厚生労働省発生食 1112 第１号
平 成　30 年　11 月　12 日

薬事・食品衛生審議会
会長　橋田　充　殿

厚生労働大臣　　根本　匠

諮問書

食品衛生法（昭和 22 年法律第 233 号）第 11 条第１項の規定に基づき、下記の事項について、貴会の意見を求めます。

記

次に掲げる農薬等の食品中の残留基準設定について

動物用医薬品フルメキン
動物用医薬品[モノ,ビス（塩化トリメチルアンモニウムメチレン）]
ーアルキルトルエン
飼料添加物グアニジノ酢酸
飼料添加物ブチルヒドロキシアニソール
農薬イソピラザム
農薬エトフェンプロックス
農薬フェンピロキシメート
農薬マンデストロビン

以上

平成 30 年 12 月 12 日

薬事・食品衛生審議会
食品衛生分科会長　村田　勝敬　殿

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
農薬・動物用医薬品部会長　穐山　浩

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会
農薬・動物用医薬品部会報告について

平成 30 年 11 月 12 日付け厚生労働省発生食 1112 第 1 号をもって諮問された、食品衛生法（昭和 22 年法律第 233 号）第 11 条第 1 項の規定に基づくブチルヒドロキシアニソールに係る食品中の飼料添加物の残留基準の設定について、当部会で審議を行った結果を別添のとおり取りまとめたので、これを報告する。

ブチルヒドロキシアニソール

今般の残留基準の検討については、食品中の動物用医薬品等のポジティブリスト制度導入時に新たに設定された基準値（いわゆる暫定基準）の見直しについて、食品安全委員会において食品健康影響評価がなされたことを踏まえ、農薬・動物用医薬品部会において審議を行い、以下の報告を取りまとめるものである。

１．概要

（１）品目名：ブチルヒドロキシアニソール[Butylated hydroxyanisole（ISO）]

（２）用　途：抗酸化剤

ブチルヒドロキシアニソール（以下、BHAという）は、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。動物用飼料中のビタミンA及びE、カロテン、動物性油脂等の酸化を遅くする目的で使用される。この他に、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。

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

日本では、飼料添加物として指定されている。また、1954年に食品添加物に指定されている。

（３）化学名及びCAS番号

2-(*tert*-Butyl)-4-methoxyphenol

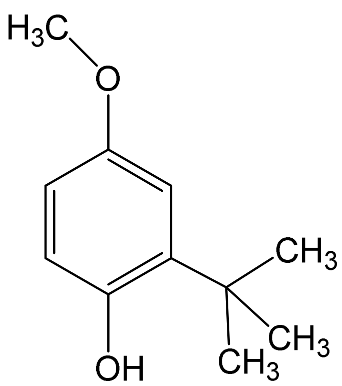
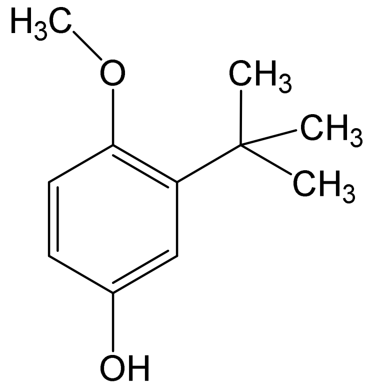
3-(*tert*-Butyl)-4-methoxyphenol (IUPAC)

Phenol, (1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-（CAS：No. 25013-16-5）

Phenol, 2-(1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-（CAS：No. 121-00-6）

Phenol, 3-(1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-（CAS：No. 88-32-4）

（４）構造式及び物性

2-(*tert*-Butyl)-4-methoxyphenol(3-BHA)　　3-(*tert*-Butyl)-4-methoxyphenol(2-BHA)

(BHA は 3-BHA 及び 2-BHA の混合物で 85%以上が 3-BHA)

分　子　式　　$C_{11}H_{16}O_2$

分　子　量　　180.24

（５）適用方法及び用量

本剤の使用対象動物及び使用方法等は以下のとおり。

①　国内での使用方法

飼料添加物	使用方法注)	休薬期間
ブチルヒドロキシアニソール	エトキシキン、ジブチルヒドロキシトルエン及びブチルヒドロキシアニソールの飼料(飼料を製造するための原料又は材料を除く。) 中の含有量は、それぞれの有効成分の合計量で飼料 1t 当たり 150 g 以下でなければならない。	−

−：設定されていない

注）対象動物は規制されていない

②　海外での使用方法

飼料添加物	使用方法注 1)	使用国	休薬期間
ブチルヒドロキシアニソール	エトキシキン、ジブチルヒドロキシトルエン及びブチルヒドロキシアニソールの飼料（飼料を製造するための原料又は材料を除く。）中の含有量は、それぞれの有効成分の合計量で飼料 1t 当たり 150 g 以下でなければならない。	ノルウェー	−注 2)

−：設定されていない。

注 1）対象動物は規制されていない

注 2）さけでは 14 日間断餌する

２．対象動物における残留試験

（１）分析の概要

【国内】

① 分析対象物質

・ブチルヒドロキシアニソール

② 分析法の概要

試料に無水硫酸ナトリウムを加えて*n*-ヘキサン・アセトン（3：2）混液で抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配した後、ガスクロマトグラフ・質量分析計（GC-MS）で定量する。

または、試料からアセトンで抽出し、アセトニトリル/ヘキサン分配した後、電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-ECD）で定量する。

にじます、こい及びあゆにおいては、試料に塩化ナトリウムを加えて混合、粉砕する。水、リン酸及びピロガロールを加えて水蒸気蒸留し、*n*-ヘキサンに捕集した後、GC-MSで定量する。

定量限界：0.02～0.05 mg/kg

【海外】

① 分析対象物質

・ブチルヒドロキシアニソール

② 分析法の概要

試料からアセトニトリルで抽出し、抽出液をろ過した後、蛍光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ（HPLC-FL）で測定する。

定量限界：0.007 mg/kg

（２）残留試験結果

① 豚（交雑種（LW）、2か月齢、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1260 mg/頭/日相当)）し、投与開始6週後並びに、最終投与0、1、2、3、5及び7日後に採取した筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び小腸における3-BHAの濃度をGC-MS又はHPLC-ECDで測定した（表1）。（農林水産省，1980）

表1. 豚に3-BHAを91日間混餌投与後の組織中の3-BHA濃度（mg/kg）

投与群 (ppm)	組織	投与開始 6週後	最終投与後日数					
			0	1	2	3	5	7
150	筋肉	0.03 <0.02	0.03 <0.02	0.03 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02
	脂肪	0.05 0.10	0.04 0.04	<0.025 0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02
	肝臓	0.04 <0.02	0.03 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02
	腎臓	0.03 0.05	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02
	小腸	0.05 0.10	<0.025 <0.02	0.03 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02
600	筋肉	0.025 <0.02	0.025 <0.02	0.03 <0.02	<0.025 –	<0.025 –	<0.025 –	<0.025 –
	脂肪	0.08 0.13	0.12 0.08	0.03 <0.02	0.03 0.04	0.03 0.05	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02
	肝臓	0.06 <0.02	0.06 <0.02	0.04 <0.02	0.03 –	<0.025 –	<0.025 –	<0.025 –
	腎臓	0.06 0.23	0.025 0.02	0.03 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 –	<0.025 –	<0.025 –
	小腸	0.05 0.48	0.14 0.10	0.04 <0.02	0.03 <0.02	<0.025 –	<0.025 –	<0.025 –

上段はGC-MS、下段はHPLC-ECDの測定値
数値は分析値を示す（検体数はn=1）
–： 分析せず
定量限界(GC-MS)：0.025 mg/kg
定量限界(HPLC)：0.02 mg/kg

② 鶏（肉用種、初生雛、雌10羽/時点(投与開始4週後のみ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)）し、投与開始4週後並びに、最終投与0、1、2、3、5及び7日後に採取した筋肉、脂肪、肝臓、腎臓及び皮膚における3-BHAの濃度をGC-MS又はHPLC-ECDで測定した（表2）。（農林水産省，1980）

表2. 鶏に3-BHAを56日間混餌投与後の組織中の3-BHA濃度 (mg/kg)

投与群 (ppm)	組織	投与開始4週後	最終投与後日数 0	1	2	3	5	7
150	筋肉	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02
	脂肪	0.04 <0.02	<0.025 0.11	<0.025 0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02
	肝臓	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02
	腎臓	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 -	<0.025 <0.02
	皮膚	0.05 <0.02	<0.025 0.04	<0.025 0.02	<0.025 <0.02	<0.025 0.03	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02
600	筋肉	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 -	<0.025 -	<0.025 -	<0.025 -
	脂肪	0.07 <0.02	0.29 0.62	0.03 0.09	<0.025 0.09	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 -
	肝臓	<0.025 <0.02	<0.025 0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 -	<0.025 -	<0.025 -
	腎臓	<0.025 <0.02	<0.025 0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 -	<0.025 -	<0.025 -
	皮膚	0.12 0.04	0.19 0.25	<0.025 0.04	<0.025 0.04	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 -

上段はGC-MS、下段はHPLC-ECDの測定値
数値は分析値を示す
-： 分析せず
投与開始4週後は8羽分の試料を、その他の時点については5羽分の試料を合わせて1検体とした。
定量限界(GC-MS)：0.025 mg/kg
定量限界(HPLC)：0.02 mg/kg

