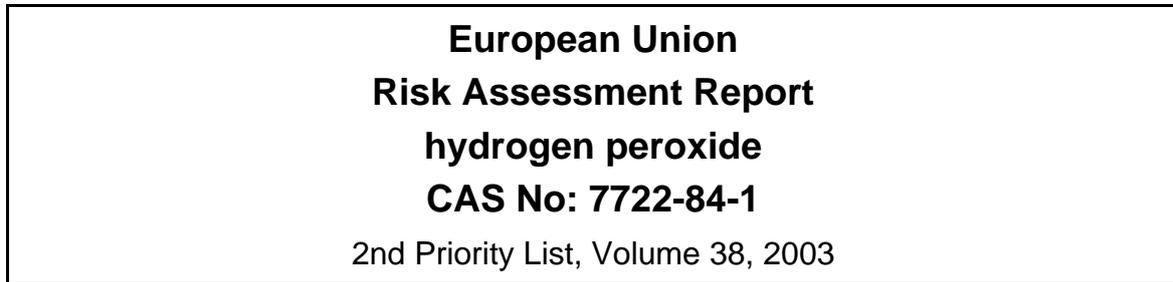
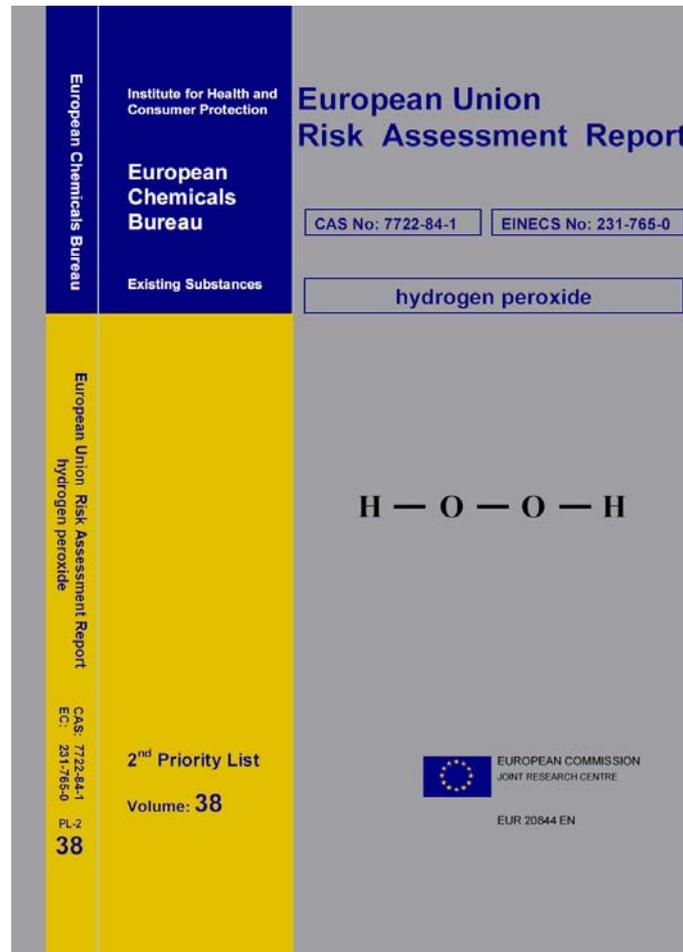


部分翻訳



欧州連合  
リスク評価書 (Volume 38, 2003)  
過酸化水素



国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部

2012年3月

本部分訳文書は、hydrogen peroxideに関する EU Risk Assessment Report の第4章「ヒト健康」のうち、第 4.1.2 項「影響評価：有害性の特定および用量反応関係」を翻訳したものである。原文（評価書全文）は、

[http://esis.jrc.ec.europa.eu/doc/existing-chemicals/risk\\_assessment/REPORT/hydrogenperoxidereport022.pdf](http://esis.jrc.ec.europa.eu/doc/existing-chemicals/risk_assessment/REPORT/hydrogenperoxidereport022.pdf)

を参照のこと。

#### 4.1.2 影響評価：有害性の特定および用量（濃度）－反応（影響）評価

##### 4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝、および分布

###### 4.1.2.1.1 内因性の過酸化水素

過酸化水素は好氣的細胞では普通にみられる代謝物であり、その細胞内濃度は生成と分解のバランスにより  $10^{-9}$ ～ $10^{-7}$  M に調節されているといわれている (Chance et al., 1979)。酸素正常状態では、麻酔された健常ラットの肝臓における  $H_2O_2$  生成速度は、肝臓 1 g 当たり 380 nmol /分と測定されている。ラット 100 g 当たりの  $H_2O_2$  推定総生成量は 1,450 nmol/分であることから、 $H_2O_2$  全生成量の約 75% が肝臓によるものであることが示された (Chance et al., 1979)。 $H_2O_2$  生成速度が上昇するか低下するかは基質と酸素の供給量により決まり、高圧環境下では生成量が著しく増加する。ラットの肝臓を単離した分画を用いた試験では、基質が十分に存在する条件下で、ミトコンドリア（酸素を 1 価または 2 価還元する種々の酵素反応を介して）、ミクロソーム（通常の電子伝達反応、グリコール酸オキシダーゼ、D-アミノ酸オキシダーゼ、尿酸オキシダーゼを介して）、ペルオキシソーム（脂肪酸の  $\beta$ -酸化を介して）、および可溶性酵素が、細胞質ゾル中  $H_2O_2$  のそれぞれ 14%、47%、34%、および 5% を供給していることが示唆された (Boveris, 1977)。

中間代謝に加えて、過酸化水素は、ほかの活性酸素種とともに、微生物の侵入に対する細胞防御に一定の役割を果たしている。食細胞が生成する  $H_2O_2$  は、正常細胞や悪性細胞を破壊することができ、赤血球、血小板、好中球またはリンパ球の機能を変化させることができる。過酸化水素は、(1) 有機基質との反応が遅いため、生体系では一定の距離まで拡散することができる、(2) 小分子で荷電していないため細胞膜を容易に通過できる、(3) 細胞内濃度が数種の酵素で制御されている、という点で、普通の酸化剤とは異なっている。多形核好中球の細胞膜がオプソニン化された粒子を取り囲むと、その粒子が完全に飲み込まれるまで、スーパーオキシドアニオンと過酸化水素が細胞外液に直接放出される。この環境の中で、過酸化水素は液胞に残留することも、細胞質中もしくは細胞外に拡散するこ

ともある。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の平衡は、これらの部位のそれぞれで発生または消費される相対量により制御され、一時的には10 μMに達することもある (Test and Weiss, 1984)。

分析が困難であるため、生体媒質中に含まれる過酸化水素の真の濃度は疑念がある。公知の分光学的測定法および HPLC 測定法を用いて行われたヒトおよびイヌの血漿の分析では、(1) カタラーゼで処理してもピークが消滅しない (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 対照と比べて) こと、また、(2) 外部から過酸化水素を添加してもピーク面積が顕著に大きくなることから、測定された物質はおそらく H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ではなく、過酸化物質である可能性が極めて高いことが示された (Nahum et al., 1989)。放射性同位元素を用いる方法でヒトおよびラットの血液および血漿中の過酸化水素が分析された。年齢が 30~35 歳の男性研究者 6 例の全血中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度は 114~577 μM (食細胞中濃度が高いことを反映している)、血漿中濃度は 13~57 μM であった。ラット血液試料中のそれぞれの H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度は同程度であった (Varma and Devamanoharan, 1991)。ヒトの呼気中の過酸化水素濃度を測定したデータでは、検出不能または最高で  $0.5 \times 10^{-8}$  M (CEFIC, 1996b) ~0.5 μM (Madden et al., 1997) であった。ただし、サンプリングおよび分析方法は異なっていた。Williams ら (1982) は、正常なヒト被験者の呼気には通常  $1 \sim 3 \times 10^{-8}$  M の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (化学発光強度として測定) が含まれることを見いだした。呼気の発光強度は、純粋な酸素の呼吸後、および午前中の喫煙の 5 分後に大きく増加した。喫煙により肺中のマクロファージが活性化され、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が放出されたものと考えられた。ヒトの眼房水には通常、19~31 μM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が含まれていると報告されており、霊長類およびウシの同様の試料中の濃度も同程度であった (Spector and Garnar, 1981; Chalmers, 1989)。白内障患者 17 例の眼房水中の過酸化水素濃度は 10~660 μM であった (Spector and Garner, 1981)。

過酸化水素などの活性酸素種が生物学的機能を果たすには、細胞内および体内のさまざまな区画中の濃度が厳密に調節される必要があることは明らかである (下記参照)。

#### 4.1.2.1.2 吸収および分布

生体膜の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 透過性は高い。透過定数は、ペルオキシソーム膜で 0.2 cm/分、赤血球膜で 0.04 cm/分であり、それに対して種々の膜において、水については 0.02~0.42 cm/分である (Chance et al., 1979)。そのため過酸化水素は、吸収表面を構成する細胞によって容易に取り込まれるが、同時に速やかに代謝され、未変化体がどの程度血液循環に入るかはよく分かっていない。さらに、血液中の赤血球は過酸化水素を分解する高い代謝能を有している。

### 粘膜からの吸収

舌下 (Ludewig, 1959)、腹腔内および直腸 (Urschel, 1967) などの、粘膜に覆われた体腔に過酸化水素溶液を投与すると、還流静脈血中の酸素含量が増加し、過酸化水素量が十分多い場合には酸素の気泡が発生した。雑種犬の腸切開術において、過酸化水素の生理食塩水希釈液を用いた結腸洗浄ならびに小腸および大腸の洗浄が行われた。濃度の高い溶液 (1.5%以上) を少量用いたときにはすぐに粘膜が白く変色し、循環体液中ですぐに気泡が発生した。濃度の低い溶液 (0.75~1.25%) では、長期に腸と接触させておくか、一定の長さの腸に対して高圧下で、または大量に導入すると同様の効果がみられた。0.75%未満の  $H_2O_2$  濃度では、静脈で気泡の発生はみられなかった。腸間膜血栓症や腸管壊疽を発症した動物はいなかった (Shaw et al., 1967)。1%過酸化水素を漿膜に適用した場合には、ガスが細い脈管に充満し、白く変色した。高い濃度 (最高で 30%まで) の過酸化水素が皮膚や (種々の動物種の) 粘膜に接触すると持続性の損傷が発生し、皮下気腫および局所血液循環の障害により組織の栄養状態が悪化した (Hauschild et al., 1958)。2 匹のネコに、9%  $^{18}O$  標識過酸化水素 1.5 mL または 19%  $^{18}O$  標識過酸化水素 0.1 mL が舌下適用され、動脈 (大腿動脈) 血および呼気中の標識体が質量分析法により追跡された。前者の例では約 1 時間以内に、後者の例では 30 分以内に酸素標識体投与量の 3 分の 1 が排気された。最初に動脈血中  $^{18}O$  濃度が急激に上昇したが、動脈血酸素飽和度は次第に低下した。それはおそらく酸素塞栓症により肺のガス交換に障害が起きたためであろう (Ludwig, 1965)。

### 皮膚からの吸収

5~30%の過酸化水素溶液をラット皮膚に *in vivo* で塗布したところ、その数分以内に、摘出した表皮中に  $H_2O_2$  を検出し得た。それに対してヒトの死体の皮膚を *in vitro* で用いた試験では、高濃度の  $H_2O_2$  を数時間塗布するか、またはヒドロキシルアミン (カタラーゼの阻害剤) により前処置した場合にのみ、真皮で  $H_2O_2$  が検出可能であった。組織化学的分析から、 $H_2O_2$  は表皮では代謝されず、皮膚付属器の「あらかじめ形成された経路 (preformed pathways)」を避けて表皮を通過すると考えられた。局所的な皮下気腫は酸素の遊離により生じ、組織内のカタラーゼ活性の分布とほぼ相関する (Ludewig, 1964)。ウサギ、ネコ、ブタ、およびラットを用いた 90%過酸化水素の急性皮膚毒性試験において、Hrubetz ら (1951) は、ウサギが最も感受性の高い動物種であることを見いだした。ウサギは塞栓症に対する感受性が高いこと、ならびに組織および血液中カタラーゼ濃度に種差があることが分かった。Hrubetz らは、ウサギでは皮下に達して血流に入る過酸化水素の量が多く、それが酸素を放出して致死性の塞栓作用を誘発するのではないかという説も示している。

## 肺からの吸収

麻酔を施したウサギに 1~6%過酸化水素のエアロゾルを吸入投与したところ、左心房血が、3 気圧での酸素投与に相当するレベルまで酸素過飽和になっていることが分かった。このレベルを増加させると試料中に細かな気泡が発生するようになった。最も刺激性のない 1%エアロゾルでも、動脈酸素濃度が、高濃度の過酸化水素の場合と同じくらいに上昇した (Urschel, 1967)。急性吸入毒性試験に関しては、致死的影響の機序が局所的なものであるか、全身的なものであるかは不明である。しかし、Kondrashov (1977) は、記載が不十分な試験報告ではあるが、ラットに 4 時間にわたり過酸化水素蒸気を曝露 (吸入および全身剃毛皮膚曝露) したときの LC<sub>50</sub> レベルは 2,000 mg/m<sup>3</sup> であること、死亡の主因はガス (酸素) 塞栓症であると述べている。

## 実験的研究の結論

動物にさまざまな経路で高濃度の過酸化水素を投与した試験では、吸収速度が速くなり、血管中で酸素の気泡が発生するようになることが示された。このことは、過酸化水素は全身的に吸収されるが、その後循環血中で代謝酵素により急速に分解されることを間接的に示している。条件によっては酸素 (微小) 気泡による全身的な塞栓形成がみられることもあった。これは血液に酸素を供給する新しい技術に関する試験で証明されたが、その試験ではブタ 12 匹の心右心室に 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生理食塩水溶液が一定速度で注入された。なお、ブタの血中カタラーゼ活性はヒトよりもわずかに低いだけであった。注入速度は、肺および全身性塞栓形成を来す気泡形成が起こらないように制限された (Fuson et al., 1967)。Hrubetz ら (1951) は、ウサギにおける過酸化水素の静脈内投与急性毒性は濃度に逆比例することを示した (試験した希釈範囲は 3.6~90%)。希釈するにつれて注射部位における遮断効果が低下し、そのことにより過酸化水素由来の酸素気泡が血液循環中に広がって、痙攣、死亡例の増加によって明らかのように一層強い毒性を引き起こすことになった。

