーテル硫酸体として 8.0%、グリシン抱合体として 1.8%が排泄された。単回投与及び反復投与では、これらの比率に顕著な差はみられなかった。（参照 2、8）

（9）体内動態試験（ヒト、単回経口投与）

男性 2 名の被験者に ^{14}C 標識 BHT⁸（2.4 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ ）及び非標識 BHT の混合物 40 mg を単回経口投与する体内動態試験が実施され、尿及び糞中の放射活性が測定された。

尿中の測定結果を表 8 に示した。

尿中では投与した放射活性の約 50%が投与後 1 日までに排泄され、以後排泄量は漸減し、投与後 11 日までに約 63～67%が排泄された。糞中の放射活性は、投与 10、18 及び 31 日後にそれぞれ 0.3、0.15 及び 0.02%であった。（参照 2、3、9）

表 8 ヒトにおける BHT 単回投与後の尿中排泄率（%）^a

投与後日数	被験者	
	A	B
1	49.5	50.7
2	5.5	5.6
3	2.8	2.8
4	1.8	2.0
5	1.3	1.5
6	1.0	1.7
7	0.7	0.9
8	-	0.5
9	-	0.5
10	-	0.7
11	0.6	-
合計	63.2	66.9

a：総投与放射活性に対する割合

（10）体内動態試験（ラット及びヒトの比較試験）

ヒト及びラットの体内動態を比較するために、ラット（Wistar 系、雄、入荷時平均体重：326±36 g）及びヒト（健常男性、平均年齢：31 歳、平均体重：73 kg）に、BHT を単回経口投与（ラット：20、63 又は 200 mg/kg 体重、ヒト：0.5 mg/kg 体重）する体内動態試験が実施された。ヒトは投与 0、15、30、45、60、75、90、120、150、180 及び 240 分後に、ラットは投与 0、15、30、45、60、90、120、180、240、360 及び 480 分後に血液を採取

⁸ 2 つの *tert*-ブチル基のメチル基を ^{14}C で標識した BHT

し、血漿中の BHT 濃度が測定された。

結果を表 9 に示した。

ラットにおける BHT の血漿中濃度は、63 及び 200 mg/kg 体重投与では、投与 2～4 時間後にピークを示し、用量依存性に増加したが、20 mg/kg 体重投与の血漿中濃度は、各測定時点において検出限界 (LOD) 付近であり明確なピークはみられなかった。ヒトでは血漿中濃度は投与後およそ 1.5 時間でピークを示したが、濃度には個体差がみられた。

次に、ヒト及びラットの代謝・排泄を比較するために、ラット (Wistar 系、雄 5 匹、平均体重：275±7 g) 及びヒト (健常男性、平均年齢：31 歳、平均体重：73 kg) に、BHT を単回経口投与 (ラット：200 mg/kg 体重、ヒト：0.5 mg/kg 体重) 後、ラットでは 4 日間、ヒトでは 2 日間にわたって採取した尿及び糞中の代謝物分析が実施された。

結果を表 10 に示した。

ラットでは、投与後 4 日までに投与量の約 2% が BHT-COOH (抱合型と非抱合型のいずれもそれぞれ投与量の約 1%) として尿中に排泄され、約 10% が BHT (未変化体) として糞中に排泄された。ヒトでは、投与後 2 日までに、投与量の約 2.6% が BHT-COOH の抱合型として、投与量の約 0.2% が BHT-COOH の非抱合型として、それぞれ尿中に排泄された。BHT (未変化体) は糞中に検出されなかった。(参照 2、10)

表 9 ラット及びヒトにおける BHT 単回経口投与後の $C_{\max}$ 及び AUC

	投与量 (mg/kg 体重)	$C_{\max}^a$ ($\mu\text{g/mL}$)	AUC ^a ($\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$)
ラット	20	0.2 ± 0.3	300 ± 400
	63	0.8 ± 0.3	2,000 ± 1,400
	200	2.3 ± 0.9	7,700 ± 2,700
ヒト	0.5	0.09 ± 0.1	76 ± 65

a : 平均±標準偏差

表 10 ラット及びヒトにおける BHT 単回経口投与後の尿及び糞中代謝物排泄率 (%) ^a

動物種 ^b (投与量)	試料	検出	LOD (%)	投与後日数 (日)				合計 (1~4)
				1	2	3	4	
ラット (200 mg/kg 体重)	尿	BHT-COOH (非抱合型)	<0.1	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	1.0 ± 0.4
		BHT-COOH (抱合型)		0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	1.1 ± 0.4
	糞	BHT (未変化体)		7.3 ± 7.9	2.4 ± 1.6	0.3 ± 0.2	0.0 ± 0.0	9.9 ± 9.1
ヒト (0.5 mg/kg 体重)	尿	BHT-COOH (非抱合型)	0.1	0.2 ± 0.1	ND	-	-	0.2 ± 0.1
		BHT-COOH (抱合型)	0.1	2.6 ± 2.2	0.0 ± 0.1	-	-	2.6 ± 2.2
	糞	BHT (未変化体)	3~5	ND	ND	-	-	ND

a : 総投与量に対する割合 (平均±標準偏差)

b : ラット 5 匹、ヒト 7 名

LOD : 検出限界、ND : 非検出、- : 未測定

(1 1) 体内動態試験 (ヒト、反復経口投与)

男性 8 名に 100 mg の BHT を 4 日間隔で 2 回経口投与する体内動態試験が実施され、投与後 24 時間まで尿を採取し、尿中の代謝物分析が行われた。

初回エーテル抽出では、TLC により BHT-COOH のみが検出されたが、2 回目のエーテル抽出では、赤外及び核磁気共鳴分光分析法と融点測定により、ベンゾイル-グリシンが同定された。さらに 2 名の成人に 1.0 g の BHT を経口投与し、投与後 24 時間まで採取した尿の TLC により、代謝物として BHT-COOH のエステル型グルクロン酸が検出された。

これらの結果から、ヒト尿中の主要代謝物は BHT-COOH 及びそのグルクロン酸抱合体であることが示唆された。(参照 2、11)

(1 2) 体内動態試験 (代謝物の概要)

各種総説等を踏まえ、BHT の生体内推定代謝経路を図 1 に整理した。(参考 3、12、13、14)

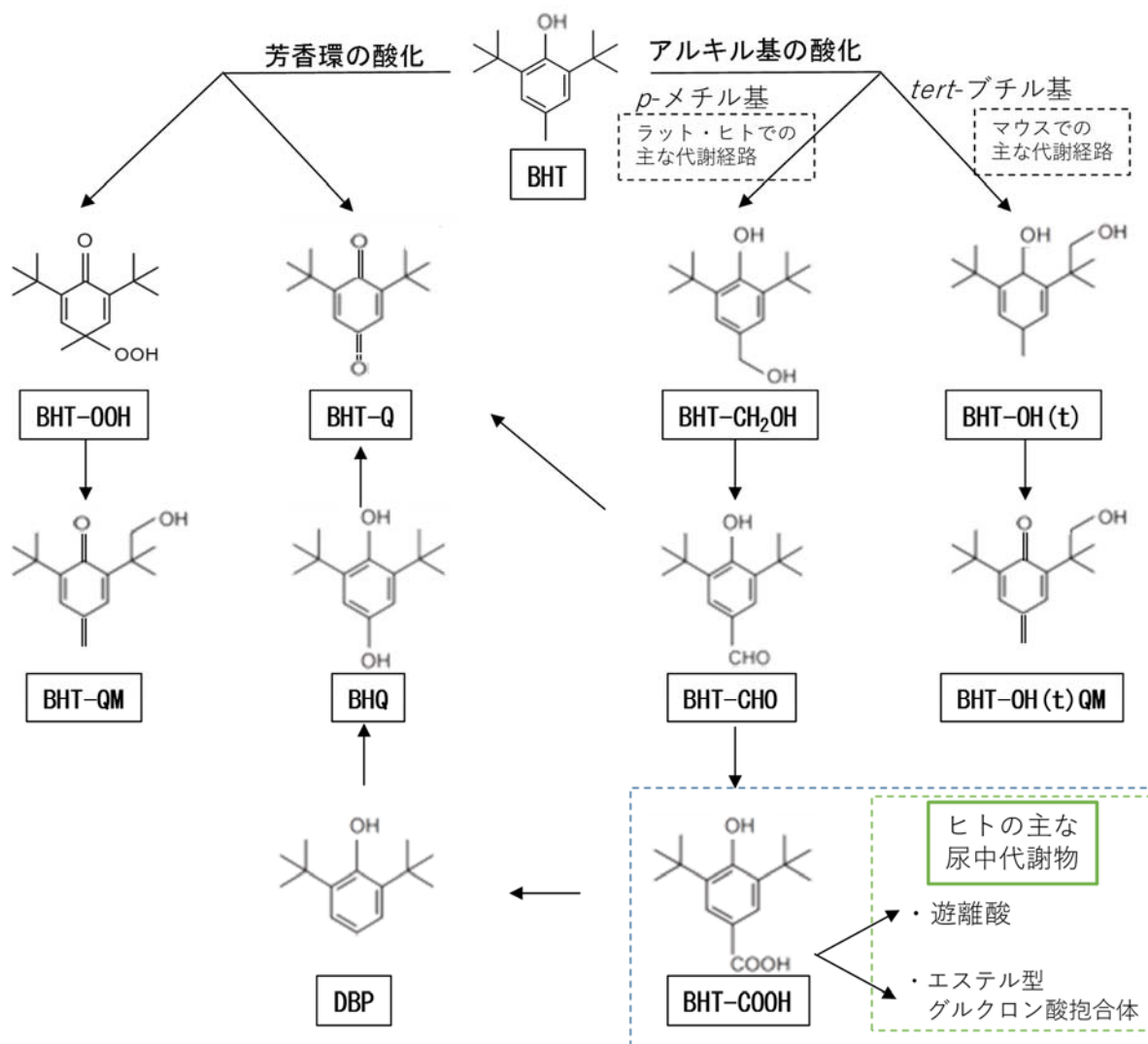


図1 BHTの生体内推定代謝経路

2. 残留試験

(1) 残留試験（牛）

牛（ホルスタイン種、44～100か月齢、雌、3頭/群）にBHTを28日間混餌投与（30、150又は300 mg/kg 飼料）する残留試験が実施された。投与前から投与28日後まで経時的に採取した乳汁（朝夕の搾乳のプール乳汁）並びに投与28日後に剖検し採材した肝臓、腎臓、筋肉（ロース、モモ及びバラ）及び脂肪について、HPLCにより組織中BHT濃度を測定した（定量限界（LOQ）：0.01 µg/g）。結果を表11及び表12に示した。

乳汁のBHT濃度は、各投与群の全ての検体でLOQ未満であった。300 mg/kg 飼料投与群において、肝臓で0.01～0.02 µg/g（3例全て）腎臓で0.01 µg/g（1例のみ）が検出されたが、30及び150 mg/kg 飼料投与群では全てLOQ未満であった。脂肪では、30 mg/kg 飼料投与群では全てLOQ未満であったが、150 mg/kg 飼料投与群では全例で0.01～0.04 µg/g及び300 mg/kg 飼料投与群では全例で0.10～0.18 µg/gが検出された。筋肉では、いずれの投与群においても全例でLOQ未満であった。（参照15、16）

表 11 牛における BHT 28 日間混餌投与時の乳汁中残留濃度 (µg/g)

乳汁採取	投与量 (mg/kg 飼料) 及び個体番号								
	30			150			300		
	001	002	003	004	005	006	007	008	009
投与開始前 ^a	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
投与開始日 ^b	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
投与開始後日数	1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	14	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	21	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	27 ^a	<LOQ	-	-	-	-	-	-	-
	27 ^b	<LOQ	-	-	-	-	-	-	-
	28	-	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

<LOQ : 定量限界 (0.01 µg/g) 未満

a : 朝方採取の乳汁 b : 夕方採取の乳汁

- : 未実施

表 12 牛における BHT 28 日間混餌投与後の組織中残留濃度 (µg/g)

投与量 (mg/kg 飼料)	個体番号	肝臓	腎臓	脂肪	筋肉		
					ロース	モモ	バラ
30	001 ^a	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	002	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	003	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
150	004	<LOQ	<LOQ	0.04	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	005	<LOQ	<LOQ	0.03	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	006	<LOQ	<LOQ	0.01	<LOQ	<LOQ	<LOQ
300	007	0.02	<LOQ	0.18	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	008	0.01	0.01	0.10	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	009	0.02	<LOQ	0.12	<LOQ	<LOQ	<LOQ

<LOQ : 定量限界 (0.01 µg/g) 未満

a : 投与開始 27 日後に剖検し採材した。

(2) 残留試験 (豚)

豚 (LW 系、SPF、去勢雄、1 頭/時点) に BHT を 91 日間混餌投与 (150 又は 600 mg/kg 飼料 (315 又は 1,334 mg/頭/日相当)) する残留試験が実施された。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 により組織中 BHT 濃度を測定した (LOD : 0.025 µg/g)。

結果を表 13 に示した。

肝臓の BHT 濃度は、150 及び 600 mg/kg 飼料投与群いずれも最終投与 0 日後以降、LOD 未満であった。腎臓では 150 mg/kg 飼料投与群で最終投与 3 日

後以降、600 mg/kg 飼料投与群では最終投与 5 日後以降で、LOD 未満であった。筋肉では、150 mg/kg 飼料投与群で最終投与 1 日後以降、600 mg/kg 飼料投与群では最終投与 5 日後以降で LOD 未満であった。一方、脂肪及び小腸では、最終投与後、漸減傾向がみられたが、最終投与 7 日後においても LOD 未満にはならなかった。(参照17)

表 13 豚における BHT 91 日間混餌投与後の組織中残留濃度 (µg/g) ^a

組織	投与開始 6 週後	最終投与後日数(日)					
		0	1	2	3	5	7
肝臓	<LOD 0.04	<LOD <LOD	<LOD <LOD	<LOD <LOD	<LOD <LOD	<LOD <LOD	<LOD <LOD
腎臓	0.04 0.05	0.08 0.09	0.08 0.08	0.04 0.09	<LOD 0.07	<LOD <LOD	<LOD <LOD
筋肉	<LOD <LOD	0.03 0.07	<LOD 0.05	<LOD 0.07	<LOD 0.03	<LOD <LOD	<LOD <LOD
脂肪	0.44 0.56	0.50 1.5	0.45 0.88	0.40 0.51	0.36 0.35	0.36 0.18	0.13 0.16
小腸	0.38 1.0	0.30 0.71	0.39 1.5	0.27 0.82	0.17 0.86	0.09 0.70	0.07 0.17

a : 同一試料について分析を 2 回実施し、それらの平均値を算出

上段は 150 mg/kg 飼料投与群、下段は 600 mg/kg 飼料投与群

<LOD : 検出限界 (0.025 µg/g) 未満

(3) 残留試験 (鶏①)

鶏 (肉用種、初生雛、雌、10 羽/時点 (投与開始 4 週後のみ 16 羽/時点)) に BHT を 56 日間混餌投与 (150 又は 600 mg/kg 飼料 (12 又は 49 mg/羽/日相当)) する残留試験が実施された。投与開始 4 週後並びに最終投与 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 により組織中 BHT 濃度を測定した (LOD : 0.025 µg/g)。なお、分析用試料は 5 羽分 (投与開始 4 週後のみ 8 羽分) をまとめて 1 試料とした。

結果を表 14 に示した。

肝臓の BHT 濃度は、150 mg/kg 飼料投与群及び 600 mg/kg 飼料投与群とも最終投与 5 日後以降、LOD 未満であった。筋肉の BHT 濃度は 150 mg/kg 飼料投与群で最終投与 1 日後以降、600 mg/kg 飼料投与群では最終投与 5 日後以降、LOD 未満であった。腎臓の BHT 濃度は、150 mg/kg 飼料投与群で最終投与 5 日後以降、LOD 未満であったが、600 mg/kg 飼料投与群では最終投与 7 日後においても LOD 未満とならなかった。脂肪及び皮膚では、特に 600 mg/kg 飼料投与群で高い残留がみられ、脂肪では、最終投与 2 日後に 56 µg/g、皮膚では投与終了 0 日後に 57 µg/g を示し、最終投与 7 日後においても、それぞれ比較的高い残留がみられた。(参照 17)

表 14 鶏における BHT 56 日間混餌投与後の組織中残留濃度 (μg/g) ^a

組織	投与開始 4 週後	最終投与後日数(日)					
		0	1	2	3	5	7
肝臓	0.03	0.21	0.13	0.03	0.06	<LOD	<LOD
	0.03	0.75	0.78	0.18	0.10	<LOD	<LOD
腎臓	0.02	0.13	0.06	0.05	0.07	<LOD	<LOD
	<LOD	0.83	0.78	0.72	0.72	0.62	0.54
筋肉	<LOD	0.02	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	<LOD	0.16	0.06	0.08	0.02	<LOD	<LOD
脂肪	0.02	3.0	1.9	1.4	0.60	0.62	0.26
	0.03	30	40	56	23	21	20
皮膚	<LOD	1.6	1.3	1.2	0.16	0.62	0.94
	0.02	57	31	33	32	7.4	3.7

<LOD：検出限界 (0.025 μg/g) 未満

a：同一試料について分析を 2 回実施し、それらの平均値を算出

上段は 150 mg/kg 飼料投与群、下段は 600 mg/kg 飼料投与群

(4) 残留試験 (鶏②)

鶏 (肉用種、1 日齢、雌雄各 1 羽/時点) に ¹⁴C 標識 BHT⁹ を添加した肉用鶏用飼料を 10 週間混餌投与 (200 mg/kg 飼料) する残留試験が実施された。投与開始 1、2、4 及び 10 週後に、雌雄各 1 羽から採取した各組織の濃度を LSC で測定した。また、産卵鶏に ¹⁴C 標識 BHT⁹ を添加した採卵鶏用飼料を 4 週間混餌投与 (200 mg/kg 飼料) した。投与開始 1、3、7、14、21 及び 28 日後に採取した鶏卵及び投与開始 4 日後に当該産卵鶏から採取した各組織の濃度を LSC で測定した。

結果を表 15 及び表 16 に示した。

肉用鶏では、BHT 及びその代謝物の濃度は、投与開始 1 週後に最高値を示し、脂肪、皮膚、筋胃及び内臓 (viscera) ¹⁰ で比較的高い値を示したが、これらも含め各組織とも、14 日後以降は概ね経時的に減少した。産卵鶏では、肉用鶏と比較して脂肪中の BHT 及びその代謝物の濃度がやや高かったが、可食部位に顕著な差はみられなかった。鶏卵中の BHT 及びその代謝物の濃度は、投与開始 7 日後に最高値 (2.5 μg/g) を示し、以降、投与開始 28 日後まで概ね 2 μg/g で維持された。(参照18)