③ 産卵鶏（白色レグホン種、9か月齢、8羽/時点）に3-BHAを56日間混餌投与（150又は600 ppm（17又は68 mg/羽/日相当））し、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日後に採卵した卵黄及び卵白における3-BHAの濃度をGC-MS又はHPLC-ECDで測定した（表3）。（農林水産省，1980）

表3. 鶏に3-BHAを21日間混餌投与後の卵黄及び卵白中の3-BHA濃度（mg/kg）

投与群 (ppm)	試料	投与開始後日数		最終投与後日数					
		7	14	0	1	2	3	5	7
150	卵白	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02
	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 <0.02	0.05 <0.02
600	卵白	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02	<0.025 <0.02
	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

上段はGC-MS、下段はHPLC-ECDの測定値　（検体数は各時点ともn=8）

定数値は分析値を示す

量限界(GC-MS)：0.025 mg/kg

定量限界(HPLC)：0.02 mg/kg

④　にじます、こい及びあゆ（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1、2、3及び7日後に採取した筋肉及び内臓（消化管内容物及び腎臓を除く）におけるBHAの濃度をGC-MSで測定した（表4）。（農林水産省，1981）

表4. にじます、こい及びあゆにBHAを混餌投与後の筋肉及び内臓のBHA濃度（mg/kg）

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

数値は分析値を示す。

検体数不明

定量限界(GC-MS)：0.05 mg/kg

⑤　大西洋さけ（3 尾以上/時点)に BHA を 28、56 又は 84 日間混餌投与（48.5、92.5 及び 225 ppm）し、投与開始 28、56 及び 84 日後、さらに最終投与から 14 日間断餌した投与開始 98 日後に採取したフィレ[注] 及び肝臓における BHA の濃度を HPLC-FL で測定した。

フィレにおける残留濃度は投与量に依存していたが、投与開始 28 日後以降は平衡状態であった。フィレ及び肝臓における最高濃度は 225 ppm 投与群で、それぞれ投与開始 28 日後で 0.183 mg/kg 及び投与開始 84 日後で 0.393 mg/kg であった。いずれの組織においても休薬期間後の残留濃度は定量限界未満（0.007 mg/kg）であった。フィレにおいて平均残留濃度が最大であった 225 ppm 投与群の投与開始 28 日後における　0.096 ± 0.048 mg/kg（n=5)から、最大残留濃度を 0.192 mg/kg と推定した。（Petri ら、2008）

注）皮膚付きの筋肉

３．ADIの評価

食品安全基本法（平成 15 年法律第 48 号）第 24 条第 2 項の規定に基づき、食品安全委員会あて意見を求めたブチルヒドロキシアニソールに係る食品健康影響評価において、以下のとおり評価されている。

（１）ADI

無毒性量：50 mg/kg 体重/day

（動物種）　イヌ
（投与方法）　混餌
（試験の種類）慢性毒性試験
（期間）　15 か月

安全係数：100

<u>ADI：0.5 mg/kg 体重/day</u>

遺伝毒性については、ブチルヒドロキシアニソール（BHA）及びその代謝物である *tert*-ブチルヒドロキノン（TBHQ）等は染色体異常誘発性を有すると考えられたが、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間接的な影響によるものであり、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を示さないと考えた。

発がん性については、BHA を投与したげっ歯類の前胃に認められた発がん性はげっ歯類に特異的なものであり、ヒトとの関連性はないと判断した。

以上のことから、BHAの一日摂取許容量（ADI）を設定することは可能であると判断した。

４．諸外国における状況

JECFAにおける毒性評価が行われ、1989年にADIが設定されている。国際基準は設定されていない。

米国、カナダ、EU、豪州及びニュージーランドについて調査した結果、いずれの国及び地域においても基準値は設定されていない。

５．基準値案

（１）残留の規制対象

ブチルヒドロキシアニソールとする。

BHAはTBHQ等に代謝されるが、代謝物及びその抱合体も速やかに体外に排泄されることから規制対象をBHAとする。

（２）基準値案

別紙１のとおりである。

（３）暴露評価

１日当たり摂取する動物用医薬品等の量のADIに対する比は､以下のとおりである。詳細な暴露評価は別紙２参照。

	TMDI／ADI(%)注)
国民全体（1歳以上）	0.2
幼小児（1～6歳）	0.3
妊婦	0.1
高齢者（65歳以上）	0.2

注）各食品の平均摂取量は、平成17年～19年度の食品摂取頻度・摂取量調査の特別集計業務報告書による。

TMDI試算法：基準値案×各食品の平均摂取量

（４）本剤については、平成17年11月29日付け厚生労働省告示第499号により、食品一般の成分規格7に食品に残留する量の限度（暫定基準）が定められているが、今般、残留基準の見直しを行うことに伴い、暫定基準は削除される。

動物用医薬品名　　ブチルヒドロキシアニソール

（別紙1）

食品名	基準値案 ppm	基準値現行 ppm	承認有無	参考基準値 国際基準 ppm	参考基準値 外国基準値 ppm	残留試験成績等 ppm
豚の筋肉	0.03	0.03	○			0.03(投与開始6週後)
豚の脂肪	0.1	0.04	○			0.10(投与開始6週後)
豚の肝臓	0.04	0.03	○			0.04(投与開始6週後)
豚の腎臓	0.05	0.02	○			0.05(投与開始6週後)
豚の食用部分	0.1	0.02	○			0.10(投与開始6週後)
鶏の筋肉	0.02	0.02	○			<0.02(n=8)(投与開始4週後)
鶏の脂肪	0.05	0.02	○			0.05(皮膚)(n=8)(投与開始4週後)
鶏の肝臓	0.02	0.02	○			<0.02(n=8)(投与開始4週後)
鶏の腎臓	0.02	0.02	○			<0.02(n=8)(投与開始4週後)
鶏の食用部分	0.05	0.02	○			鶏の脂肪参照
鶏の卵	0.06	0.02	○			推:0.052※
魚介類(さけ目魚類に限る。)	0.5	0.5	○			0.12,0.13(にじます)、0.22,0.27(こい)、0.05,0.07(あゆ)
魚介類(うなぎ目魚類に限る。)	0.5	0.5	○			魚介類(さけ目魚類に限る。)参照
魚介類(すずき目魚類に限る。)	0.5	0.5	○			魚介類(さけ目魚類に限る。)参照
魚介類(その他の魚類に限る。)	0.5	0.5	○			魚介類(さけ目魚類に限る。)参照

平成17年11月29日厚生労働省告示第499号において新しく設定した基準値(暫定基準)については、網をつけて示した。
「登録有無」の欄に「○」の記載があるものは、国内で動物用医薬品として使用が認められていることを示している。
※一般的なサイズの鶏卵(黄身の割合が高いMサイズ)の卵重量を50 g(卵黄20 g+卵白30 g)として計算している。
推:推定残留濃度(0.10×0.4+0.02×0.6=0.052)を示す。

（別紙２）

ブチルヒドロキシアニソールの推定摂取量（単位：µg/人/day）

食品名	基準値案 (ppm)	国民全体 (1歳以上) TMDI	幼小児 (1～6歳) TMDI	妊婦 TMDI	高齢者 (65歳以上) TMDI
豚の筋肉	0.03	4.2*	3.3*	4.3*	3.1*
豚の脂肪	0.1				
豚の肝臓	0.04	0.0	0.0	0.0	0.0
豚の腎臓	0.05	0.0	0.0	0.0	0.0
豚の食用部分	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0
鶏の筋肉	0.02	0.9*	0.7*	1.0*	0.7*
鶏の脂肪	0.05				
鶏の肝臓	0.02	0.0	0.0	0.0	0.0
鶏の腎臓	0.02	0.0	0.0	0.0	0.0
鶏の食用部分	0.05	0.1	0.1	0.1	0.1
鶏の卵	0.06	2.5	2.0	2.9	2.3
魚介類（さけ目魚類に限る。）	0.5	5.3	2.7	2.0	6.1
魚介類（うなぎ目魚類に限る。）	0.5	0.9	0.2	0.7	1.1
魚介類（すずき目魚類に限る。）	0.5	17.0	7.3	10.2	21.2
魚介類（その他の魚類に限る。）	0.5	13.7	6.2	7.8	18.6
計		44.5	22.4	29.0	53.1
ADI 比（%）		0.2	0.3	0.1	0.2

TMDI：理論最大１日摂取量（Theoretical Maximum Daily Intake）
TMDI試算法：基準値案×各食品の平均摂取量
＊ 各部位のうち最も高い基準値を用いた。

（参考）

これまでの経緯

平成１７年１１月２９日	残留基準告示
平成２４年　８月２１日	厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに残留基準設定に係る食品健康影響評価について要請
平成３０年　１月３０日	食品安全委員会委員長から厚生労働大臣あてに食品健康影響評価について通知
平成３０年１１月１２日	薬事・食品衛生審議会へ諮問
平成３０年１１月１３日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

● 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会

［委員］

○穐山　浩	国立医薬品食品衛生研究所食品部長
石井　里枝	埼玉県衛生研究所副所長（兼）食品微生物検査室長
井之上　浩一	立命館大学薬学部薬学科臨床分析化学研究室准教授
折戸　謙介	麻布大学獣医学部生理学教授
魏　民	大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学准教授
佐々木　一昭	東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門准教授
佐藤　清	元　一般財団法人残留農薬研究所理事
佐野　元彦	東京海洋大学海洋生物資源学部門教授
永山　敏廣	明治薬科大学薬学部特任教授
根本　了	国立医薬品食品衛生研究所食品部第一室長
二村　睦子	日本生活協同組合連合会組織推進本部長
宮井　俊一	一般社団法人日本植物防疫協会技術顧問
由田　克士	大阪市立大学大学院生活科学研究科公衆栄養学教授
吉成　浩一	静岡県立大学薬学部衛生分子毒性学分野教授