## 吸収および分布に関連するヒトの事故から得られた所見

35%過酸化水素の誤飲例が 2 件報告されており、それらの例では大脳酸素閉塞症によると思われる脳損傷が発生した (Giberson et al., 1989; Sherman et al., 1994)。その後者の例では、摂取直後に多発性脳梗塞の特異なパターン (MRI で検出) がみられたことから、一層確実性があった。著者らは、病態生理学的機序について以下のように推測している。すなわち、心臓の開存性卵円孔があった (この例で関係があるとはいわれていないが)、未代謝の過酸化水素のうち肺毛細血管床を通過して動脈循環へ入るものがあった、または過酸化水素が肺毛細血管から吸引および吸収された、のではないかということである。3 例目は 3%

過酸化水素溶液 230 g を誤飲した小児の例である。その小児は 10 時間後に死亡し、腸リンパ管および肺血管系にガス塞栓がみられた。さらに脾臓、腎臓、心筋に透明な液胞が認められた (Cina et al., 1994)。

過酸化水素は手術創の洗浄によく用いられる。54 歳の男性が、感染および瘻孔のあるヘルニア縫合術の手術創を 5×20 mL の 3% 過酸化水素により加圧下で洗浄された。手術創からは洗浄液が全量排出されてはいないようであった。5 回目の洗浄の際、患者は突然意識を失い、心臓性ショックを呈して昏睡状態に陥り、それが 15 分間続いた。赤血球損傷の徴候はなかった。ECG では一過性心筋虚血の徴候がみられた。患者は 3 日以内に完全に回復した。著者らは、その事例で最も考えられる機序として、酸素微小気泡による広範な塞栓症、特に大脳および冠状動脈での微小気泡の発生が考えられると述べた (Bassan et al., 1982)。2 名の患者が肺の手術時に 3% 過酸化水素 300 mL で右胸腔の灌注を受けた (Konrad et al., 1997)。その患者の 1 名に肺塞栓症の臨床徴候がみられたため、もう 1 人の患者は経食道超音波心エコーでモニタリングされた。灌注から数秒以内に右心房および右心室で気泡が検出され、約 3 分間持続した。しかし、その患者では血液動態または呼吸器系の合併症はみられなかった。著者らは、過酸化水素による体腔の手術創の灌注に関連して、ガス塞栓症に関する別の症例報告 4 件 (患者 5 例に関する) を引用し (Shah et al., 1984; Tsai et al., 1985; Ferrari et al., 1994; Saissy et al., 1994; Morikawa et al., 1995)、続いてさらに別の症例報告 2 件 (Sleigh and Linter, 1985; Timperley and Bracey, 1985) を紹介している。以上のように、過酸化水素は手術の際に、遊離された酸素を散逸できない閉鎖空間、または加圧下で使用された場合には特に危険であると考えられる。

#### 4.1.2.1.3 代謝

##### 解毒 (捕捉) 反応

過酸化水素の代謝酵素として主なものは、カタラーゼおよびグルタチオンペルオキシダーゼの 2 つであり、これらによりさまざまなレベルで、また細胞のさまざまな場所で  $H_2O_2$  濃度が制御される。カタラーゼはペルオキシソームで生成する多量の  $H_2O_2$  を処理する。グルタチオンペルオキシダーゼ (GSH ペルオキシダーゼ) は、細胞質ゾルおよびミトコンドリアの両区画で  $H_2O_2$  を代謝する (Chance et al., 1979)。生体防御における効果的な細胞内外のネットワークは、ビタミン E、ユビキノール、カロテノイド、アスコルビン酸、グルタチオンなどの、さまざまな小分子の非酵素的抗酸化剤により完成される (Kelly et al., 1998)。ピルビン酸塩などの  $\alpha$ -ケト酸は、過酸化水素を非酵素的に水に還元する際に 1 位の炭素が脱炭酸されるため、 $H_2O_2$  の効率的な捕捉剤として機能する (Salahudeen et al., 1991)。培養線維芽細胞を用いて、細胞外  $H_2O_2$  除去の速度論が検討された。そのプロセス

には、2つの速度論的に異なる反応が含まれており、1番目の反応の特徴は  $K_m$  が比較的低値 ( $40 \mu\text{M}$ ) であることであり、第2番目の反応は速度の直線的な濃度依存性が  $500 \mu\text{M}$  までみられることであった。特異的阻害剤を用いることにより、1番目の反応には GSH ペルオキシダーゼが、2番目の反応にはカタラーゼが関与していると判断された。 $10 \mu\text{M}$  未満の過酸化水素濃度では、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の 80~90% が GSH ペルオキシダーゼにより分解されると推測された。 $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度の上昇につれてカタラーゼの寄与度が高まる (Makino et al., 1994)。

カタラーゼ活性および GSH ペルオキシダーゼ活性は、さまざまな動物種にわたってさまざまな組織に不均等に分布している。脳、肺、心臓ではカタラーゼ活性が低く、筋組織では GSH ペルオキシダーゼが有効濃度に満たない (Chance et al., 1979)。ラットの胃腸管中の抗酸化酵素活性が測定され、その結果、グルタチオンペルオキシダーゼの比活性は胃で最大でありカタラーゼ活性は胃腸管のすべての領域で一定であることが示された。活性に加齢変化は認められなかった。最大の活性は細胞質ゾルにみられた (Manohar and Balasubramanian, 1986)。ラット、ハムスター、ヒヒおよびヒトの肺ホモジネートを用いて種々の抗酸化酵素活性が測定された。グルタチオンペルオキシダーゼ活性はヒヒやハムスターの肺よりもラット肺の方が高かった。カタラーゼ活性には変動がみられ、ヒヒではラットに比べて 10 倍高かった。ラット肺の抗酸化酵素活性はほかの種とは異なっていた。ハムスターは最もヒトに似ているように思われた (Bryan and Jenkinson, 1987)。

ヒトの新鮮単離気管支上皮細胞を用いた試験では、かなりの抗酸化能があることが示された。カタラーゼおよびグルタチオンレダクターゼの双方の不活性化 (グルタチオン酸化還元サイクルの障害を来す) により、過酸化水素媒介性損傷に対する細胞の感受性が高くなった (Kinnula et al., 1994)。しかし、別の試験では 100% の酸素に約 15 時間曝露されたヒト志願者のほとんどが酸化剤毒性により気管支炎を発症したが、主要な抗酸化酵素 (スーパーオキシドジスムターゼおよびカタラーゼ) の遺伝子の発現レベルはごく低く、曝露による発現増加はみられなかった。ヒト気管支上皮中のカタラーゼ活性はベースラインで  $0.008 \pm 0.002 \text{ U}/10^6$  細胞であり、100% 酸素曝露後には有意な変化はみられなかった (Erzurum et al., 1993)。

ヒトの新鮮単離および培養肺胞マクロファージを用いた、カタラーゼ活性とグルタチオンレダクターゼ活性を選択的に阻害する試験により、カタラーゼは多量の過酸化水素を捕捉するが、細胞膜の完全性を維持する上でグルタチオン酸化還元サイクルが一層重要であることが示された。カタラーゼは主にペルオキシソームに局在し、細胞質ゾルおよび核基質では、低い濃度しか認められなかった。細胞膜に極めて有効なカタラーゼ活性があることが推測されたが、立証されてはいない (Pietarinen et al., 1995)。

ウサギの新鮮単離 II 型肺胞上皮細胞 (AII) が、過酸化水素生成キサンチン-キサンチン

オキシダーゼ系（定常状態で約 300  $\mu\text{M}$  の  $\text{H}_2\text{O}_2$  を生成）または 300  $\mu\text{M}$  の  $\text{H}_2\text{O}_2$  とともに最長 1 時間インキュベートされた。カタラーゼをアミノトリアゾールで阻害、または還元型グルタチオンをクロロジニトロベンゼンと結合させて、細胞の代謝防御機能を修飾した。AIII 細胞は当量の遊離カタラーゼよりも速い速度で  $\text{H}_2\text{O}_2$  を除去した。アミノトリアゾールにより AIII 細胞のカタラーゼ活性が 89% 低下し、 $\text{H}_2\text{O}_2$  のクリアランス半減期が 1.3 分から 18.1 分に延長し、60 分間の  $\text{H}_2\text{O}_2$  曝露後にトリパンプブルー排除能が低下したことから分かるように、処理細胞では酸化剤による損傷に対する感受性が高くなった。グルタチン枯渇細胞は対照と同じ速度で  $\text{H}_2\text{O}_2$  を捕捉した。したがって AIII 細胞は、細胞外の過酸化水素（生理学的濃度が高い状態）を主にカタラーゼ依存性経路で還元する。AIII 細胞は界面活性剤を分泌し、肺胞空間にナトリウムを能動輸送する。肺胞上皮表面は主に (> 95%) I 型肺胞細胞から成っているため AIII 細胞は少数しか存在しない。AIII 細胞は外因性酸化剤に抵抗力を示すが、ATI 細胞は感受性が高い。要するに AIII 細胞は、主にカタラーゼに依存した反応経路により、高濃度の  $\text{H}_2\text{O}_2$  による損傷から肺胞上皮を防御する上で重要な役割を果たしている (Engstrom et al., 1990)。

血液中では、細胞内外の過酸化水素は赤血球により効率的に除去される。ヘモグロビンの酸化を防ぐ赤血球の能力は、生理学的条件下では血糖が存在するかしないか、NAD(P)H の産生に血糖が利用できるかどうか、また、還元型グルタチオンの十分なレベルが維持されているかどうか大きく依存している。この過程ではグルタチオンペルオキシダーゼが特に重要である。過酸化物を生成する別の（外因性）発生源がある場合には赤血球のカタラーゼ濃度が重要になる。このような条件では、過酸化物によるメトヘモグロビンの生成はカタラーゼ濃度に依存し、カタラーゼ活性が高いほど細胞の抵抗力が強くなる (Aebi and Suter, 1972)。別の試験によると、ヒト赤血球は細胞外の過酸化水素を効率的に除去し、周囲の組織が過酸化物、および副産物であるヒドロキシルラジカルや次亜塩素酸による損傷を受けないように防御している。捕捉能はカタラーゼに依存しているのに対し、ヘモグロビン、GSH、糖代謝の寄与は極めて小さい。赤血球の  $\text{H}_2\text{O}_2$  除去効率は等濃度の遊離カタラーゼの約 4 分の 1 であった。つまり、赤血球が血液から過酸化水素を除去する能力は極めて高い (Winterbourn and Stern, 1987)。ヒト赤血球のカタラーゼ活性は血清より 3,600 倍高い。血清中カタラーゼ活性は非溶血性貧血患者では多少低く (0.62)、溶血性貧血患者 (8.3 倍) および悪性貧血 (6.6 倍) では高い (Góth et al., 1983)。

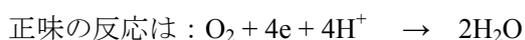
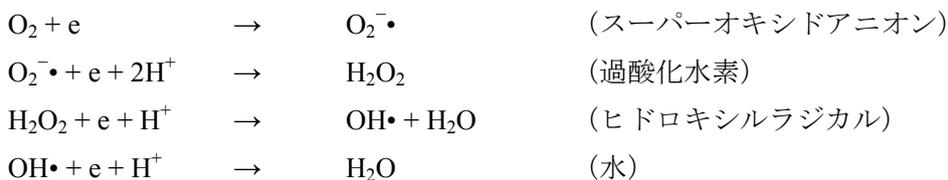
脳ではカタラーゼおよびグルタチオンペルオキシダーゼ濃度が低い (Olanow, 1993)。線条体のドパミン作動性ニューロンは、ドパミン代謝の際、過酸化水素などの活性酸素種に比較的高濃度で曝露を受ける。過酸化水素に対するニューロンの脆弱性はグリア細胞が存在すると低減されることが見いだされた (Langeveld et al., 1995)。線条体ニューロン (マウス胚由来) を 30 分間過酸化水素に曝露すると、細胞の生存度は濃度依存的 (10~1,000  $\mu\text{M}$ )

に低下した。100  $\mu\text{M}$  の毒性作用はカタラーゼを添加するか、または還元型グルタチオンの存在下でグルタチオンペルオキシダーゼを添加することにより全体的に抑制された。線条体ニューロンが、外部から加えられた  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100  $\mu\text{M}$ ) を除去する能力は  $46 \pm 6$  nmol/mg タンパク質/分であった。カタラーゼを特異的に阻害するか、またはグルタチオンペルオキシダーゼを特異的に阻害（還元型グルタチオン含量を減らすことにより）する試験の結果、ニューロンの防御は主にグルタチンペルオキシダーゼにより媒介されていることが示された。線条体星状膠細胞の生存性には過酸化水素曝露の影響はなく（60 分間、1 mM まで）、ニューロン集団に対する神経毒性作用は星状膠細胞・ニューロンの共培養では顕著に低下した。約 20 個のニューロンに対して 1 個の星状膠細胞の場合に有意な神経防御が認められた。線条体星状膠細胞が、外部から加えられた  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100 $\mu\text{M}$ ) を除去する能力は  $317 \pm 27$  nmol/mg タンパク質/分、すなわちニューロンより 7 倍高かった。このペルオキシダーゼ活性のほとんどがカタラーゼによるものであった。星状膠細胞の生体防御機能は、防御化合物の放出が可能であることによるものではなく、むしろ高い過酸化水素クリアランス能力によるものであった。両ペルオキシダーゼ活性を同時に阻害しても、どちらの細胞型でも  $\text{H}_2\text{O}_2$  のクリアランスが完全に抑制されなかったことから、フェントン反応などの非酵素的プロセスも過酸化水素の消失に何らかの役割を果たしているとも考えられる (Desagher et al., 1996)。

### 毒性に関連する代謝

好氣的細胞代謝では、酸素 1 分子を完全に水に還元する過程で電子 4 個が必要であり、連続的な 1 価還元プロセスでは中間体であるスーパーオキシドアニオンラジカル ( $\text{O}_2^-$ )、過酸化水素およびヒドロキシルラジカル ( $\text{OH}\cdot$ ) が生成される (Fridovich 1978; 1983)。還元型金属イオン ( $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^+$ ) の存在下では、過酸化水素からフェントン反応によりヒドロキシルラジカルが生成する可能性がある。活性酸素種の生成に関する化学反応を以下に示す。

分子状酸素は 1 電子還元 of 4 段階の反応により水に還元される。



この (活性) 酸素種の消失には数種の酵素が関与している。

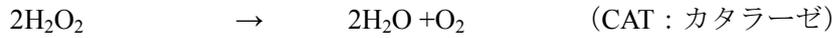
SOD



GSPx

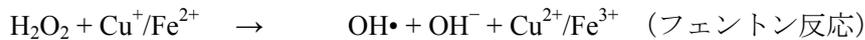


CAT



生物体では、 $\text{Fe}^{2+}$ および  $\text{Cu}^+$ のような遷移金属イオンによる触媒作用を通じて非酵素的に反応性の高い（そのため毒性のある）ヒドロキシルラジカルが生成する可能性もある（いわゆるハーバー・ワイスおよびフェントン反応）。

