



# 論文内容要旨

食品、プラスチック、ゴム、石油などの、劣化、酸化を防ぐ添加物として広く使用されているフェノール型酸化防止剤ジブチルヒドロキシトルエン（BHT）の毒性に関する報告は多く、とくに顕著な症状は、肺、肝臓、腎臓の機能障害である。

著者は、BHT摂取にみられる出血毒性に注目し、その特性と作用機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

## 1. BHTの出血致死効果とその用量反応関係

Sprague-Dawley系雄ラットに0.58~1.44%のBHTを含む飼料を40日間与えた。BHTの摂取量が526mg/kg/day以上のラットに出血による死亡が観察され、死亡率は用量に依存した。LD<sub>50</sub>(40days)は760(669-864)mg/kg/dayであった。死亡ラットには胸腔、腹腔、その他の器官への大出血が認められた。また、生存動物においても436mg/kg/day以上の群で、精巣上体、精巣などへの出血、およびプロトロンビン時間の延長が観察され、出血の程度、プロトロンビン時間の延長もBHTの用量に依存した。そして低プロトロンビン血症をひきおこす最小用量は14.7mg/kg/dayであった。

## 2. 種々の酸化防止剤、BHT構造関連化合物の出血致死効果

アリルアミン型、オキシキノリン型、フェノール型、ヒドロキノン型、ビスフェノール型、トリスフェノール型など、それぞれの型の酸化防止剤の代表的化合物につき、出血効果の有無を検討するとともに、構造関連化合物として、置換フェノール類の効果も検討した。その結果、BHTによって惹起された出血致死は、必ずしも酸化防止剤一般に共通した反応ではなかった。そして特に2, 6位に*tert*-ブチル基、イソプロピル基を有する置換フェノール類(2,4,6-tri-*tert*-butylphenol, 4-*tert*-butyl-2,6-diisopropylphenol, 2,6-di-*tert*-butylphenolなど、図1参照)は、BHTと酷似する出血をひき起した。

## 3. BHTの代謝と出血毒性

BHTの主要代謝経路は4位のメチル基の酸化であり、ヒドロキシメチル、アルデヒド、カルボン酸などの生成である。しかしこれらのいずれの代謝物も、BHTそのものよりはるかに弱い毒性を示した。従って、BHTそのものの組織中の濃度が、出血毒性において直接的な意義を有するものと考えられた。BHT摂取後のラット肝臓中の代謝産物を調べると、未知の代謝物が比較的高濃度で存在した。ガスクロマトグラフィ、質量分析等の結果よりこれはキノンメチド型代謝物(2,6-di-*tert*-butyl-4-methylene-2,5-cyclohexadienone, BHT-QMと略す、図2参照)であると同定した。

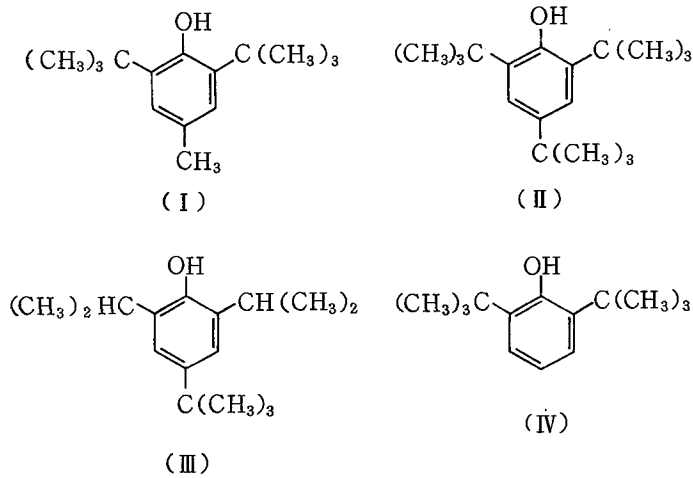


図1. BHTおよび関連化合物の構造式

- (I) BHT, (II) 2,4,6-tri-*tert*-butylphenol,  
 (III) 4-*tert*-butyl-2,6-diisopropylphenol,  
 (IV) 2,6-di-*tert*-butylphenol.