⁹ 詳細は不明であるが、ベンゼン環を ¹⁴C で標識した BHT と考えられる。

¹⁰ 腹腔内の臓器全体から肝臓、腎臓、心臓及び筋胃を除いたものと考えられる。

表 15 鶏における ^{14}C 標識 BHT 混餌投与後の各組織中濃度 ($\mu\text{g/g}$)

組織 ^a	投与開始後期間 (週)				
	肉用鶏				産卵鶏
	1	2	4	10	4
脂肪	11.2	7.4	2.2	3.9	17.5
胸部筋肉	2.4	1.0	0.9	0.9	0.2
脚部筋肉	2.8	1.3	1.2	0.6	1.4
翼部筋肉	2.7	2.0	1.3	0.8	1.8
肝臓	5.6	4.9	5.4	4.4	6.8
腎臓	4.4	4.0	2.8	3.6	3.9
心臓	4.6	4.0	3.0	1.3	1.0
皮膚	14.1	9.1	6.1	3.5	14.3
筋胃	9.1	7.1	6.9	0.9	4.8
内臓	12.1	9.1	7.0	5.7	7.1

a: 測定試料の詳細 (サンプル量、試料プールの有無等) 不明

表 16 鶏における ^{14}C 標識 BHT 混餌投与開始後の鶏卵中濃度 ($\mu\text{g/g}$)

投与開始後日数(日)	1	3	7	14	21	28
鶏卵中濃度	0.2	1.0	2.5	2.1	2.3	2.2

a: 測定試料の詳細不明 (サンプル量、試料プールの有無等)

(5) 残留試験 (鶏卵①)

鶏 (卵用種、4羽/群) に BHT を混餌投与 (5 mg/kg 飼料を 8 週間混餌投与後 100 mg/kg 飼料の混餌投与に変更し継続飼育、又は 50 mg/kg 飼料を 8 週間混餌投与後 500 mg/kg 飼料の混餌投与に変更し継続飼育) する残留試験が実施された。投与開始時及び投与開始 4、8、10、12、16、20 及び 26 週後に採卵し、卵黄から抽出した脂肪分における BHT 濃度が測定された。

結果を表 17 に示した。

5 mg/kg 飼料から 100 mg/kg 飼料に給与変更した投与群では、BHT の残留はみられなかった。50 mg/kg 飼料及び 500 mg/kg 飼料投与群では、500 mg/kg 飼料に変更後 2 週から 26 週まで、約 20 $\mu\text{g/g}$ 前後の BHT が卵黄の脂肪分から検出された。(参照19)

表 17 採卵鶏における BHT 混餌投与後の卵黄中濃度 ($\mu\text{g/g}$) ^a

BHT 濃度 (mg/kg 飼料)	投与開始後期間 (週)							
	0	4	8	10	12	16	20	26
5 → 100	0	0	0	0	0	0	0	T
50 → 500	0	0	0	24	20	18	18	24

a: 測定試料: 鶏卵 4 個のプール試料 (1 個/羽を 4 羽分プール) (26 週を除く。)

T: 痕跡程度

(6) 残留試験 (鶏卵②)

鶏 (卵用種 (白色レグホン種)、9 か月齢、8 羽/群) に BHT を 21 日間混餌投与 (150 又は 600 mg/kg 飼料 (16 又は 68 mg/羽/日相当)) する残留試験が実施された。投与開始 7 及び 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 で卵黄及び卵白中 BHT 濃度を測定した (LOD : 0.025 µg/g)。

結果を表 18 に示した。

卵白は、150 及び 600 mg/kg 飼料投与群のいずれも全ての時点で BHT は検出されなかった。一方、卵黄では、150 mg/kg 飼料投与群で最終投与 1 日後に 1.45 µg/g、600 mg/kg 飼料投与群では最終投与 0 日後に 34 µg/g の最高値を示し、最終投与 7 日後においても、150 mg/kg 飼料投与群では 0.16 µg/g、600 mg/kg 飼料投与群では 4.1 µg/g が検出された。(参照20)

表 18 採卵鶏における BHT 21 日間混餌投与後の卵白及び卵黄中残留濃 (µg/g) ^a

投与量 (mg/kg 飼料)	検体	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	卵白	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	卵黄	0.93	0.95	0.82	1.45	0.71	0.67	0.26	0.16
600	卵白	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	卵黄	29	33	34	20	20	16	13	4.1

a : 同一試料について分析を 2 回実施し、それらの平均値を算出

上段は 150 mg/kg 飼料投与群、下段は 600 mg/kg 飼料投与群

<LOD : 検出限界 (0.025 µg/g) 未満

(7) にじます、こい、うなぎ、あゆ及びまだい

にじます、こい、うなぎ、あゆ又はまだい (10 尾以上/時点) に BHT をそれぞれ 63、76、62、65 又は 60 日間混餌投与 (全魚種において 150 又は 450 mg/kg 飼料) する残留試験が実施された。投与期間中に 1 回 (にじます : 投与開始 32 日後、こい : 投与開始 43 日後、うなぎ : 投与開始 30 日後、あゆ : 投与開始 30 日後) 並びに最終投与 1、2、3 及び 7 日後に筋肉及び内臓 (消化管内容物及び腎臓を除く。) を採取¹¹し、GC-MS により残留濃度を測定した

(LOD : 0.1 µg/g (にじます、こい、うなぎ、あゆ)、0.05 µg/g (まだい))。

なお、150 及び 450 mg/kg 飼料の BHT 投与量は、にじますで 1.1 及び 3.2 mg/kg 体重/日相当、こいで 1.4 及び 4.7 mg/kg 体重/日相当、うなぎで 1.8 及び 5.1 mg/kg 体重/日相当、あゆで 3.7 及び 9.8 mg/kg 体重/日相当、まだいで 1.9 及び 5.8 mg/kg 体重/日相当とされている。

結果を表 19 に示した。

筋肉における BHT の残留は、150 及び 450 mg/kg 飼料投与群のいずれも、

¹¹ うなぎの分析試料は筋肉のみ、あゆの分析試料は全魚体 (消化管内容物を除く。)

うなぎが最も高く、次いでにじますであり、これらと比較してこい及びまだいは低かった。いずれの魚種でも投与終了後、残留濃度の減少がみられたが、450 mg/kg 飼料投与群ではこいを除いて最終投与 7 日後でも LOD 未満とならなかった。内臓における BHT の残留はまだいが最も高く、次いでにじます、こいであった。いずれの魚種でも、最終投与 7 日後には残留濃度は減少したが、LOD 未満とならなかった。あゆ（全魚体）の残留は比較的高く、最終投与 7 日後でも減少はみられなかった。（参照21）

表 19 にじます、こい、うなぎ、あゆ及びまだいにおける BHT 混餌投与後の筋肉及び内臓中濃度 (µg/g)

魚種	投与量 (mg/kg 飼料)	組織 ^a	投与期間中	最終投与後日数(日)			
				1	2	3	7
にじます	150	筋肉	0.7	0.7	0.9	0.9	0.3
		内臓	4.1	7.6	7.4	7.9	3.9
	450	筋肉	2.8	2.9	2.8	2.2	2.0
		内臓	19.5	28.1	25.0	21.2	19.2
こい	150	筋肉	0.3	0.2	<LOD	0.1	<LOD
		内臓	3.1	1.4	0.9	1.0	0.7
	450	筋肉	1.2	1.4	1.2	0.9	<LOD
		内臓	11.4	6.2	11.1	4.1	1.5
うなぎ	150	筋肉	1.4	1.9	1.9	1.7	1.3
	450	筋肉	10.7	12.3	11.3	6.4	4.2
あゆ	150	全魚体	1.9	1.6	1.6	2.9	2.0
	450	全魚体	6.0	2.9	3.7	2.6	3.4
まだい	150	筋肉	—	0.27	0.1	0.08	<LOD
		内臓	—	6.5	2.6	1.5	0.72
	450	筋肉	—	1.3 1.2	0.91	0.48	0.3
		内臓	—	47 45	36	27	18

a：各時点で 10 尾以上から採取（測定試料数は不明）

<LOD：検出限界（0.1 µg/g（にじます、こい、うなぎ、あゆ）、0.05 µg/g（まだい））未満

—：未実施

（８）残留試験（くるまえば①）

くるまえばに BHT を 60 日間混餌投与（0、150 又は 450 mg/kg 飼料）¹²する残留試験が実施された。最終投与 1、2、3 及び 7 日後に肉質部を採取¹³し、GC-MS により残留濃度を測定した（LOD：0.05 µg/g）。

結果を表 20 に示した。

全投与群において、BHT の肉質部中の残留濃度は、全ての時点で LOD 未満であった。（参照22）

¹² 給餌は 1 日 1 回夕方に行い、投与終了日を除く日曜日は無給餌とした。

¹³ 10 尾以上から頭胸部、外骨格、脚及び腸管を除いて肉質部を細断し 50 g 以上を採取したものを 1 検体とした。

表 20 くるまえばいにおける BHT 混餌投与後の肉質部中濃度 (μg/g)

投与量 (mg/kg 飼料)	投与開始前	投与終了後日数 (日)			
		1	2	3	7
0	<LOD ^a	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
150	-	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
450	-	<LOD ^b	<LOD	<LOD	<LOD

<LOD : 検出限界 (0.05 μg/g) 未満

a : 3 検体を分析し、全て<LOD

b : 2 検体を分析し、全て<LOD

- : 未実施

(9) 残留試験 (くるまえばい②)

くるまえばいに BHT を 7 日間混餌投与 (0、200、400、800 又は 1,600 mg/kg 飼料) する残留試験が実施された。最終投与 24 時間後に肉質部を採取し、GC-MS により残留濃度を測定した (LOD : 0.05 μg/g)。分析検体の採取は前述 (くるまえばい①) の試験と同様に行った。

結果を表 21 に示した。

全投与群において、BHT の肉質部中の残留濃度は LOD 未満であった。(参照 22)

表 21 くるまえばいにおける BHT 混餌投与後の肉質部中濃度 (μg/g)

群	対照群	BHT 投与群			
投与量 (mg/kg 飼料)	0	200	400	800	1,600
肉質部中濃度	<LOD ^a	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

<LOD : 検出限界 (0.05 μg/g) 未満

a : 2 検体を分析し、全て<LOD

3. 遺伝毒性試験

BHT の遺伝毒性に関する各種の *in vitro* 試験及び *in vivo* 試験の結果を表 22 に示した。

BHT は、一部のマウスリンフォーマ (L5178Y *Tk*^{+/+}) 細胞やチャイニーズハムスター V79 細胞を用いる遺伝子突然変異試験において S9mix 添加条件下で陽性を示し、また、一部の染色体異常試験では S9mix 非添加条件下で陽性を示したが、細菌を用いる復帰突然変異試験、姉妹染色分体交換試験及び DNA 修復試験を含むその他の *in vitro* 試験ではいずれも陰性であった。また、*in vivo* 試験では DNA 損傷試験 (コメットアッセイ) での一部の臓器を除いて、いずれも陰性であった。

BHT は生体内における代謝の過程で、酸化代謝物やキノン化合物が生成されるが、これらから生じる活性酸素種により DNA 損傷が生じることが報告されて

いる（参照 14、23）。したがって、*in vitro* の遺伝子突然変異試験や染色体異常試験の一部及び *in vivo* の DNA 損傷試験（コメットアッセイ）において一部の臓器で陽性結果が認められたことは、BHT の生体内代謝過程で生成される酸化代謝物やキノン化合物から生じる活性酸素種による間接的な影響の可能性があり、閾値があるものと考えた。

以上より、食品安全委員会肥料・飼料等専門等調査会は、BHT には、飼料添加物として適切に使用された場合において、食品を介してヒトに対して特段問題となる遺伝毒性はないと判断した。

表 22 BHT 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	0.015～0.6% (±S9)	陰性	2
		<i>S. typhimurium</i> TA98、TA100	1～100 µg/plate (±S9)	陰性	2、24
		<i>S. typhimurium</i> TA97、TA102、TA104、TA100	1～1,000 µg/plate (±S9)	陰性	2、24
		<i>S. typhimurium</i> TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538	100～10,000 µg/plate (±S9)	陰性	2、24
		<i>S. typhimurium</i> TA98、TA100	100～1,000 µg/plate (±S9)	陰性	2
		<i>S. typhimurium</i> TA98	10 µg/plate (±S9)	陰性	2
		<i>S. typhimurium</i> TA102、TA2698、 <i>E. coli</i> WP2/pKM101、WP2 <i>uvrA</i> /pKM101	333～5,000 µg/plate (+S9)	陰性	24
		<i>S. typhimurium</i> TA98、TA100、TA1537	0.05～500 µg/plate (±S9)	陰性	24
	遺伝子突然変異試験	マウスリンフォーマ細胞 (L5178Y <i>Tk</i> ^{+/+})	2～28 µg/mL (+S9) 1.25～40 µg/mL (-S9)	陽性 (+S9)	24
		マウスリンフォーマ細胞 (L5178Y <i>Tk</i> ^{+/+})	40 µg/mL まで (±S9、3h) 50 µg/mL まで (-S9、24h)	陰性	3、25
		チャイニーズハムスターV79細胞、HGPRT 遺伝子	1、5、10 µg/mL (+S9)	陽性 ^a	24

	検査項目	試験対象	用量	結果	参照
		ラット肝上皮細胞 (line 18)、HGPRT 遺伝子	50～90 µg/mL (-S9)	陰性	2、24
	有糸分裂組換え試験	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D4	0.6～2.4%	陰性	2
	染色体異常試験	ヒト WI-38 細胞 (胎児肺由来)	2.5～250 µg/mL (-S9)	陽性 (参考) ^b	2、24、26
		チャイニーズハムスター卵巣由来 (CHO) 細胞	1.6～16 µg/mL (±S9)	陰性	24
		CHO 細胞	0.1～0.5 µg/mL (-S9)	陽性	24
	姉妹染色分体交換試験	CHO 細胞	1～1,000 µg/mL	陰性	2
	DNA 修復試験	ラット初代培養肝細胞	0.01～10 µg/mL	陰性	2
in vivo	宿主経路試験 (復帰突然変異)	マウス (ICR Swiss 系) / <i>S. typhimurium</i> G46、TA1530	30～1,400 mg/kg (単回)	陰性	2、24
	宿主経路試験 (有糸分裂組換え)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> D3/マウス (ICR Swiss 系)	30、250、500 mg/kg 体重/日 (反復)	陰性	2、24
	相互転座試験	マウス (雄)	1% (混餌、8 週間)	陰性	2、24
	伴性劣性致死試験	ショウジョウバエ	2.0×10 ⁻⁶ µg	陰性	2
		ショウジョウバエ	5% (混餌)	陰性	2
	性染色体欠失試験	ショウジョウバエ	2.0×10 ⁻⁶ µg	陰性	2
	染色体異常試験	マウス (ICR 系) 又はラット (Wistar 又は SD 系) 骨髓細胞	1.5% (混餌、9 か月)	陰性	24、27
		骨髓細胞 (アルビノスイスラット)	3 mg/kg 体重 (経口、3 か月)	陰性	2
	小核試験	マウス (C57BL/6 系 × C3H/He 系) 骨髓細胞	0、125、250、500、1,000 mg/kg 体重 (腹腔内、5 日間)	陰性	24
		ラット骨髓細胞	30、250、500 (5 回) 30、900、1,400 mg/kg (単回)	陰性	2、24
		ラット末梢血細胞	17.3、34.5、69.0 mg/kg 体重 (経口、3 か月)	陰性	3
	優性致死試験	ラット (SD 系)	30、900、1,400 mg/kg 体重 (単回)	陰性	2、26
			30、250、500 mg/kg 体重/日 (反復)	陰性	

	検査項目	試験対象	用量	結果	参照
		ラット（SD 系、雄）	50、166、500 mg/kg 体重/日	陰性 ^c	2、24
		マウス（雄）	10,000 mg/kg 飼料	陰性	2、24
	DNA 損傷試験（コメットアッセイ）	マウス（ddY 系、雄）	10～1,000 mg/kg（経口、単回）	陽性（脳、腺胃、結腸、膀胱） 陰性（肝臓、腎臓、肺、骨髄）	28

a：細胞毒性用量のみ陽性

b：分裂中期細胞ではなく、分裂後期細胞を観察した結果であり、バリデーションされた試験ではなく、Bomhard の総説（参照 26）においても妥当性に疑念があるとされていることを踏まえ、参考資料とした。

c：OECD Screening Information Data Set (SIDS)（参照 24）の計算による評価。

4. 急性毒性試験

マウス、ラット、ウサギ及びモルモットにおける BHT の急性毒性試験の結果を表 23 に示した。

表 23 BHT の急性毒性試験結果

動物種	雌雄	投与経路	LD ₅₀ 又は概算の致死量 (mg/kg 体重)	参照
マウス	不明	経口	2,000	2
ラット	不明	経口	>1,700～1,970	
	不明	経口	2,450	
ウサギ	不明	経口	2,100～3,200	
モルモット	不明	経口	10,700	

5. 亜急性毒性試験

（1）30 日間亜急性毒性試験（マウス、混餌投与）

マウス（ddY 系、雄 10 匹/群）に BHT を 30 日間混餌投与（0、13,500、17,500、22,800、29,600、38,500 又は 50,000 mg/kg 飼料（0、1,570、1,980、2,630、3,370、4,980 又は 5,470 mg/kg 体重/日相当））する亜急性毒性試験が実施された。

毒性所見を表 24 に示した。

病理組織学的検査では、肝臓に異常はみられなかった。（参照 2、24、29）

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、血液凝固系（PT 及びカオリン加活性化トロンボプラスチン時間（KPTT）の変動¹⁴及び腎臓の尿細管病変が全ての BHT 投与群で認められたことから、本試験の LOAEL を 13,500 mg/kg 飼料（1,570 mg/kg 体重/日）と判断した。

¹⁴ 血液凝固系の毒性については、II の 8 の（1）血液凝固系への影響に関する試験を参照。

表 24 マウスを用いた 30 日間亜急性毒性試験における毒性所見

投与量 (mg/kg 飼料)	毒性所見
50,000	腎臓の形態異常
22,800 以上	体重低下、腎臓絶対重量減少、腎臓相対重量増加
13,500 以上	PT 減少、KPTT の減少 (13,500、17,500 及び 22,800 mg/kg 飼料で観察)、腎臓尿細管病変

(2) 7 週間亜急性毒性試験 (マウス、混餌) <参考資料¹⁵>

マウス (B6C3F1 系、雌雄各 5 匹/群) に BHT を 7 週間混餌投与 (0、3,100、6,200、12,500、25,000 又は 50,000 mg/kg 飼料) する亜急性毒性試験が実施された。

試験期間中、25,000 mg/kg 飼料投与群の雌 1 匹、50,000 mg/kg 飼料投与群の雄 1 匹及び雌 4 匹が死亡した。全ての BHT 投与群で用量依存性の体重増加抑制がみられた。病理組織学的検査では、25,000 mg/kg 飼料投与群の雄で軽微な小葉中心性肝細胞空胞化がみられたが、これは 12,500 mg/kg 飼料投与群の雌ではみられなかった。