金属イオン



「完全な」ハーバー・ワイス反応 ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ による  $\text{H}_2\text{O}_2$  の還元) はおそらく以下のとおりである（フェントン反応はハーバー・ワイス反応の特定の一部であることを示している）。



鉄は結合型が多いため遊離型の血漿中レベルは極めて低く、細胞内の鉄は *in vivo* におけるフェントン反応の媒介に利用できない (Gutteridge, 1994)。しかし、生物学的還元剤もしくはキレート剤、酸性 pH により、輸送・貯蔵タンパク質から鉄の遊離が促進される可能性がある (Vallyathan and Shi, 1997)。スーパーオキシドアニオンはスーパーオキシドジスムターゼの作用で  $\text{H}_2\text{O}_2$  に変換される。さらに微量の遷移金属イオン（鉄塩は *in vivo* で利用できるようになるかもしれない）の存在下で、スーパーオキシドアニオンおよび過酸化水素は、いわゆる鉄触媒ハーバー・ワイス反応により  $\text{OH}\cdot$  を生成する。ヒドロキシルラジカルは反応性が高く、ヒドロキシルラジカルが産生される部位のごく近くに生体分子などの有機化合物が存在する場合にはそれらをすべて酸化する。スーパーオキシドおよび  $\text{H}_2\text{O}_2$  の反応性はそれより低く、生成部位から離れて拡散することができ、「余分の」遷移金属イオンと遭遇すると必ず  $\text{OH}\cdot$  が生成される。 $\text{H}_2\text{O}_2$  もすべての細胞膜を容易に通過する。そのためヒドロキシルラジカルは  $\text{H}_2\text{O}_2$  に起因する毒性作用に関係している。酸素ラジカルの生成により、脂質の過酸化、酵素の不活性化を含むタンパク質の崩壊、または DNA 損傷が起こる (Halliwell and Gutteridge, 1984; Vuillaume, 1987; Kappus, 1987)。外因性過酸化水素を用いた、さまざまな *in vitro* 細胞毒性および遺伝毒性試験により（セクション 4.1.2.7 を参照のこと）、鉄がキレート化されると毒性応答が劇的に低下することが示され、ヒドロキシルラジカルの生成がそのような状況下で毒性発現に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

### 解毒作用に関する酵素の遺伝的多型

ヒト集団では、過酸化水素の分解能（カタラーゼ活性、還元型グルタチオンのレベル、したがって GSH 酸化還元サイクルの活性）、特に赤血球の過酸化水素分解能を決定する遺伝的に規定された形質がある。血中カタラーゼ活性値の分布は、無カタラーゼ血症、低カタラーゼ血症、正常と表わされる 3 種の表現型に対応する三峰性を示すことが明らかになった。低カタラーゼ血症の個々人の活性は健常者平均の 36~55%であった。無カタラーゼ血症（血中カタラーゼ活性が健常者の 0~3.2%）に関するホモ接合体を有する個体の約半数に、臨床症状（高原病）がみられる。この疾患では主として血中、またおそらく組織中のカタラーゼ活性が欠如しているために口腔に潰瘍が発現する。歯の間隙または扁桃腺窩中の細菌が、過酸化水素を生成する。生成した  $H_2O_2$  を分解するカタラーゼがないため、ヘモグロビンがメトヘモグロビンに酸化され、その結果感染部位から酸素が奪われ、口腔粘膜の潰瘍形成、壊死および崩壊を来す。スイスの集団ではホモ接合体の頻度は 1000 人中約 0.04 人である (Aebi and Suter, 1972)。世界中（1989 年までに）で無カタラーゼ血症と報告された患者の総数は、52 家族、107 名であった。無カタラーゼ血症は不完全常染色体劣性形質として遺伝的に受け継がれると考えられている。日本人の無カタラーゼ血症に関しては、劣性対立遺伝子の発現頻度は 0.00087 と推測され、ヘテロ接合体およびホモ接合体の発現頻度はそれぞれ  $1.73 \times 10^{-3}$  および  $4.23 \times 10^{-6}$  と推定された。典型的な無カタラーゼ血症では、体細胞には微量のカタラーゼ活性しか認められず、非定型無カタラーゼ血症では、血液細胞にはより低いカタラーゼ活性（正常の約 4%）しかなく、体細胞でも活性は低下していた。アジア人集団における低カタラーゼ血症の発現頻度は平均 0.2~0.4%であり、朝鮮人で最も高く（1.29%）、日本人が最も低かった（0.23%）。4~5 名から成る日本人の群の血中カタラーゼ活性の平均値 ± 標準偏差は、健常者で  $3,380 \pm 180$  Pu/g Hb、低カタラーゼ血症例で  $1,520 \pm 350$  Pu/g Hb、無カタラーゼ血症例で  $5.5 \pm 0.8$  Pu/g Hb であった (Ogata, 1991)。

グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) 欠損症は赤血球の遺伝病（30,000 種以上の変異型が確認されている）であり、酵素が欠損した赤血球では、酸化型グルタチオンの還元に必要な NAD(P)H 濃度を十分なレベルに維持する能力がないために、グルタチオンペルオキシダーゼによる過酸化水素の解毒が不十分になる。おそらく過酸化物からヒドロキシルラジカルが発生し、それが細胞膜を損傷して溶血しやすくなると思われる (Hochstein, 1988)。溶血に伴い、ヘモグロビンのメトヘモグロビンへの酸化および変性ヘモグロビン（ハインツ小体）の生成が起こることが多い。世界中で約 4 億人が G6PD を欠損していると推定されている。遺伝子座の欠損部位は X 染色体上にあるため、酵素異常症は女性より男性の方に多くみられる。有病率はクルディスタンのユダヤ人で 63%、日本では 0.1%以下のごく低率であり、格差がみられる (Sodeinde, 1992)。人体に過酸化水素を生

成させる薬剤（抗マalaria薬プリマキンなど）を用いると G6PD 依存性溶血および貧血が発現ようになるが、その症候群を発症するのは酵素異常症患者のほんのわずかにすぎない。

#### 4.1.2.1.4 トキシコキネティクスおよび代謝に関する結論

過酸化水素は好氣的細胞では普通にみられる代謝物であるが、分析が困難であるため生物媒体中の真の濃度は不明確である。定常状態のレベルは、その生成と分解のバランスに依存しているように思われる。過酸化水素は生体膜を容易に通過（透過定数は水の透過定数に相当）し、有機基質との反応が遅いため細胞内でかなりのところまで拡散することができる。主要な過酸化水素代謝酵素としてカタラーゼとグルタチオンペルオキシダーゼがあり、血中ばかりでなく細胞内の種々の区画で  $\text{H}_2\text{O}_2$  をさまざまな濃度に調節している。過酸化水素は、生理学的に低い濃度では主に GSH ペルオキシダーゼにより分解されるが、過酸化水素濃度が上昇するとともにカタラーゼの関与が増加する。赤血球は極めて高いカタラーゼ活性を有するために血液から過酸化水素を速やかに除去するが、血清中カタラーゼ活性は低い。

動物試験およびヒトの症例報告の双方において、過酸化水素は高い取り込み速度で吸収表面を通過し、近接する組織および血管に入り、そこで分解されて酸素気泡を遊離させることが示されている。1 mL の 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  から約 100 mL の酸素が生成し、その結果機械的圧力による損傷が発生することもある。遊離された酸素（加圧下で）が逸出することができない閉鎖系体腔に  $\text{H}_2\text{O}_2$  が投与された場合には、酸素塞栓症の危険性が特に高い。正常状態では肺が微小気泡の効果的なフィルターとして機能するので、静脈塞栓症からはほとんどの例で重大な事態に至ることはない (Butler and Hills, 1979)。しかしイヌを用いた試験では、急速注入で 30 mL の空気を肺に過負荷した場合、または空気の微小気泡を静脈注入する前に動物に血管拡張剤（アミノフィリン）を事前投与した場合には、ドプラ超音波検査法で大腿動脈に塞栓が認められた。職業的曝露に相当すると思われる過酸化水素の吸入や皮膚接触に関しては、その全身的な帰結に関するデータはない。しかし、血中における過酸化水素分解能の高さから考えて、過酸化水素の内因的な定常状態が影響を受けることはありそうもない。生体系では、過酸化水素は鉄触媒反応（フェントン反応、ハーバー・ワイス反応）を経てヒドロキシルラジカルを生成することもある。過酸化水素の細胞毒性は、ヒドロキシルラジカル生成に大きく依存しているように思われる。遺伝的に規定された形質（無カタラーゼ血症、赤血球のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ欠損症）により過酸化物に対するヒトの感受性が高まる。

過酸化水素のトキシコキネティクスについて、科学的データがさらに増えることが望まれ

る。そのような試験の実行可能性を検討した結果、産業界は、外因性過酸化水素の帰結を観測することは、どのような測定法でも生理学的平衡に干渉を及ぼすため、現在のところ不可能であると結論を下している。

#### 4.1.2.2 急性毒性

##### 4.1.2.2.1 動物における試験

動物における経口投与、経皮投与、吸入、静脈内投与による急性毒性試験に関する代表的なデータを Appendix C に要約する。

#### 経口投与試験

ラットにおける経口 LD<sub>50</sub> 値または致死量は 70%過酸化水素での約 800 mg/kg (Du Pont, 1996) から 10%過酸化水素での 5,000 mg/kg 超 (FMC, 1990) までの範囲であるが、Ito ら (1976) によれば希釈液 (9.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) の毒性はさらに強く、LD<sub>50</sub> は雄ラットで約 1,500 mg/kg、雌ラットで 1,600 mg/kg であった。70%過酸化水素では、死亡例の大部分は投与日に発生した。すべての用量群で嗜眠、不活発、呼吸不整、円背位等の毒性徴候が観察された。雌雄ラットの死亡例に、被験物質の投与に起因する舌、食道、胃、十二指腸の肉眼変化および腹膜腔の癒着がみられた。すべての用量で、胃の幽門洞に変性性潰瘍および再生性過形成がみられた。潰瘍性壊死が胃上皮 (粘膜筋板) 内に及び、潰瘍形成の程度が軽微～軽度と判定された (Du Pont, 1996)。10%過酸化水素を用いた試験では、雌ラット 1 例が投与 1 日目に死亡した。糞便量の減少および黒色化、自発運動の低下、接触に対する感受性亢進、血尿、流涙、横臥位、チアノーゼ、歩行失調、色素性鼻漏、鼻汁、腹部生殖器の汚れ等の一般状態の変化がみられた。剖検所見としては、死亡例において、胃と腸に出血および血液の充満、ならびに肺の赤色化のみが観察された。

#### 経皮投与試験

急性経皮毒性試験は、ほとんどの場合に方法の記述が不十分であるので、それらの評価には注意が必要である。濃度の高い過酸化水素 (90%) の経皮 LD<sub>50</sub> には、動物種によりかなりの差 (700～5,000 mg/kg) がみられるようである。例えば、ラットは抵抗性のある種であり、ウサギは感受性のある種である (Hrubetz et al., 1951)。70% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ではウサギにおける経皮 LD<sub>50</sub> は 9,200 mg/kg とされている (FMC, 1979b)。しかし、ウサギを用いた別の試

験では、35%過酸化水素を塗布し閉塞包帯で被覆して 24 時間曝露しても死亡例はみられなかった。10 例中 2 例で 4 および 5 日目に流涙および鼻汁が観察されたことが報告されている。塗布の 24 時間後にすべてのウサギの試験部位に紅斑、浮腫、蒼白化がみられた。4 日目までにすべての試験部位が壊死状態になった。7 日目ではすべての部位に痂皮がみられ、試験終了時にはすべての部位に痂皮と落屑がみられた。試験期間中にウサギ 7 例で体重が増加し、3 例で体重が減少した (FMC, 1983b)。10%過酸化水素をマウスに適用した試験では、1,400 mg/kg の用量の皮膚適用から 5~10 分後に全身毒性の徴候 (興奮と抑制、歩行失調、振戦、四肢の不全麻痺、および呼吸促進) がみられたことが報告されている。28%の溶液を 8,000 mg/kg 超の用量で適用した場合には一部の動物が死亡した (Liarskii et al., 1983)。報告が十分ではないがおそらく濃過酸化水素溶液がラットに対して使用されていると思われる別の試験では、死亡原因はガス塞栓症であると報告されている (Kondrashov, 1977)。

### 吸入試験

急性吸入毒性を検討するために、過酸化水素のエアロゾルと蒸気を用いた試験が行われている。マウスを用いたエアロゾル試験では、曝露時間が 5 分から 2 時間までの範囲であったことから 4 時間 LC<sub>50</sub> 値が得られていない。さらに、最近行われた 2 件の鼻部曝露試験 (Solvay Duphar, 1995a; 1995b) では、発生させた粒子の大きさが報告されていない (吸入可能な範囲であったと考えられるが)。90% $\text{H}_2\text{O}_2$  から発生させた 12,000~13,000 mg/m<sup>3</sup> のエアロゾルに 10~15 分間曝露したところ、半数のマウスが死亡 (Punte et al., 1953) し、920~2,000 mg/m<sup>3</sup> (70% $\text{H}_2\text{O}_2$  のエアロゾル) の濃度で 2 時間曝露した場合には、少なくとも一部のマウスが死亡した。死亡例の肉眼所見 (頭部、舌、頸部、前足および鼻部の皮膚の腫脹や褪色、皮下気腫および出血、リンパ節の赤色化、肺のびまん性の赤色化) は、被験物質の漂白性および腐食性によるものであった (Solvay Duphar, 1995a)。マウスを用いた呼吸刺激性試験では、RD<sub>50</sub> 値 (呼吸数の 50%減少; 30 分間曝露) は 665 mg/m<sup>3</sup> (70%  $\text{H}_2\text{O}_2$  のエアロゾル) であった (Solvay Duphar, 1995b)。Punte ら (1953) は、マウスを用いた試験では、3,600~5,200 mg/m<sup>3</sup> の濃度で死亡例はなかったが、肺のうっ血および気管支上皮の壊死がみられたことを報告している。9,400 mg/m<sup>3</sup> で致死範囲に達し、曝露の 6 日後に死亡例が発生した。12,000~19,000 mg/m<sup>3</sup> の濃度で 10~15 分間曝露した場合には、生存時間は動物の大部分で 1 時間未満に短縮した。低濃度曝露でみられた症状は、軽度の鼻部刺激、瞬目、軽微な喘ぎ呼吸、筋肉協調性の喪失であった。これらの症状は概して 30 分以内に消失した。肺うっ血がみられ、生存マウスには気管支上皮の壊死が認められた。最高濃度 (19,000 mg/m<sup>3</sup>) の曝露を受けた 4 例の眼に肉眼的混濁がみられ、8 週後に屠殺された。マウスを 9,400 mg/m<sup>3</sup> に曝露した場合には、曝露から 5 週目の検査では有意な変化は認められなかったが、8 週目では同じ濃度の曝露群で顕微鏡的病変が認められた。こうし