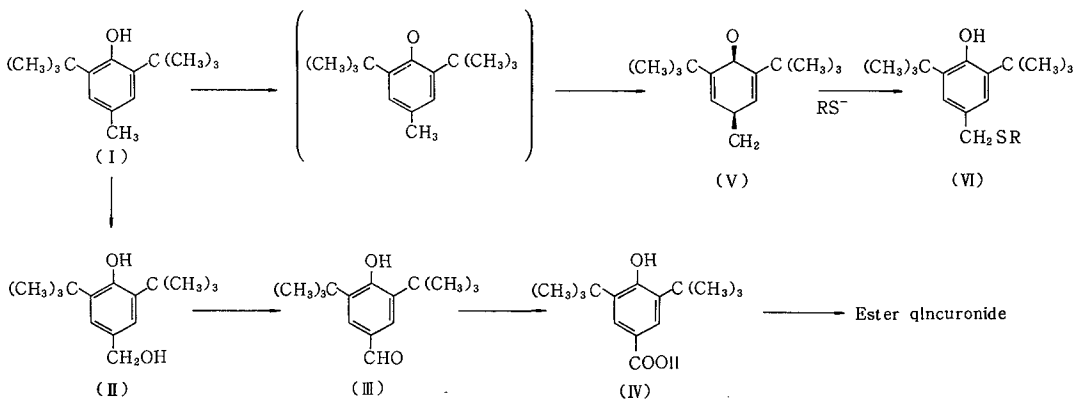


図2. キノンメチド (V) の構造式とBHTの代謝経路

- (I) BHT, (II) BHT-alcohol, (III) BHT-aldehyde,  
 (IV) BHT-acid, (V) BHT-QM, (VI) BHT-thioether.

#### 4. BHT毒性の種差, 系統差, 性差

ラット (Sprague-Dawley, Wistar, Donryu, Fischer系), マウス (ICR, ddY, DBA/c, C3H/He, BALB/cAn, C57BL/6系), ウサギ, ハムスター, モルモット, ビーグル犬, ニホンウズラに対するBHTの毒性を比較した。ラットはすべての系統で出血致死が見られ, 雄は雌より高い感受性を示した。また, マウスでは系統によって毒性の発現に差があり, ddY系マウスのみ精巣上体出血, 皮下出血が認められた。モルモットでは脳内に出血が認められた。その他の動物では概ね影響を受けなかった。投与後の各動物の肝臓中の活性代謝物BHT-QMを分析すると, 毒性が顕著に認められるラットにのみ本物質が明瞭に検出された。

#### 5. ビタミンKによるBHTの出血毒性の抑制

BHTによる出血は, ビタミンK<sub>1</sub>の飼料への添加により抑制された。また, BHT投与により, 血液凝固反応のパラメータであるプロトロンビン時間が明瞭に延長し, この効果も, ビタミンK<sub>1</sub>の同時投与, 静脈注射で顕著に抑制された。従って, BHTによる出血効果は, ビタミンKの消費を経る欠乏が関与するものと考えられた。

#### 6. 止血機構 (hemostatic balance) に対するBHTの作用

BHTを摂取させると出血致死に先行して, 種々の活性が変化するものと考えられる。これらのうち, 特に, 血管透過性, 血小板機能, 血液凝固能, 線溶能, カリクレインキニン系, 補体系などに対する作用を測定した。その結果, もっとも明瞭かつ早い時期に生じた変化は, ビタミンK依存因子 (プロトロンビン, VII, IX, X) の低下であった。

BHTの経口投与によって引き起されるビタミンK依存凝血因子低下は, 投与後36~60時間で観察された。凝血因子の血中での半減期を考慮すると, 投与後24時間前後をピークとして因子合成阻害が生じていると推測できた。この時間は肝臓中のBHT-QM濃度が最大に達する時間と一致した。