試験実施者は体重に対する影響を考慮し、発がん性試験 (6 の (6) 108 週間慢性毒性・発がん性試験 (マウス、混餌投与)) の投与量を 3,000 及び 6,000 mg/kg 飼料とした。(参照 2、30)

(3) 10 週間亜急性毒性試験 (マウス、混餌) <参考資料¹⁶>

マウス (B6C3F1 系、雌雄各 20 匹/対照群、雌雄各 10 匹/BHT 投与群) に、BHT を混餌投与 (0、2,500、5,000、10,000、20,000 又は 40,000 mg/kg 飼料 (雄/雌: 0/0、410/438、820/875、1,640/1,750、3,480/4,130 又は 6,960/8,260 mg/kg 体重/日相当¹⁷)) する亜急性毒性試験が実施された。

40,000 mg/kg 飼料投与群の雌雄で体重増加抑制 (対照群との比較で 10% 以上) がみられ、同群の病理組織学的検査では、脾臓、心臓及び腎臓の萎縮がみられた。

試験実施者らは BHT の混餌投与における最大耐容量を 20,000 mg/kg 飼料と判断した。(参照 2、24、37)

(4) 6 週間亜急性毒性試験 (ラット①、混餌) <参考資料¹⁸>

ラット (離乳後、雌雄各 3 匹/群) に BHT を 6 週間混餌投与 (ラード 20% 含有飼料に BHT を 0、1,000、2,000、3,000、4,000 又は 5,000 mg/kg 飼料に

¹⁵ 発がん性試験の用量設定試験であることから参考資料とした。

¹⁶ 発がん性試験の用量設定試験であることから参考資料とした。

¹⁷ OECD SIDS (参照 24) による換算。

¹⁸ 基礎飼料にラードが添加されていることから参考資料とした。

より添加) する亜急性毒性試験が実施された。

3,000 mg/kg 飼料以上投与群の雄で有意な成長率抑制がみられた。雌雄とも肝臓重量 (絶対重量及び相対重量) の増加がみられ、肝臓相対重量は 2,000 mg/kg 飼料以上投与群で有意に増加した。また、雄では左副腎相対重量が増加したが組織学的変化はみられなかった。雌では一貫した変化はみられなかった。全ての BHT 投与群で、用量依存性の血清コレステロール濃度の増加がみられた。また、副腎コレステロール濃度の有意な増加がみられた。一方、肝臓中のエステル型肝コレステロールの総濃度又は濃度比、肝脂質濃度、多価不飽和脂肪酸の総濃度には有意な変化はみられなかった。(参照 2)

(5) 6 週間亜急性毒性試験 (ラット②、混餌) <参考資料¹⁹>

ラットに BHT を 6 週間混餌投与 (ラード 20% 含有飼料に BHT を 0、2,000、3,000、4,000 又は 5,000 mg/kg 飼料添加) する亜急性毒性試験が実施された。

BHT 投与群の雄では雌に比べて成長率の有意な抑制がみられるとともに、副腎相対重量の増加がみられた。また、BHT 投与群では肝脂質の増加と並行して肝重量増加もみられた。血清コレステロール値は用量に依存して増加した。(参照 2)

(6) 7 週間亜急性毒性試験 (ラット、混餌) <参考資料²⁰>

ラット (F344 系、雌雄各 5 匹) に BHT を 7 週間混餌投与 (0、6,200、12,500、25,000 又は 50,000 mg/kg 飼料) する亜急性毒性試験が実施された。

試験期間中、50,000 mg/kg 飼料投与群の雌雄全て及び 12,500 mg/kg 飼料投与群の雄 1 匹が死亡した。BHT 投与群では投与 7 週後に用量依存性の体重減少がみられ、25,000 mg/kg 飼料投与群の体重は対照群の 38~48% であった。12,500 mg/kg 飼料投与群の雌雄で軽度の造血亢進がみられた。(参照 2、30)

(7) 10 週間亜急性毒性試験 (ラット、混餌) <参考資料²¹>

ラット (雌雄各 16 匹/群) に BHT を 10 週間混餌投与 (脂肪を 20% 含有する飼料に BHT を 0、300、1,000 又は 3,000 mg/kg 飼料添加) する亜急性毒性試験が実施された。

投与期間中、対照群の雄 1 匹、1,000 mg/kg 飼料投与群の雄 2 匹並びに 3,000 mg/kg 飼料投与群の雄 4 匹及び雌 2 匹が死亡した。3,000 mg/kg 飼料投与群の雄で軽度の体重増加抑制がみられたが、雌ではいずれの群にも BHT 投与の影響はみられなかった。雌雄とも血清コレステロール値に有意な変化はみられなかった。(参照 2)

¹⁹ 基礎飼料にラードが添加されていることから参考資料とした。

²⁰ 発がん性試験の用量設定試験であることから参考資料とした。

²¹ 基礎飼料が脂肪を 20% 含有していることから参考資料とした。

(8) 16 週間亜急性毒性試験（ラット、混餌）＜参考資料²²＞

ラット（離乳後、雌雄各 12 匹/群）に BHT を 16 週間混餌投与（0 又は 1,000 mg/kg 飼料）する亜急性毒性試験が実施された。

成長率、体重、摂餌量、病理組織学的検査では対照群と BHT 投与群との差はみられなかった。一方、組織学的変化を伴わない肝臓相対重量及び副腎重量の増加がみられた。生化学及び組織化学的検査では、肝グルコースリン酸及びグルコースリン酸デヒドロゲナーゼ活性について対照群と BHT 投与群との差はみられなかった。（参照 2）

(9) 4 週間亜急性毒性試験（アカゲザル、経口投与）＜参考資料²³＞

アカゲザル（哺乳期 3 頭/群又は幼若期 2 頭/群若しくは 3 頭/群）に BHT（溶媒：コーンオイル）を 4 週間経口投与（哺乳期：500 mg/kg 体重/日、幼若期：50 又は 500 mg/kg 体重/日）する亜急性毒性試験が実施された。対照群にはコーンオイル投与又は非投与群が設定された。また、並行してブチルヒドロキシアニソール（BHA）投与試験が実施された。

血液及び血液生化学検査（全血球数、血清ナトリウム、血清カリウム、ビリルビンコレステロール及び AST）及び尿検査については毎週実施した。幼若期の投与群では投与開始 2 週後に 24 時間絶食させた上で肝生検を実施した。全動物について、投与期間終了後 24 時間絶食させた上で、剖検し、主要臓器及び組織を採取し、病理組織学的検査（電顕検索を含む。）を実施した。また、肝組織中のタンパク質量、RNA、DNA 及びチトクローム P450 の分析並びに調製ミクロソームのニトロアニソール脱メチル化酵素及びグルコース-6-ホスファターゼ活性の測定が実施された。

投与期間中、全ての群で死亡個体はみられなかった。血液及び血液生化学検査並びに尿検査で異常はみられなかった。病理組織学的検査では、コーンオイルを投与した全ての幼若期の投与群（BHT 投与群及び BHA 投与群並びにコーンオイル投与対照群）において、肝細胞質に軽度又は中等度の脂肪滴の増加がみられた。BHT 及び BHA 投与群では、巨大肝細胞（hepatocytomegaly）及び核小体肥大がみられた。核小体について、電子顕微鏡観察を行った結果、500 mg/kg 体重/日投与群でのみ、肝細胞の 15%に核小体の断片化がみられた。肝組織中のタンパク質量、RNA、DNA 及びチトクローム P450 については影響はみられず、BHT の 500 mg/kg 体重/日投与群ではニトロアニソール脱メチル化酵素活性の増加及びグルコース-6-ホスファターゼ活性の減少を示したが、哺乳期のサルでは影響はみられなかった。

以上の所見から、試験実施者は、BHA 及び BHT 50 mg/kg 体重/日の用量で非ヒト霊長類に 28 日間投与した場合、明らかな有害影響はないと推測するこ

²² BHT 投与群が 1 用量のみのため参考資料とした。

²³ 毒性について判断できる試験でないと考えられたことから、参考資料とした。

とが妥当であり、本用量がヒトが通常消費する量よりはるかに高い用量であることから、ヒトは現在使用されている量よりも高用量の酸化防止剤について有害影響を受けずに耐容できるだろうと考察している。(参照 2、24、31)

6. 慢性毒性及び発がん性試験

(1) 10 か月慢性毒性試験 (マウス、混餌投与)

マウス (C3H 系、6~10 週齢、雌雄各 17~39²⁴匹/群) に BHT を 10 か月間混餌投与 (0、500 又は 5,000 mg/kg 飼料 (0、39、390 mg/kg 体重/日相当²⁵)) する慢性毒性試験が実施された。対照群は 2 群設定され、それぞれ市販飼料又は BHT 非添加の半合成飼料が与えられた。投与期間終了後、肝臓と肺の増殖性病変を肉眼的に観察し、明らかに腫瘍と判定された病変の約 50% 及び増殖性病変と疑われる肝臓について組織学的検査が実施された。

体重については、BHT 投与群は対照群より低値であった。

各群肝腫瘍又は肺腫瘍の発生頻度を表 25 に示した。

雄では BHT 投与群で肝腫瘍 (肝細胞腺腫) の発生が有意に増加したが、雌では増加はみられなかった。肺腫瘍 (肺腺腫) の発生頻度は、対照群と BHT 投与群との間で有意な差はみられなかった。

試験実施者は BHT 投与により、C3H マウスの雄に自然発生性の肝腫瘍の発現が促進されたとしている。

JECFA は、C3H マウスにおける自然発生性の肝腫瘍の発生率は、性別、個体密度、飼料中タンパク質量及び摂取カロリーにより変わることが過去に示されていること、また、C3H マウスの 12 か月試験の背景データによると、肝腫瘍の発生率は雄で 41~68%、雌で 6~13% であったことから、本試験で報告されている肝腫瘍発生率についても、他試験で示されているほぼ同週齢の C3H マウスの対照動物と顕著な差があるものではなかったとしている。(参照 2、24、32、33)

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、本試験に関する情報が限定されていること、データの傾向が明確でないこと及び試験条件が十分でないことを踏まえ、本試験において、マウスへの発がん性については判断が困難であると考えた。

²⁴ 表中の匹数と異なるが、参照 5 の原著論文の記載のとおり。

²⁵ OECD SIDS (参照 24) による換算。

表 25 マウスを用いた 10 か月間慢性毒性試験における肝及び肺の腫瘍発生率

群	肝腫瘍		肺腫瘍	
	雄	雌	雄	雌
市販飼料	7/38 (8)	2/28 (7)	2/38 (5)	4/28 (14)
BHT 非添加半合成飼料	2/37 (5)	0/39 (0)	2/37 (5)	4/39 (10)
BHT 500mg/kg 飼料添加飼料	15/26 ^b (58)	1/29 (3)	5/26 (19)	3/29 (10)
BHT 5,000mg/kg 飼料添加飼料	10/36 ^b (28)	2/46 (4)	5/36 (14)	9/46 (20)

a : 発生例数/検査動物数 (括弧内は発生率 (%))

b : BHT 非添加半合成飼料投与群と有意差あり ($p < 0.05$)

(2) 11 か月間慢性毒性試験 (マウス、1 か月間混餌投与) <参考資料²⁶>

マウス (C3H 系、各群の雌雄・動物数の詳細不明) に、BHT 添加飼料 (0 又は 5,000 mg/kg 飼料 (390 mg/kg 体重/日相当²⁷)) を 1 か月間投与後、市販飼料で 10 か月間飼育する慢性毒性試験が実施された。

BHT 投与群及び BHT 非投与群の雄における肝腫瘍発生頻度は、それぞれ 3/35 匹 (9%) 及び 5/29 匹 (17%)、肺腫瘍発生頻度は 2/35 匹 (6%) 及び 2/29 匹 (7%) であった。(参照 32、24、33)

(3) 10 か月間及び 16 か月間慢性毒性試験 (マウス、混餌投与) <参考資料²⁸>

マウス (BALB/c 系、8 週齢、雄 18 匹/群) に BHT を 10 か月間混餌投与 (7,500 mg/kg 飼料) する慢性毒性試験が実施された。

その結果、亜急性胆管炎を伴う重度の胆管過形成がみられた。

上記結果を踏まえ、次にマウス (BALB/c 系、8 週齢、雄約 50 匹/群) に、BHT を 16 か月間混餌投与 (0 又は 7,500 mg/kg 飼料、2~3 か月ごとに数匹/群で中間検査) する慢性毒性試験が実施された。

その結果、投与 16 か月後においては、いずれの群でも上記 10 か月間混餌投与試験でみられた胆管過形成はみられなかった。

肺腫瘍の発生率については、投与 16 か月後の対照群 (BHT 非添加) で 24% (6/25 匹)、BHT 投与群で 63.6% (7/11 匹) であった。なお、JECFA によると、供試動物数を増やした再試験が実施され、その結果、雌雄とも肺腫瘍発生率への影響はみられなかったとしている。(参照 2、34、35)

²⁶ 本試験は発がん性を指標としているが、BHT 投与期間が 1 か月であり、発がん性について判断できないことから参考資料とした。

²⁷ OECD SIDS (参照 24) による換算

²⁸ 同一の著者らがこれらの試験を実施しているにも関わらず胆管過形成、肺腫瘍発生率のいずれについても再現性がみられず、両試験の見解も一致していないため参考資料とした。

(4) 96 週間慢性毒性・発がん性試験（マウス、混餌投与）

マウス（B6C3F1 系、6 週齢、雌雄各 51 又は 52 匹/群）に BHT を 96 週間混餌投与（0、200、1,000 又は 5,000 mg/kg 飼料。飼料分析値ではそれぞれ 0、200、800 又は 4,000 mg/kg 飼料（0、30、120 又は 600 mg/kg 体重/日相当²⁹）する慢性毒性・発がん性試験が実施された。体重及び摂餌量測定を定期的に実施し、BHT 投与期間終了後、全ての生存動物をさらに基礎飼料で 8 週間飼育した後、剖検した。剖検時に各群 31 匹から血液及び尿を採取し、血液検査（赤血球数、白血球数、血小板数、Hb 及び Ht）、血液生化学検査

（AST、ALT、ALP、TB、T.Chol、TP、Glu、BUN 及び A/G 比）及び尿検査（尿比重及び尿定性（pH、タンパク質量、Glu、ケトン、ビリルビン、潜血及びウロビリノーゲン））が実施され、さらに全剖検例について、脳、肺、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、唾液腺、精巣、卵巣及び下垂体の重量を測定し、各組織について病理組織検査が実施された。

毒性所見を表 26 に示した。

死亡率及び摂餌量について対照群との顕著な差はみられなかった。試験実施者は、絶対臓器重量又は相対臓器重量の変動が散見されたが、用量依存性に乏しく、関連する病理組織学的変化もみられなかったことから、毒性学的意義はないとしている。病理組織学的検査では、腫瘍性病変として、肺腺腫、肝細胞がん及び悪性リンパ腫が比較的高い頻度で発生したが、いずれも対照群と BHT 投与群に有意差はみられなかった。

試験実施者は、本試験において発がん性はみられないとしている。（参照 2、24、36）

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、雌雄でみられた体重増加抑制及び雄でみられた AST の増加を毒性所見と考え、本試験における NOAEL は、雄で 800 mg/kg 飼料（120 mg/kg 体重/日）、雌で 200 mg/kg 飼料（30 mg/kg 体重/日）と判断した。また、本試験では、発がん性は認められないと判断した。

表 26 マウスを用いた 96 週間慢性毒性・発がん性試験における毒性所見

投与量 (mg/kg 飼料)	雄	雌
4,000	体重増加抑制 AST の有意増加	体重増加抑制
800 以上	所見なし(800 以下)	
200		所見なし

(5) 100 週間慢性毒性・発がん性試験（マウス、混餌投与）

マウス（CFI 系、雌雄各 24 匹/群）に BHT を混餌投与（0 mg/kg 飼料、

²⁹ JECFA の換算式を用いて食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会にて算出。

1,000 mg/kg 飼料（100 mg/kg 体重/日³⁰）、1,000 mg/kg 飼料を 4 週間投与後 2,500 mg/kg 飼料（250 mg/kg 体重/日）に変更又は 1,000 mg/kg 飼料を 8 週間投与後 5,000 mg/kg 飼料（500 mg/kg 体重/日）に変更する慢性毒性・発がん性試験が実施された。対照群には基礎飼料を投与した。いずれの投与群も 100 週齢に達するまで投与を継続した。

BHT 投与群に生存率の有意な低下はみられなかった。試験期間中に死亡した又は安楽死処置された動物では、小葉中心性の巨大肝細胞（greater centrilobular cytomegaly）及び巨大核がみられた。胆管過形成は試験動物 141 匹中 3 匹にみられた。悪性腫瘍の発生率については、対照群と 5,000 mg/kg 飼料投与群に有意差はみられなかった。

肺腫瘍発生率を表 27 に示した。

BHT 投与群では肺腫瘍の発生率が増加したが、対照群と BHT 投与群の肺腫瘍を区別する組織形態学的特徴はみられなかった。また、BHT 投与群の雌で良性卵巣腫瘍がみられたが、対照群での発生はみられなかった。

OECD の SIDS（Screening Information Data Set）では、本試験の結果について、肺腫瘍発生率の背景値が高いことから、BHT が発がん物質として関与しているかを明らかにすることは困難であったと試験実施者がコメントしたと記載している。

EFSA は、本試験における肺腫瘍発生率について BMD の試算を実施し、BMDL₁₀ を 38 mg/kg 体重/日と算出している。しかしながら、同一著者のより検体数の多い試験においてこれらの所見が確認されていないことを付記しており、ADI 設定においても直接的な参照をしていない。（参照 2、3、24）

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、肺腫瘍発生率の背景値が高いことから、本試験において、BHT のマウスへの発がん性については判断できなかった。

表 27 マウスを用いた 100 週間慢性毒性・発がん性試験における肺腫瘍発生率

投与量（mg/kg 飼料）		動物数	肺腫瘍発生率（%）
BHT 濃度 （mg/kg 飼料）	BHT 摂取量 ^a （mg/kg 体重/日相当）		
0	0	48	47
1,000	100	48	53
2,500 ^a	250	48	74
5,000 ^b	500	48	75

a：1,000 mg/kg 飼料を 4 週間投与後、2,500 mg/kg 飼料に変更

b：1,000 mg/kg 飼料を 8 週間投与後、5,000 mg/kg 飼料に変更

（6）108 週間慢性毒性・発がん性試験（マウス、混餌投与）

マウス（B6C3F1 系、雌雄各 50 匹/投与群、雌雄各 20 匹/対照群）に、BHT を 107～108 週間混餌投与（0、3,000 又は 6,000 mg/kg 飼料（0、450、又は