（○：部会長）

答申（案）

ブチルヒドロキシアニソール

食品名	残留基準値 ppm
豚の筋肉	0.03
豚の脂肪	0.1
豚の肝臓	0.04
豚の腎臓	0.05
豚の食用部分注1)	0.1
鶏の筋肉	0.02
鶏の脂肪	0.05
鶏の肝臓	0.02
鶏の腎臓	0.02
鶏の食用部分	0.05
鶏の卵	0.06
魚介類（さけ目魚類に限る。）	0.5
魚介類（うなぎ目魚類に限る。）	0.5
魚介類（すずき目魚類に限る。）	0.5
魚介類（その他の魚類注2)に限る。）	0.5

ブチルヒドロキシアニソールは食品添加物としても使用されていることから、食品衛生法第11条違反の判断の際には、食品添加物の使用履歴について十分に確認すること。

注1）「食用部分」とは、食用に供される部分のうち、筋肉、脂肪、肝臓及び腎臓以外の部分をいう。

注2）「その他の魚類」とは、魚類のうち、さけ目類、うなぎ目類及びすずき目類以外のものをいう。

府　食　第　４　４　号
平成３０年１月３０日

厚生労働大臣
　加藤　勝信　殿

食品安全委員会
　委員長　　佐藤　洋

食品健康影響評価の結果の通知について

平成24年８月21日付け厚生労働省発食安0821第16号をもって貴省から当委員会に意見を求められたブチルヒドロキシアニソールに係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法（平成15年法律第48号）第23条第２項の規定に基づき通知します。
なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

ブチルヒドロキシアニソールの一日摂取許容量を 0.5 mg/kg 体重/日とする。

別　添

飼料添加物評価書

ブチルヒドロキシアニソール

２０１８年１月

食品安全委員会

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 7

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 14
　（４）ヒト 14
　（５）代謝物 TBHQ の体内動態試験 15
　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 22
　３．遺伝毒性試験 23
　４．急性毒性試験 34
　（１）BHA に関する試験 34
　（２）TBHQ に関する試験 34
　５．亜急性毒性試験 34
　（１）180 日間亜急性毒性試験（イヌ）＜参考資料＞ 34
　（２）6 か月間亜急性毒性試験（イヌ） 35
　（３）110 日間亜急性毒性試験（豚）＜参考資料＞ 35
　（４）TBHQ に関する亜急性毒性試験 35
　６．慢性毒性及び発がん性試験 38
　（１）104 週間発がん性試験（マウス）① 38
　（２）104 週間発がん性試験（マウス）② 39

（３）96 週間慢性毒性及び発がん性試験（ラット）＜参考資料＞ 40
（４）104 週間慢性毒性及び発がん性試験（ラット） 40
（５）104 週間発がん性試験（ラット）① 41
（６）104 週間発がん性試験（ラット）② 42
（７）104 週間発がん性試験（ラット）③ ＜参考資料＞ 43
（８）104 週間発がん性試験（ラット）④ ＜参考資料＞ 44
（９）104 週間発がん性試験（ラット）⑤ ＜参考資料＞ 44
（１０）3～24 か月間発がん性試験（ラット）＜参考資料＞........................ 45
（１１）110 週間発がん性試験（ラット）＜参考資料＞ 46
（１２）104 週間発がん性試験（ハムスター）① 46
（１３）104 週間発がん性試験（ハムスター）② ＜参考資料＞ 47
（１４）1 年間慢性毒性試験（イヌ）＜参考資料＞ 48
（１５）15 か月間慢性毒性試験（イヌ） 48
（１６）TBHQ に関する慢性毒性及び発がん性試験 49
７．生殖発生毒性試験........................ 52
（１）生殖毒性試験（ラット） 52
（２）3 世代生殖毒性試験（ラット）＜参考資料＞ 53
（３）児動物の行動機能への影響（マウス）＜参考資料＞ 53
（４）発生毒性試験（ウサギ） 53
（５）発生毒性試験（豚）＜参考資料＞ 53
（６）発生毒性試験（サル）＜参考資料＞ 54
（７）TBHQ に関する生殖発生毒性試験........................ 54
８．その他の毒性試験........................ 56
（１）胃に対する BHA の影響に関する試験 56
（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........................ 61
（３）胃に対する TBHQ の影響に関する試験 64
（４）発がん性に関する促進作用又は抑制作用........................ 64
（５）酵素誘導及び遺伝子発現に関する知見........................ 68
（６）細胞毒性に関する知見 68
（７）内分泌様作用に関する知見 69
（８）免疫反応への影響........................ 71
９．ヒトにおける知見........................ 71
（１）過敏症及びアレルギーに関する知見 71
（２）胃癌に関する疫学的知見........................ 72

Ⅲ．国際機関等における評価 73
１．JECFA における評価........................ 73
２．EU における評価 73
３．国際がん研究機関（IARC）における評価 74

Ⅳ. 食品健康影響評価 75

・ 表 36 JECFA、EFSA 及び食品安全委員会における無毒性量等の比較 77
・ 別紙 1：検査値等略称 79
・ 別紙 2：代謝物略称 81
・ 参照 83

〈審議の経緯〉

2005 年 11 月 29 日 暫定基準告示（参照 1）
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
2017 年 12 月 5 日 第 676 回食品安全委員会（報告）
2017 年 12 月 6 日 から 2018 年 1 月 4 日まで 国民からの意見・情報の募集
2018 年 1 月 24 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
2018 年 1 月 30 日 第 682 回食品安全委員会（報告）
（同日付けで食品安全委員会委員長から厚生労働大臣に通知）

〈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）	（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）
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	吉田 緑
三森 国敏（委員長代理*）	吉田 緑	山本 茂貴
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

* ：2012 年 7 月 2 日から

〈食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会専門委員名簿〉

（2017 年 9 月 30 日まで）		（2017 年 10 月 1 日から）	
今井 俊夫（座長）		今井 俊夫（座長*）	
山中 典子（座長代理）		山中 典子（座長代理*）	
荒川 宜親	菅井 基行	新井 鐘蔵	下位 香代子
今田 千秋	髙橋 和彦	荒川 宜親	菅井 基行
植田 富貴子	戸塚 恭一	今田 千秋	髙橋 和彦
川本 恵子	中山 裕之	植田 富貴子	中山 裕之
桑形 麻樹子	宮島 敦子	川本 恵子	宮島 敦子
小林 健一	宮本 亨	桑形 麻樹子	山田 雅巳
佐々木 一昭	山田 雅巳	小林 健一	吉田 敏則
下位 香代子	吉田 敏則	佐々木 一昭	

*：2017 年 10 月 25 日から

〈第 119 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）

〈第 120 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）

〈第 121 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「ブチルヒドロキシアニソール」（CAS No.25013-16-5）について、JECFA、EFSA の評価書等を用いて食品健康影響評価を実施した。

評価に用いた試験成績は、薬物動態（マウス、ラット、イヌ及びヒト）、残留（豚、鶏、にじます、こい及びあゆ）、遺伝毒性、急性毒性（マウス及びラット）、亜急性毒性（イヌ及び豚）、慢性毒性及び発がん性（マウス、ラット、ハムスター及びイヌ）、生殖発生毒性（マウス、ラット、ウサギ、豚及びサル）、胃に対する影響（マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、モルモット及びサル）に関する試験等の成績である。

遺伝毒性については、ブチルヒドロキシアニソール（BHA）及びその代謝物である *tert*-ブチルヒドロキノン（TBHQ）等は染色体異常誘発性を有すると考えられたが、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間接的な影響によるものであり、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を示さないと考えたことから、BHA の一日摂取許容量（ADI）を設定することは可能であると判断した。

発がん性については、BHA を投与したげっ歯類の前胃に認められた発がん性はげっ歯類に特異的なものであり、ヒトとの関連性はないと判断した。

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ほかには、ラットで慢性間質性腎炎並びにイヌで体重増加抑制及び肝細胞変性があった。

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及び行動への影響）がみられたが、催奇形性はみられなかった。

各種毒性試験の結果、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 に安全係数 100 を適用し、BHA の ADI を 0.5 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：ブチルヒドロキシアニソール

英名：Butylated Hydroxyanisole

３．化学名

IUPAC

英名：2(3)-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole　　（参照 2）

CAS (No. 25013-16-5)

英名：(1,1-Dimethylethyl)-4-methoxyphenol　（参照 2）

４．分子式

$C_{11}H_{16}O_2$　（参照 2）

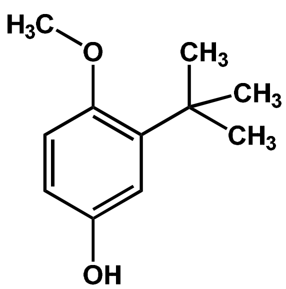
５．分子量

180.25　　（参照 2）

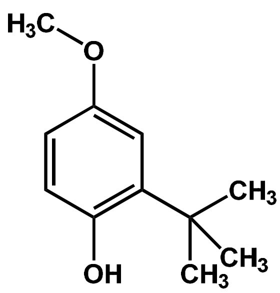
６．構造式

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）

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 及び 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。このほかに、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、カロテン、動物性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150g以下[1]と規定されている。（参照3～9）