た所見から、高濃度の  $\text{H}_2\text{O}_2$  エアロゾルに曝露されると潜行性で遅発性の角膜損傷が発現することが示された。

(1) 計算濃度  $4,000 \text{ mg/m}^3$  (真の濃度はおそらくそれよりかなり低い、次の試験を参照のこと) で 8 時間、または、(2) 測定濃度  $338\sim 427 \text{ mg/m}^3$  で 4 または 8 時間という、異なる実験構成の 2 組のラット試験で、マウスとラットが過酸化水素の蒸気に 4~8 時間曝露 (全身曝露) された。試験 (1) では死亡例は報告されず、中毒症状はみられなかった。自身を掻いたりなめたりする以外はラットに異常な徴候はみられなかった。病理検査では気管と肺にうっ血が認められた。最初の 3 日間で屠殺されたラットには、出血のない、局在化した小さな領域の肺浮腫および肺胞気腫の領域が存在した。肺のほとんどで、重度のうっ血に加えて肺胞気腫の領域が多数認められた。検査されたそのほかのすべての器官は正常のように思われた。試験 (2) では、単回 4 時間曝露でも単回 8 時間曝露でも死亡例の報告はなかった。動物の病理検査では、試験 (1) で記述された所見と同じ結果が得られた (Comstock et al., 1954; Oberst et al., 1954)。ラットの過酸化水素蒸気への 4 時間の全身 (剃毛皮膚) 曝露を行った別の試験では、報告内容は十分ではないものの、 $\text{LC}_{50}$  は  $2,000 \text{ mg/m}^3$  で、動物の主要な死因はガス塞栓症であることが報告されている (Kondrashov, 1977)。ラットが  $170 \text{ mg/m}^3$  の過酸化水素 (50% 溶液から調製可能な最高蒸気濃度) に 4 時間曝露 (全身曝露) されたが、鼻汁および一過性の体重低下という軽微な徴候がみられただけであった (FMC, 1990)。

Svirbely ら (1961) は、ラットよりマウスの方が過酸化水素蒸気の毒性に感受性が高いことを見いだした。 $110 \text{ mg/m}^3$  (78 ppm) の 4 時間曝露はマウスにとっては致死적ではなかったが、 $160 \text{ mg/m}^3$  (113 ppm) では 10 例中 1 例が 24 時間以内に、10 例中 4 例が 2 週間観察期間内に死亡し、 $321 \text{ mg/m}^3$  (227 ppm) では 25 例中 5 例が 24 時間以内に、25 例中 22 例が 2 週間以内に死亡した。 $320 \text{ mg/m}^3$  (226 ppm) を適用した別の試験では、10 例中 1 例が 24 時間以内に、10 例中 5 例が 2 週間以内に死亡した。事前に単回で過酸化水素の曝露を受けると、それがなければ致死量である  $\text{H}_2\text{O}_2$  に対して、中程度の抵抗力がみられるようになった (Svirbely et al., 1961)。

### 静脈内投与試験

過酸化水素溶液の静脈内投与に関していえば、ラットに長時間 (最長 30 分) かけて注入したときの最大耐量は約  $50 \text{ mg/kg}$  であった。生存例では、血漿中酵素レベルから判断して肝毒性を示す明確な徴候はみられなかった (CEFIC, 1997a)。過酸化水素溶液を濃度を上げて (3.6~90%) ウサギの耳翼辺縁静脈に注射 (注入速度は記述されていないが、所要時間は数分であると思われる) したところ、逆説的に、過酸化水素濃度が下がるほど毒性が強

くなった。3.6%過酸化水素溶液のLD<sub>50</sub>は約3.2 mg/kgであった (Hrubetz et al., 1951)。

#### 4.1.2.2.2 ヒトにおける試験

過酸化水素の誤飲による中毒については数件の報告例があるが、摂取量に関する適切な情報がある報告はほとんどない (Appendix D)。まれな吸収経路としては、血管に富む肉芽腫性組織に覆われていると思われる体腔からの吸収があり、その例では 54 歳の肥満男性が、感染および瘻孔を伴うヘルニア縫合術の手術創において、3%過酸化水素 5×20 mL による洗浄を受けた。手術創から洗浄液が全量排出されたわけではないように思われた。5 回目の洗浄の際、患者は突然意識を失い、心臓性ショックを呈し、昏睡状態に陥り、その状態が 15 分間続いた。赤血球損傷の徴候はなかった。ECG では一過性の心筋虚血の徴候がみられた。患者は 3 日以内に完全に回復した。著者らは、この症状の発現は酸素微小気泡による広範な塞栓症、特に大脳および冠状動脈の塞栓症によるものと説明した (Bassan et al., 1982)。洗浄液の半量ほどが吸収されたと仮定すると、過酸化水素の投与量は 1.5 g で、肥満の人 (体重 100 kg と仮定) では約 15 mg/kg 体重となる。2 名の患者が肺の手術の際に 3%過酸化水素 300 mL で右胸腔の灌注を受けた (Konrad et al., 1997)。その患者の一人が肺塞栓症の臨床徴候を呈したあと、もう一人は経食道超音波心エコーによりモニタリングされた。灌注から数秒以内に右心房および右心室に気泡が検出され、約 3 分間持続した。しかし、患者には血液動態学的または呼吸系の合併症はみられなかった。著者らは、過酸化水素による体腔の外科的灌注に関連して、さらにガス塞栓症の 4 例を挙げている。

84 歳の男性が 35%過酸化水素溶液 30 mL を摂取 (摂取量は約 10 g、すなわち約 150 mg/kg 体重) した直後に限局性神経障害にみまわれた。磁気共鳴画像法検査により前部、中間部、後部の血管支配領域における多発性大脳および小脳梗塞が明らかになった。酸素ガスによる脳塞栓症によるものと考えられた (Sherman et al., 1994)。別の例では、40 歳の女性が 35%過酸化水素 60 mL を誤飲し、無事に回復した。その女性は喉、上腹部、胸骨下の領域に灼熱感を訴えて嘔吐した。腹部の X 線検査により胃に大量のガスが認められ、左葉を含む肝臓全体の静脈系にもガスが認められた。腰筋に沿った後腹膜にガスが認められ、胃壁内にもガスが認められた。食道胃十二指腸鏡検査では重度のびまん性出血性胃炎が認められたが、咽頭、食道、十二指腸は正常であった (Luu et al., 1992)。過酸化水素摂取量は 21 g、すなわち約 350 mg/kg と算出された。

経口致死量に関して 2 つの例をあげることができる。2 歳の男児が 35%過酸化水素 4~6 オンス (113~170 g) を誤飲した。その児童はすぐに反応がなくなり、チアノーゼを呈し、左腕がこわばるようになった。病院到着後の胸部 X 線写真では右心室、縦隔、門脈系にガスの存在が認められ、依然として麻痺が続いた。食道胃十二指腸鏡検査では重度の出血性

胃炎がみられたが穿孔は認められなかった。食道と十二指腸は正常のようにみえた。その児童は 4 日目に死亡した。剖検では、小脳および鉤回扁桃の切痕を伴う顕著なびまん性脳水腫が認められた (Christensen et al., 1992)。過酸化水素の摂取量は、約 50 g で体重 13 kg と仮定すると約 3,800 mg/kg 体重であった。もう 1 つの例では、16 か月の男児が空の容器で遊んでいたが、それにはもともと 3%過酸化水素溶液が 230 g 入っていた。ふたに傷があり内容物を吸ってしまったのである。児童の口や鼻から白い泡が発生した。それからその児童はベッドまで歩いて行き、10 時間後に死亡しているのを発見された。剖検では心臓の右心室および門脈系で泡立った血液が認められた。胃粘膜は赤色を呈し、脳には浮腫がみられた。病理組織学的検査では肺に浮腫がみられ、びまん性間質性気腫が明確に認められた。肺血管系および胃腸リンパ管内にガス塞栓が認められた。胃腸管壁、脾臓、腎臓、心筋に明瞭な空胞もみられた (Cina et al., 1994)。摂取された過酸化水素の推定量は 7 g、11.6 kg の男児では約 600 mg/kg 体重であった。後者の例は希釈 (3%) 過酸化水素による事故であったという点で重要ではあるが、1%溶液でも、新生児の腸に入ると腸間膜灌流に深刻な障害を引き起こし、最終的に壊疽に至ることがあるということに注意が必要である (Shaw et al., 1967)。

#### 4.1.2.2.3 急性臓器毒性に関するその他の試験

高酸素性中枢神経毒性 (Piantadosi and Tatro, 1990; Zhang and Piantadosi, 1991)、ならびに心筋 (Cavarocchi et al., 1986; England et al., 1986; Byler et al., 1994; Voogd et al., 1994) や他の組織モデル (Murthy et al., 1990) の虚血/再灌流障害に、過酸化水素が影響を及ぼしていることを推測させる機序的な理由がある。モルモット単離肺を灌流および換気した条件下で、過酸化水素を灌流緩衝液に 50  $\mu$ M (約 1.7 ppm) の濃度で添加すると、5 分間の曝露中に、気道コンダクタンス、動肺コンプライアンス、灌流流量の低下がみられた。ラット肺の血管および気管支平滑筋で同様の収縮を引き起こすには約 10 倍高い濃度が必要であった。昇圧応答は、トロンボキサン A<sub>2</sub> の遊離によって媒介されたものであった。血管および気管支収縮が、肺の過酸化物誘導性損傷で観察された急性肺浮腫の一因であると考えられた (Bannenberg et al., 1993)。 $\beta$ -D-グルコースおよびグルコースオキシダーゼから成る過酸化水素生成系を灌流させた単離ラット肺の灌流液に肺胞マクロファージを加えると、肺の重量増加が抑制された。肺胞マクロファージを添加すると赤血球またはカタラーゼを添加したときと同等の損傷低減効果があった。肺胞マクロファージが単離肺を防御する能力は、*in vitro* で過酸化水素濃度を低下させる能力に符合した。肺胞マクロファージは、アジ化物処理されるとカタラーゼ活性が相対的に低下し、過酸化水素生成系で灌流されている肺の損傷を防止できず、*in vitro* で過酸化水素を効率的に低下させることはできなかった (McDonald et al., 1991)。

#### 4.1.2.2.4 急性毒性の結論

ヒトにおける過酸化水素水溶液の経口摂取による中毒事故は多数報告されているが、摂取量の報告がある例はほとんどない。全身作用の機序は酸素塞栓症であった。希釈（3%）液でも摂取容量が大きい（摂取量は約 600 mg/kg 体重）と 16 か月の男児では死亡の原因となった。35%過酸化水素溶液（摂取用量は約 150 mg/kg 体重）の摂取の結果、84 歳の男性で重度の脳損傷が発生した。3%過酸化水素による感染創洗浄の際に発生した珍しい事例では、約 15 mg/kg 体重ほどの低い摂取量でも、酸素微小気泡による全身性塞栓症によるものと思われる一過性のショックおよび昏睡を引き起こした。

利用可能なすべての情報に基づいて判断すると、過酸化水素は経口摂取で有害（R22）、また、吸入で有害（R20）と分類される。分類についてはセクション 1 も参照のこと。

#### 4.1.2.3 刺激性

過酸化水素溶液の刺激性／腐食性は皮膚および眼刺激性試験で十分に概説されており、腐食作用に関する独特の機序、すなわち血液循環の閉塞が明らかにされている。

##### 4.1.2.3.1 皮膚

###### 動物における試験

ウサギを用いた最新の皮膚試験によれば、過酸化水素 10%溶液にはわずかな刺激性（FMC, 1990a）があり、50%以上の濃度の溶液には強度の刺激性と腐食性（FMC, 1990b; 1989）がある。3%（Du Pont, 1972）、6%（Du Pont, 1973）、8%（Du Pont, 1974）の濃度では、24 時間の閉塞曝露にもかかわらず、過酸化水素によるウサギの皮膚反応は軽度であり、刺激性ありとは判定されなかった。35%過酸化水素については、ニュージーランドホワイト種ウサギ 6 匹が、皮膚の 2 カ所の部位に 0.5 mL の被験物質を塗布され、閉塞包帯下で 4 時間曝露された。4 時間目および 24 時間目で、すべてのウサギに軽微から中等度の紅斑ないしは浮腫が観察された。48 および 72 時間目では適用部位に軽微な紅斑および褐色の領域が認められた。褐色領域は 6 日目には落屑に進展した。14 日目の試験終了時でも、なお 2 例で落屑がみられた。一次刺激性スコアは 1.6/8.0 であった（FMC, 1983）。このような所見から、35%過酸化水素は遅延型表皮壊死および脱落を伴う中等度刺激性を有することが示された。

## ヒトにおける試験

36 か月間にわたりユタ州中毒管理センター (Utah Poison Control Center) に報告されたすべての曝露事故を遡って再検討したところ、過酸化水素によるものは 325 例 (0.34%) であった。経口摂取が最も一般的な曝露経路であり、全曝露事故の 83% を占めた。次に一般的な曝露経路は眼および経皮でありそれぞれ 8.0% および 7.7% であった。主な皮膚所見は感覚異常 (60%)、蒼白化 (56%)、水疱形成 (16%) の 3 種であった。最も一般的な皮膚・眼曝露の転帰は、軽微な一過性の障害であった。このような曝露から永続的な後遺症は生じなかった (Dickson and Caravati, 1994)。

32 名の志願者のグループ (男性 18 名、女性 14 名、23~37 歳) を対象として、片方の手をさまざまな濃度の過酸化水素蒸気に時間を変えて曝露する試験が行われた。皮膚刺激反応の閾値が決定された (方法は開示されていない)。ゴム製の膜にある開放部から曝露チャンバー内に被験者の片方の手を入れ、もう一方の手を対照とした。曝露直後に皮膚を洗浄し、洗浄液を分析 (曝露領域と対照領域の双方) して  $\text{H}_2\text{O}_2$  の付着量を測定した。皮膚刺激の閾値濃度 (見かけ上の LOAEL) は曝露時間に依存し、以下のとおりであった。すなわち、4 時間曝露では  $20 \text{ mg/m}^3$ 、1 時間曝露では  $80 \text{ mg/m}^3$ 、30 分曝露では  $110 \text{ mg/m}^3$ 、15 分曝露では  $140 \text{ mg/m}^3$ 、5 分曝露では  $180 \text{ mg/m}^3$  であった。閾値濃度における過酸化水素付着量測定値は  $1.1\sim 1.7 \text{ mg/dm}^2$  であり、 $0.5\sim 0.8 \text{ mg/dm}^2$  の付着量では効果がないことが分かった (Kondrashov, 1977)。