³⁰ EFSA（参照 24）の換算値を用いた。

900 mg/kg 体重/日相当³¹⁾) する慢性毒性・発がん性試験が実施された。

試験期間中、一般状態観察（1 日 2 回）、腫瘤の触診（月 1 回）及び体重測定（少なくとも月 1 回）が実施され、投与終了時に生存していた動物及び試験期間中に死亡した動物（可能な限り）について、剖検並びに主要臓器及び組織の病理組織学的検査が実施された。

病理組織学的検査結果を表 28 に示した。

BHT 投与群の雌雄に用量依存性の体重増加抑制がみられた。投与期間終了時の生存率は、対照群の雄で 60%、雌で 85%、3,000 mg/kg 飼料投与群の雄で 86%、雌で 82%及び 6,000 mg/kg 飼料投与群の雄で 92%、雌で 90%であり、雄では死亡率の有意な減少がみられた。

試験実施者は、雄の肝臓における非腫瘍性傷害性所見の増加は BHT 投与に関連したものである可能性があると考えしている。一方、雌の肺における肺胞/細気管支腺腫又はがんの発生頻度は 3,000 mg/kg 飼料投与群では有意に増加したが、6,000 mg/kg 飼料投与群では有意差がなく、用量依存性がみられなかったことから、BHT 投与との関連性は明らかでないとして、マウスに対する発がん性はないとしている。（参照 2、30）

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、雌の肺胞/細気管支腺腫又はがんの発生頻度については、3,000 mg/kg 飼料投与群では、対照群ではみられなかったがんの発生が認められたこと及び肺胞/細気管支腺腫又はがんの発生頻度が、当該試験施設の背景値 21/440 例（4.7%）を超えているが、用量依存性は認められず、6,000 mg/kg 飼料の高用量投与群では有意差が認められないことから、本試験の雌マウスにおける BHT の肺発がん性については判断できないと考えた。また、3,000 mg/kg 飼料以上投与群の雄では、肝臓の傷害性所見の増加が認められたことから、本試験の LOAEL を 3,000 mg/kg 飼料（450 mg/kg 体重/日）と判断した。

³¹ OECD SIDS（参照 24）による換算。JECFA の変換式による値と一致する。

表 28 マウスを用いた慢性毒性・発がん性試験における腫瘍性及び非腫瘍性病変発生率^a

性別		雄			雌		
投与量 (mg/kg 飼料)		0	3,000	6,000	0	3,000	6,000
肝臓	検査動物数	20	48	49	20	46	49
	腫瘍性病変						
	肝細胞腺腫	2 (10)	11 (23)	7 (14)	0 (0)	3 (7)	2 (4)
	肝細胞がん	9 (45)	12 (25)	6 (12) ^c	1 (5)	1 (2)	3 (6)
	肝細胞腺腫又はがん	11 (55)	23 (48)	13 (27) ^b	1 (5)	4 (9)	5 (10)
	非腫瘍性病変						
	肥大肝細胞巣	0 (0)	9 (19)	20 (41)	0 (0)	1 (2)	1 (2)
	ペリオオシス	0 (0)	34 (71)	43 (88)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	肝細胞変性・壊死	2 (10)	34 (71)	45 (92)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	肝細胞空胞化	3 (15)	29 (42)	22 (45)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
肺	検査動物数	20	50	49	20	46	50
	腫瘍性病変						
	肺泡/細気管支腺腫	5 (25)	12 (24)	7 (14)	1 (5)	4 (9)	4 (8)
	肺泡/細気管支がん	2 (10)	9 (18)	10 (20)	0 (0)	12 (26)	3 (6)
	肺泡/細気管支腺腫 又はがん	7 (35)	21 (42)	17 (49)	1 (5)	16 (35) ^c	7 (14)

a : 発生例数 (括弧内は発生率 (%))

b : 対照群と有意差あり (p<0.05、Fischer exact test)

c : 対照群と有意差あり (p<0.01、Fischer exact test)

(7) 120 週間発がん性試験 (マウス、混餌投与)

マウス (B6C3F1 系、8 週齢、雌雄各 50 匹) に BHT を 104 週間混餌投与 (0、10,000、又は 20,000 mg/kg 飼料 (雄/雌 : 0/0、1,640/1,750、3,480/4,130 mg/kg 体重/日相当)) する発がん性試験が実施された。剖検・病理組織学的検査は、BHT 投与期間終了後、基礎飼料で 16 週間継続飼育した後、実施された。

肝腫瘍の発生頻度を表 29 に示した。

摂餌量について対照群と BHT 投与群との顕著な差はみられなかった。BHT 投与群の雌雄で平均体重の低値がみられ、体重増加抑制は雌でより顕著であった。生存率は BHT 投与群で高く、対照群の雄で 40%、雌で 58%、10,000 mg/kg 飼料投与群の雄で 64%、雌で 81%及び 20,000 mg/kg 飼料投与群の雄で 74%、雌で 89%であった。

BHT 投与群の雄で、用量依存性を伴った肝細胞腺腫又は変異肝細胞巣の発生率の有意な増加がみられた。一方、リンパ腫及びリンパ性白血病の発生率は、雌雄ともに用量に依存して低下した。(参照 2、24、37)

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、BHT 投与群の雄で、肝細胞腺

腫の発生頻度が用量依存性を伴って増加し、20,000 mg/kg 飼料投与群では有意差が認められたことから、本試験において雄マウスの肝臓に対し発がん性が認められると判断した。

表 29 マウスを用いた 120 週間発がん性試験における肝臓の変異肝細胞巢数^a及び腫瘍性所見発生頻度^b

投与量 (mg/kg 飼料)	雄			雌		
	0	10,000	20,000	0	10,000	20,000
検査動物数 ^c	32	42	47	41	44	40
変異肝細胞巢	1 (0.03)	25 (0.60) ^d	42 (0.89) ^d	0 (0)	1 (0.02)	1 (0.03)
肝細胞腺腫	6 (19)	16 (38)	25 (53) ^d	5 (12)	7 (16)	2 (5)
肝細胞がん	7 (22)	11 (26)	8 (17)	2 (5)	1 (2)	0 (0)

a：総発生個数（括弧内は個数/匹）

b：発生例数（括弧内は発生率（%））

c：生存期間が投与開始後 62 週を超えた個体

d：対照群と有意差あり（ $p < 0.01$ 、カイ二乗試験）

（8）76 週間慢性毒性・発がん性試験（ラット、混餌投与）

ラット（F344 系、雄、21 匹（BHT 投与群）、36 匹（対照群））に BHT を 76 週間混餌投与（0、100、300、1,000、3,000 又は 6,000 mg/kg 飼料（0、7.5、23、75、225 又は 450 mg/kg 体重/日相当³²））する慢性毒性・発がん性試験が実施された。投与 12、36 及び 48 週時点で各群 4 匹を、投与 76 週時に全ての生存ラットについて剖検し、病理組織学的検査が実施された。貯蔵鉄欠乏変異肝細胞巢の検討のため、各剖検時の 2 週間前から鉄が負荷（鉄 12.5 mg/kg 体重を 3 回/週、皮下投与）された。

毒性所見を表 30 に示した。

投与期間中に死亡はみられなかった。貯蔵鉄欠乏変異肝細胞巢は、投与 48 週及び 76 週で軽度な増加傾向がみられた。肝細胞腺腫は全群でみられたが、発生率に用量依存性はみられなかった。肝細胞がんの発生はみられなかった。

（参照 2、24、38）

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、本試験においては BHT について発がん性はみられないとし、体重の減少に基づき、NOAEL は 1,000 mg/kg 飼料（75 mg/kg 体重/日）であると判断した。

³² OECD SIDS（参照 24）による換算。

表 30 ラットを用いた 76 週間慢性毒性・発がん性試験における毒性所見

投与量 (mg/kg 飼料)	毒性所見
6,000	肝臓重量の増加
3,000 以上	体重減少
1,000 以下	所見なし

(9) 24 か月慢性毒性・発がん性試験（ラット、混餌投与）

ラット（SD 系、4 週齢、雌雄各 40 匹/群）に BHT を 24 か月間混餌投与（0、50、620 又は 3,200 mg/kg 飼料（雄/雌：0/0、2.14/2.49、9.61/10.26 又は 144.8/170.9 mg/kg 体重/日相当））する慢性毒性・発がん性試験が実施された。各群は投与開始後 3、6 及び 12 か月にそれぞれ 5 匹を、24 か月に 10 匹を検査に供し、残り 15 匹は終生投与を継続した。各中間検査及び最終剖検例について血液及び血液生化学検査、尿検査、臓器重量測定及び病理組織学的検査が実施された。

死亡率、平均寿命、体重及び摂餌量に BHT 投与による影響はみられなかった。3,200 mg/kg 飼料投与群の雌雄で、投与後 3 か月において血清カリウム値の増加が、50 mg/kg 飼料投与群の雌で、投与後 12 か月において血清コレステロール値の増加がみられた。また、3,200 mg/kg 飼料投与群の雌雄で、投与後 6 か月及び 12 か月において肝重量の増加又は増加傾向がみられ、肝細胞の軽度腫脹並びに細胞質での好塩基性物質の凝集が、投与後 3 か月及び 6 か月において尿細管上皮の空胞化が散見されたが、これらの組織変化は投与後 24 か月及び終生投与動物にはみられなかった。また、BHT 投与に起因すると考えられる腫瘍の発生もみられなかった。

試験実施者は、肝臓及び腎臓の組織所見は適応性変化と考え、本試験における NOAEL を 3,200 mg/kg 飼料としている。また、発がん性はみられないとしている。（参照 2、27）

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、血液生化学検査における血清カリウム及び血清コレステロール値の変動は一過性であり、投与後 3 か月から 12 か月に散見された肝臓及び腎臓の組織学的変化も投与後 24 か月以降には認められなかったことから、これらの所見は毒性学的意義に乏しく、その他 BHT 投与に起因すると考えられる組織学的異常は認められていないことより、本試験における NOAEL は最高投与量である 3,200 mg/kg 飼料（雄/雌：144.8/170.9 mg/kg 体重/日相当）と判断した。また、本試験においてラットに対して発がん性は認められないと判断した。

(10) 104 週間慢性毒性・発がん性試験（ラット、混餌投与）

ラット（Wistar 系、7 週齢、雌雄各 57 匹/群、雌雄各 36 匹/対照群）に BHT を 104 週間混餌投与（0、2,500 又は 10,000 mg/kg 飼料（0、150、600

mg/kg 体重/日³³⁾) する慢性毒性・発がん性試験が実施された。

体重及び摂餌量は定期的に測定し、投与期間終了後、血液を採取し、血液検査（赤血球数、白血球数、Hb 並びに Ht）及び血液生化学検査（AST、ALT、 γ -GTP、ALP、ChE、TP、T.Chol、TG、BUN、Cre、UA、TB、A/G 比、 β -LP、Na、Cl 及び IP）が実施された。剖検後、主要臓器（肝臓、脾臓及び腎臓）の重量を測定し、主要臓器及び臓器について病理組織学的検査が実施された。

毒性所見を表 31 に示した。

BHT 投与群の雌で肝臓結節性過形成及び脾臓がん並びに雌雄で下垂体腺腫及び腺がんの発生率が増加したが対照群との有意差はみられなかった。

試験実施者は、本試験において発がん性はみられなかったとしている。（参照 2、24、39）

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 BHT 投与に起因すると考えられる腫瘍発生率の増加はみられなかったことから、本試験においてはラットに対して発がん性は認められないと判断した。また、本試験の LOAEL は、雄でみられた TG の低下、 γ -GTP 増加及び肝臓重量の増加並びに雌でみられた T.Chol 増加、肝臓重量の増加及び脾臓重量の低下に基づき、最小投与量である 2,500 mg/kg 飼料であると判断した。

表 31 ラットを用いた 104 週間慢性毒性・発がん性試験における毒性所見

投与量 (mg/kg 飼料)	雄	雌
10,000	死亡率増加（96 週以降）、体重増加抑制（60 週まで）	体重増加抑制（全期間）
2,500 以上	TG 低下、 γ -GTP 増加 肝臓重量の増加	T.Chol 増加 肝臓重量の増加 脾臓重量の低下

（1 1）105 週間慢性毒性・発がん性試験（ラット、混餌投与）

ラット（F344 系、雌雄各 50 匹/投与群、雌雄各 20 匹/対照群）に、BHT を 105 週間混餌投与（0、3,000 及び 6,000 mg/kg 飼料（0、225 及び 450 mg/kg 体重/日相当³⁴⁾）する慢性毒性・発がん性試験が実施された。

試験期間中、一般状態観察（1 日 2 回）、腫瘍の触診（月 1 回）及び体重測定（少なくとも月 1 回）が実施され、投与終了時に生存していた動物及び試験期間中に死亡した動物（可能な限り）について、剖検並びに主要臓器及び組織の病理組織学的検査が実施された。

肺胞組織球症及び下垂体腺腫発生頻度を表 32 に示した。

投与群と対照群との間で死亡率に有意な差はみられなかった。BHT 投与群

³³ JECFA の換算式を用いて食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会にて算出

³⁴ OECD SIDS（参照 24）による換算。

の雌雄で用量依存性の体重増加抑制がみられた。病理組織学的検査では、非腫瘍性病変として、肺胞組織球症が対照群を含む全ての群で観察されたが、その発生頻度は特に 6,000 mg/kg 飼料投与群の雌で高かった。腫瘍性病変として、BHT 投与群の雌で下垂体腫瘍発生頻度の低下がみられたが、その他の腫瘍性病変の発生頻度については対照群と BHT 投与群で有意な差はみられなかった。

試験実施者は、雌に認められた肺胞組織球症の発生頻度の増加は、BHT 投与に関連したものである可能性があると考えしている。また、本試験において発がん性は認められないとしている。(参照 2、24、30)

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、肺胞組織球症の発生頻度の増加が 6,000 mg/kg 飼料投与群の雌で認められたことから、本試験における NOAEL を 3,000 mg/kg 飼料 (225 mg/kg 体重/日) と判断した。また、本試験においてラットに対して発がん性は認められないと判断した。

表 32 ラットを用いた 105 週間慢性毒性・発がん性試験における肺胞組織球症及び下垂体腫瘍発生頻度^a

投与量 (mg/kg 飼料)	雄			雌		
	0	3,000	6,000	0	3,000	6,000
肺胞組織球症 (限局性)	1/20 (5)	4/49 (8)	7/49 (14)	2/18 (11)	12/48 (25)	21/49 (43)
下垂体腫瘍 ^b	7/19 (37)	9/47 (19)	9/47 (19)	8/18 (44)	9/48 (19) ^c	5/49 (10) ^d

a：発生例数/検査動物数（括弧内は発生率%）

b：雄は腺腫又はがん、雌は腺腫

c：対照群と有意差あり（ $p < 0.05$ ）

d：対照群と有意差あり（ $p < 0.01$ ）

（12）110 週間慢性毒性・発がん性試験（ラット、混餌投与）

ラット（F344 系、雄、27 匹/群）に BHT を 110 週間混餌投与（0 又は 12,000 mg/kg 飼料（0 又は 900 mg/kg 体重/日相当³⁵））する慢性毒性・発がん性試験が実施された。投与期間終了後、生存している全てのラットについて剖検の上、病理組織学的検査が実施された。

毒性所見を表 33 に示した。

生存率は投与 80 週以降、対照群及び BHT 投与群とも低下し、両群の差はみられなかった。BHT 投与群で変異肝細胞巣の発生頻度及び大きさは軽度低下し、肝細胞腺腫の発生頻度の低下がみられた。また、主要臓器において肉眼で確認された腫瘍の発生頻度に用量依存性はみられなかった。(参照 2、24、38)

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、本試験においてはラットに対して発がん性は認められないと判断した。

³⁵ OECD SIDS（参照 24）による換算。

表 33 ラットを用いた 110 週間慢性毒性・発がん性試験における毒性所見

投与量 (mg/kg 飼料)	毒性所見
12,000	体重増加抑制、肝臓重量減少

(13) 繁殖毒性試験及び F1 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験①（ラット、混餌投与）

母動物への BHT 投与による出生前ばく露後 144 週齢まで反復投与を行う慢性毒性・発がん性試験が、「7（4）繁殖毒性試験（ラット、混餌投与）」と同一の試験として実施されている。本試験については、この繁殖毒性試験と総合的に評価する必要があるため、「8（1）繁殖毒性試験及び F1 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験（ラット、混餌投与）①」に記載する。

(14) 繁殖毒性試験及び F1 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験②（ラット、混餌投与）

母動物への BHT 投与による出生前ばく露後 22 か月齢まで反復投与を行う慢性毒性・発がん性試験が、「7 の（4）繁殖毒性試験（ラット、混餌投与）」と同一の試験として実施されている。本試験については、この繁殖毒性試験と総合的に評価する必要があるため、「8 の（2）繁殖毒性試験及び F1 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験（ラット、混餌投与）②」に記載する。

7. 生殖発生毒性試験

(1) 3 世代繁殖毒性試験（マウス、混餌投与）

マウス（Crj:CD-1 系、P 世代：5 週齢、雌雄各 10 匹/群）に BHT を混餌投与（0、150、450、1,350 又は 4,050 mg/kg 飼料（0、22.5、67.5、202.5 又は 607.5 mg/kg 体重/日相当））する 3 世代繁殖毒性試験が実施された。P 世代の雌雄には 5 週齢から投与を開始し、9 週齢時に交配して自然分娩させ F₁ 世代を得た。F₁ 児動物（F₁ 世代：雌雄各 10 匹/群）は、生後 4 週で離乳し、9 週齢時に交配、分娩させ、F₂ 世代を得た。F₂ 児動物（F₂ 世代：雌雄各 10 匹/群）も同様に交配、分娩させ、得られた F₃ 児動物は 21 日齢まで飼育した。

F₁ 及び F₂ 世代では、生後 0 日に同腹児数、同腹児体重及び性比を調べた。その後、哺育児体重のほか、生後 3 週までの間に、初期行動発達（正向反射、背置走性、断崖落下）及び神経行動学的パラメータ（嗅覚方向反応、強制水泳試験、オープンフィールド試験）が測定された。

毒性所見を表 34 に示した。

P 世代では、哺育 2 週に、150 及び 450 mg/kg 飼料投与群で、各 1 匹が死亡した。

F₁ 及び F₂ 世代では、同腹児数、同腹児体重及び性比への影響はみられなかった。F₂ 児動物では体重に差はみられなかった。F₂ 世代の雄では、オープン

フィールド試験での 180 度転回スコアが低値であったが、雌では影響はみられなかった。

試験実施者は、本試験において繁殖性及び児動物に対して有害な影響はみられないとしている。

EFSA は、各群の動物数が少ないことをコメントした上で、本試験における NOAEL を F₁ 世代の哺育期にみられた体重増加抑制の所見に基づき、1,350 mg/kg 飼料と判断している。（参照 2、3、24、40）

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、F₁ 世代の哺育期にみられた体重増加抑制の所見に基づき、本試験の NOAEL を 1,350 mg/kg 飼料（202.5 mg/kg 体重/日）と判断した。