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

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）

[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。

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）マウス

マウス[3]（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/kg 体重）し、体内動態試験が実施された。投与 48 時間後までの血液、肝臓、腎臓、胃及び腸管並びに排泄物中 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 体重投与群では、投与 30 分後の血液、肝臓及び腎臓に高濃度の 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%及び硫酸抱合体 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）

---

3 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。

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-^{14}C]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%、糞には 53%が排泄された。（参照 3、13）

ラット（F344 系、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。動物にはメトキシ基又は *tert*-ブチル基を ^{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。

尿、糞及び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、糞及び呼気に排出された。（参照 3）

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、糞及び呼気中排泄率（%）

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
	tert-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
	tert-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 ^{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 によって同定した上で、酵素での加水分解による更なる性状解析及び同定を実施した。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。

2-BHA を投与した動物の尿の主な代謝物は、2-BHA のグルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体並びに TBHQ の硫酸抱合体であった。糞便には未変化体の 2-BHA がみられた。

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り、その他に少量の TBHQ の硫酸抱合体がみられた。糞には、3-BHA の未変化体及びグルクロン酸抱合体のほかに、少量の TBHQ 及びその硫酸抱合体並びに diBHA がみられた。（参照 3、14）

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
	tert-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
	tert-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-^{14}C]又は[methyl-^{14}C]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-^{14}C]若しくは[methyl-^{14}C]標識 3-BHA 又は[butyl-^{14}C]標識 2-BHA を単回強制経口投与（1 g/kg 体重）した。それぞれの群を、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、前胃の上皮への結合に代謝活性化は関与せず、DNA 及び RNA への結合は認められなかった。（参照 3）

ラット（SD 系、雌 3 匹）に ^{14}C 標識 3-BHA を単回強制経口投与（0.11 mmol(0.020 g)/匹）した。投与 24 時間後に採取した前胃、腺胃及び肝臓からミクロソームを精製し、ミクロソーム中タンパク質に結合した放射活性物質量を測定した。

前胃、腺胃及び肝臓に結合した放射活性物質量は、^{14}C 標識 3-BHA に換算するとそれぞれ 0.07、0.005 及び 0.006 nmol eq/mg タンパク質であり、前胃の結合放射活性量は腺胃の 14 倍、肝臓の 12 倍であった。

また、*in vitro* の試験において、TBQ 又は BHA-o-O を NADPH 又は NADH と反応させたところ、NADPH 又は NADH の酸化がみられた。試験系にラットの肝臓から抽出した酵素は含まれていなかったことから、この酸化は酵素が関与するものではなく直接的な化学反応と考えられた。（参照 15）

ラット（F344 系、雄、匹数不明）に ^{14}C 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。^{14}C 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のタンパク質への結合率は、静脈内投与と

比較して、54 倍高かった。（参照 3）

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、おおよそ一定であった（肝臓約 12、血清約 60、胎児約 1.3～1.8）。（参照 3、16）

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 17）

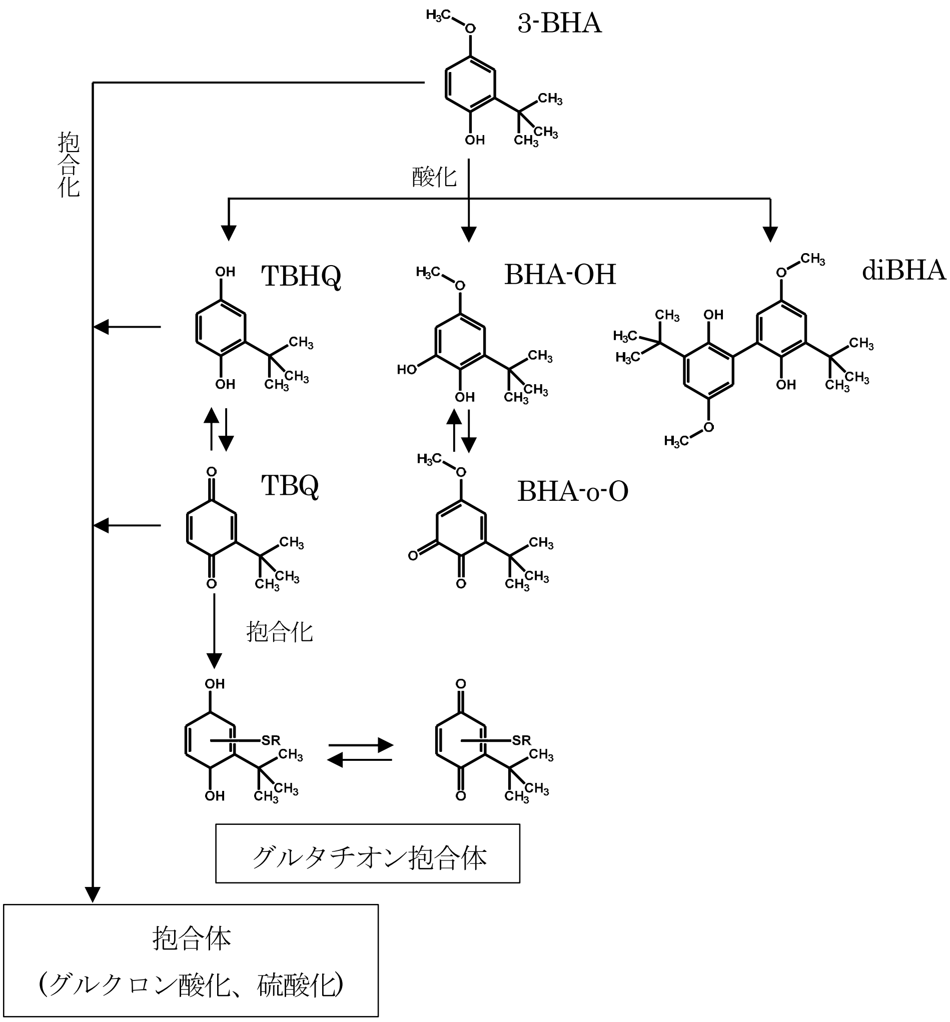


図１　ラット体内における 3-BHA の推定代謝経路（参照 17 の改変）

（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-^{14}C]標識 BHA を単回腹腔内投与（5 mg eq/kg 体重）し、全身、血液、尿、糞及び数種類の組織（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%が尿から、15～30%が糞から回収された。

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、18）

（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 時間後まで採取し、尿は投与開始 1、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[4]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/人）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。

尿での BHA の回収率は、投与 1 日後では 52 ± 16%、投与 8 日後では 75 ± 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 ± 3.1%及び 13.0 ± 3.9%であった。BHA 及び TBHQ 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、19）

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
$AUC_{0\sim4h}$ (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[5]（15、48、92、383、380 又は 400 mg/kg 体重[6]）した。尿及び糞を毎日採取した。試験期間の終わりに、血液、肝臓、腎臓、脳、消化管並びに腎臓周囲、大網及び皮下脂肪を採取した。

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。

---

[4] 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。
[5] 経口投与と推察される。
[6] 用量の記載は、参照 20 のとおりである。

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 体重を超える投与群では検出されなかった。（参照 20）

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

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 及び 0.06～0.37 mg eq/g(湿重量)であった。（参照 10、20）

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、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。

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 時間後に回復した。

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。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。200 mg/kg 体重以上投与群では、投与量の約 33%が尿ではなく、糞から回収された。

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%であったが、より高用量を投与すると排泄は低下し、400 mg/kg 体重投与群では 2%であった。

他に主要な代謝物はみられなかった。（参照 20）

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%）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、20 か月後及び剖検時に 5 匹から採取した。剖検時に腎臓周囲、大網及び皮下脂肪を採取し、性別及び用量ごとにプールした。

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*-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 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。

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*-硫酸抱合体であり、*O*-グルクロン酸抱合体はほぼみられなかった。

ごく微量の TBHQ が血清及び脂肪に検出された。（参照 20）

妊娠ラット（SD 系、48 週齢、匹数不明）[7]に、帝王切開の前日に ^{14}C 標識 TBHQ を単回経口投与（40 mg/kg 体重）し、尿及び糞を帝王切開時（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 時間の尿から投与量の約 74%が回収された。

---

[7] 生殖発生毒性試験の F_2 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。

投与後 7.6 時間の消化管から投与量の 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。

本試験の結果に基づいて、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%にばく露され、またより高濃度の抱合体にばく露されることになると推測された。（参照 10、20）

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 20）

ラット（F344 系、雄）に ^{14}C 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 ^{14}C 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 20）

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。

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 20）

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、13 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 か月後に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 20）

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。① TBHQ 150 mg を含むゼラチンカプセル、②2% TBHQ を含有するコーン油及び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、TBHQ、2%綿実油及び 2%粉砂糖の混合物 20 g（TBHQ 投与量は 20～70 mg）。投与物の摂取直後に①～③でミルクを摂取し、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 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 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 20）

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 20、21）

好気的条件、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 及び 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（O_2-˙）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 20、22）

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 並びに 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 20）

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 の含硫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、尿排泄の前には更に代謝される。TBHQ の含硫代謝物が腎臓及び膀胱に対する 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 20）

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[8])）し、投与開始 6 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、脂肪及び小腸を採材し、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）。

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、脂肪においては最終投与 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 23）

---

[8] 参照 23 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。
[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。

表 7　豚における 3-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 23 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」と記載した。

（２）鶏

鶏（肉用種、初生雛、雌 10 羽/時点(投与開始 4 週後のみ 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[10])）し、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 又は HPLC によって組織中 BHA 濃度を測定[11]した（検出限界：GC-MS 0.025 μg/g、HPLC 0.02 μg/g）。なお、分析用試料として、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、2 試料を作製した。