### 4.1.2.3.2 眼

#### 動物における試験

ドレイズ法を用いた過酸化水素の眼刺激性試験において、5% 溶液が軽微な刺激性 (FMC, 1987a)、8% 溶液が中等度刺激性 (FMC, 1987b)、10% 溶液が強度刺激性 (FMC, 1985) であることが示された。興味深いことに、後者の 2 試験では眼を水道水で洗浄すると、刺激反応の重症度が重くなった。8% 過酸化水素に関する試験では、ニュージーランドホワイト種ウサギ 4 匹が用いられた。2 匹のウサギの眼は未洗浄のままにされ、残り 2 匹のウサギの眼は 100 mL の水道水で処置後約 20~30 秒間穏やかに洗浄された。投与の 1 時間後にすべての眼に中等度の結膜炎が認められた。24 時間目の評価までに刺激反応は悪化し、その時点で未洗浄眼には軽微の角膜混濁、虹彩炎および重度の結膜炎がみられた。洗浄眼には重度の角膜混濁、重度の虹彩炎および結膜炎がみられた。未洗浄眼では刺激反応は次第に消失したが、洗浄眼では 7 日目に角膜血管新生および 13 日目には角膜の膨隆 (ウサギ 1 例) が発現した。22 日目の試験終了日には、未洗浄眼の 1 つに軽微な角膜混濁が、洗浄眼

の残りのウサギに軽微な角膜混濁、軽度の結膜炎および血管新生が認められた (FMC, 1987b)。

Sarver ら (1996) は、ニュージーランドホワイト種ウサギ 6 匹を用いて、6%過酸化水素溶液の眼刺激性を検討した。被験物質 0.1 mL の点眼から約 20 秒後に、ウサギ 3 匹の処置眼と対照眼が室温の水で約 1 分間洗浄された。残り 3 匹の眼は洗浄されなかった。ドレイズ法を用いて 1、24、48、および 72 時間後に眼の検査が行われた。被験物質処置・未洗浄眼では軽微な角膜混濁、中等度の虹彩炎、中等度および重度の結膜発赤、軽微から軽度の結膜浮腫ならびに血液の混じった多量の分泌物がみられた。生体顕微鏡検査では、処置眼に角膜損傷は認められなかった。ウサギ 2 例の処置眼は点眼後 72 時間までに臨床的に正常になり、残りのウサギの処置眼は 7 日までに正常になった。被験物質処置・洗浄眼では、軽微または軽度の角膜混濁、中等度の虹彩炎、軽度から重度の結膜発赤、軽微から中等度の結膜浮腫、ならびに血液の混じった中程度から多量の分泌物がみられた。ウサギ 1 例で、結膜の蒼白化および角膜血管新生を伴う結膜出血が観察された。生体顕微鏡検査では、このウサギで中等度から重度の角膜損傷が認められたが、残り 2 例では角膜損傷は認められなかった。2 例の処置眼は 48 または 72 時間までに臨床的に正常になった。3 番目のウサギでは、21 日目までにすべての刺激反応が消失したが、角膜血管新生はなお認められた。

もっと以前に実施された別の一連の眼刺激性試験は FHSA 法を用いてウサギに 8、10、12%過酸化水素が適用されたが、その結果 10%、12%溶液を適用されたウサギの眼に広汎性で重度の不可逆的な穿孔性角膜損傷 (びらん)、重度の虹彩炎および重度の結膜炎が発現した。角膜損傷は進行性で、14 日目に角膜は著しく混濁し、重度に血管新生した組織変化を伴う変形がみられた。洗浄眼では、中等度であるが穿孔性の角膜損傷、軽度から重度の虹彩炎、そして重度の結膜炎がみられた。角膜損傷は可逆的で、14 日目には角膜損傷がみられないか、または角膜損傷があっても軽度で回復しつつある状態であった。8%過酸化水素を適用されたウサギの眼では、軽度で可逆的な角膜損傷、および重大な虹彩損傷を伴わない中等度から重度の結膜炎がみられた。眼は 7 日間以内に正常になった。洗浄眼では、重大な角膜や虹彩の損傷を伴わない軽度の結膜炎がみられた。この眼は 2 日以内に正常になった (Du pont, 1972)。眼の洗浄により刺激反応が悪化した試験もあればそうでない試験もある理由は不明である。眼の洗浄に使用された水道水の純度 (還元金属イオン含量など) が反応に影響を及ぼした可能性もある。35%過酸化水素にはウサギの眼に対して腐食性がある。曝露直後に水道水で眼を洗浄しても、刺激反応に対する有意な影響はみられなかった (FMC, 1983)。

ウサギの結膜嚢に 300 ppm 過酸化水素溶液 6 滴 (1 日総点眼量 0.3 mL) を 1 日 1 回連続 5 日間点眼したところ、中心角膜厚が一時的に 10%増加した。100 ppm 水溶液では 7%増加したが、60 ppm 水溶液では有意な変化はみられなかった。最終曝露の 2 時間後に腫脹が最

大になったが、さらに4～6時間経過すると角膜厚は正常に戻った (Yan and Pitts, 1991)。角膜上皮細胞を用いた細胞毒性試験では、一層低いレベル (7～50 ppm) でもさまざまな毒性作用が迅速に誘発された (Riley, 1990; Artola et al., 1993; Hayden et al., 1990; Tripathi et al., 1992) ことから、局所毒性は、*in vivo* 条件下で作用する生理学的中和の機序により、かなり低減されることが示された。

### ヒトにおける試験

36 か月間にわたりユタ州中毒管理センターに報告されたすべての曝露事故を遡って再検討したところ、過酸化水素に関連する報告の 8%が、曝露経路として眼にかかわるものであった。最も高頻度で観察された眼症状は、灼熱感 (65%)、発赤 (50%)、霞眼 (19%) などであった。最も一般的な眼曝露の転帰は、軽微な一過性の障害であり、永続的な後遺症はみられなかった (Dickson and Caravati, 1994)。

歴史的にみれば、 $H_2O_2$  は 1～3% (10,000～30,000 ppm) の濃度で点眼抗菌剤として、重大な損傷を引き起こすこともなく 1 日当たり 3～5 回局所使用されてきた (Grant, 1993)。 $H_2O_2$  の効果には用量相関性があり、過去には 0.5% (5,000 ppm) が治療に用いられてきたが、5 および 10% (50,000 および 100,000 ppm) になると角膜混濁、強い痛みおよび眼内炎症を起こすことはよく知られている (Chalmers, 1989)。30 歳の女性が 3%過酸化水素に保存したソフトコンタクトレンズを適切なカタラーゼ中和なしに使用したところ、すぐに充血、流涙、眼瞼の痙攣を伴う痛みを感じた。すぐにレンズを外し、局部麻酔薬による眼の治療を受けた。その後の 48 時間でデキサメタゾン点眼薬が使用されたにもかかわらず眼はますます赤くなり、角膜に点状の着色斑がみられるようになった。その後、角膜は透明になり始め、視力が回復し、数日後には点状角膜症および軽い不快感以外に後遺障害は認められなかった (Knopf, 1984)。

高含水性含ハイドロゲルコンタクトレンズを介した過酸化水素が及ぼす眼に対する影響の閾値レベルを決定するために、ヒト被験者 8 名を用いた二重盲検無作為化対照比較試験が実施された。レンズを 0、25、50、100、200、400、もしくは 800 ppm の過酸化水素を含む等張生理食塩水に予浸し、それを 5 分間装着したときの応答として、主観的快適性、結膜充血、角膜および結膜上皮の着色、ならびに角膜の酸素取り込み量が評価された。高レベルの  $H_2O_2$  ( $\geq 200$  ppm) では不快感が大きくなり、結膜充血の増悪がみられた。最高レベル (800 ppm) の  $H_2O_2$  でも、角膜および結膜上皮に強度の着色は誘発されず、角膜の酸素応答も変化しなかった (Paugh et al., 1988)。10 名の志願者の眼に過酸化水素溶液を点眼するか、または過酸化水素溶液に 2～4 時間浸漬したコンタクトレンズを装着する、単盲検対照比較試験が実施された。過酸化水素希釈点眼液の平均検出閾値は 812 ppm (範囲は

400～1,500 ppm) であった。平均閾値は、55%含水レンズで 267 ppm、38%含水レンズで 282 ppm であった。ハイドロゲルレンズから 50 ppm の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が除去される時間は、眼瞼を閉じたままの状態の装着で 30 秒以内、大きく眼を開けて 5 秒間隔で瞬きする場合には 60 秒以内であった。10 名の被験者に 50 ppm の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、500 ppm の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ならびに陰性および陽性対照を点眼投与後、フルオレセイン角膜透過性が測定された。その結果、陰性対照と 2 段階の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度で有意差はみられなかった。過酸化水素消毒剤の配合はレンズ内残留 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度がわずか 50～60 ppm になるように決められている (Mc Nally, 1990)。

#### 4.1.2.3.3 気道

##### 動物における試験

70%過酸化水素から発生させたエアロゾルの気道刺激性が、Alarie (マウス RD<sub>50</sub>) 法を用いて検討された。呼吸数が 50%低下する曝露濃度 (RD<sub>50</sub>) は 665 mg/m<sup>3</sup> [95%信頼区間 (CI) : 280～1,139 mg/m<sup>3</sup>]、毎分換気量が 50%低下する曝露濃度は 696 mg/m<sup>3</sup> (95%CI : 360～1,137 mg/m<sup>3</sup>) であった。比較的高濃度の過酸化水素エアロゾルは、呼吸器に対する刺激性物質であった (Solvay Duphar, 1995)。

麻酔された雄 Hartley モルモットが、過酸化水素エアロゾルに 5 分間曝露された。超音波ネブライザー (5 分間で約 1 mL が消費され、発生される最高過酸化物濃度は 42 mg/L と計算されたが、粒子径は不明) で発生された 0.034、0.34、ないしは 3.4%過酸化水素エアロゾル (0.01、0.1、ないしは 1 M) の吸入により、気管および主要気管支において、濃度依存的にポンタミンスカイブルー滲出 (血管透過性亢進の指標) が増加した。この効果は、カタラーゼおよびデフェロキサミン (鉄のキレート剤かつ過酸化水素のヒドロキシラジカル変換の阻害剤) の 5 分間の吸入前処置により用量依存的に低減された。さらに、高濃度の過酸化水素により、過剰換気 (気道収縮を示す) の 2 相性の亢進が誘発され、それはカタラーゼによる吸入前処置により抑制されたがデフェロキサミンでは抑制されなかった。著者らは、生じた炎症作用は過酸化水素自体により媒介されているばかりでなく、ヒドロキシラジカルによっても媒介されているかもしれないと述べている (Misawa and Arai, 1993)。

##### ヒトにおける所見

32 名の志願者のグループ (男性 18 名、女性 14 名、23～37 歳) が、さまざまな濃度の過酸化水素の蒸気にさまざまな時間、鼻呼吸 (フェイスマスクを使用) により曝露された。

呼吸刺激性の閾値が決定された（方法は公開されていない）。呼吸刺激性は主に過酸化水素濃度に依存し、曝露時間の影響はわずかにすぎなかった。曝露はすべて 5 分から 4 時間行われ、その結果、閾値は  $10 \text{ mg/m}^3$ （見かけ上の LOEL）、無影響レベルは  $5 \text{ mg/m}^3$  であった。著者らは、作業員が  $10 \text{ mg/m}^3$  の過酸化水素濃度で呼吸刺激症状を訴えたという、上述の試験結果と一致するロシアの職業曝露事例を引用している（Kondroshov, 1977）。Kaelin ら（1988）も、ミルク包装機械から発生した約  $12 \text{ mg/m}^3$  の過酸化水素（暫時  $41 \text{ mg/m}^3$  もあり得る）の曝露を受けた乳製品工場作業員 7 名が、眼および喉の刺激を訴えたことを報告した。 $\text{H}_2\text{O}_2$  製造工場ではドラムやタンク充填作業に従事している工場作業員において、鼻に対する軽微な刺激（および接触による皮膚の白色化）がみられた（CEFIC, 1996b）。作業中（1 時間）の最高平均曝露レベルは  $3.5 \text{ mg/m}^3$  であった。

#### 4.1.2.4 腐食性

先のセクションで述べたように、過酸化水素溶液は、濃度が 35%以上になると表皮の壊死を引き起こし、適用から数日後に褐色または灰色の領域として肉眼で分かるようになり、1 週間以内に落屑および潰瘍形成に至る。組織学的にみると、50%過酸化水素に起因する水疱形成が 48 時間までに観察された（FMC, 1990）。麻酔された 1 匹のニュージーランドホワイト種ウサギが 70%過酸化水素 0.5 mL で処置され、約 1 時間接触させておいた後に被験物質が除去された。4.5 時間目に、試験部位に軽微な紅斑および重度の浮腫、皮膚の下部に白い気泡がみられた。24 時間目でも軽度の紅斑、浮腫、皮膚直下の気泡、同時に 1~2 mm の大きさの褐色の斑点が数個みられた。そうした所見は 48 時間まで同様であったが、褐色の斑点は領域を形成するまでに拡大した。対応するドレイズスコアは、それぞれ 0.4/8.0、0.3/8.0、および 0.3/8.0 であった。病理組織学的病変は、3 度の熱傷で生じる病変と一致した。被験物質は、真皮、表皮、血管、結合組織および付属器に広範な損傷を与える物質と判定された（FMC, 1989）。

ニュージーランドホワイト種ウサギを用いて、50%または 70%過酸化水素溶液の急性皮膚腐食性が詳細に評価された（Du Pont, 1994）。50%過酸化水素では、3 分間の曝露期間の最終時点までに中等度の紅斑および軽度の浮腫が生じた。処置後 24、48、72 時間目には、軽度の紅斑および無症状から軽度の浮腫がみられた。7 または 14 日目では、皮膚刺激反応はみられなかった。70%過酸化水素処置のウサギでは、試験部位に塗布の時点で蒼白化がみられた。曝露 3 分後に、蒼白化領域の周辺で軽度の紅斑および重度の浮腫がみられた。24、48、72 時間目では、中等度または軽度の紅斑、および中等度または軽度の浮腫がみられた。試験部位では皮膚脱落や裂傷もみられた。処置後 24、48、72 時間目に表層の壊死がみられ、7 日目には全層に及ぶ壊死がみられた。14 日目には癒痕組織がみられた。50%