表 34 マウスを用いた 3 世代繁殖毒性試験における毒性所見

投与量 (mg/kg 飼料)	毒性所見
4,050	F ₁ 児動物体重増加抑制（哺育期腹平均体重、生後 7、14、21 日）
1,350 以下	所見なし

（2）繁殖毒性試験（マウス、混餌投与）＜参考資料＞³⁶

マウス（非近交系アルビノマウス、動物数不明）に 10 又は 20%ラード含有飼料に BHT を添加（0、1,000 又は 5,000 mg/kg 飼料（0、150 又は 750 mg/kg 体重/日相当））し、出産前 64～92 日間混餌投与する繁殖毒性試験が実施された。

1,000mg/kg 飼料投与群に影響はみられなかった。5,000mg/kg 飼料投与群では、出産までの日数延長並びに生後 12 日の生存児数の減少及び児体重（児平均体重及び同腹児平均体重）の低値がみられた。

EFSA は、本試験の NOAEL を 1,000 mg/kg 飼料（150 mg/kg 体重/日相当）と判断している。（参照 3）

（3）発生毒性試験（マウス、経口投与）

妊娠マウス（ICR 系、7 日間投与：26～30 匹/群、単回投与：19～20 匹）に BHT を経口投与（妊娠 7～13 日連続投与：0、70、240 又は 800 mg/kg 体重/日、妊娠 9 日単回投与：0、1,200 又は 1,800 mg/kg 体重/日相当）し、妊娠 18 日に帝王切開する発生毒性試験が実施された。対照群は溶媒対照群（オリーブ油）及び無処置群が設定された。

毒性所見を表 35 及び表 36 に示した。

7 日間投与では、帝王切開所見で妊娠黄体数、着床数、生存胎児数、胚・胎児死亡数（早期、後期）、性比及び胎児重量に BHT 投与の影響はみられなかった。また、胎児の外表、骨格及び内臓検査において、形態異常及び変異の発

³⁶ 基礎飼料にラードが添加されていること及び試験内容に不明な点が多いことから参考資料とした。

現並びに化骨進行度に BHT 投与の影響はみられなかった。

単回投与では、母動物において、1,200 mg/kg 体重/日投与群で 2/20、1,800 mg/kg 体重/日投与群で 5/20 が死亡したが、生存動物の剖検では異常はみられなかった。帝王切開所見では、妊娠黄体数、着床数、生存胎児数、胚・胎児死亡数（早期、後期）、性比及び胎児重量に BHT 投与の影響はみられなかった。また、胎児の外表、骨格及び内臓検査において、1,200 mg/kg 体重/日以上投与群で、腰椎後椎骨の化骨数の僅かな減少がみられたが、形態異常及び変異の発現に BHT 投与の影響はみられなかった。

試験実施者は、BHT はマウスに対して催奇形性を示さないとしている。（参照 27）

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、本試験における連続投与による母動物及び胎児の NOAEL を脾臓重量の増加及び腎臓相対重量の増加に基づき、240 mg/kg 体重/日と判断した。また、催奇形性は認められないと判断した。

表 35 マウスを用いた 7 日間投与発生毒性試験における毒性所見

投与量 (mg/kg 体重/日)	母動物	胎児
800	脾臓重量増加、腎臓重量減少	毒性所見なし
240 以下	毒性所見なし	

表 36 マウスを用いた単回投与（妊娠 9 日）発生毒性試験における毒性所見

投与量 (mg/kg 体重/日)	母動物	胎児
1,800	脾臓重量増加	毒性所見なし
1,200	体重増加抑制、肺重量増加	毒性所見なし

（４）繁殖毒性試験（ラット、混餌投与）

繁殖毒性試験が、「6 の（１３）繁殖毒性試験及び F1 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験①（ラット、混餌投与）」と同一の試験として実施されている。本試験については、「（１）繁殖毒性試験及び F1 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験（ラット、混餌投与）①」に記載する。

（５）繁殖毒性試験（ラット、混餌投与）①

繁殖毒性試験が、「6（１４）繁殖毒性試験及び F1 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験②（ラット、混餌投与）」と同一の試験として実施されている。本試験については、この慢性毒性・発がん性試験と総合的に評価する必要があるため、「8（２）① 用量設定試験」に記載する。

(6) 繁殖毒性試験（ラット、混餌投与）②

繁殖毒性試験が、「6（14）繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験②（ラット、混餌投与）」と同一の試験として実施されている。本試験については、この慢性毒性・発がん性試験と総合的に評価する必要があるため、「8（2）② 繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験（本試験）」に記載する。

(7) 発生毒性試験（ウサギ）＜参考資料³⁷＞

妊娠ウサギ（ダッチベルテッド、雌 12～18 匹/群）に BHT を妊娠 6 日から 18 日まで経口投与（0、3.20、14.9、69.1 又は 320 mg/kg 体重/日）する発生毒性試験が実施された。妊娠 29 日に帝王切開を行った。

0 mg/kg 体重/日投与群で 1 匹、14.9 mg/kg 体重/日投与群で 3 匹、69.1 mg/kg 体重/日投与群で 4 匹及び 320 mg/kg 体重/日投与群で 3 匹がそれぞれ妊娠 29 日以前に死亡又は流産となった。BHT 投与群で吸収胎児数が増加したが、生存胎児の外表、内臓及び骨格検査では異常発現に对照群との差はみられなかった。

試験実施者は、BHT に催奇形性はみられないとしている。（参照 14）

(8) 発生毒性試験（アカゲザル、混餌投与）＜参考資料³⁸＞

アカゲザル（雌、6 頭/群）を、BHT 及び BHA の混合物含有飼料（BHT：50 mg/kg 体重/日相当、BHA：50 mg/kg 体重/日相当）又は BHT 及び BHA を含有しない飼料で 1 年間飼育後、雄と交配させ、その後さらに妊娠期間 165 日を含む 1 年間、同じ飼料で飼育する試験が実施された。母動物には、定期的な体重測定、血液及び血液生化学検査並びに月経周期の記録が実施され、児動物には生後 1、5、15、30 及び 60 日に血液学的検査が実施された。对照群は 6 頭、BHT/BHA 投与群は 5 頭出産し、児動物の観察は 2 歳まで継続し、生後 3 か月時には对照群及び BHT/BHA 投与群の児動物からそれぞれ 2 頭が母動物から隔離され、1 か月間のホームケージ内での心理学的（psychological）観察が実施された。

試験期間中、母動物及び児動物に臨床的異常はみられなかった。对照群及び BHT/BHA 投与群とも、児動物は健康であり、生後 3 か月時の心理学的観察においても異常な行動所見はみられなかった。（参照 2、41）

8. 繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験

(1) 繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験（ラット、混餌投与）①

本試験では繁殖毒性試験を実施するとともに、本試験の F₁ 世代を用いて慢

³⁷ 子宮内状況のデータが不明であることから参考資料とした。

³⁸ BHT と BHA の混合物が投与されていることから参考資料とした。

性毒性・発がん性試験が実施された併合試験である。

ラット（Wistar 系、P 世代：雌雄各 40～60 匹/群）に、BHT を 13 週間混餌投与（0、25、100 又は 500 mg/kg 体重/日相当）後、各群の雌雄を交配させた。雌動物には、分娩後、離乳時まで投与を継続した。引き続き F₁ 世代（雌雄各 80～100 匹/群）に、BHT を離乳から 141～144 週齢まで混餌投与（0、25、100 又は 250 mg/kg 体重/日相当）する試験が実施された。なお、500 mg/kg 投与群では P 世代の雌に腎毒性がみられたため、F₁ 世代では 250 mg/kg に投与量が下げられている。

F₁ 世代が離乳するまでにみられた毒性所見を表 37 に、離乳後の 5 週齢以降にみられた毒性所見を表 38 及び表 39 に示した。

妊娠率に影響はみられなかった。

F₁ 世代において、一般症状及び血液検査（対照群及び 250 mg/kg 体重/日投与群のみ。生後 9、19、43 及び 108 週に実施）で BHT 投与の影響はみられなかった。

非発がん性の毒性として、JECFA 及び EFSA は、生後 0 日の同腹児数の減少、哺育期間中の児動物の体重増加抑制等から、本試験における NOAEL を 25 mg/kg 体重/日としている。

発がん性については、JECFA は、対照群と比較して BHT 投与群では、生存率が高く、BHT 投与群でみられた肝腫瘍の多くは通常の発がん性試験のばく露期間を超えた投与 141～144 週後の剖検時に発見されたものであったことから、BHT の発がん性を評価することは困難であるとしている。

EFSA は、F₁ 動物を用いた慢性毒性・発がん性試験における肝腫瘍発現には閾値があるものとみなし、BMD 分析により、雄における肝細胞がんの発生率に関する BMDL₁₀ を 247 mg/kg 体重/日と推定している。（参照 2、3、24、42）

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、25 mg/kg 体重/日でみられた離乳時の体重低値については軽度であり、離乳後には体重推移に影響がみられないことから毒性所見とはせず、本試験における親動物及び児動物の NOAEL を体重増加抑制等に基づき 25 mg/kg 体重/日と判断した。

発がん性については、JECFA と同様の見解から、本試験において評価することは困難であると考えた。

表 37 離乳時までの母動物及び児動物の毒性所見^a

投与量 (mg/kg 体重/日)	母動物	児動物
500	体重増加抑制、腎毒性	同腹児数減少
100 以上	毒性所見なし	体重増加抑制
25		毒性所見なし

a：原著論文に基づく。

表 38 F₁ 世代の 5 週齢以降にみられた主な所見^a

投与量 (mg/kg 体重/日)	雄	雌
250 ^a	・遊離コレステロール増加 (9 週齢時) ・トリグリセライド減少 (19 及び 43 週齢時)	・体重低値 ・遊離コレステロール増加 (9、19 及び 43 週齢時) ・総コレステロール増加 (9 及び 19 週齢時) ・リン脂質増加 (19 及び 108 週齢時) ・トリグリセライド減少 (43 及び 108 週齢時)
100 以上	・体重増加抑制	・所見なし(100 以下)
25 以下	・所見なし	

a：血液生化学検査は、対照群及び 250 mg/kg 体重/日投与群（雌雄各 20 匹）に実施

表 39 繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験（ラット、混餌投与）の肝臓における増殖性及び非増殖性病変発生頻度^a

性別	雄				雌			
投与量 (mg/kg 体重/日)	0	25	100	250	0	25	100	250
検査動物数	100	80	80	99	100	79	80	99
増殖性病変								
結節性過形成	2	0	2	2	2	0	4	5
腺腫	1	1	5	18 ^b	2	3	6	12 ^d
がん	1	0	1	8 ^c	0	0	0	2
非増殖性病変 ^e								
限局性肝細胞肥大	6	7	14	8	1	7	11	16
胆管増生	1	2	5	12	5	5	2	4
嚢胞	1	1	6	17	7	2	1	9

a：発生例数

b：対照群と有意差あり（ $p<0.001$ ）、かつ傾向検定で有意差あり（ $p<0.001$ ）

c：対照群と有意差あり（ $p<0.05$ ）、かつ傾向検定で有意差あり（ $p<0.01$ ）

d：傾向検定で有意差あり（ $p<0.05$ ）

e：非増殖性病変について、統計学的評価は行われていない

（２）繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験（ラット、混餌投与）②

本試験は繁殖毒性試験を実施するとともに、本試験の F₁ 世代を用いて慢性毒性・発がん性試験が実施された併合試験である。なお、本試験は「８の（１）繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験（ラット、混餌投与）①」同様の手法を採用することにより実施されている。

① 用量設定試験

ラット（Wistar 系、P 世代：28 匹/群、雌 16 匹/群）に BHT を 5 週間混餌投与（0、500、750 又は 1,000 mg/kg 体重/日相当）後、各群の雌雄を交配させた。雌動物には、妊娠・分娩後、離乳時まで投与を継続した。

母動物は離乳時に剖検し、全例から肝臓、腎臓、副腎、甲状腺、脾臓、膵臓及び肺が採取された。児動物は離乳時（生後 21 日）に各腹 1 匹から肝臓、腎臓及び副腎を採取して病理組織学的検査に供し、各群 14 匹は離乳から基礎飼料で 4 週間飼育が継続された。

主な毒性所見を表 40 に示した。

交尾率に影響はみられなかった。

母動物では交配前の体重及び摂餌量に影響はみられなかった。

児動物では、同腹児数に群間で顕著な差はみられなかった。発生異常はみられなかった。離乳 4 週後の剖検例では肝臓相対重量は対照群と顕著な差はみられず、病理組織学的異常もみられなかった。

試験実施者は、500 mg/kg 体重/日以上からみられた児動物の体重増加抑制は母乳の質的又は量的な低下によるものと考察している。（参照 2、24、43）

表 40 ラット繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験における毒性所見（離乳時まで）（用量設定試験）

投与量 (mg/kg 体重/日)	母動物	児動物
750 以上	体重増加抑制（妊娠最終週以降） 摂餌量増加抑制（妊娠～哺育期） 小葉中心性肝細胞肥大 （典型的なすりガラス様変化（電顕により sER の増加）を伴う）、肝細胞空胞化、小葉中心性のグリコーゲン減少及び類洞拡張、並びに胆管増生（門脈領域に炎症・線維化なし）	
500 以上	肝臓重量増加	体重増加抑制（生後 2 週以降）、肝臓重量減少、肝臓グリコーゲン消失、副腎束状帯の脂肪滴増加

② 繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験（本試験）

上記①の用量設定試験に基づき、繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験（本試験）が実施された。

ラット（Wistar 系、P 世代：雄（13 週齢）7 匹/群及び雌（9 週齢）50 匹/

群)にBHTを3週間混餌投与(0、25、100又は500 mg/kg 体重/日相当)後、各群(雄:6匹/群、雌:48匹/群)の雌雄を2週間交配させた。各群5匹の母動物は妊娠19又は20日に帝王切開を行い、胎児体重測定及び胎児観察を行い、病理組織学的検査が実施された。また、各群5匹の母動物は、分娩させ離乳時(生後3週)まで投与を継続し、児動物とともに離乳時に剖検した。

F₁世代の群分けについては、生後4~6日に各母動物の出生児を8匹かつ雄の数が最大となるようにした。各群5匹の母動物は離乳時に各母動物当たり最低4匹の児動物とともに剖検し、各検査に供された。

残りのF₁世代(雄37~52匹/群)にBHTを離乳後から22か月間混餌投与(0、25、100又は250 mg/kg 体重/日相当)した。なお、離乳後1、6、11及び16か月時に5~13匹/群について中間検査を実施した。

P及びF₁世代でみられた繁殖毒性所見を表41に示した。

母動物では、体重推移、摂餌量及び交尾率に影響はみられなかった。離乳時剖検の500 mg/kg 体重/日投与群では、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)及びペントキシレゾルフィン-O-デペンチラーゼ(PROD)活性の有意な増加がみられ、チトクロームP450は増加傾向がみられた。

帝王切開の結果、吸収胚・胎児数、同腹児数、胎児体重、胎児肝臓重量並びに病理組織学的検査及び生化学的分析(肝臓)について、影響はみられなかった。離乳時(生後21日齢)の児動物では、500 mg/kg 体重/日投与群で、体重の有意な低値及び肝臓相対重量の増加がみられた。生化学的分析では、GST、エトキシレゾルフィン-O-デエチラーゼ(EROD)、ベンズフェタミンN-脱メチル化及びエポキシド加水分解酵素活性が有意に増加した。また、総グルタチオン及びチトクロームP450に影響はみられなかった。

試験実施者は、500 mg/kg 体重/日投与群の哺育児の体重増加抑制は母乳の質的又は量的な低下によるものと考察している。

離乳後、F₁世代を用いた22か月間反復投与試験における毒性所見を表42に示した。

一般状態及び摂餌量に影響はみられなかった。臓器重量では、肝臓相対重量が用量に依存して増加し、250 mg/kg 体重/日投与群で有意な増加を示したが、絶対重量に影響はみられなかった。

肝臓の免疫組織化学検査では、250 mg/kg 体重/日投与群でチトクロームP450-2Bの細胞内量増加及び分布の拡大がみられた。P450-1A及びエポキシド加水分解酵素の染色性に変化はみられなかった。また、門脈周囲肝細胞におけるγ-GTPの顕著な発現が離乳後11か月以降からみられ、その程度は弱いものの100 mg/kg 体重/日投与群でも観察された。グルコース-6-ホスファターゼの分布に変化はみられず、BHT投与に起因する胆管過形成及び門脈周囲炎症性細胞浸潤もみられなかった。離乳4週以降、肝細胞増殖活性の増加はみられなかった。

肝酵素活性については、250 mg/kg 体重/日投与群で、総チトクローム含量が21日齢で30~60%まで増加し、さらにエポキシド加水分解酵素、GST及

び PROD 活性も 100 mg/kg 体重/日以上投与群で有意に増加した。肝グルタチオン量及びグルコース-6-ホスファターゼ活性に影響はみられなかった。

腎臓の病理組織学的検査では、離乳 11 か月以降で顕著となる慢性腎症の重篤度の減弱がみられた。副腎に影響はみられなかった。血清サイロキシン濃度に変化はみられなかった。

JECFA は、100 mg/kg 体重/日以上投与群で肝酵素誘導及び甲状腺機能亢進像が認められていること並びに出生前ばく露を伴う F₁ 世代における前がん病変がみられた用量及びその病理所見を踏まえ、閾値を有する毒性評価が可能であると、本試験の NOEL を 25 mg/kg 体重/日と判断している。

EFSA は、哺育児について体重増加抑制があり、これが母動物の母乳産生減少によるものである可能性があること並びに母動物において肝肥大並びに PROD 及び GST の誘導がみられることを踏まえ、本試験から生殖発生毒性について NOAEL の設定は困難であるとしている。離乳後 22 か月間反復投与での毒性については、「(1) 繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験 (ラット、混餌投与) ①」で得られた発がん性に関する結果を踏まえ、NOAEL を 25mg/kg 体重/日と判断している。(参照 2、3、24、43)

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、離乳時の哺育児の低体重は生殖発生毒性に由来しない可能性を考慮し、本試験における生殖発生毒性についての NOAEL は 100 mg/kg 体重/日以上となると判断した。F₁ 世代の 22 か月間反復投与における毒性については、肝臓の門脈周囲肝細胞 γ -GTP 発現増加像並びに甲状腺機能亢進像に基づき、NOAEL を 25 mg/kg 体重/日と判断した。以上より、本試験の NOAEL を 25 mg/kg 体重/日と判断した。

表 41 ラットを用いた繁殖毒性試験における毒性所見 (離乳時まで)

投与量 (mg/kg 体重/日)	母動物	胎児	哺育児
500	肝臓重量増加、肝臓における滑面小胞体の増生、グルコース-6-ホスファターゼ・総グルタチオン・EROD 活性の減少	体重低値	肝臓相対重量増加
100 以上	小葉中心性肝細胞肥大及び甲状腺機能亢進病変	毒性所見なし (100 以下)	毒性所見なし (100 以下)
25 以下	所見なし		