結果を表 8 に示した。

150 ppm 投与群の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。

---

[10] 参照 23 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。

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 23）

表 8　鶏における 3-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
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 又は 68 mg/羽/日相当[12])）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[13]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

12　参照 24 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。
13　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。

検出されなかった。（参照 24）

表 9　採卵鶏における 3-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[14]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 ppm 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。[15]

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 25）

[14] 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。

[15] 参照 25 のデータから算出した。

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　　<LOD：検出限界(0.05 μg/g)未満

３．遺伝毒性試験

BHA 及び 3-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 及び 12 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
in vitro	復帰突然変異試験	*Salmonella typhimurium* TA1535、TA1537、TA1538	0.00375～0.0150% (w/v)	陰性	26
		S. typhimurium TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538	5～5,000 μg/plate (±S9)[a]	陰性	27
		S. typhimurium TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538	10～1,000 μg/plate (±S9)	陰性	26
		S. typhimurium TA98、TA100	1～100 μg/plate (±S9)	陰性	28
		S. typhimurium TA97、TA100、TA102、TA104	1～1,000 μg/plate (±S9)[b]	陰性	3、29
		S. typhimurium TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538	1～100 μg/plate (±S9)	陰性	3、30

		S. typhimurium TA97、TA98、TA100、TA102	0.5～100 μg/plate (－S9)[a] 1～250 μg/plate (＋S9)[a]	陰性	3、31
		S. typhimurium 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	32
		Saccharomyces cerevisiae D7	50～200 μg/mL (－S9、4 時間ばく露) 50～150 μg/mL (＋S9、4 時間ばく露) 1～100 μg/mL (－S9、24 時間ばく露)	陰性	3、33
	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 (*hprt* 座位)	18～54 μg/mL (±ラット又はハムスター由来の S9)	陰性	3、34
		ラット肝上皮細胞 (*hprt* 座位)	60～90 μg/mL (－S9)[a]	陰性	3、30
		Staphylococcus aureus W46	12.5、25 μg/mL (－S9)	陽性	3、35
		S. cerevisiae D4	0.0625 ～ 0.2500% (w/v)	陰性	26
	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	26
		CHL 細胞	～0.03 μg/mL (－S9)	陰性	26、36
		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	26、37
		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、38
			25～500 μM (+S9)	陽性 (50～250 μM、＋S9)	
			62～250 μM (+ラット肝ミクロソーム、±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	陽性 (0.125 mg/mL、+S9)	3、31

			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]		
		CHO細胞	62.5～750 µM（±S9、8又は24時間培養）[a] 33.1～662 µM（+S9(±カタラーゼ)、8又は24時間培養）[a]	陽性 (331 µM、+S9(−カタラーゼ)、24時間)	3、39
	不定期DNA合成(UDS)試験	ラット肝初代培養細胞(雄)	0.01～5.0 µg/mL[a]	陰性	3、30
	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	1×10^{-6}～1×10^{-4} mol/L（−S9）	陰性	26、37
		CHL V79細胞	18～54 µg/mL（±S9）	陰性	3、34
		CHO細胞	5～500µg/mL（±S9）[a]	陰性	3、30
	遺伝子変換試験	*S. cerevisiae* D7	50～200 µg/mL（−S9、4時間ばく露） 50～150 µg/mL（+S9、4時間ばく露） 1～100 µg/mL（−S9、24時間ばく露）	陰性	33
	DNA損傷試験 (8-oxodG検出)	deoxyguanosine	～0.08 mM (37℃、17時間培養)	陰性	40
	DNA損傷試験 (DNAの生物学的不活化試験)	φX-174 DNA（一本鎖）	0.1 mM (37℃、30時間処理)	陰性	
	宿主経由試験	*S. typhimurium* TA1530、G46 マウス(ICR Swiss系、雌雄不明)	15～1,500 mg/kg体重	陰性	26
		S. cerevisiae D3 マウス(ICR Swiss系、雌雄不明)	15～1,500 mg/kg体重	陽性	
in vivo	染色体異常試験	ラット骨髄細胞	15～1,500 mg/kg	陰性	26
	不定期DNA	マウス（B6C3F1	単回強制経口投与	陰性	3、41

	合成（UDS）試験	系、雌雄各 5 匹/群） 前胃上皮	(300 mg/kg 体重、2、4 時間処理)		
	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、41
	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、42
		ショウジョウバエ(雄)	0.01 ～ 0.15% 溶液経口投与	陰性	3、43
	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]	26
	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、骨髄	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、44
		マウス（ddY 系、雄 3 匹/群）骨髄、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))	45
	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	[*tert*-^{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、[*tert*-^{14}C]標識 2-BHA：1 g/kg 体重 単回強制経口投与	陰性	46
		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

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
in vitro	DNA 損傷試験 (8-oxodG 検出)	ヒト末梢血リンパ球	10～100 μM (50 時間培養)	陽性 (100 μM)	3、47
in vivo	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	単回強制経口投与 (およそ 220 mg/kg 体重相当)	陰性	3、17
	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、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、48
	DNA 付加体形成試験	ラット（F344 系、雄 6 匹/群) 前胃	単回又は 5 日間反復強制経口投与 (1,000 mg/kg 体重/日)	陰性	3、49

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
in vitro	復帰突然変異試験	*S. typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538	～5.0 μg/mL (TA1535)、～15 μg/mL (TA1537) ～50 μg/mL (TA98、TA100、TA1538)	陰性	10、20
		S. typhimurium TA98、TA100、TA1535、TA1537、TA1538	～450 μg/plate (－S9) ～2,700 μg/plate (＋S9)	陰性	10、20
		S. typhimurium TA97、TA100、TA102、TA104	1～1,000 μg/plate (±S9)[a]	陰性	10、20、29
		S. typhimurium 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、20、32
		S. typhimurium TA97 、 TA98 、TA100、TA102	0.5～100 μg/plate (－S9) 5～1,000 μg/plate (＋S9)[b]	陰性	10、20、31
		S. cerevisiae D7	100～500 μg/mL (－S9) 50～200 μg/mL (＋S9)	陰性	10、20、33
	遺伝子突然変異試験	マウスリンパ腫細胞	～31.3 μg/mL (±S9)	陽性 (+ S9)	10、20

		L5178Y（$Tk^{+/-}$）			
		CHO 細胞（*hprt* 座位）	～6 μg/mL (－S9) ～250 μg/mL (＋S9)	陰性	10、20
		CHL V79 細胞（*hprt* 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、20、33
	染色体異常試験	CHL V79 細胞	～330 μg/mL (±S9)	陽性 (－S9)	10、20
		CHO 細胞	100～335 μM (－S9、高細胞密度) 15～62 μM (－S9、通常の細胞密度)	陽性 (150～335 μM、高細胞密度) (31、62 μM、通常の細胞密度)[d]	10、20、38
		CHO 細胞	5～25.2 μg/mL (－S9) 100.5～300 μg/mL (＋S9)	陽性[e] (+ S9)	10、20
		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 (±S9、6 時間処理後 18 時間培養)	陰性 陽性 (＋S9)	10、20、31
	小核試験	CHL V79 細胞	120～720 μM (－S9)	陽性	10、20、50
			720 μM (単独、±カタラーゼ又は＋グルタチオン)	TBHQ により増加した小核の減少[f]	
	遺伝子転換試験	*S. cerevisiae* D7 (*trp5* 座位)	100～500 μg/mL (－S9) 50～200 μg/mL (＋S9)	陰性	10、20、33
	姉妹染色分体交換試験	CHO 細胞	0.5～16.7 μg/mL (－S9) 5～166.7 μg/mL (＋S9)	陽性[g] (＋S9)	10、20
		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、20、33
	DNA 損傷試験 (8-oxodG 検出)	deoxyguanosine	～0.1 mM (37℃、17 時間処理)	陽性[i]	10、20、40
		ヒト末梢血リンパ球	10～100 μM (37℃、50 時間処理)	陽性[j]	10、20、47
		子牛胸腺 DNA	10^{-6}～10^{-2} M (37℃、1 時間処理、±$CuCl_2$)	陽性[k]	10、20、51
		ラット肝細胞 (F344 系、雌由来)	10 及び 50 μM (37℃、1 時間処理)	陽性[l]	10、52
	DNA 鎖切断試験	φX-174 RF I DNA(二本鎖)	1～100 μM (± Cu(II)、37℃、30 分処理)	陽性[m] (＋Cu(II))	10、52

	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	53
	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)	φX-174 DNA (一本鎖)	0.1 mM (37℃、30 時間)	陽性	40
in vivo	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、20
		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、20、54
		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、20
		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、20
		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)[q]	陰性	10、20
	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、20
	姉妹染色分体交換試験	マウス骨髄細胞 (Swiss 系、雄 20 匹/群)	腹腔内投与 (0.5～200 mg/kg 体重)[s]	陽性	10、20、55
	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、17

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 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みられた。
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。
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。
d：カタラーゼによって染色体異常細胞数は減少した。
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。
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

ルタチオンによって減少した。
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）がみられた。
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。
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酸、デスフェリオキサミンメシル酸塩及び Fe^{3+}によって抑制されたが、Fe^{2+}で促進された。
j：アセチルサリチル酸（0.0004%）によって抑制された。
k：$CuCl_2$ によって促進され、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よって抑制され、$FeCl_2$、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しなかった。
l：BCS 及びネオクプロインによって抑制された。
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。
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。
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%だった。
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%だった。
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。
r：着床後胚損失率に用量相関性がみられなかった。
s：参照 55 の用量設定の根拠から、体重当たりの用量と判断した。