過酸化水素への 1 時間曝露では、軽微な紅斑、重度の浮腫および蒼白化が生じた。軽度あるいは軽微な浮腫、もしくは浮腫を伴わない軽度の紅斑が、7 日間にわたりみられた。処置後 14 日目では紅斑も浮腫もみられなかった。処置後 72 時間目に、試験部位に表層壊死がみられ、7 日目には全層に及ぶ壊死および皮膚脱落がみられた。14 日目には癒痕組織がみられた。50%過酸化水素への 4 時間曝露では、曝露期間の最終時点までに軽度の紅斑、中等度の浮腫および蒼白化が生じた。蒼白化は 48 時間にわたり観察された。処置後 7 日間を通じて中等度、軽度もしくは軽微な紅斑、および、軽度あるいは軽微な浮腫がみられる例もあったが、浮腫がみられない例もあった。処置後 14 日目では紅斑も浮腫もみられなかった。処置後 72 時間目に表層壊死がみられ、7 日目には全層に及ぶ壊死および皮膚脱落がみられた。14 日目には癒痕組織と皮膚脱落がみられた。

### 刺激性および腐食性に関する結論

動物試験からは、過酸化水素の眼・皮膚に対する刺激性／腐食性を判断する上で十分な証拠が得られている。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 製造工場のドラムやタンクへの充填作業に要する 1 時間で最高平均レベル 3.5 mg/m<sup>3</sup> に曝露された作業員では、軽微な鼻刺激性および接触による皮膚の漂白が観察され、10 mg/m<sup>3</sup> の過酸化水素蒸気に曝露された試験志願者で、軽微な呼吸刺激が報告されている。

過酸化水素は強度の腐食性物質 (R35) であり、低濃度でも眼刺激性 (R36) や皮膚刺激性 (R38) を有し、眼に重度の損傷を与える可能性がある (R41)。分類についてはセクション 1 を参照のこと。

#### **4.1.2.5 感作性**

9 種の 3%過酸化水素製剤についての皮膚感作性が、Magnusson-Kligman 法の変法によりモルモットで検討された (Du Pont, 1953)。感作のために、モルモット 5 匹に 0.1%過酸化水素 0.1 mL が 2 週間にわたり 6 回皮内注射され、別群の 5 匹には 3%過酸化水素 1 滴が擦過処置した皮膚に 6 回適用された。2 週間の休息期間後、動物に対して先に感作で行われた処置を 1 回行って、チャレンジさせた。皮膚反応は 1、24、および 48 時間目に観察された。感作処置やチャレンジに先立って、10 匹の動物を用いて、正常皮膚に対する一時刺激性も検討された。本試験は、使用動物数が少なく、報告も適切ではなかったために最新の要件に適合していないが、結果概要からは 9 種の過酸化水素製剤はすべて感作性がないように思われた (1 物質当たり 10 匹が使用された)。

過酸化水素貼付試験陽性の 2 つの症例を扱った 1 件の臨床報告書がある (Aguirre et al., 1994)。最初の症例は 20 歳の女性であり、美容師として 4 年間働いており、アトピーやアレルギーの既往歴はない。もう 1 つの症例は 27 歳の主婦であり、アトピーやアレルギーの既往歴もなく、この 6 年間 1~2 カ月ごとに髪を家で自分自身で染めている。両症例ともに 3%過酸化水素に対する皮膚反応が強く、前者の患者は硫酸ニッケルと 4-アミノフェノールにも陽性であり、後者は硫酸ニッケル、精製ツベルクリンタンパク質 (PPD)、ホルムアルデヒド、4-アミノフェノール、モノチオグリコール酸グリセリルおよびココミドプロピルベタインにも陽性であった。著者らは、整髪関連の一連の化学物質の貼付試験を受けたほかの美容師 156 名はすべて 3%過酸化水素に対して陰性であったと報告している。フィンランド労働衛生研究所の皮膚科では、1985 年以来、3%過酸化水素水溶液を含む一連の被験物質を用いて、整髪剤中の化学物質への曝露を受けている皮膚炎患者 (主に美容師) を検査してきた。1991 年以降の検査結果については電子データが利用可能であった。130 名の患者が検査でアレルギー反応がなく、1 名に刺激反応がみられた。フィンランド職業病登録簿が 1975~1997 年の間で検索されたが、過酸化水素に起因するアレルギー性皮膚症の症例は何ら含まれていなかった。フィンランドのトゥルク大学中央病院 (University Central Hospital in Turku) 皮膚科は、1995~1996 年の間に 3%過酸化水素を用いて患者 59 例の貼付試験を行ったが、陽性反応はみられなかった (Kanerva et al., 1998)。

### **感作性に関する結論**

過酸化水素貼付試験陽性の報告例が 2 例あり、古い動物試験 (結果は陰性) には不確かさがあり、また何十年にも及ぶ広範な職業的および消費的使用についての知見があるが、過酸化水素の皮膚感作誘発能は極めて低く、そのために分類基準に当てはまらないと自信をもって述べることができる。

#### **4.1.2.6 反復投与毒性**

マウス、ラット、およびイヌにおける反復投与毒性試験の要点および主要な結果を Appendix E に要約する。試験で用いられた投与方法は、吸入 (過酸化水素の蒸気)、強制経口投与、飲水投与である。ある試験で過酸化水素が混餌投与されたが、その試験では実際に胃腸管に入った過酸化水素の濃度/用量がかなりあいまいであった (影響は報告されていない)。別の試験では、報告内容は不十分ではあるが、ラットが空気を媒体とした過酸化水素蒸気に全身曝露され、剃毛皮膚に対する局所的影響が酵素測定により評価された (Kondrashov, 1977)。

#### 4.1.2.6.1 吸入曝露

##### 動物における試験

1950年代初頭に実施された一連の試験では、ラットとマウスに対して7週間、イヌに対しては6か月間の過酸化水素蒸気への全身曝露が行われた（Comstock et al., 1954; Oberst et al., 1954）。試験方法に制限（比較的精度の低い過酸化水素分析法など）があり、報告内容が不完全であるため、確実な結論を導き出すことは困難であるが、これらの独自の試験から、いくつかの重要な知見が得られている。23匹のラットの1群が平均過酸化水素レベル  $93 \text{ mg/m}^3$  (67 ppm) に、マウス各群10匹から成る複数の群が  $79 \text{ mg/m}^3$  (57 ppm) または  $107 \text{ mg/m}^3$  (77 ppm) に曝露され、その結果、主として外見異常、すなわち鼻汁、足の浮腫、鼠径部皮膚の刺激反応、脱毛がみられた。ラットでは体重増加量がわずかに低かった（有意差なし）。肺、気管、肝臓、腎臓、脾臓、角膜の病理/病理組織学的検査では重大な変化は認められなかった。

2匹のイヌ（1匹は対照）が平均過酸化水素濃度  $10 \text{ mg/m}^3$  (7 ppm) に1日1回6時間、毎週5日間で6か月間曝露（総曝露回数126回）された。この例では、明らかに呼吸器系の変化がみられただけでなく、曝露による外見異常も認められた。イヌでは、曝露中に体表数カ所がはがれるほど自分の体を引っかいていたことから外表に刺激反応があったことは明らかである。被毛の漂白が観察された。イヌは、24週目の曝露中に、時折くしゃみをし、流涙もみられた。剖検後の病理検査で変化がみられたのは皮膚および呼吸器系のみであった（検査された器官の範囲は報告なし）。皮膚はかなり肥厚し、脱毛が目立ったが、毛包の破壊はみられなかった。肺では無気肺や気腫の領域が散在していた。終末細気管支や呼吸細気管支には筋層の過形成がみられた。肺組織、主に肺胞壁が分断されているようにみえる部分の至る所に、赤色化した円形の領域が散在していた。なお、この領域はコラーゲンから構成されており、筋肉細胞および繊維状の弾性組織を含むこともあった（Comstock et al., 1954; Oberst et al., 1954）。ラットやマウスよりも、イヌの方が過酸化水素の蒸気に敏感であるように思われる。イヌは口呼吸動物であることに注意が必要である。その試験では過酸化水素の濃度が1濃度だけであったため、NOAELを決定することは不可能である。イヌでみられた影響の種類（ラットやマウスに比べて）から考察すると、 $10 \text{ mg/m}^3$  が暫定的にLOAELと考えられる。

Kondrashov ら（1977）はラットを用いて全身曝露（刈毛）による亜慢性毒性試験（過酸化水素  $0.1\sim 10.1 \text{ mg/m}^3$  の蒸気に1日5時間、週5日間で4か月間曝露）を行った。呼吸器および曝露を受けた皮膚（セクション 4.1.2.6.2 参照）が酵素組織学的方法で検査された。呼吸器系への影響に関する  $\text{H}_2\text{O}_2$  蒸気の閾値濃度は  $10 \text{ mg/m}^3$  と報告された。無影響濃度は  $1 \text{ mg/m}^3$  であった。 $10 \text{ mg/m}^3$  の蒸気への2および3か月間の曝露では、血清エポキシダーゼ

活性の亢進（対照群動物で 2.16 および 2.20 に対してそれぞれ 2.50 および 2.63）がみられた。4 か月後では、肺でコハク酸デヒドロゲナーゼ（SDH）活性の低下（対照群で 0.34 に対して曝露群動物で 0.26）がみられた。4 か月後には、肺で SDH、モノアミンオキシダーゼ（MAO）、酸性ホスファターゼ、ジエステラーゼ活性の低下およびアルカリホスファターゼ活性の亢進がみられた。方法に制限があり通常とは異なること、また報告が不十分であることから、試験で得られた所見の評価は困難であり、NOAEL について確かな結論を導き出すことはできない。組織中酵素レベルの変化に基づいて、過酸化水素 10 mg/m<sup>3</sup> を LOEL とみなすこともできる。この試験で得られた所見は、先に挙げたイヌを用いた試験を支持するものと考えられる。

技術会議（Technical Meeting）での過酸化水素のリスク評価が完了したあと、産業界はラットにおける 90 日間反復吸入毒性試験に必要なデータをそろえるために、ラットを用いた 28 日間用量設定試験（CEFIC Peroxygen Sector Group, 2002）を行った。各群雌雄各 5 匹の Alpk:AP<sub>f</sub>SD（Wistar 由来）ラットが、0（対照）、2.9、14.6、33 mg/m<sup>3</sup> の過酸化水素蒸気に 1 日 6 時間、週 5 日間で 28 日間全身曝露された。14.6 および 33 mg/m<sup>3</sup> の曝露レベルでは気道刺激性を示す徴候がみられたが、2.9 mg/m<sup>3</sup> ではみられなかった。病理組織学的検査（Table 4.12）に関しては、高レベルの 2 濃度で、鼻腔前部の上皮に濃度相関性の壊死と炎症がみられた。最高曝露濃度群の雌 2 例の喉頭に、単核細胞の浸潤がみられた。さらに肺については、各曝露群の雄各 1 例および最高用量群の雌 2 例で脈管周囲の好中球浸潤がみられ、低用量側 2 群の一部の動物では出血が認められた。対照群動物では変化はみられなかった。水溶性酸化剤の蒸気から予想されるように、過酸化物による一次的障害は鼻部に集中していた。肺における病態に関しては、その試験の著者らは、曝露濃度との関連性が欠如していることや発現率が低いことから、影響が曝露に起因する可能性は低く、したがって、試験の NOAEL を 2.9 mg/m<sup>3</sup> とした。

**Table 4.12** Summarised microscopic findings of the respiratory system in the 28-day inhalation study in rats

Target organ	Microscopic findings			
	0 mg/m <sup>3</sup>	2.9 mg/m <sup>3</sup>	14.6 mg/m <sup>3</sup>	33 mg/m <sup>3</sup>
Nasal cavity	-	-	Necrosis* and inflammation (squamous epithelium, anterior regions of nasal cavity) 3/5 M, 2/5F	Rhinitis 1/5 M Necrosis* and inflammation (squamous epithelium, anterior regions of nasal cavity) 4/5M, 4/5F
Larynx	-	Inflammation 1/5F		Mononuclear cell infiltration 2/5F Epithelial erosion 1/5M
Lung	-	↑ Perivascular neutrophil infiltration 1/5M Haemorrhage 2/5M, 1/5F	↑ Perivascular neutrophil infiltration 1/5M Haemorrhage 2/5M	↑ Perivascular neutrophil infiltration 1/5M, 2/5F

- indicates no findings

\* Necrosis in the context of this report means the more common type of cell death following external stimuli (cf. apoptosis), manifested by severe cell swelling or rupture, denaturation & coagulation of cytoplasmic proteins and breakdown of cell organelles

F - female; M - male

## ヒトの所見

過酸化水素の長期吸入曝露に関連する有害影響を取り扱った文献の中から、ある報告が 1 つ見つかった。その報告は、進行性の呼吸困難および両側性でびまん性の肺小結節性浸潤を呈する 41 歳の牛乳充填機操作員に関するものであった。その機械では厚紙が過酸化水素槽を通過しており、機械の近くの  $\text{H}_2\text{O}_2$  測定値は  $41 \text{ mg/m}^3$ 、床の上では  $12 \text{ mg/m}^3$  であった。したがって、日中の一般的な曝露レベルは  $12 \text{ mg/m}^3$  で、一時的に最高で  $41 \text{ mg/m}^3$  に上昇するという状態であった。その患者は機械を、3 年間は週 2 回、その後ごく最近の 6 か月間では毎日操作していた。患者は 25 年間毎日 2 箱のたばこを吸っている。患者の症状は入院前約 1 か月以内に現れた。患者は（ほかの 6 名の労働者と同様に）仕事に眼および喉に刺激があること、毛髪が次第に漂白されていくことに気づいた。肺機能検査値および肺ガス交換測定値は間質性肺疾患を示すものであった。経気管支生検標本において、肺胞虚脱、肺胞壁の肥厚、単核細胞の間質性浸潤、肺胞内のヘモジデリン含有マクロファージが認められた。患者は適切な鑑別診断法により慎重に検査された。赤血球カタラーゼは正常範囲内であった。患者は、職業的曝露から遠ざかってからは治療なしでも徐々に改善し、1.5 カ月目で、もはや呼吸困難を示さなくなった。その後のコルチコステロイド服用により胸部 X 線写真および肺機能検査は正常になった。著者らは、その患者の臨床症状の原因が、過酸化水素への高濃度曝露にあるとした。喫煙が関係していた可能性もある (Kaelin et al., 1988)。