表 42 ラットを用いた繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性試験における毒性所見（離乳後）

投与量 (mg/kg 体重/日)	毒性所見
250	体重低値 好酸性・好塩基性細胞巣増加 グルコース-6-ホスファターゼ欠損変異肝細胞巣増加 肝細胞結節増加（6/19 例）
100 以上	肝相対重量増加 門脈周囲肝細胞 γ -GTP 発現増加 甲状腺：濾胞縮小・不規則、コロイドの消失又は減少、充血及び濾胞細胞数増加
25	毒性所見なし

9. その他の毒性試験

（1）血液凝固系への影響に関する試験

① 40 日間亜急性毒性試験（ラット、混餌投与）＜参考資料³⁹＞

ラット（SD 系、4 週齢、雄 10 匹/群）に、BHT を 40 日間混餌投与（0、5,800、6,900、8,200、10,000、12,000 又は 14,400 mg/kg 飼料（0、436、526、663、713、774 又は 874 mg/kg 体重/日相当⁴⁰））する亜急性毒性試験が実施された。

投与 9～37 日間に、6,900 mg/kg 飼料以上投与群で用量依存性の死亡（21/50 例）がみられ、死亡動物では胸腹腔内出血が観察された。プロトロンビン指数は BHT 投与群で 5,800 mg/kg 飼料から用量依存性に低下し、それぞれ対照群の 35、25、18、20 及び 15%であった。（参照 2、24）

② 4 週間亜急性毒性試験（ラット、混餌投与）＜参考資料³⁹＞

ラット（SD 系、雄）に、BHT を 4 週間混餌投与（0、85、170、330、650、1,300、2,500 又は 5,000 mg/kg 飼料）する亜急性毒性試験が実施された。

投与 1 週では 170 mg/kg 飼料以上投与群から、投与 4 週では 5,000 mg/kg 飼料投与群のみに、それぞれプロトロンビン指数の有意な低下がみられた。また、5,000 mg/kg 飼料投与群では肝臓相対重量が増加した。（参照 2、24）

③ BHT による出血作用の抑制に関する検討（ラット、混餌投与）＜参考資料³⁹＞

ラット（SD 系、雄）に、BHT を単独又はフィロキノンと同時に 3 週間混餌投与（0、BHT（12,000 mg/kg 飼料）、BHT（12,000 mg/kg 飼料）+フィロキノン（5 mg/kg 飼料）又は BHT（12,000 mg/kg 飼料）+フィロキノン（500

³⁹ ラットではキノンメチド体が生成されやすく、高用量での BHT 投与下では、その影響が大きくなると考えられること及び同一著者によるものよりも詳細な再試験が実施されていることから、参考資料とした。

⁴⁰ OECD SIDS（参照 24）による換算。

mg/kg 飼料)) する出血作用抑制に関する試験が実施された。

BHT の 12,000 mg/kg 飼料投与群に発現した死亡（出血による）、出血及びプロトロンビン指数の低下はフィロキノン同時投与によって抑制された。（参照 2、24）

④ 血液凝固因子に対する影響検討（ラット、混餌投与）＜参考資料³⁹⁾＞

ラット（SD 系、雄 4～5 匹/群）に、BHT を 7 日間混餌投与（12,000 mg/kg 飼料（1,000 mg/kg 体重/日相当））し、血液凝固因子及び血小板凝集が測定された。

血漿中の血液凝固因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ及びⅩは投与 2～7 日にわたって経時的に減少を示し、投与 4 日～7 日には精巣上体の出血がみられた。血小板については、トロンビン又はカルシウム要求性の凝集はみられなかった。（参照 2、24）

⑤ 血液凝固に関する急性毒性試験（ラット、単回経口投与）

ラット（SD 系、4 週齢、雄 5～6 匹/群）に、BHT 又は BHT のキノンメチド体を単回経口投与（BHT：0 又は 160 mg/kg 体重、BHT キノンメチド体：75 又は 150 mg/kg 体重）する急性毒性試験が実施された。

キノンメチド体 150 mg/kg 体重投与群において、投与 24 時間後に 6 匹中 5 匹で鼻出血及び 3 匹で肺出血がみられ、ビタミン K 依存性の血液凝固因子である第Ⅱ及び第Ⅶ因子が有意に減少し、投与 48 時間後には 2 匹で精巣上体内部及び 1 匹で胸腺に出血がみられた。キノンメチド体投与群において、血漿中の第Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ及びⅩ因子が有意に低下した。一方で、BHT 投与群では、第Ⅱ因子が軽度低下したが、出血はみられなかった。

試験実施者は、出血はキノンメチド体によるもので、ビタミン K の還元サイクルを阻害するためと考察した。（参照 44）

⑥ ビタミン K 依存性凝固因子に対する影響の検討（ラット、混餌投与）

ラット（Wistar 系、雄 5～6 匹/群）に、BHT を単独又はビタミン K と同時に 3 週間混餌投与（0、BHT 3,000 mg/kg 体重/日、BHT 3,000 mg/kg 体重/日 + ビタミン K 250 mg/kg 体重/日）し、プロトロンビン時間（PT）及びビタミン K 依存性凝固因子が測定された。

BHT 投与では、PT に影響はみられなかったが、ビタミン K 依存性凝固因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ及びⅩを低下させた。

また、ラット（Wistar 系、雄 5～6 匹/群）に、BHT 及びビタミン K をそれぞれ単独又は同時に 14 日間混餌投与（BHT 3,000 mg/kg 体重/日、ビタミン K 250 mg/kg 体重/日又は BHT 3,000 mg/kg 体重/日 + ビタミン K 250 mg/kg 体重/日）し、トロンボテスト時間、PT、APTT 及び血清フィブリノーゲン濃度が測定された。

投与 7 日に、BHT 単独投与群では、トロンボテスト時間、PT 及び APTT

が有意に延長したが、ビタミン K の添加はそれらを抑制した。BHT の投与は血清フィブリノーゲン濃度に影響しなかった。

ラット (Wistar 系、雄 5~6 匹/群) に、BHT を単独 (0、12.5、125 又は 600 mg/kg 体重) 又はビタミン K と同時 (BHT 600 mg/kg 体重+ ビタミン K 0.3 mg/kg 体重) に 28 日間混餌投与し、トロンボテスト時間、PT 及び APTT が測定された。

BHT の 600 mg/kg 体重投与群におけるトロンボテスト時間の有意な延長は、ビタミン K 添加により抑制された。(参照 2、24、45)

これら一連の試験の結果から、ラットにおける BHT の血液凝固に対する影響は 600 mg/kg 体重/日以上となると考えられた。

⑦ 血液凝固系への影響に関するまとめ

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、血液凝固系への影響は、BHT のビタミン K 拮抗作用によるビタミン K 依存性凝固因子の阻害に起因するものであると考えた。

また、血液凝固に関する NOAEL については、当初実施された試験では、キノンメチド体の影響が排除できないと考えられたことから、⑥の検討の結果 (参照 45) を踏まえ、125 mg/kg 体重/日であると判断した。

(2) 肝臓への影響に関する試験

① 7 日間及び 28 日間亜急性毒性試験 (ラット、混餌投与)

ラット (Wistar 系、雄、5 匹/群 (7 日間投与)、10 匹/群 (28 日間投与)) に BHT を 7 日間又は 28 日間経口投与 (0、25、250 又は 500 mg/kg 体重/日) する亜急性毒性試験が実施された。

7 日間投与では、投与 3 日まで体重増加抑制がみられたが、その後回復した。肝臓相対重量は 7 日間投与及び 28 日間投与のいずれも用量に依存して増加した。

肝臓の生化学的分析では、肝マイクロソームタンパク質量及びグルコース-6-ホスファターゼ活性は、7 日間投与では 500 mg/kg 体重/日投与群で減少したが、28 日間投与では 250 mg/kg 体重/日以上投与群で増加した。また、7 日間投与及び 28 日間投与とも、EROD 活性の変動は軽微であったが、エトキシクマリン-O-エチラーゼ活性及びエポキシド加水分解酵素活性は用量に依存して増加した。チトクローム P450 濃度に顕著な変動はみられなかった。

肝臓の病理組織学的検査では、7 日間投与及び 28 日間投与とも 250 mg/kg 体重/日投与群で門脈周囲にグリコーゲン蓄積がみられ、500 mg/kg 体重/日投与群では、7 日間投与で肝細胞の肥大、壊死、過形成及び線維化がみられ、これらに加えて、28 日間投与では、胆管増生、褐色色素貪食マクロファージの出現及びグリコーゲン減少がみられた。

試験実施者は、7 日間投与及び 28 日間投与において、25 mg/kg 体重/日投与

群では肝傷害はみられなかったとしている。（参照 2、46）

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、BHT は、ラットの肝臓において肝薬物代謝酵素を誘導し、高用量では、肝傷害を示唆する組織学的変化を生じさせると考えた。

（３）甲状腺への影響に関する試験

ラット（MOL/Wistar 系、雄）に、BHT をヨード含有飼料（12 mg/kg 基礎飼料）に添加し 90 日間混餌投与（BHT：0、500 又は 5,000 mg/kg 飼料（0、25 又は 250 mg/kg 体重/日相当））し、投与 8、26 及び 90 日に甲状腺の ¹²⁵I の取り込みが測定された。

その結果、いずれの測定時点においても、BHT 投与群では ¹²⁵I 取り込みの顕著な増加がみられた。

ラット（MOL/Wistar 系、雄）に、BHT をヨード含有飼料（12、150 又は 300 mg/kg 基礎飼料）に添加し 30 日間混餌投与（BHT：0、500 又は 5,000 mg/kg 飼料）した試験では、甲状腺重量の有意な増加が 500 mg/kg 飼料以上投与群で、肝臓重量の有意な増加が 5,000 mg/kg 飼料投与群でみられた。血中 T3 及び T4 については、変動はみられなかった。また、T4 の生物学的半減期は BHT 投与群で投与 13 日に増加し、75 日後に正常に回復した。

BHT の 5,000 mg/kg 飼料投与群投与 28 日後の電子顕微鏡による観察が実施され、甲状腺で濾胞細胞の増加がみられた。

試験実施者は本試験では NOEL は設定できなかったと考察している。

EFSA は、甲状腺における濾胞細胞の増加に基づき、本試験における NOAEL を 25 mg/kg 体重/日と判断している。（参照 2、3、47）

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、甲状腺における濾胞細胞の増加に基づき、甲状腺への影響に関する NOAEL を、EFSA と同様に、25 mg/kg 体重/日と判断した。

（４）発がん性に関する促進作用又は抑制作用＜参考資料⁴¹＞

既知の発がん性物質等の発がんに対する BHT 投与の影響を JECFA の資料を基に表 43 に整理した。（参照 2）

表 43 BHT の発がんに対する促進又は抑制作用

動物	投与量		対象病変	結果
	発がん性物質	BHT		
マウス (A 系、雄)	カルバミン酸エチル：500 mg/kg 体重、単回腹腔内投与	500 mg/kg 体重、週 1 回×8 週間、経口投与（投与 1 週間から）	腫瘍	促進

⁴¹ いずれの試験も BHT を飼料添加物として使用した場合における食品を介したヒトへの BHT の発がん性の判断に影響しないと判断されることから、参考資料とした。

動物	投与量		対象病変	結果
	発がん性物質	BHT		
マウス (BALB/c 系、雄)	MNU：直腸内投与	混餌投与（投与期間不明）	消化管腫瘍	促進
マウス (Swiss-Webster 系、雄)	カルバミン酸エチル：1000 mg/kg 体重、単回腹腔内	250 mg/kg 体重、週 1 回×9～13 週間、注入（投与開始時期不明）	肺腫瘍	促進
マウス (Swiss 系、性別不明)	カルバミン酸エチル：50、250 又は 1000 mg/kg 体重	300 mg/kg 体重、13 回/週、腹腔内投与（投与 7 日後から）	肺腫瘍	促進
	カルバミン酸エチル（投与量不明）：BHT 投与 1 週後に投与	13 回投与（投与量不明）	肺腫瘍	影響なし
マウス (A/J 系、雄)	カルバミン酸エチル：単回腹腔内投与（投与量不明）	0.75%混餌、8 週間（投与開始時期不明）	肺腫瘍	促進
マウス (A/J 系、性別不明)	カルバミン酸エチル（投与量不明）：ミニポンプ留置持続投与（BHT 投与と同時期）	400 mg/kg 体重、単回腹腔内投与	肺腫瘍	影響なし
	カルバミン酸エチル（投与量不明）	腹腔内投与（BHT 単独又は SKF525A を同時投与、投与量不明）	肺腫瘍	促進
マウス (A/J 系、SWR/J 系、BALB/cByJ 系、129/J 系、C57BL/6J 系)	カルバミン酸エチル：1,000 mg/kg 体重、単回注入（BHT 投与 6 時間後）	200 mg/kg 体重、単回腹腔内投与	肺腫瘍	抑制：A/J 系 促進：SWR/J 系、129/J 系、C57BL/6J 系 影響なし：BALB/cByJ 系
マウス (A/J 系、性別不明)	カルバミン酸エチル：1,000 mg/kg 体重（投与経路不明）	400 mg/kg 体重、注入（投与経路及び投与開始時期不明）	肺腫瘍	促進
	3-メチルコランソレン：投与量及び投与経路不明	300 mg/kg 体重、反復注入（投与経路及び投与開始時期不明）	肺腫瘍	促進
マウス (MA/MyJ 系)	カルバミン酸エチル：50 mg/kg 体重、単回注入	BHT 及びその代謝物の 50 又は 200 mg/kg 体重、6 回/週、腹腔内投与（投与開始時期不明）	肺腫瘍	促進 (BHT-BuOH)

動物	投与量		対象病変	結果
	発がん性物質	BHT		
マウス (B6C3F1 系、雄)	DEN : 100 又は 200 mg/kg 体重 (1 回/週 ×10 週)	0.5%混餌投与 (DEN 投与終了後 4 週間経 過後から 24 週間)	変異肝細胞巣及 び肝細胞腺腫	影響なし
ラット (系統不明、 雌雄)	2-AAF 又は FAA : 混 餌 (1/30 mol) (雄 : 24 週間、雌 36 週 間)	0.6%混餌 (同時期)	肝腫瘍 (雄)	抑制
ラット (F344 系、 雄)	MNNG : 100 mg/kg 体重、単回経口 EHEN : 750 mg/kg 体重、単回経口 MBN : 0.5 mg/kg 体 重、皮下 2 回 上記それぞれに DBN を 0.1%混餌投与 (4 週間) 後、さらに DHPN を 0.1%飲水 投与 (2 週間)	0 又は 0.7%混餌 (36 週間) (DHPN 投与 終了 3 日後から)	腫瘍	抑制 : 腎 促進 : 甲状腺 影響なし : 舌、食道、前 胃、十二指 腸、小腸、 肝、肺、膀胱
ラット (F344 系、 雄)	BBN : 0.01 又は 0.05%飲水投与 (4 週 間)	0 又は 1%混餌投与 (32 週間) (投与開 始時期不明)	膀胱の乳頭腫及 びがん	促進 : BBN 0.05%群
ラット (系統/性別不 明)	FAA : 0.02%混餌投 与 (25 週間)	0 又は 0.6%混餌投与 (25 週間) (投与開 始時期不明)	膀胱腫瘍	促進 : BHT0.6%群
ラット (系統/性別不 明)	FAA : 0.02%混餌投 与 (25 週間)	0.03、0.1、0.3 又は 0.6%混餌投与 (25 週 間) (同時期)	膀胱腫瘍	促進 : BHT0.3 及び 0.6%群
ラット (F344 系、 雄)	MNU : 2 回/週 (4 週 間) (投与量及び投与 経路不明)	1%混餌投与 (32 週 間) (投与開始時期不 明)	膀胱腫瘍及び過 形成、甲状腺腺 腫	促進
ラット (F344 系、 雄)	BBN : 0.05%飲水投 与 (2 週間)	0、0.25、0.5 又は 1%混餌投与 (22 週 間)、投与 8 日に左側 尿管下部を結紮処置	膀胱の前腫瘍性 病変、乳頭腫又 は結節性過形成	促進 : BHT1% 群
ラット (F344 系、 雄)	N,N'-ジブチルニトロ サミン : 0.05%飲水 投与 (16 週間)	0 又は 0.7%混餌投与 (16 週間) (同時 期)	前胃過形成結節	抑制
ラット (F344 系、 雄)	BBN : 0.05%飲水投 与 (4 週間)	0 又は 0.8%混餌投与 (36 週間) (投与開 始時期不明)	膀胱上皮過形成 (乳頭状又は結 節性)	促進

動物	投与量		対象病変	結果
	発がん性物質	BHT		
ラット (F344 系、雄、4 及び 54 週齢)	DMBA : 50 mg/kg 体重、皮下投与 (週 1 回×10 週間)	0 又は 1%混餌投与 (11 週間) (同時期)、DMBA 投与開始後 55 週間飼育	腫瘍性病変発生頻度	促進：膀胱乳頭腫及びがん 抑制：肝細胞巣及び膵腺房細胞巣
ラット (F344 系、性別不明)	AAF : 0.005%混餌投与 (76 週間)	0.6%混餌投与 (76 週間) (同時期)	膀胱腫瘍	促進
	AAF : 0.005%混餌折るよ「(76 週間)	0.01~0.6%混餌投与 (76 週間) (同時期)	肝腫瘍発生	抑制：腺腫、がん
ラット (系統/性別不明)	1,2-DMH : 1 回/週×4 回 (投与量、投与経路不明)	0.5%混餌投与 (1,2-DMH 4 回投与後から 36 週間)	結腸腫瘍	抑制：発生数 (結腸遠位部)
ラット (Wistar 系、性別不明)	MNNG : 飲水投与 (1.0 mg/mL) (25 週間)	1.0%混餌投与 (25 週間) (同時期)	胃がん	抑制
ラット (Wistar 系、雄、7 週齢)	MNNG : 飲水投与 (100 mg/mL) (8 週間)	1%混餌投与 (32 週間)	前胃及び腺胃の腫瘍	影響なし
ラット (F344 系、雄、21 匹/群)	DBN : 飲水投与 (0.5 g/L、4 週間)	1%混餌投与 + ビタミン K 0.0007% (32 週間)	腫瘍	促進：食道腫瘍、膀胱乳頭腫 影響なし：前胃がん
ラット (F344 系、雄)	DMH : 皮下投与 (2 又は 4 回)	0、0.5 又は 1.0%混餌投与 (皮下投与直後から 5~6 か月間)	消化管腫瘍	促進：小腸及び結腸腫瘍
	NMU : 経口投与 (90 mg/kg 体重)	0.5%混餌投与 (投与開始時期不明)	胃、結腸腫瘍	影響なし
ラット (系統/性別不明、22 日齢)	AAF : 0.02%、18 日間	0 又は 0.5%混餌投与、407 日間 (投与終了後から)	肝腫瘍	促進
ラット (系統/性別不明)	AAF : 0.02%混餌投与 (25 週間)	0 又は 0.6%混餌投与 (同時に 25 週間)	肝腫瘍	抑制
ラット (系統/性別不明)	AAF : 0.02%混餌投与 (25 週間)	0.03、0.1、0.3 又は 0.6%混餌投与 (同時に 25 週間)	肝腫瘍	抑制 (用量依存性の発生率低下)