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	*S. typhimurium* TA97、TA98、TA100、TA102	0.05～10 μg/plate (－S9) 2.5～500 μg/plate (＋S9)[a]	陰性	3、31
		S. typhimurium TA98、TA100	10～200 μg/plate (±S9)[b]	陰性	3、56
		S. typhimurium TA98、TA100	10～100 μg/plate (±S9)[c]	陰性	3、57
	染色体異常試験	CHO 細胞	2.5～7.5 μM (－S9)	陽性	38
		CHL 細胞	0.0015～0.003 mg/mL (－S9、24 時間処理) 0.002～0.003 mg/mL (－S9、48 時間処理) 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、31
	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、47
		deoxyguanosine	～0.08 mM (37℃、17 時間培養)	陰性	40
	DNA 損傷試験 (DNA の生物学的不活化試験)	φX-174 DNA (一本鎖)	0.1 mM (37℃、30 時間処理)	陰性	40
in vivo	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 日間強制経口投与(125 mg/kg 体重/日)	陰性	3、49
	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	単回強制経口投与 (0.00001～0.1 %、投与 3 時間後採取)	陽性	3、17

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。
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
in vitro	復帰突然変異試験 (Ames 試験)	*S. typhimurium* TA98、TA100	10～300 μg/plate (±S9)[a]	陰性	3、56
	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、31
in vivo	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	単回強制経口投与 (0.01～0.1 %、投与 3 時間後採取)	陽性	3、17
	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、49

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
in vitro	復帰突然変異試験 (Ames 試験)	*S. typhimurium* TA97 、 TA98 、TA100、TA102	25～5,000 μg/plate (±S9)	陰性	3、31
	染色体異常試験	CHL 細胞	0.1～0.2 mg/mL (－S9、24 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)	陰性	3、31

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
in vitro	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、31

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
in vitro	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、31

【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。[16]（参照 58）

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）は陽性であったが、*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。

代謝物 TBHQ については、*in vitro* の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、*in vivo* の染色体異常試験及び小核試験で陽性であったが、*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 virto* 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 及び 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た。

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及び BHA は体内で代謝され、キノン化合物が生成する（参照 17）ことから、BHA 及

[16] 参照 58 が講演要旨であり、用量等の詳細データがないことから、参考資料とした。

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間接的な影響と考えられた。

食品安全委員会は、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を示さないと考えた。

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。

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、59
	不明	経口	1,500～1,700	3
ラット	不明	経口	2,200～5,000	3、59
	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。

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	20
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時間までは続かなかった。

５．亜急性毒性試験

（１）180日間亜急性毒性試験（イヌ）＜参考資料[17]＞

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又は303/269 mg/kg体重/日相当[18])）し、亜急性毒性試験が実施された。

[17] 試験の検査項目が特殊であることから、参考資料とした。
[18] 参照62のデータから体重1 kg当たりのBHA摂取量を算出した。

1.3%投与群では、摂餌量及び体重増加量が減少した。また、両投与群で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では、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、胃及び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 60、61、62）

（２）6 か月間亜急性毒性試験（イヌ）

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又は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みられなかった。

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60、61、63）

食品安全委員会は、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[19]＞

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。

3.7%投与群で体重増加量の有意な低下がみられた。肝臓及び甲状腺の絶対及び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わたって、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、64）

（４）TBHQ に関する亜急性毒性試験

①　13 週間亜急性毒性試験（マウス）

マウス（B6C3F1 系、雌雄各 10 匹/群）に TBHQ を 13 週間混餌投与（0、2,500、5,000、10,000、20,000 又は 40,000 mg/kg 飼料(雄/雌：0/0、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

[19] 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。

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程度であったが、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 20）

② 6 か月間亜急性毒性試験（ラット）

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

増加がみられたことを除き、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）投与群の雄の精巣及び肝臓並びに 50 mg/kg 飼料以上投与群（加熱油）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 20）

③ 13 週間亜急性毒性試験（ラット）

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、更に離乳後 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、用量相関性がなく、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 週後には 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巣の相対重量が、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 飼料投与群の雌雄にみられた。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、雌でそれぞれ 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。腎臓の鉱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 20）

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

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[20])）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。扁平上皮がんの発生は両投与群にはみられなかった。（参照 3、65）

食品安全委員会は、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。

[20] 参照 3 に記載されている体重 1 kg 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（匹）

添加量 (%)	生存動物数 [a]	前胃の病変		
		過形成	乳頭腫	扁平上皮がん
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

マウス（$B6C3F_1$ 系、雄 150 匹/群）に BHA を 104 週間混餌投与（0、0.5 又は 1%(0、約 750 又は約 1,500 mg/kg 体重/日相当[21])）し、発がん性試験が実施された。投与開始 8 週以降 8 週ごとに各群 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。

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 及び 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、また扁平上皮がんは投与 88 週では両投与群、96 週では 1%投与群でみられ、これらの扁平上皮がん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）

食品安全委員会は、0.5%以上投与群において前胃の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。

[21] 参照 3 に記載されている体重 1 kg 当たりの用量

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(匹)

添加量 (%)	生存動物数 [a]	前胃の病変		
		過形成	乳頭腫	扁平上皮がん
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（$p<0.05$）

（３）96 週間慢性毒性及び発がん性試験（ラット）＜参考資料[22]＞

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、有意に高かった。また、そのほかにみられた腫瘍は、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）、腎がん 1 例（0.2%投与群の雌）、腺胃腺がん 1 例、甲状腺腺腫 1 例並びに精巣間細胞腫 1 例（0.04%投与群の雄）であった。（参照 67）

（４）104 週間慢性毒性及び発がん性試験（ラット）

ラット（F344 系、雌雄各 50～52 匹/群）に BHA を 104 週間混餌投与（0、0.5 又は 2%(雄/雌：0/0、98/108 又は 414/474 mg/kg 体重/日相当[23])）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 無添加飼料を給餌した後、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%投与群の雌雄は対照群と比べて約 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

---

[22] 試験の用量が飼料への添加濃度で記載されており、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。
[23] 参照 69 に記載されている体重 1 kg 当たりの用量を記載した。

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及び心臓の相対重量の有意な増加が認められた。
投与群で、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がんがみられ、その発生頻度は有意に増加した（表 23）。扁平上皮がんの初発は 2%投与群の雄及び雌でそれぞれ 59 及び 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。扁平上皮がんでは高分化型及び低分化型がみられた。（参照 3、60、68、69）
食品安全委員会は、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及び腎臓に病変がみられた動物数（匹）

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	扁平上皮がん	
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

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がんがみられ、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に有意な差はみられなかった。（参照 3、70）

食品安全委員会は、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（匹）

添加量（%）	生存動物数[a]	前胃の病変		
		過形成	乳頭腫	扁平上皮がん
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

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[24])）し、発がん性試験が実施された。

各群の投与 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がんの発生もみられた。（参照 3、65）

食品安全委員会は、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。

[24] 参照 3 に記載されている体重 1 kg 当たりの用量

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（匹）

添加量（%）	生存動物数 a	前胃の病変		
		過形成	乳頭腫	扁平上皮がん
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）

（７）104 週間発がん性試験（ラット）③　＜参考資料[25]＞

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 週ごとに各群 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%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%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。

扁平上皮がんは、2%投与群のみでみられ、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がん 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 60、66）

表 26　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（匹）

添加量（%）	生存動物数 a	前胃の病変		
		過形成	乳頭腫	扁平上皮がん
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：がん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）

[25] 試験の用量が飼料への添加濃度で記載されており、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。

（８）104 週間発がん性試験（ラット）④　＜参考資料[26]＞

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[27])）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、腺腫及びがん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、71）

（９）104 週間発がん性試験（ラット）⑤　＜参考資料[28]＞

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[29])）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。

扁平上皮がんの発生頻度は系統によって異なっていた。（参照 3、72）

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 (匹)

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		
				扁平上皮がん	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（$p<0.001$）

[26] １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] １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

（１０）3～24 か月間発がん性試験（ラット）<参考資料[30]>

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[31]）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、前胃のほかに、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（labelling index）[32]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 匹に[methyl-^{3}H]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、無添加飼料への切替え時及び投与開始 15 か月後に各群 6 匹の標識率を測定した。

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 例にがんがみられた。

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 細胞腺腫又はがん及び濾胞細胞腺腫又はがんがみられたが、その発生頻度に BHA 投与の明らかな影響はみられなかった。

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った（投与群/対照群：2.24～5.42）。しかし、無添加飼料への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、73）

---

30 1 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 1 kg 当たりの用量
32 ある特定の物質を動物に投与し、免疫組織学的染色等によって測定した器官中の細胞数及び増殖割合。

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の前胃に病変がみられた動物数（匹）

投与期間(か月間)		動物数		前胃の病変							
				過形成	基底細胞の増殖		表皮嚢胞	粘膜皺襞	偽粘膜皺	乳頭腫	がん
BHA添加	無添加	開始時	終了時		粘膜固有層	粘膜下組織					
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

（１１）110 週間発がん性試験（ラット）＜参考資料[33]＞

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[34])）し、発がん性試験が実施された。

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、膵臓の順に高かったが、対照群との違いはみられなかった。（参照 3、74）

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（匹）

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

（１２）104 週間発がん性試験（ハムスター）①

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 又は 2%(0、約 1,200 又は約 2,400 mg/kg 体重/日相当[35])）し、発がん性試験が実施された。