$\text{H}_2\text{O}_2$  製造工場の全従業員について FVC、FEV、PEF 測定を含む肺機能検査が 3~5 年間行われたが、職業的曝露に起因する有害影響を示す証拠はみられなかった (CEFIC, 1996b)。過去には同じ施設で毛髪の漂白、鼻血、眼または呼吸刺激が報告されたことがある。運転操作法が改善（典型的な曝露レベルは検出不可から  $0.79 \text{ mg/m}^3$ ）されてから事故の報告はほとんどなかった。

ある過酸化水素製造者が最近、4 施設の製造作業員に関する健康調査を行った (Degussa-Huls, 1999)。調査対象には 110 名の作業員が含まれ、その 80 名が 10 年を超える期間製造に携わっていた（最長で 40 年間）。1990 年代の全期間の曝露データを収集する対象として、半自動装置を用いた積み込みおよび充填作業、ドラムや容器への包装作業、トラックや貨車への積み込み作業、安定剤の添加、各種濃度の過酸化水素溶液の調製作業が選ばれた。交代勤務全体の過酸化水素平均レベルは、職業曝露限度 (OEL)  $1.4 \text{ mg/m}^3$  (セクション 4.1.1.1.2 参照) 未満であったが、短期間の濃度は上昇して約  $5 \text{ mg/m}^3$ 、偶発的な状況では  $10 \text{ mg/m}^3$  であった。健康診断データには、一部の肺機能検査 (努力性肺活量および最大呼気流量)、症状の問診などの所見が含まれていた。肺機能検査では、注目すべき所見は報告されなかった (喫煙者では、予想どおり肺機能検査値の数年間の変化曲線にわずかな低下がみられた)。2 施設では、過酸化水素に偶発的に接触したあとで皮膚刺激および皮膚の

白色化が報告されることが時折あった。毛髪漂白の事例は遠い過去には 1 施設で発生している。急性咽喉刺激も 1 例報告されている。健康調査データは、過酸化水素曝露を受けると治療を要する病気を発症するという懸念を大方払拭するはずのものであるが、それらは適切に実施された試験から得られたものではないため、有害影響がなかったことを示す信頼できる証拠として用いることはできない。

フィンランド労働衛生研究所は技術会議の援助を受けて、フルーツジュースの無菌包装作業で過酸化水素蒸気の曝露を受けている少人数の作業員を有する 1 企業において、労働者健康調査を共同で実施した (Riihimäki et al., 2002)。その施設のフルーツジュース製造は 1998 年の春に逐次開始されたため、すべての作業員が過酸化水素の取り扱いに携わった期間は 3 年以下であった。1999 年夏に、工場ホール的一端に設置された 2 台の包装用機械を担当していた 6 名の操作/保守作業員が、眼と気道の刺激、頭痛、嗅覚の一時的喪失、皮膚症状および徴候、毛髪の白色化が生じたことを、労働衛生担当職員に訴えた。作業員の呼吸区域では空気中の  $\text{H}_2\text{O}_2$  について最高濃度  $11 \text{ mg/m}^3$  [8 時間時間加重平均 (TWA)  $2 \sim 3 \text{ mg/m}^3$ ] が測定され、機械内部の故障を修理してから断続的な皮膚接触が続いて起こった。機械内部の Karton を手で取り扱った作業員は、指に灼熱感と突き刺すような痛みを感じ、手や顔が乾燥し、皮膚の弾力性が低下したこと、また髪が乾いてざらざらした状態となり漂白されたことを報告した。工場ホールに設置されたほかの 4 台の機械では過酸化水素検出レベルは低く、被害を訴える操作員は現れなかった。

状況を改善するための対策が開始され、過酸化水素レベルがモニタリングされたが、目標レベル ( $0.5 \sim 0.7 \text{ mg/m}^3$ ) が 2000 年春に達成されるまで数か月かかった。その時点で、調査票を用いて症状が確認されたが、その調査票では、高濃度曝露の原因である 2 台の機械で作業していたほかの作業員に眼・気道刺激性および喘息症状があったことが示された。その企業の労働衛生管理部門の記録から呼吸器疾患の既往歴が調査され、 $\text{H}_2\text{O}_2$  レベル低下の前後での経時的な病欠記録も 2001 年春まで調査された。機械操作員 2 名、保守作業員 1 名にみられた再発性気管支炎-副鼻腔炎は一定の経過をたどり、高濃度曝露 10 か月間の経過と一致していた。症例報告書で詳細に報告されている患者 2 名では、気管支収縮もみられ、完全に回復したのは吸入コルチコステロイドの投与が行われ、並行して曝露レベルが低下したあとであった。

著者らは、以上の結果は、高濃度の過酸化水素蒸気への反復曝露により、気道粘膜の持続的な刺激反応および炎症、呼吸器感染症に対する感受性の亢進が誘発され、また刺激物質誘導性の喘息が誘発されることもあるという仮説を支持するものであると結論付けている。酸素（酸素過剰）およびオゾンによる呼吸器に対する作用との類似性が明らかに認められ、そのことにより新しい知見の生物学的妥当性が高まったと述べている。しかし、上記調査には肺の特殊検査が含まれていなかったため、過酸化物により起こり得る慢性的な肺の変

化を評価することはできない。上記調査でモニタリングされた患者は曝露量の減少後には健康を回復したことから、注目すべき影響はありそうもない。さらに、曝露期間は慢性的影響が現れるには短すぎる。限定的なこの調査から、過酸化水素の反復吸入毒性（気道に対する作用）に関する LOAEL（8 時間 TWA）を  $2 \text{ mg/m}^3$  と求めることができる。曝露濃度が顕著に変動したため、影響をもたらす上で、最高濃度（1 台で最高  $11.3 \text{ mg/m}^3$ 、もう 1 台で最高  $4.2 \text{ mg/m}^3$ ）が重要な役割を果たした可能性がある。

#### 4.1.2.6.2 皮膚曝露

ラットを用いた亜慢性試験（4 か月、5 時間/日、5 日間/週）が実施され、被毛を機械的に除去されたラットが  $0.1 \sim 10.1 \text{ mg/m}^3$  の過酸化水素蒸気に全身曝露された（Kondrashov, 1977）。試験計画書の詳細は報告されていない。ラット皮膚に対する  $\text{H}_2\text{O}_2$  蒸気的作用の閾値濃度は  $1 \text{ mg/m}^3$  と報告され、無作用濃度は  $0.1 \text{ mg/m}^3$  であった。  $1 \text{ mg/m}^3$  群では、2 か月後に背部表皮の酵素組織学的検査で MAO および NAD-ジアホラーゼ活性の亢進が、4 か月後に MAO、NAD-ジアホラーゼ、SDH、乳酸デヒドロゲナーゼ活性の亢進が明らかになった。さらに、S. K. Rozentel の方法（方法は記載なし）により、皮膚角質層に重大な機能障害が認められた（4 か月後）。この所見は、試験方法が限定的で一般的なものではないこと、また報告が不十分なことから評価が困難であり、NOAEL に関する確実な結論は得られなかった。組織酵素レベルの変化に基づいて判断すると、過酸化水素  $1 \text{ mg/m}^3$  を LOEL と考えることができる。呼吸器系に比べて皮膚は過酸化水素に対する感受性が高いというのが著者の主要な論点であった（セクション 4.1.2.6.1 参照）。ラット、マウス、イヌを用いた先の試験はその見解を裏付けているように思われる。

#### 4.1.2.6.3 経口投与

##### 強制経口投与

Wistar ラットに対して過酸化水素を 40～100 日間強制経口投与を行った試験が 2 件あり、それらは評価に値するものがある。その片方では、かなり濃度の高い過酸化水素溶液（5%）が  $56.2 \sim 506 \text{ mg/kg}$  体重/日の用量範囲で投与され（Ito et al., 1976）、もう一方では、希釈液（0.06～0.6%）が  $6 \sim 60 \text{ mg/kg}$  体重/日の用量範囲で投与された（Kawasaki et al., 1969）。後者の試験では、主に最高用量で以下の影響があるように思われた。すなわち、投与 20 日目以降で体重増加量の有意な減少、投与 40 日目で脾臓重量のわずかな高値（100 日目の試験終了時にはみられなかったが）、投与 100 日目ではヘマトクリット値および血漿蛋白の低下がみられた。30 および  $60 \text{ mg/kg}$  体重/日群では、100 日目の試験終了時

に、血漿カタラーゼ活性の有意な低下がみられた。したがって、NOAEL は 20 mg/kg 体重/日であった。Ito ら (1976) によると、高用量群 (506.0 mg/kg) で体重増加抑制 (ならびに摂餌量および食餌効率の低下)、また赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の低下がみられた。高および中用量 (168.7 mg/kg) 群では分節核好中球および単球の増加、ならびにリンパ球の減少がみられ、S-GOT、S-GPT、アルカリホスファターゼ、血液尿素窒素の低下もみられた。S-GOT の低下は低用量 (56.2 mg/kg) 群でもみられた。高用量群では肝、脾臓、副腎、精巣の各相対重量が上昇したように思われたが、投与に起因する病理組織学的所見は認められなかった。高用量群では胃粘膜のびらん、痂皮ならびに筋層への小円形細胞の散発的な浸潤がみられた。用量反応性がみられる評価項目 (肝酵素活性の低下および一部の血液学的検査項目) があつたことは注目に値する。著者らはこうした影響の原因を酸素としたが、胃腸粘膜に対する局所的影響 (十二指腸および小腸についてはデータの報告がない) は、複雑な因子と考えるべきである。

### 飲水投与

過酸化水素の飲水投与による生物学的影響を検討した試験がいくつかあるが、ほとんどの場合、目的が極めて限られており、毒性学的評価に必要な基礎的データをそろえた試験はマウスを用いた最新の 90 日間試験 (FMC, 1997) だけである。0.3%以上の濃度の過酸化水素を数週間にわたり飲水投与されたラットとマウスでみられた共通の所見は、摂水量の減少と発育遅延であつた (Shapiro et al., 1960; Kihlström et al., 1986a, 1986b; Hankin, 1958; Romanowski et al., 1960; Du pont, 1995; FMC, 1977)。Takayama による F344 雌雄ラットを用いた試験 (1980) では、最低用量、すなわち 0.15%過酸化水素飲料水溶液の 10 週間投与群でも、体重増加量が対照群動物に比べて少し低いように思われた。この所見は、雄 dd マウス (Aoki and Tani, 1972) でも、いくぶん低い用量 (0.1%) を投与されたカタラーゼ欠損 C57BL/6NCrIBR マウス (FMC, 1997) でもみられなかった。飲料水中の過酸化水素濃度を上げる (1 および 1.5%) と、Holzman ラット (Shapiro et al., 1960) で汎汎性齲 (う) 食病変および歯周組織の病理学的変化が誘発され、2.5、5、10%過酸化水素を飲水投与されたラットはすべて 43 日以内に死亡した (Romanowski et al., 1960)。

各群雌雄各 10 匹の F344 ラットに 0、0.15、0.3、0.6、1.2、2.4%の濃度の過酸化水素が 10 週間飲水投与された (Takayama, 1980)。投与開始直後から、2.4%群のラットで顕著な体重減少と鼻出血がみられた。1.2%および 0.6%群でも、過酸化水素投与の初期の段階から体重減少がみられた。体重増加率は、対照群の雄では 66.1%であつたが、過酸化水素投与群では最大増加率が 53.3% (0.6%投与群) であり、2.4%過酸化水素投与群の雄では 45.9%の体重減少となつた。対照群の雌の体重増加率は 37.2%であつたが、投与群の最大増加率は低用量 (0.15%) 過酸化水素投与群における 29.7%で、最高用量群では 30.4%の体重減

少であった。2.4%群の雄のうち 9 例、およびほかの用量群のすべてのラットが 10 週投与期間の最後まで生存した。雄と同様に、最高用量群の雌 10 例中 9 例、およびほかの用量群のすべてのラットが投与期間の最後まで生存した。各群 5 例について病理組織学的検査が行われた。病理学的所見が報告されたのは最高用量群だけであり、雌雄全例で多発性胃びらんおよび潰瘍が、雄 2 例で精巣萎縮（群全体で精巣重量が対照群より 60%低かった）が、ラット 1 例（7 週目に死亡）で肝うっ血がみられた。最高用量の雄で脳以外の組織の重量の減少がみられ、ほぼ体重減少に対応しており、雌でも同様であった。最低用量においても体重増加に対する影響が明らかであったことから NOAEL を決定することはできない。

カタラーゼ欠損 C57BL/6NCrIBR マウスを用いた最近の 90 日間飲水投与試験では、各群雌雄各 15 匹に、35% $H_2O_2$  から調製された 100、300、1,000、3,000 ppm の蒸留水希釈溶液が 90 日間投与された（FMC, 1997）。対照群動物には蒸留水が投与された。経過観察終了時点で各群雌雄各 10 例に麻酔が施され、血液採取のあとで肉眼および病理組織学的検査のために屠殺された。各群雌雄各 5 例には、追加的な 6 週間回復期間が設定され、その期間は蒸留水のみが継続投与された。

投与期間（0～90 日目）： $H_2O_2$  濃度 300、1,000、3,000 ppm 群の両性で投与に起因する用量依存的な影響が明確にみられた。有意な体重減少がみられたのは 3,000 ppm 群の雌雄のみであった。300 ppm 以上の群の雌で摂餌量および摂水量の用量相関的な減少がみられたが、雄では最高用量群で一貫した減少がみられた。摂水量の有意な減少に基づき、雌における LOAEL は 300 ppm（103 mg/kg/日）とされた。

回復期間（91～134 日目）：最も注目すべき影響は 3,000 ppm 群の雄、および 300、1,000、3,000 ppm 群の雌でみられた摂水量の増加であった。

病理組織学的検査：組織学的検査は、全群全例において、すべての肉眼病変、舌、食道、胃、十二指腸、回腸、空腸、盲腸、結腸、直腸について行われ、高用量群および対照群動物においては、生殖器を含むすべての主要器官についても行われた。過酸化水素に起因する変化がみられたのは十二指腸のみであり、その変化は最終解剖時に 1,000 および 3,000 ppm 群の雌雄で観察され、300 ppm 群では雄のみに観察された。その十二指腸の全体的な構造は正常であったが、対照群マウスに比べて横断面直径が増加し、肥大してより実質化の進んだ絨毛を伴う粘膜領域の拡大もみられた。粘膜層の厚みや絨毛の大きさの増高がみられたため、この変化は粘膜過形成と判定された。粘膜過形成は 100 ppm 群のマウスや対照群ではみられなかった。