動物	投与量		対象病変	結果
	発がん性物質	BHT		
ラット（系統/性別不明）	AAF：0.02%混餌投与（8週間）	300、0.1、0.3 又は 0.6%混餌投与（22週間）（投与終了後から）	変異肝細胞巣及び肝腫瘍	促進
ラット（系統/性別不明）	DEN：200 mg/kg 体重、腹腔内投与	1%混餌投与（DEN投与後から6週間）及び部分的肝切除（投与3週時）	γ-GTP 陽性肝細胞巣	抑制
ラット（Wistar 系、雄）	アザセリン：30 mg/kg 体重、腹腔内投与（1回/週×2回）	1%混餌投与（投与後から26週間）	脾臓：GST-A 陽性腺房細胞巣 肝臓：GST-P 陽性肝細胞巣	脾臓：促進（前腫瘍性病変の発生頻度は減少） 肝臓：抑制
ラット（SD 系、雌）	DMBA 又は MNU（投与量及び投与経路不明）	0.3%混餌投与（投与後から30週間）	乳腺腫瘍	抑制（DMBA 投与群） 影響なし（MNU 投与群）
ラット（SD 系、雌）	DMBA：5 mg/ラット（投与経路不明）	0.03、0.1、0.3 及び 0.6%混餌投与（投与14日前から投与後210日まで）	乳腺腫瘍	抑制（用量依存性の腫瘍発生率低下）
ラット（LEW 系、雄）	アザセリン：1回/週×3回	0.45%混餌投与（投与後から4か月間）	脾臓変異細胞巣	抑制（好酸性変異巣）

a：発がん性物質の投与に対する BHT の投与時期

10. ヒトにおける知見

（1）経口摂取による急性毒性についての知見

BHT 4 g を空腹時に摂取した 22 歳の女性が、同日夜刻から上腹部に激しい痙攣、全身倦怠感、嘔気及び嘔吐に続いて、めまい、混乱及び軽度の意識消失を示し、翌日の受診で胃腸炎と診断された。

また、BHT 80 g をベニバナ油に懸濁し空腹時に摂取した 24 歳の女性が、意識朦朧、失調性歩行及び発語不明瞭を示し、受診時には、構音障害⁴²、失調性歩行、ロンベルグ徴候陽性⁴³、思考障害を伴わない精神緩慢及び左腕の測定障害⁴⁴がみられた。（参照 3）

⁴² 発音が正しくできない状態。

⁴³ 閉足直立し、閉眼時と開眼時の身体の揺れを比較し、閉眼時に揺れが大きい場合をロンベルグ徴候陽性とする。

⁴⁴ 距離の測定に過不足が生じ、目的動作が正しく行えない状態。

(2) 胃がんに関する疫学的知見

BHT の食物を介した摂取と胃がん発症リスクの関連性について、55～69 歳の男女 128,852 人を対象として「オランダコホート研究 (NLCS)」による調査が、1986 年から開始された。6.3 年にわたる追跡調査により、192 例の胃がん発生例及び男女 2,035 例についてサブコホート研究が可能となった。

サブコホートにおける BHT の平均摂取量は 0.351 mg/日で、胃がん発生と BHT を含むマヨネーズやドレッシング摂取との関連はみられず、有意差はないが、BHT の摂取量増加にともなって胃がん発生リスクが減少する傾向がみられた（摂取量の大小による率比 (rate ratio) は 0.74 (95%信頼区間 : 0.38 ~1.43)）。

試験実施者は、本研究では、食物を介した一般的に想定される低レベルの BHT の摂取と胃がん発生リスクとの間には有意な関連性はみられなかったとしている。(参照 3、48)

Ⅲ. 国際機関等における評価

1. EU における評価 (1987 年)

食品科学委員会 (SCF: Scientific Committee for Food) は、ラット 90 日間混餌投与試験において 500ppm (25 mg/kg 体重/日相当) 投与群でみられた甲状腺重量増加、ラットの繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験において 25 mg/kg 体重/日以上でみられた児動物体重 (離乳時) 低値及びラット血液凝固検討試験におけるプロトロンビン指数減少 (本指標の NEL (No effect level) は 85ppm) を考慮し、BHT の NEL は概ね 100ppm (5 mg/kg 体重/日相当) と判断し、これに安全係数 100 を適用して、ADI は 0~0.05 mg/kg 体重/日と設定された。(参照49)

2. JECFA における評価 (1986 年、1996 年)

JECFA は、1986 年の評価において、「Ⅱ 8 (1) 繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験 (ラット、混餌投与) ①」での同腹児数、児動物の性比及び哺育期間中の体重増加に対する NOEL である 25 mg/kg 体重/日に基づいて、暫定 ADI が 0~0.125 mg/kg 体重/日と設定されたが、当該試験での出生前ばく露を伴う長期投与において肝腫瘍発生の増加がみられたため、出生前ばく露後の肝臓への毒性影響についての追加検討が求められ、その結果も踏まえた再評価を行うこととした。

1996 年の評価において、BHT の肝傷害の発現には肝薬物代謝酵素が関与する可能性があり、肝酵素誘導が最も鋭敏な指標であると考えられたことから、ラット出生前ばく露を含む追加試験での肝酵素誘導及び甲状腺に対する影響に基づいて、NOAEL は 25 mg/kg 体重/日と判断された。なお NOAEL の判断にあたっては、先に実施された出生前ばく露を含む慢性毒性試験における繁殖試験部分でみられた所見も考慮された。JECFA はこの 25 mg/kg 体重/日に不確実係数 100 を適用し、ADI は 0~0.3 mg/kg 体重/日と設定された。(参照 2、33)

3. 国際がん研究機関 (IARC) における評価 (1986 年、1987 年)

IARC は、ラットの出生前ばく露を伴った慢性毒性試験における肝腫瘍発生について検討を行ったが、対照群と BHT 投与群との生存率の差が大きく、肝腫瘍発生率に関して評価は困難であると判断し、BHT のヒトに対する発がん性を評価することはできなかった。試験動物において、BHT の発がん性についての限られた証拠 (limited evidence) があるが、ヒトに対する発がん性について分類できない (Not classifiable as to its carcinogenicity to humans) としている。(参照50、51)

4. EFSA における評価 (2012 年)

2012 年に食品添加物としての BHT について、「1. EU における評価 (1987 年)」の再評価を実施した。

EFSA は、遺伝毒性試験の結果、BHT は変異原性や DNA 反応性を有しない

ことから、ラットの繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験における肝腫瘍発現には閾値があるものとみなした。また、当該試験における BMD 分析により、雄における肝細胞がんの発生率に関する BMDL₁₀ は 247 mg/kg 体重/日と推定された。

2 つの繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験についての JECFA の評価及び NOAEL 25 mg/kg 体重/日は同意できるものであり、SCF によって設定された ADI を改定する根拠となるとした。また、この NOAEL は上記 BMDL₁₀ の値である 247 mg/kg 体重/日を下回るものであり、肝発がんの BMDL₁₀ も包含されるとしている。

EFSA はこの NOAEL 25 mg/kg 体重/日に不確実係数 100 を適用し、ADI は 0.25 mg/kg 体重/日と設定された。(参照 3)

5. 環境省による環境リスク初期評価

2008 年に、環境省中央環境審議会環境保健部会化学物質評価専門委員会は、BHT に関する環境リスク初期評価を実施した。

BHT の非発がん影響については、一般毒性及び生殖発生毒性等に関する知見が得られているとされた。遺伝毒性については、全体として概ね陰性の結果が優位であるとされた。また、発がん性試験では、陽性がみられた報告であっても、その用量は非発がん影響よりも大きく上回っていた。以上より、閾値を前提とする有害性について、非発がん影響に関する知見に基づき無毒性量等が設定可能と判断され、ラットの慢性毒性に関する 2 試験での NOAEL である 25 mg/kg 体重/日が、BHT の無毒性量等と設定された。

本評価では、BHT に関する経口ばく露評価が実施されている。食品による BHT の経口ばく露量については、沖縄県衛生研究所が実施したマーケットバスケット方式による試験における摂取量に基づき算定された。公共用水域・淡水及び食物を摂取すると仮定した場合、BHT の経口ばく露量の平均値は 1.0 µg/kg 体重/日程度、予測最大値は 1.7 µg/kg 体重/日程度とされた。

この予測最大ばく露量から、BHT の NOAEL である 25 mg/kg 体重/日を除し、さらに、当該 NOAEL が実験動物を用いた結果であることから 10 を除した結果、MOE (Margin of Exposure) は 1,500 と算出された。

以上より、MOE が 100 を超えていることから、BHT の経口ばく露による健康リスクについては、情報収集等の作業を要しないと評価された。(参照52)

IV. 食品健康影響評価

抗酸化剤として飼料添加物に使用される BHT について食品健康影響評価を実施した。

体内動態試験では、マウス、ラット及びヒトにおいて、BHT は消化管から速やかに吸収され、BHT 及びその代謝物の大部分が尿及び糞中（マウス及びラットでは主に糞中、ヒトでは主に尿中）に排泄された。BHT の代謝には種差が示唆された。また、ラットでは ^{14}C 標識 BHT の単回経口投与後 40 時間においても胆汁中に比較的高い放射能が検出されたことから、腸肝循環の関与が示唆された。BHT の代謝はアルキル置換基及びベンゼン環の酸化による 2 つの経路をとるが、さらにアルキル置換基は *p*-メチル基の酸化又は *tert*-ブチル基の酸化に分かれると考えられる。マウスにおける代謝では *tert*-ブチル基の酸化が主であり、*p*-メチル基の酸化代謝物 BHT-COOH は遊離酸として主に糞中へ、又はグルクロン酸抱合体として尿中へ排泄されるが、ラットにおける代謝では *tert*-ブチル基の酸化は乏しく、*p*-メチル基酸化による BHT-COOH が主要代謝物であり、糞中へは主に未変化体及び BHT-COOH の遊離酸が、尿中へは BHT-COOH の遊離酸及びグルクロン酸抱合体が排泄されることが考えられた。ヒトでの排泄経路は主に尿中であり、BHT-COOH のエステル型グルクロン酸抱合体及び遊離酸が尿中へ排泄されることが考えられた。

残留試験では、BHT の国内での最大投与量である 150 mg/kg 飼料の混餌投与において、牛、豚及び鶏のいずれにおいても肝臓及び筋肉中の残留は、投与終了後比較的速やかに LOD 未満となった。一方、牛及び豚の脂肪及び小腸並びに鶏の脂肪及び皮膚については、経時的な減少傾向はみられたものの、最終投与 7 日後においても BHT が検出された。また、採卵鶏への 150mg/kg 飼料の混餌投与では、鶏卵において BHT は卵白では検出されなかったが、卵黄では検出され、最終投与 7 日後においても検出されたことから、脂肪組織への残留傾向が示された。魚類の混餌投与では、いずれの魚種でも投与終了後に漸減したが、筋肉における BHT の残留はうなぎで最も高く、次いでにじますで高く、いずれも 150 mg/kg 飼料での最終投与 7 日後では LOD 未満とはならなかった。一方、こい及びまだいは比較的低く、いずれも最終投与 7 日後は LOD 未満となった。

遺伝毒性については、*in vitro* 及び *in vivo* 遺伝毒性試験のいずれにおいても概ね陰性の結果が示されている。一部の *in vitro* 及び *in vivo* 試験において陽性結果が認められたが、これらは BHT の生体内代謝過程で生成される酸化代謝物やキノン化合物から生じる活性酸素種による間接的な影響の可能性があり、閾値があるものと考えた。したがって BHT には特段問題となる遺伝毒性はないと考えられ、ADI を設定することは可能であると判断した。

亜急性毒性試験及び慢性毒性試験では、主に血液凝固系、肝臓及び甲状腺に毒性影響が認められている。血液凝固系への影響は、BHT のビタミン K 拮抗作用によるビタミン K 依存性凝固因子の阻害に起因するものであり、短期の試験では、マウス及びラットにおいて出血傾向がみられ、その NOAEL は 125 mg/kg 体重/日であると判断された。一方、長期の試験では血液凝固系に関する毒性影

響は認められなかった。肝臓及び甲状腺に対する生化学的又は組織学的変化を伴った毒性影響は主にラットで認められた。

発がん性については、マウスの発がん性試験の一部で肺腫瘍又は肝腫瘍の増加が、ラットの繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験では肝腫瘍の増加がそれぞれみられた。これらの腫瘍発生に至る機作は明らかではないが、前述したとおり BHT には特段問題となる遺伝毒性はないことから、腫瘍発生は非遺伝毒性メカニズムと考えられ、その用量には閾値があるものと考えられた。

生殖発生毒性については、繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験の一部で 1 世代繁殖性が検討され、出生児及び哺育児において、1 腹当たりの胎児数の減少や体重増加抑制が認められた。ラット及びウサギを用いた発生毒性試験では催奇形性は認められなかった。

各種毒性試験のうち、肝臓における毒性影響（肝傷害）及び甲状腺における毒性影響（甲状腺機能亢進及び濾胞細胞の増加）並びに出生児及び哺育児における毒性影響（1 腹当たりの胎児数の減少及び体重増加抑制等）についての最も低い NOAEL は、ラット繁殖毒性試験及び F₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験及び甲状腺への影響に関する試験における 25 mg/kg 体重/日であった。また、この NOAEL は、マウスの肺腫瘍及び肝腫瘍それぞれの発生頻度の有意な増加並びにラットの肝腫瘍発生頻度の有意な増加を認めた投与量の値を下回っており、発がん性についても包含したものであると考えた。

食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会は、BHT の ADI の設定に当たっては、この NOAEL 25 mg/kg 体重/日を根拠として、これを安全係数 100 で除した 0.25 mg/kg 体重/日を ADI と設定することが適当であると判断した。

以上から、BHT 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た。

ADI 0.25 mg/kg 体重/日

ばく露量については、当該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。

表 44 各試験における JECFA、EFSA 及び食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会の無毒性量等の比較

動物種	試験	投与量 (mg/kg 体重/ 日)	無毒性量等 (mg/kg 体重/日)		
			JECFA ^a	EFSA	食品安全委員会
マウス	30 日間亜急性 毒性試験	0、1,570、 1,980、 2,630、 3,370、 4,980、5,470	—		1,570 (LOAEL) トロンボプラスチン 指数及びカオリン加 APTT の減少、腎臓 尿細管病変
	96 週間発がん 性試験	0、30、120、 600 ^c	—		120 (雄) 体重増加 抑制、AST 増加 30 (雌) 体重増加 抑制
	108 週間発がん 性試験	0、450、900 ^b	—		450(雄) (LOAEL) 肝臓傷害性所見の増 加 判断できず (雌)
	3 世代繁殖毒 性試験	0、22.5、 67.5、202.5、 607.5 ^c	—	202.5 体重増加抑制	202.5 体重増加抑制 (F ₁ 児動物)
	発生毒性試験 (7 日間混餌 投与)	0、70、240、 800	—		240 脾臓重量増加、腎臓 重量減少 催奇形性なし
ラット	76 週間慢性毒 性・発がん性 試験	0、7.5、23、 75、225、 450 ^b	—		75 体重減少 発がん性なし
	24 か月慢性毒 性試験	0/0、 2.14/2.49、 9.61/2.49、 9.61/10.26、 144.9/170.9 (雄/雌)	—		144.9/170.9 (雄/ 雌) 発がん性なし
	108 週間慢性 毒性・発がん 性試験	0、150、600 ^c	—		150 (LOAEL) (雄) TG 低下、 γ - GTP 増加 (雌) T.Chol 増 加、肝臓重量増加、 脾臓重量低下 発がん性なし
	105 週間発がん 性試験	0、225、450 ^b	—		225 肺胞組織球症の発生 頻度の増加 発がん性なし
	繁殖毒性試験 及び F ₁ 世代を 用いた慢性毒 性・発がん性 試験(1)	F ₀ : 0、25、 100、500 F ₁ : 0、25、 100、250	25 同腹児数の減少、児 動物の体重増加抑制 等	BMDL ₁₀ : 247 肝臓における発がん 性	母動物、哺育児、 F ₁ : 25 体重増加抑制
	繁殖毒性試験 及び F ₁ 世代を 用いた慢性毒 性・発がん性				体重増加抑制、肝臓 重量減少、肝臓グリ コーゲン消失、副腎 束状帯の脂肪滴増加

	試験(2)	②F ₀ : 0、 25、100、500 F ₁ : 0、25、 100、250	25 肝酵素誘導及び甲状腺機能亢進像	25 繁殖毒性試験及び F ₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験(1)の発がん性に関する結果を踏まえて決定	25 肝臓の門脈周囲肝細胞γ-GTP 発現増加、甲状腺機能亢進像
	甲状腺への影響に関する試験 (90 日間)	0、25、250	—	25 甲状腺における濾胞細胞の増加	25 甲状腺における濾胞細胞の増加
毒性学的 ADI (mg/kg 体重/日)			0.3	0.25	0.25
毒性学的 ADI 設定根拠資料			繁殖毒性試験及び F ₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験 (1)・(2)、 NOEL : 25 mg/kg 体重/日 安全係数 : 100	繁殖毒性試験及び F ₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験(2) NOAEL : 25 mg/kg 体重/日 安全係数 : 100	繁殖毒性試験及び F ₁ 世代を用いた慢性毒性・発がん性試験(1)・(2)、甲状腺への影響に関する試験(ラット) NOAEL : 25 mg/kg 体重/日 安全係数 : 100
ADI (mg/kg 体重/日)			0.3	0.25	0.25

a : NOEL として記載されている。

b : OECD SIDS (参照 24) による換算

c : JECFA の換算式に基づき算出

— : NOAEL に関する記述なし。

斜線 : 記載なし。

〈別紙 1 : 検査値等略称〉

略称等	名称
AAF	acetylaminofluorene : アセチルアミノフルオレン
ADI	Acceptable Daily Intake : 許容一日摂取量
A/G 比	Albumin / Globulin ratio : アルブミン/グロブリン比
Alb	albumin : アルブミン
ALP	alkaline phosphatase : アルカリ性ホスファターゼ
ALT	alanine aminotransferase : アラニンアミノトランスフェラーゼ
APTT	Activated Partial Thromboplastin Time : 活性化部分トロンボプラスチン時間
AST	aspartate aminotransferase : アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	area under the blood concentration-time curve : 血中薬物濃度-時間曲線下面積
BBN	<i>N</i> -butyl- <i>N</i> -butan-4-ol-nitrosamine : <i>N</i> -ブチル- <i>N</i> -(4-ヒドロキシブチル)ニトロソアミン
BHA	butylated hydroxyanisole : ブチルヒドロキシアニソール
BHT	dibutylhydroxytoluene : ジブチルヒドロキシトルエン
BMD	Benchmark Dose : ベンチマークドーズ
BMDL	Benchmark Dose Lower Confidence Limit : ベンチマーク用量信頼下限値
BUN	blood urea nitrogen : 血液尿素窒素
ChE	Cholinesterase : コリンエステラーゼ
CHO 細胞	Chinese Hamster Ovary cells : チャイニーズハムスター卵巣由来細胞
Cl	chlorine : クロール (塩素)
C _{max}	maximum drug concentration : 最高血 (漿) 中濃度
Cre	creatinine : クレアチニン
DBN	diazabicyclononene : ジアザビスクロノネン
DEN	diethylnitrosoamine : ジエチルニトロソアミン
DHPN	<i>N</i> -bis(2-hydroxypropyl)-nitrosamine : <i>N</i> -ビス(2-ヒドロキシプロピル)-ニトロソアミン
DMBA	7,12-dimethylbenz[a]anthracene : 7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン
DMH	1,2-dimethylhydrazine : 1,2-ジメチルヒドラジン
E ₂	17 β -estradiol : 17 β -エストラジオール
EFSA	European Food Safety Authority : 欧州食品安全機関
EHEN	<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -nitroso-2-aminoethanol : <i>N</i> -エチル- <i>N</i> -ヒドロキシ