各群の投与 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

---

[33] 1 用量の試験であることから、参考資料とした。
[34] 参照 3 に記載されている体重 1kg 当たりの用量
[35] 参照 3 に記載されている体重 1 kg 当たりの用量

した。
1%投与群の 1 例に扁平上皮がんがみられたが、2%投与群にはみられなかった。（参照 3、65）
食品安全委員会は、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（匹）

添加量 (%)	生存動物数[a]	前胃の病変		
		過形成	乳頭腫	扁平上皮がん
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（$p<0.01$）

（１３）104 週間発がん性試験（ハムスター）② ＜参考資料[36]＞
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 週間ごとに各群 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 週及び 104 週に検査した。
投与 8～104 週に両投与群の全動物に前胃の過形成がみられた。対照群においても 56 週まではみられなかったが、56～80 週に 10%の動物にみられた。
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。
扁平上皮がんは、64 週目から両投与群でみられた。扁平上皮がんは、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がん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 60、66）

[36] 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。

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（匹）

添加量 (%)	生存動物数 [a]	前胃の病変		
		過形成	乳頭腫	扁平上皮がん
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：がん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[37]＞

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、血液学的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 26、75）

（１５）15 か月間慢性毒性試験（イヌ）

イヌ（コッカースパニエル種、離乳直後、雌雄、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/日投与群でみられたが、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。

尿検査では、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、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 26、76）

食品安全委員会は、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

37 供試した動物数が少ないことから、参考資料とした。

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）TBHQ に関する慢性毒性及び発がん性試験

① 104 週間慢性毒性及び発がん性試験（マウス）

マウス（B6C3F$_1$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。

中間検査においては、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・がん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、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・がんの発生頻度が有意に高かったが、肝細胞腺腫・がん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 及び 5/54）であったが、その発生頻度の差は有意でなく、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 及び 24/54 であったが、重篤度は対照群と同程度であった。過形成病変は中間検査においてはみられなかった。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、20）

② 20 か月間慢性毒性試験（ラット）

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、死亡率は対照群と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も、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、20）

③　30か月間慢性毒性及び発がん性試験（ラット）

ラット（F344/N系、雌60匹/群；F_0世代）にTBHQを雄との交配2週間前からF_1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F_1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（0、1,250、2,500及び5,000 ppm：24/60、27/60、33/57及び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がん（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、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、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は対照群と投与群とで同程度であった。対照群ではみられなかったC細胞がん及び濾胞細胞がんが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、有意な差ではなかった。雌では甲状腺腺腫及びがんの発生頻度は対照群と投与群とで同様であった。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細胞がん及び濾胞細

胞がんの発生頻度は、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細胞がん及び濾胞細胞がんは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及び雌の乳腺線維腺腫、腺腫又はがん（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 投与群のみで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、嚢腫（0、1,250、2,500 及び 5,000 ppm：2/60、3/60、7/58 及び 11/60 例）及び化膿性炎症（0、1,250、2,500 及び 5,000 ppm：9/60、8/60、9/58 及び 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（0、1,250、2,500 及び 5,000 ppm：1/60、1/60、3/57 及び 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嚢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、20）

④ 117 週間慢性毒性試験（イヌ）

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、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、同群の雌の Hb が 26 及び 112 週で対照群より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、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。RBC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でも、細胞構造の異常はみられなかった。投与群の肝細胞における小胞体増加もみられなかった。臓器重量は過去のデータ範囲内であること及び臓器に病理組織学的所見はみられなかったことから、臓器重量の変化は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、Ht及び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、20)

7．生殖発生毒性試験

（1）生殖毒性試験（ラット）

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並びに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、26)

食品安全委員会は、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[38]＞

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 体重/日、LD_{50} の 1/5 量に相当）し、3 世代生殖発生毒性試験を実施した。F_1 及び F_2 世代に 6 か月間混餌投与した。BHA について、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 26）

（３）児動物の行動機能への影響（マウス）＜参考資料[39]＞

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。

帰巣反応（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)

（４）発生毒性試験（ウサギ）

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。

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、26)

食品安全委員会は、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[40]＞

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

---

[38] 用量の詳細が不明であることから、参考資料とした。
[39] 試験の詳細が不明であることから、参考資料とした。
[40] 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。

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について、対照群に比べて著しい影響がみられた。

肝臓及び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）

（６）発生毒性試験（サル）＜参考資料[41]＞

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 又は 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。）にわたって実施された。血液生化学的検査を 1 か月ごとに実施し、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 日並びに分娩後 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の一般状態に異常はみられなかった。母動物はその後も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）

（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）

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 F_2 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、出産率並びに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} 世代においてはみられなかった。

F_0 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。

---

[41] BHA 及び BHT の混合物の投与であり、1 用量の試験であることから、参考資料とした。

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 週後までの死亡率（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 20）

② 生殖毒性試験（ラット）(a)

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、生殖毒性試験が実施された。

F_0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、母動物は無添加飼料を与える群と添加飼料を継続して与える群に分けられた。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 例及び対照群 1 例、投与 6 日以降：各投与群の雄 1 例及び対照群の雌 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、出生時死亡率並びに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ものである可能性がある。（参照 20）

③ 生殖毒性試験（ラット）(b)

ラット（F344/N 系、雌 16 匹）に TBHQ を交配前 2 週間からF_1児動物の離乳まで混餌投与（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児の離乳時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。

F_1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 20）

④　発生毒性試験（ラット）

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。

各投与群の TBHQ の総投与量は 970、1,880 又は 3,600 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、投与群と対照群と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付けられた。（参照 20）

⑤　*in vitro* の発生毒性に関する試験

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 20）

８．その他の毒性試験

（１）胃に対する BHA の影響に関する試験

①　28 日間投与毒性試験（マウス）＜参考資料[42]＞

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60、61）

②　2 週間投与毒性試験（ラット）

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、試験が実施された。BHA 無添加の対照群のほかに、2%投与群と同量の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。

各組織における標識率は、2%BHA 投与群の前胃、腺胃、小腸及び結腸/直腸においては無添加対照群及び制限給餌対照群に比べて有意に高く、食道においては制限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。前胃に加えて、食道、腺胃、小腸及び結腸/直腸も BHA の細胞増殖増強効果の標的組織になり得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加していた。（参照 3）

42　1 用量の試験であることから、参考資料とした。

食品安全委員会は、2%投与群の前胃、腺胃、小腸及び結腸/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を飼料添加濃度として1.0%（500 mg/kg体重/日相当）と判断した。

③　9又は27日間投与毒性試験（ラット）

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、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、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し、前胃の扁平上皮の標識体取り込みを調べた。

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。

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、不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。投与開始27日後には、肥厚は6倍に拡大しており、前胃-胃底部境界縁周辺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日後には、標識率は前胃後部（pre-fundic region）でおよそ8倍に増加していた。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倍に増加したにすぎなかったが、前胃後部での肥厚は12倍以上に増加していた。前胃中部では、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の影響に意義のある違いはみられなかった。

ANSパネルは、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、60、77）

食品安全委員会は、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。

④　4週間投与毒性試験（ラット）＜参考資料[43]＞

ラット（F344系、雄、5匹/群）にBHA（粉末状）を4週間混餌投与（2%(1,000 mg/kg体重/日相当)）し、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みられた。（参照3、60）

[43] 1用量の試験であることから、参考資料とした。

⑤　4 週間投与毒性試験（ラット）＜参考資料[44]＞

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、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 当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及び大きさの用量依存的な増加並びに標識率の有意な増加がみられた。（参照 3）

⑥　10 週間投与毒性試験（ラット）＜参考資料[45]＞

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(LD_{50} の 1/5 量相当)）し、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 26）

⑦　3 か月間投与毒性試験（ラット）＜参考資料[46]＞

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%に前胃の過形成が、26%に乳頭腫が、6%にがんがみられた。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、がん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60）

⑧　3 か月間投与毒性試験（ラット、肝部分切除）＜参考資料[47]＞

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。がんは 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の前胃では腫瘍がみられ、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

---

44 試験の詳細が不明なことから、参考資料とした。
45 試験の詳細が不明なことから、参考資料とした。
46 1 用量の試験であることから、参考資料とした。
47 供試動物が肝臓を部分切除した動物であり、一般的な毒性試験と異なることから、参考資料とした。

てがんがみられた。がん細胞には異型、核異型及び有糸分裂像がみられたが、分化度は高かった。

筋層及び脂肪組織へのがんの浸潤もみられた。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60）

⑨　24 週間投与毒性試験（ラット）＜参考資料[48]＞

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、特に腺胃と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間質での増殖並びに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で継続していた。検査した動物のうち3例で乳頭腫がみられた。この群で炎症、基底細胞の異形成及びがんはみられなかった。（参照60）

⑩　32 週間投与毒性試験（ラット）＜参考資料[49]＞

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、試験が実施された。

BHA 全投与群に体重増加抑制のほかに、前胃粘膜で扁平上皮の肥厚及び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60）

⑪　1～4 週間投与毒性試験（ハムスター）＜参考資料[50]＞

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

---

48 1 用量の試験であることから、参考資料とした。

49 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。

50 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。

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 61）

⑫ 16 週間投与毒性試験（ハムスター）＜参考資料[51]＞

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、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ー検査に供試した。

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り、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）

⑬ 20 週間投与毒性試験（ハムスター）＜参考資料[52]＞

ハムスター（品種不明、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%に更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60）