#### 7. BHT代謝物によるビタミンK依存凝血因子低下作用の機構

血液凝固因子合成低下にはチトクロムP-450によるBHTの活性化が必要であることも推測でき, 活性代謝物のひとつと見られるBHT-QMを直接投与した実験により, その凝血因子低下作用, 出血作用も観察できた。

また, BHT-QMの作用機構を明らかにするため, *in vitro*において, ラット肝臓ミクロゾームのフィロキノン (ビタミンK<sub>1</sub>) エポキシド依存蛋白質カルボキシル化反応に対するBHT-QMの作用を検討した。この結果BHT-QMは $10^{-4}$ M前後以上の濃度でこの反応を阻害した。次に, その作用点を調べると, フィロキノンエポキシドレダクターゼの阻害反応であることが明らかとなった。それらの阻害濃度を考察すると, *in vivo*でBHTを与えたラットの肝臓中に生じるBHT-QM濃度に匹敵した。

## 8. 結 論

BHTによるラットの出血致死効果は、次の過程で起るものと考えられる。すなわち、体内で生じたBHTの活性代謝物（キノンメチドもそのひとつである）は、ビタミンK依存血液凝固因子の生合成を阻害し、その結果、血液凝固異常を生じ、出血が起って死亡する。また、BHTの毒性に関して認められる種差、性差などは、キノンメチドなどの代謝物の生成の差によるものとして説明ができる。

## 審査結果の要旨

我が国でも広く酸化防止剤として使用され、食品添加物としても指定されているジブチルヒドロキソトルエン (BHT) は、動物実験の結果、肺、肝、腎の機能障害をひき起こす物質であることが明らかとなった。本研究はこれらの障害のうち、特に出血毒性に注目し、その毒性発現の特性と機構を明らかにしようとしたものである。

まずBHTの毒性発現の動物種差を調べてみると、ラットが特に感受性が高いことが確認された。そのLD<sub>50</sub> (40日) は、760mg/kg/dayであり、ヒトの許容摂取量の約1,000倍である。この出血毒性は酸化防止剤に共通して認められる作用ではなく、限られた化学構造の化合物においてのみみられる性質であった。

この種差の生じる原因を考えるため、BHTの代謝物とその毒性との関係を検討した。その結果、BHTの代謝物として報告されているすべての化合物は、BHTよりも毒性が低いことが明らかになった。したがって毒性の発現に代謝物が関与するとすれば、未知の化合物であることが推測できる。BHTをラットに投与したのち、肝中の代謝物を分析してみると、新しい代謝物が分離され、これはキノンメチド型の化合物 (BHT-QM) であることが確認された。BHT-QMは毒性も極めて高く、本化合物がBHTの毒性発現に密接に関係しているものと考えられた。動物種によってこのBHT-QMの産生が異なり、先のBHTの毒性の種差も代謝活性の違いとして説明できる。

さらにBHTおよびBHT-QMの出血毒性発現の機構を調べるため、ラットにこれら化合物を投与後、血中の種々の血液凝固因子を測定した。その結果、プロトロンビン濃度が顕著に減少していた。しかしこの低下は、フィロキノンの投与によって完全に回復することから、出血毒性はフィロキノンの枯渇によっている可能性が高い。BHT-QMはin vitroでも肝ミクロソームのフィロキノンエポキシド依存の蛋白カルボキシル化反応を強く阻害する。この反応の阻害機構としては、BHT-QMのフィロキノンエポキシド還元酵素に対する直接の阻害であることを示した。

以上の結果より、BHTは肝で代謝されて活性代謝物BHT-QMとなり、これがフィロキノン還元酵素を阻害するためフィロキノンエポキシドが蓄積し、分解する結果フィロキノン濃度が低下するものと考察した。

本研究は化学物質の代謝と毒性に関して重要な知見を加えるとともに、食品添加物の安全性を評価する上でも価値ある結果が得られており、博士論文に相当するものと認める。