	エチルニトロソアミン
ER	estrogen receptor : ヒトエストロゲン受容体
FAA	<i>N</i> -2-fluorenylacetamideofluoroacetic acid : フルオロ酢酸
GC	gas chromatography : ガスクロマトグラフィー
GC-MS	gas chromatography - mass spectrometry : ガスクロマトグラフィー・質量分析
Glu	Glucose : グルコース (血糖)
GST	Glutathione S-transferase : グルタチオン S-トランスフェラーゼ
γ -GTP	gamma-glutamyl transpeptidase : γ グルタミントランスペプチターゼ
Hb	hemoglobin : ヘモグロビン量 (血色素量)
HPLC	high performance liquid chromatography : 高速液体クロマトグラフィー
Ht	hematocrit : ヘマトクリット値
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives : FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
LD ₅₀	50% lethal dose : 半数致死量
LDH	lactate dehydrogenase : 乳酸脱水素酵素
LOAEL	Lowest-Observed-Adverse-Effect Level : 最小毒性量
LOD	limit of detection : 検出限界
LOQ	limit of quantitation : 定量限界
LOEL	Lowest-Observed-Effect Level : 最小影響量
β -LP	β -lipoprotein : β -リポタンパク
LSC	liquid scintillation counter : 液体シンチレーションカウンター
MBN	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -benzyl nitrosamine
MNNG	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine : <i>N</i> -メチル- <i>N</i> ² -ニトロ- <i>N</i> -ニトロソグアニジン
MNU (NMU)	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosourea (N-nitroso-N-methylurea) : <i>N</i> -メチルニトロソウレア
MOE	Margin of Exposure : MOE (ばく露マージン (ばく露幅))
NOAEL	No-Observed-Adverse-Effect Level : 無毒性量
NOEL	No-Observed-Effect Level : 無作用量
PROD	ペントキシレゾルフィン-O-デペンチラーゼ
PT	prothrombin time : プロトロンビン時間
RBC	red blood cell : 赤血球
SCE	sister chromatid exchange : 姉妹染色分体交換
T _{1/2}	half-life period : 消失相半減期

TB	total bilirubin : 総ビリルビン
T.Chol	total cholesterol : 総コレステロール
TG	Triglyceride : トリグリセリド
TLC	thin-layer chromatography : 薄層クロマトグラフィー
T _{max}	maximum drug concentration time : 最高血（漿）中濃度到達時間
TP	total protein : 総タンパク質
UA	uric acid : 尿酸

〈別紙 2 : 代謝物略称〉

略称	代謝物名
BHT-OH(t)	3- <i>tert</i> -butyl-2-hydroxy- $\beta,\beta,5$ -trimethylbenzeneethanol
BHT-BuOH	6- <i>tert</i> -butyl-2-(hydroxy- <i>tert</i> -butyl)-4-methylphenol
BHT-OH(t)QM	2- <i>tert</i> -butyl-6-(2-hydroxy <i>tert</i> -butyl)-4-methylene-2,5-cyclohexadien-1-one
BHT-CH ₂ OH	3,5-di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxy-benzyl alcohol
BHT-CHO	3,5-di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxybenzaldehyde
BHT-COOH	3,5-di- <i>tert</i> -butyl-4-hydroxy-benzoic acid
BHT-Q	2,6-di- <i>tert</i> -butyl-1,4-benzoquinone
BHQ	2,6-di- <i>tert</i> -butyl-1,4-benzenediol
DBP	2,6-di- <i>tert</i> -butyl-4-phenol
BHT-OOH	2,6-di- <i>tert</i> -butyl-4-methyl-4-hydroperoxy-2,5-cyclohexadien-1-one
BHT-QM	2,6-di- <i>tert</i> -butyl-4-methylene-2,5-cyclohexadien-1-one

(参照 3、12、13、14)

〈参照〉

- 1 Maryadele O'Neil: (2013). The Merk Index, 15th Edition. London. the Royal Society of Chemistry.
- 2 JECFA: Butylated hydroxytoluene. WHO Food Additives Series. 35. 1995.
- 3 EFSA: Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E321) as a food additive. EFSA Journal 2012; 10(3): 2588.
- 4 Matsuo M, Mihara K, Okuno M, Ohkawa H and Miyamoto J: Comparative metabolism of 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) in mice and rats Food Chem Toxicol. 1984; 22: 345-54.
- 5 Daniel JW and Gage JC: The absorption and excretion of butylated hydroxytoluene (BHT) in the rat. Food Cosmet Toxicol. 1965; 3(3): 405-15.
- 6 Tye R, Engel JD and Rapien I: Summary of toxicological data: Disposition of butylated hydroxytoluene (BHT) in the rat. Food Cosmet Toxicol. 1965; 3(3): 547-51.
- 7 Takahashi O and Hiraga K: 2,6-Di-tert-butyl-4-methylene-2,5-cyclohexadienone: a hepatic metabolite of butylated hydroxytoluene in rats. Food Cosmet Toxicol. 1979; 17(5): 451-4.
- 8 Dacre JC: The metabolism of 3:5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene and 3:5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzoic acid in the rabbit. Biochem J. 1961; 78(4): 758-66.
- 9 Daniel JW, Gage JC, Jones DI and Stevens MA: Excretion of butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA) by man Food Cosmet Toxicol. 1967; 5(4): 475-9.
- 10 Verhagen H, Beckers HH, Comuth PA, Maas LM, ten Hoor F, Henderson PT and Kleinjans JC: Disposition of single oral doses of butylated hydroxytoluene in man and rat. Food Chem Toxicol. 1989; 27(12): 765-72.
- 11 Holder GM, Ryan AJ, Watson TR and Wiebe LI: The metabolism of butylated hydroxytoluene, (3,5-di-t-butyl-4-hydroxytoluene) in man. J Pharm Pharmacol. 1970; 22(5): 375-6.
- 12 Madhavi DL, Deshpande SS and Salunkhe DK: (1996). Food antioxidants Technological, toxicological, health perspective. Marcel Dekker, New York.
- 13 Barbara Nieva-Echevarría, María J Manzanos, Encarnación Goicoechea, and María D: Guillen 2,6-Di-Tert-Butyl-Hydroxytoluene and Its Metabolites in Foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2015; 14: 67-79.
- 14 Lanigan RS and Yamarik TA Final report on the safety assessment of BHT (1). Int J Toxicol. 2002; 21 Suppl 2: 19-94.
- 15 株式会社 NAS 研究所：平成 23 年度生産資材安全確保調査・試験事業試験報告書「BHT の牛への移行調査確認試験」、平成 24 年 3 月
- 16 社団法人 県中央研究所：平成 24 年度生産資材安全確保調査・試験事業試験報告書「畜産物等における BHT の含有量調査委託事業」、2012 年 7 月
- 17 財団法人 畜産生物科学安全研究所：飼料安全性及び有用性確認調査委託事業試験報告書「BHA 及び BHT の残留試験報告書（肉用鶏及び肥育豚）」、昭和 55 年 9 月
- 18 Frawley JP, Kay JH and Calandra JC: The residue of butylated hydroxytoluene (BHT) and metabolites in tissue and eggs of chickens fed diets containing radioactive BHT. Food Cosmet Toxicol. 1965; 3(3): 471-4.

- 19 van Stratum PGC and Vos HJ: The transfer of dietary butylated hydroxyl-toluene (BHT) into the body and egg fat of laying hens. *Food Cosmet Toxicol* 1965; 3(3): 475-7.
- 20 財団法人 畜産生物科学安全研究所：飼料安全性及び有用性確認調査委託事業調査報告書「BHA 及び BHT の残留試験報告書（鶏卵への移行）」、昭和 55 年 9 月
- 21 水産庁：養殖水産動物における BHT の残留試験報告書（にじます、こい、うなぎ、あゆ、及びまだい）、昭和 56 年 1 月
- 22 山口県内海水産試験場：養魚飼料添加物使用基準検討試験委託事業「試験報告書（クルマエビ）」、昭和 55 年 3 月
- 23 Oikawa S, Nishino K, Oikawa S, Inoue S, Mizutani T and Kawanishi S: Oxidative DNA damage and apoptosis induced by metabolites of butylated hydroxytoluene. *Biochem Pharmacol*. 1998; 56(3): 361-70.
- 24 OECD: 2,6-di-tert-butyl-p-cresol (BHT), OECD SIDS Initial Assessment Report for Siam 2002; 14: UNEP Publications.
- 25 Kim Y and Ryu J: Evaluation of the Genetic Toxicity of Synthetic Chemical (XVIII)-in vitro Mouse Lymphoma Assay and in vivo Supravital Micronucleus Assay with Butylated Hydroxytoluene (BHT). *Molecular & Cellular Toxicology*, 2007; 3(3): 172-6.
- 26 Bomhard EM, Bremmer JN and Herbold BA: Review of the mutagenicity/genotoxicity of butylated hydroxytoluene. *Mutat Res*. 1992; 277(3): 187-200.
- 27 東京都立衛生研究所毒性部：研究報告「ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の慢性毒性、催奇形性ならびに突然変異誘起性試験」、昭和 52 年 10 月
- 28 Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K and Tsuda S: The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res*. 2002; 519(1-2): 103-19.
- 29 Takahashi O: Haemorrhages due to defective blood coagulation do not occur in mice and guinea-pigs fed butylated hydroxytoluene, but nephrotoxicity is found in mice. *Food Chem Toxicol*. 1992; 30(2): 89-97.
- 30 National Cancer Institute: Bioassay of butylated hydroxytoluene (BHT) for possible carcinogenicity. National Cancer Institute Carcinogenesis Technical Report Series. 1979; No150.
- 31 Allen JR and Engblom JF: Ultrastructural and biochemical changes in the liver of monkeys given butylated hydroxytoluene and butylated hydroxyanisole. *Food Cosmet Toxicol*. 1972; 10(6): 769-79.
- 32 Lindenschmidt RC, Tryka AF, Goad ME and Witschi HP: The effects of dietary butylated hydroxytoluene on liver and colon tumor development in mice. *Toxicology* 1986; 38(2): 151-60
- 33 JECFA: Butylated hydroxytoluene. WHO Food Additives Series 21. 1986.
- 34 Clapp NK, Tyndall RL and Cumming RB: Hyperplasia of hepatic bile ducts in mice following long-term administration of butylated hydroxytoluene *Food Cosmet Toxicol*. 1973; 11(5): 847-9.
- 35 Clapp NK, Tyndall RL, Cumming RB and Otten JA: Effects of butylated hydroxytoluene alone or with diethylnitrosamine in mice. *Food Cosmet Toxicol*. 1974; 12(3): 367-71.
- 36 Shirai T, Hagiwara A, Kurata Y, Shibata M, Fukushima S and Ito N: Lack

- of carcinogenicity of butylated hydroxytoluene on long-term administration to B6C3F1 mice. *Food Chem Toxicol.* 1982; 20(6): 861-5.
- 37 Inai K, Kobuke T, Nambu S, Takemoto T, Kou E, Nishina H, Fujihara M, Yonehara S, Suehiro S and Tsuya T: Hepatocellular tumorigenicity of butylated hydroxytoluene administered orally to B6C3F1 mice. *Jpn J Cancer Res.* 1988; 79(1): 49-58.
 - 38 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.
 - 39 Hirose M, Shibata M, Hagiwara A, Imaida K and Ito N: Chronic toxicity of butylated hydroxytoluene in Wistar rats. *Food Cosmet Toxicol.* 1981; 19(2): 147-51
 - 40 Tanaka T, Oishi S and Takahashi O: Three generation toxicity study of butylated hydroxytoluene administered to mice. *Toxicol Lett.* 1993; 66(3): 295-304
 - 41 Allen JR: Long-term antioxidant exposure effects on female primates. *Arch Environ Health.* 1976; 31(1): 47-50.
 - 42 Olsen P, Meyer O, Bille N and Würtzen G: Carcinogenicity study on butylated hydroxytoluene (BHT) in Wistar rats exposed in utero. *Food Chem Toxicol.* 1986; 24(1): 1-12.
 - 43 McFarlane M, Price SC, Cottrell S, Grasso P, Bremmer JN, Bomhard EM and Hinton RH: Hepatic and associated response of rats to pregnancy, lactation and simultaneous treatment with butylated hydroxytoluene. *Food Chem Toxicol.* 1997; 35(8): 753-67.
 - 44 Takahashi O: 2,6-di-tert-butyl-4-methylene-2,5-cyclohexadienone (BHT quinone methide): an active metabolite of BHT causing haemorrhages in rats. *Arch Toxicol.* 1988; 62(4):325-7.
 - 45 Cottrell S, Andrews CM, Clayton D and Powell CJ: The dose-dependent effect of BHT (butylated hydroxytoluene) on vitamin K-dependent blood coagulation in rats. *Food Chem Toxicol.* 1994; 32(7): 589-94.
 - 46 Powell CJ, Connelly JC, Jones SM, Grasso P and Bridges JW: Hepatic responses to the administration of high doses of BHT to the rat: their relevance to hepatocarcinogenicity. *Food Chem Toxicol.* 1986; 24(10-11): 1131-43.
 - 47 Søndergaard D and Olsen P: The effect of butylated hydroxytoluene (BHT) on the rat thyroid. *Toxicol Lett.* 1982; 10(2-3): 239-44.
 - 48 Botterweck AA, Verhagen H, Goldbohm RA, Kleinjans J and van den Brandt PA: Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. *Food Chem Toxicol.* 2000; 38(7): 599-605.
 - 49 Commission of the European Communities: Reports of the Scientific Committee for Food 1989; ANNEX: 22-3.
 - 50 WHO: WHO IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: 1986; 40: 161-206.
 - 51 WHO: WHO IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Overall Evaluation of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volume 1 to 42. 1987; Supplement 7: 47-8.
 - 52 環境省中央環境審議会環境保健部会化学物質評価専門委員会：環境省化学物質

の環境リスク評価「2,6-ジ-*t*-ブチル-4-メチルフェノール」、化学物質環境リスク
評価 第6巻、2008年5月

ジブチルヒドロキシトルエンに係る食品健康影響評価に関する審議結果(案)についての意見・情報の募集結果について

1. 実施期間 令和2年7月28日～令和2年8月27日
2. 提出方法 インターネット、ファックス、郵送
3. 提出状況 1通
4. 頂いた意見・情報及び肥料・飼料等専門調査会の回答

	頂いた意見・情報	肥料・飼料等専門調査会の回答(案)
1	日本で登録されている農薬(殺菌剤、抗生物質含む)の種類、成分数はダントツの世界一と理解していますが、まずはその数字を他国のものも含めて明らかにしていただきたい。その数字をごらんになった上で、農薬の総種類数規制、総量規制の必要性を感じられるかどうかをお答えください。 また、複数の農薬の複合影響を確認する必要性についての見解もいただきたく存じます。 ・100の安全係数で除しているから、リスクはないとみなされているようですが、これほど多くの種の農薬や添加物、遺伝子組み換え品が認められている日本では、安全係数100では不十分ではないでしょうか？リスクを最小化するために1000にすべきではないでしょうか？ ・「発がん性試験において、マウスで肝細胞腺腫の発生頻度の増加がみられたが、発生機序は遺伝毒性メカニズムとは考え難く、本剤の評価に当たり閾値を設定することは可能である」としていますが、「肝細胞腺腫の発生頻度の増加がみられた」からには、量の大小に関わらず一律に残留禁止とするのが、国民の健康を第一に考えれば当然の処置と考えられますが、なぜそうしないのでしょうか？	本成分は飼料添加物として、主に飼料の変敗防止及び輸送時の火災防止のために抗酸化作用を目的に使用されるもので、農薬としては登録されておりません。 安全係数については、「飼料添加物に関する食品健康影響評価指針(平成30年9月25日食品安全委員会決定)」に基づき、安全係数を100とすることが妥当と判断しました。 食品安全委員会は、今回設定した許容一日摂取量(ADI)に基づき適切なリスク管理措置が実施されれば、残留した本剤の食品を介した安全性は担保され则认为ます。 ジブチルヒドロキシトルエン(BHT)の発がん性の評価については、一部の試験で腫瘍の増加がみられますが、遺伝毒性試験の一部の試験で得られた陽性結果は「BHTの生体内代謝過程で生成される酸化代謝物やキノン化合物から生じる活性酸素種による間接的な影響の可能性があり、閾値のあるものと考えられる。したがってBHTには特段問題となる遺伝毒性はないと考えられ、ADIを設定することは可能」と判断したことを踏まえ、たとえ発がん性があっても、「BHTには特段問題となる遺伝毒性はないことから、腫瘍発生は非遺伝毒性メカニズムによるものと考えられ、その用量には閾値があるものと考えられた」と評価しています。

※頂いたものをそのまま掲載しています。

ジブチルヒドロキシトルエンに係る評価書の変更点

修正箇所※	食品安全委員会 第 791 回会合資料 (変更後)	食品安全委員会 第 785 回会合資料 (変更前)
6 頁 27 行目	NOAEL 25 mg/kg <u>体重/日</u>	NOAEL 25 mg/kg
43 頁 10 行目	本試験の NOAEL を 1,350 mg/kg 飼料 (202.5 mg/kg <u>体重/日</u>) と判断した。	本試験の NOAEL を 1,350 mg/kg 飼料 (202.5 mg/kg 体重) と判断した。
50 頁 16 行目	NOAEL を 25mg/kg <u>体重/日</u> と判断している。	NOAEL を 25mg/kg 体重と判断している。
63 頁 22 行目	NOAEL 25 mg/kg <u>体重/日</u>	NOAEL 25 mg/kg/日

※修正箇所は、第 791 回会合資料における頁等