⑭ 5～7 日間投与毒性試験（ウサギ）＜参考資料[53]＞

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 g/匹/日）し、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 は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 26、78）

---

[51] 1 用量の試験であることから、参考資料とした。
[52] 1 用量の試験であることから、参考資料とした。
[53] 1 用量の試験であることから、参考資料とした。

⑮　28 日間投与毒性試験（モルモット）＜参考資料[54]＞

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 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 61）

⑯　85 日間投与毒性試験（サル）＜参考資料[55]＞

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 又は 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、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もみられなかった。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）の有意な上昇（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/日投与群並びに対照群で 2.64 ± 0.26%、2.89 ± 0.39%、2.19 ± 0.11%）。（参照 3）

（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

①　1、2 又は 4 週間投与毒性試験（ラット）＜参考資料[56]＞

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並びに軽度の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及び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、主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明らかな増加がみられた。

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 61）

---

54 試験の詳細が不明であることから、参考資料とした。
55 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。
56 1 用量の試験であることから、参考資料とした。

② 90 日間投与毒性試験（ラット）

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[57])）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%投与群でも、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 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 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、更に 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の過形成がみられ、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 試験においては 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、61、79）

食品安全委員会は、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 試験においては、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。

③ 13 週間投与毒性試験（ラット）(a) ＜参考資料[58]＞

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 又は 2%、粉末飼料）した。

2%投与群では、ほかの投与群及び対照群より摂餌量及び体重増加量が少なく、試

---

[57] 参照 3 に記載されている体重 1 kg 当たりの用量

[58] 試験の用量が飼料への添加濃度で記載されており、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。

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。^{3}H 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 61）

④ 13 週間投与毒性試験（ラット）(b)

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。標識率は、0.5%投与群においては投与開始9日後には2.5倍に、2%投与群においては投与開始91日後には5.3倍になった。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60）

ANSパネルは、0.5%以上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)

食品安全委員会は、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。

⑤ 6、12 又は 15 か月間投与毒性試験（ラット）＜参考資料[59]＞

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、噴門部付近の食道、境界縁に隣接する大弯部の前胃及び腺胃並びに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

[59] １用量の試験であることから、参考資料とした。

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 61）

（３）胃に対する TBHQ の影響に関する試験

① 4 週間投与毒性試験（ラット）

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）

② 20 週間投与毒性試験（ハムスター）

ハムスター（品種、性別及び匹数不明）に TBHQ を 20 週間混餌投与（0.5%）した。

その結果、TBHQ 投与による前胃、腺胃及び膀胱における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）

（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 の促進作用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。

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	67
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	減少	67
			肝臓等の器官の病理組織学的所見	抑制	
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]	前胃及び腺胃のがん	促進(前胃のみ)	65
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、がん	促進(乳頭腫、がん)	
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]	前胃のがん及び乳頭腫	促進	61
			膀胱の乳頭腫、乳頭状及び結節性過形成	促進	
ラット (F344 系、雄)	1,2-ジメチルヒドラジン(DMH)：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]	結腸がん	影響なし	65
ラット (F344 系、雄)	*N*-エチル-*N*-ヒドロキシエチルニトロソアミン(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]	肝臓の過形成、肝細胞がん	抑制(過形成の数及び肝細胞がん)	65
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、がん	促進(乳頭腫、がん)	65
	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、がん	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、がん	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]	膀胱がん、乳頭腫、乳頭状又は結節性過形成	促進	61
ラット(SD 系、雌)	7,12-ジメチルベンズ(a)アントラセン(DMBA)：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
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、腺がん	影響なし	65
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、腺がん	影響なし	65

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 陽性の病巣

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	20
			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	20
ラット (F344/Dulrj 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、20
			膀胱がん又は乳頭腫	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、20
			膀胱がん又は乳頭腫	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) EHEN：単回単回強制経口投与(750 mg/kg 体重) *N*-メチルベンジルニトロソアミン：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)	36 週間混餌投与(1%) (最終投与 3 日後から)[a]	結腸がん	抑制	20
			腎臓の前腫瘍性病変及び腫瘍	抑制	

	上述の投与と同時に、*N*-ジブチルニトロソアミンを 4 週週間飲水投与(0.1%)し、その後 *N*-ビス(2-ヒドロキシプロピル)ニトロソアミンを 2 週間飲水投与(0.1%)		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	

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、26、61、67）

また、TBHQ についても同様に酵素誘導の報告があり（参照 20）、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。（参照 3、80）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 20、81）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 20）

（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）

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更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、核の凝縮及び断片化、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並びに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 発現解析並びにカスパーゼ 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 及び BHT の併用による強い細胞毒性及びアポトーシスの誘発は BHA フェノキシルラジカルと BHT 又は BHT フェノキシル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とも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、細胞壊死をもたらす可能性が示された。

（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。

表 35　BHA の内分泌様作用

試験系	使用した動物等	結果	参照
in vitro	ヒト乳がん由来細胞(MCF-7)	細胞は、17β-エストラジオール(E_2)及び BHA によって増殖した。最大細胞増殖を示す濃度はそれぞれ 30 pmol/L 及び 50 μmol/L であった。BHA の作用の強さ(E_2 が最大細胞増殖を示す濃度を BHA の濃度で除した割合(%))は、0.00006%であった。BHA の最大細胞増殖の程度は、E_2 の 66.8%であった。TBHQ では増殖しなかった。 また、E_2(100 pmol/L)と同様に、BHA(50 μmol/L)はヒトエストロゲン受容体 α (ERα)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及び上昇させた。	3、82
	ヒト乳がん由来細胞(MCF-7)[a]	エストロゲン様の細胞増殖作用を示した。 E_2 及び BHA の最大細胞増殖を示す濃度は、それぞれ 30 pmol/L 及び 50 μmol/L であった。BHA の作用の強さ(E_2 が最大細胞増殖を示す濃度を BHA の濃度で除した割合(%))は、0.00006%であった。BHA の最大増殖程度の割合は、E_2 の 30%であった。	3、83、85
	ヒト前立腺がん由来細胞(組換えヒト PC-3)	5α-ジヒドロテストステロン（50 pmol/L）によるアンドロゲンレセプター活性化に対して BHA は拮抗作用を示した。50%効果濃度(EC_{50})は 7.6 μmol/L であった。	3、86
	ヒト ER 欠失骨芽細胞(U2-OS)[b]	ERα 及び ERβ に対しエストロゲン様作用を示した。 BHA の ERα 及び ERβ に対する最小効果濃度は 5.9 及び 8.4 μmol/L であった。E_2 では 0.3×10^{-6} 及び 6.6×10^{-6} μmol/L であった。E_2 の作用に対する BHA の等価係数(E_2 の EC_{10} を BHA の EC_{10} で除した数値)は ERα で 5.2×10^{-8} 、ERβ で 7.7×10^{-7} であった。また、BHA と E_2 の存在下(ERα で 5 pmol/L、ERβ で 100 pmol/L)では、BHA の作用は相加的であった。	83、87
	ヒト乳がん由来細胞(MDA-kb2)[c]	0.3～300 μmol/L の範囲において、アンドロゲン作用を示さなかった。5α-ジヒドロテストステロン（1000 pmol/L）の存在下では濃度依存性の抗アンドロゲン作用を示した。50%阻害濃度(IC_{50})は 172.5±83.48mM (平均±標準誤差)であった。	84
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 E_2 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。また、E_2 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。	3、83
	ラット	【投与】	3、83

	(SD 系、未成熟雌及び去勢雄)	(エストロゲン作用) 未成熟雌に 3 日間皮下投与(50、100、250 又は 500 mg/kg 体重/日、±E_2) (アンドロゲン作用) 去勢雄に 10 日間経口投与(50、100、250 又は 500 mg/kg 体重/日、±テストステロンプロピン酸エステル) 【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、E_2 の刺激による子宮及び膣重量の増加が抑制された。 (アンドロゲン作用)毒性学的影響はなし	
	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 又は 500 mg/kg 体重/日) 【結果】 100 mg/kg 体重/日以上投与群の雄(親及び児動物)で血清中テストステロンの減少がみられ、同群の雄(親動物)で血清中チロキシン濃度の減少がみられた。 500 mg/kg 体重/日投与群の雌(児動物)で血清中コレステロール濃度の上昇及びチロキシン濃度の低下がみられた。 100 mg/kg 体重/日以上投与群で膣、精巣及び腹側前立腺の重量減少並びに肝臓、副腎及び甲状腺の重量増加がみられた。 500 mg/kg 体重/日投与群で親動物に交配率の低下、児動物に性成熟（膣開口及び包皮分離）の遅延、発情周期の短縮並びに精子の運動性及び大きさの低下がみられた。	83

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
b：ER 依存性のルシフェラーゼ遺伝子及び ERα 又は ERβ 発現遺伝子を導入
c：AR 依存性のルシフェラーゼ遺伝子を導入

（８）免疫反応への影響

BHA に関して *in vitro* で脾臓細胞の免疫応答を抑制又はグアニル酸シクラーゼ機能阻害によって免疫応答を抑制することが報告されている。（参照 26、61）

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は、TBHQ 投与による生理学的な反応と考えられた。（参照 10）

９．ヒトにおける知見

（１）過敏症に関する知見

参照 3 及び 26 に、過敏症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、26）

これらの試験結果から、BHA の経口摂取が過敏症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）

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 26）

（２）胃がんに関する疫学的知見

BHA の食物を介した摂取と胃がん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。

本研究において、胃がん発症リスクと日常の食事由来の 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）