死亡率：過酸化水素の投与に起因する死亡はなかった。対照群の雄 1 例（死因は未確認）

が死亡し、3,000 ppm 群の雄 1 例が投与 43 日目に死亡した（病理組織学的所見なし）。回復期間後は、いずれの用量群においても過形成はみられなかった。

**結論：**NOAEL は、摂餌量および摂水量の減少ならびに十二指腸粘膜の過形成の所見に基づいて、雄および雌で 100 ppm（それぞれ 26 および 37 mg/kg/日）とされた。

#### 4.1.2.6.4 臓器毒性を示唆するその他の試験

慢性気道疾患の病理学的な発症機序を調べることを目的とした試験では、25～200  $\mu$ M の過酸化水素中で 2～60 分間インキュベートされた休止期にあるウシ気管筋細胞において、マイトジェン活性化タンパク質（MAP）キナーゼの活性化がみられた（Abe et al., 1994）。著者らの考えによると、過酸化水素により細胞シグナル伝達の正の調節が起こったことから、ヒトの重要な炎症性気道疾患（気管支肺異形成および重度の慢性喘息）でみられる平滑筋量の増加は活性酸素中間体の作用による可能性があることが示された。

実験モデルやヒト脳を用いた試験から作成されるデータベースの充実により、酸化ストレス（一部は過酸化水素により媒介される）が、パーキンソン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症などのニューロン変性疾患で重要な役割を果たしているのではないかと考えられるようになった（Simonian and Coyle, 1996）。過酸化水素中和機能が欠損する個体は増大するリスクに身をさらす可能性があるが、外因性過酸化水素曝露が影響を及ぼすことを示唆する確かな仮説はない。

#### 4.1.2.6.5 反復投与毒性に関する結論

過酸化水素の反復経口投与毒性を特徴づける上で、動物試験のデータベースが十分に利用できる。ラットに 50～500 mg/kg 体重/日の用量範囲で強制経口投与した場合の典型的な所見は、体重増加の抑制であった。そのほかの検査項目では、赤血球数の減少、およびヘマトクリット値、血漿蛋白濃度、血漿カタラーゼ活性の低下がみられることもあった。0.5% 過酸化水素がラットやマウスに飲水投与されたときは、一貫した体重増加抑制（ならびに摂水量の減少）がみられ、用量を下げた別に行われた試験では、0.15% = 1,500 ppm でもラット（Takayama, 1980）に対して、3,000 ppm でもマウス（FMC, 1997）に対して同様の効果が観察された。後者はカタラーゼ欠損マウスを用いて、望ましい試験デザインに基づいて行われた 90 日間試験であるが、その試験では過酸化水素の飲水投与による NOAEL は 100 ppm、すなわち 1 日量として雄で 26 mg/kg 体重、雌で 37 mg/kg 体重であった。摂餌量および摂水量の用量相関的な減少、ならびに雄 1 例における十二指腸粘膜過形成の所見に

基づいて、LOAELは300 ppm（雄で76 mg/kg 体重、雌で103 mg/kg 体重）とされた。過形成は高用量側、すなわち1,000 および3,000 ppm（相当する1日量はそれぞれ雄で239 mg/kg、雌で328 mg/kg、および雄で547 mg/kg、雌で785 mg/kg）群の雌雄で一貫してみられた所見であり、回復期間中に完全な回復がみられた。最高用量（3,000 ppm）では、血漿総蛋白およびグロブリン濃度の低下がみられた。

過酸化水素の反復吸入曝露毒性は十分に解明されてはおらず、ラットとイヌを用いた限定的な試験が1つだけあり、それによると約10 mg/m<sup>3</sup>で皮膚、気道、肺への局所的な影響があると考えられる（Kondrashov, 1977; Comstock et al., 1954; Oberst et al., 1954; CEFIC Peroxygen Sector Group, 2002）。こうした所見は、ヒトの間質性肺疾患に関する単独の報告症例（Kaelin et al., 1988）を考慮すると注目に値するものである。なお、その症例は就業日のほとんどで過酸化水素濃度約12 mg/m<sup>3</sup>、一時的には最高41 mg/m<sup>3</sup>の職業的曝露を受けた状況の中で発生したものである。ある工場で過酸化水素製造に携わるすべての作業員について3～5年間、肺機能検査が行われたが、曝露に起因する有害な影響を示す証拠は得られなかった。以前報告された眼や気道の刺激性や毛髪の漂白の症状は、過酸化水素濃度が検出不可から0.8 mg/m<sup>3</sup>の範囲に低下したときには消失した。最近、長期間の曝露を受けた作業員の臨床所見と症状に関する調査が、ある企業の労働衛生監視プログラムの中で実施され、その結果偶発的な急性障害が発生したことが分かったが、慢性肺障害は示唆されなかった。しかし、その健康データは適切な試験から得られたものではないことから、有害影響が全くないということを示す確かな証拠として用いることはできない。それとは別に、無菌包装作業で比較的高レベル〔2～3 mg/m<sup>3</sup> 8時間TWA および最高11 mg/m<sup>3</sup> 短時間曝露（STE）〕の過酸化物の蒸気に約10か月間曝露された少人数の作業員（N=6）に関する健康モニタリング試験（Riihimäki et al., 2002）が行われ、その結果、作業員の半数で持続性の気道刺激反応および炎症が誘発され、呼吸器感染に対する感受性が亢進するなどの症状がみられたが、曝露を徹底的に抑えるとそれらの症状は消失した。ヒトに関する所見などのそのほかのデータは、過酸化水素の反復吸入毒性の特徴を明確化するのに役に立つ。

#### 4.1.2.7 変異原性

##### In vitro 試験

過酸化水素は、種々の *in vitro* 試験系で変異原であり、遺伝毒性物質である（Appendix F の要約データを参照のこと）。細菌を用いた試験では、ほとんどの遺伝子突然変異試験（Ames 試験では特に酸素ラジカルに敏感な菌株）、DNA 損傷・修復試験で陽性であった。

哺乳動物細胞を用いた試験では、遺伝子突然変異試験、DNA 損傷・修復試験、UDS 試験、SCE 試験、および染色体異常に関する細胞遺伝学的試験において、ほとんどの場合に陽性であった。応答は不変ではなく (Abu-Shakra and Zeiger, 1990)、細菌および哺乳動物細胞のカタラーゼ存在量の差により影響を受けることが多かった。カタラーゼ活性のない細菌の菌株は特に敏感なようであった (Abril and Pueyo, 1990)。過酸化水素耐性チャイニーズハムスター細胞株 R-8 は、親細胞に比べてカタラーゼ活性が 10 倍高かった (Sawada et al., 1988)。代謝活性化系を使用した試験はほとんどないが、ミクロソームミックスにより (カタラーゼ添加のように) 遺伝毒性応答が顕著に低下または消失するという事は、S9 に過酸化水素分解酵素が含まれていることを示していると考えられる (Mehnert et al., 1984a; 1984b; Speit et al., 1982; Procter & Gamble, 1985)。防御酵素に加えて、突然変異に対する細胞の感受性を決定すると考えられているそのほかの因子は、フェントン反応 (ヒドロキシルラジカルの生成) がどの程度起こるかということと細胞の修復能 (Kruszewski and Szumiel, 1993) である。

### In vivo 試験

*In vivo* 変異原性・遺伝毒性に関しては、ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験から最新の *in vivo-in vitro* 肝細胞不定期 DNA 合成 (UDS) 試験およびマウス骨髄小核試験までの範囲にわたるものが有用であった (Appendix F)。さらに、2 つの宿主経路試験があり、うち片方では、サルモネラ菌指標微生物を腹腔内接種されたマウスに対して 0.3% 過酸化水素 0.5 mL が 2 回強制経口投与 (keck et al., 1980) され、もう一方ではさまざまな濃度の過酸化水素が、事前に腫瘍細胞の腹腔内接種を受けたマウスに腹腔内注射された (Schöneich, 1967)。前者の例では変異原性陽性の結果が得られ、過酸化水素が吸収されて細菌と接触したことが示唆された。後者の例では、過酸化水素の腫瘍細胞に対する直接的な局所作用として染色体異常が予想される。応答強度には著しい個体差がみられ、著者らはそれが腹腔内の赤血球数 (したがってカタラーゼ) の差によるものとしている。

ラット肝臓を用いた *in vivo-in vitro* UDS 試験 (CEFIC, 1977b) では、Wistar 雄ラット 5 匹に過酸化水素が 25 または 50 mg/kg (0.1 または 0.2% 溶液) の用量で約 30 分かけて投与速度 0.2 mL/分で静脈内注入された。陰性対照には同じ投与速度・容量 (25 mL/kg) で水が投与された。陽性対照動物 (雄 5 匹) にはコーン油に懸濁させたアセトアミドフルオレン (2-AAF) が 75 mg/kg の用量で経口投与された (12~14 時間試験)。2~4 時間試験の陽性対照にはジメチルニトロサミン (DMN、水に溶解) が用いられた (経口投与、10 mg/kg)。肝臓が緩衝液で灌流され、単離肝細胞が UDS 測定のために [<sup>3</sup>H]チミジンに曝露された。過酸化水素注入ラットの肝臓における群平均純核内粒子数 [net (nuclear) grain count; NNG] は -2.1 以下で、修復細胞の出現頻度はどちらの用量でも 0.7% 以下であった。溶媒投与群動

物の群平均核内 NNG 数は 0 未満 (-2.6 および -2.7) で、修復細胞の出現頻度は 0~0.3% にすぎなかった。陽性対照物質 2-AAF および DMN では、群平均 NNG はそれぞれ 9.4 および 10.4 への増加がみられ、修復細胞の出現頻度は 50%以上 (それぞれ 84.7% および 83.7%) であった。したがって試験系には、2 つの既知の DNA 損傷誘発物質に対して感受性が認められた。試験は適切に実施され、過酸化水素の静脈内投与が約 30 分に限定されたという制限はあるが、遺伝毒性評価にとって妥当なものであった。陽性対照物質は、両者ともに経口投与された。

最新の方法を用いた小核試験 2 試験が実施された。そのうち片方の試験ではカタラーゼ欠損 C57BL/6NCrIBR マウス (Du Pont, 1995)、もう一方の試験では Swiss OF1/ICO:OF1 (IOPS Caw) マウス (CEFIC, 1995b) が用いられた。最初の例では、小核試験は、過酸化水素の 2 週間飲水投与試験の一部として実施された。投与 14 日目に 0、200、1,000、3,000、6,000 ppm 曝露群各群の雌雄各 10 例から、骨髓塗抹標本が作製された。雌雄各 5 匹から成る別の群には、20 mg/kg のシクロホスファミド (陽性対照) が、回収の 24 時間前に単回で腹腔内投与された。陰性対照、6,000 ppm、および陽性対照の各群から得られた多染性赤血球 (PCE) が小核を有するかどうか評価された。1 個体あたり 2,000 個の PCE が観察された。6,000 ppm 用量群では、小核を有する PCE の出現頻度に統計学的に有意な上昇はみられず、多染性/正染性赤血球比率の低下もみられなかった。シクロホスファミド投与群動物の応答は、予想どおりであった (Du Pont, 1995)。

欧州化学工業連盟 (CEFIC) による試験 (1995b) では、各群雌雄各 5 匹のマウスから成る 6 群に、過酸化水素が単回腹腔内注射された。用量は先に実施された急性毒性試験に基づいて設定され、1%、2%、4% 溶液が容量 25 mL/kg (用量はそれぞれ 250、500、1,000 mg/kg) で投与された。雌雄各 5 匹から成る 2 群には水 (陰性対照) が腹腔内注射された。陽性対照群にはシクロホスファミドが 10 mL/kg の投与容量で経口投与された。屠殺時間は 24 時間または 48 時間に設定された。1 個体あたり 2,000 個の多染性赤血球が観察され、小核を有する多染性赤血球の数が計測された。多染性赤血球 (PE) および正染性赤血球 (NE) の比率が、1,000 個の赤血球の観察により求められた。250 および 500 mg/kg 群の両性、ならびに 1,000 mg/kg 群の雌においては、投与後に臨床症状や死亡は観察されなかった。1,000 mg/kg の用量で雄 16 例中 1 例が死亡し、残りの雄には活動性低下ないしは立毛が観察された。本試験条件下では、いずれの用量レベルであっても、骨髓細胞における細胞遺伝学的な損傷は誘導されなかった。PE/NE 比は溶媒対照群に比べ、投与 24 時間後においては過酸化水素投与群で、投与 48 時間後では 250 および 1,000 mg/kg 用量群で有意に低かった ( $p < 0.05$ ) ことから、被験物質が骨髓に対して影響を及ぼしたことが示された。シクロホスファミドにより小核を有する多染性赤血球数に有意な増加 ( $p < 0.001$ ) が誘導されたことから、試験系の感度が十分であったことが示された。PE/NE 比が有意に低下し

た ( $p < 0.05$ ) ことから、骨髄細胞に対するこの物質の毒性作用が示された。先行する用量設定試験では、4~8%溶液を 2,000 mg/kg の最高用量で投与された動物数例で痙攣が誘発され、その後死亡に至るか、または生存例では自発運動の低下および立毛が発現した。この試験は適切に実施され、遺伝毒性学的評価に関しては妥当なものであるが、過酸化水素の寿命が極めて短いと思われることから陰性結果の評価には注意が必要である。著者らが、過酸化水素は骨髄に対して何らかの形で毒性作用 (PE/NE の低下で示される) を示すが、その機序は不明であると結論していることに注意が必要である。

さらに、マウス骨髄小核試験 2 件が科学文献に掲載され、双方ともに陰性の結果であった (Keck et al., 1980; Liarskii et al., 1983) が、報告内容が不十分なため評価できない。

最近実施されたある試験では、がん原性の予備検討として標的器官 (マウス皮膚) 遺伝毒性および変異原性が検討された (Society for Plastic Industry, 1997)。雌の Sencar マウス 10 匹の皮膚に 70%過酸化水素が 10、100、200  $\mu\text{mol}/200 \mu\text{L}$  エタノールの用量で週 2 回、4 週間にわたり適用された。陽性対照および陰性対照群マウスには、同じ条件でそれぞれ DMBA (1 匹あたり 10 または 200  $\mu\text{mol}$ ) またはエタノール (200  $\mu\text{L}$ ) が適用された。動物は、最後の投与から 2 日目または 4 日目に屠殺された (それぞれの日に 5 匹ずつ)。適用部位が切除され、固定・染色後に上皮・真皮の厚みおよび皮膚細胞充実性が光学顕微鏡観察により評価された。最終投与の 2 日後に屠殺された動物から得られた新鮮な凍結組織の非フェノール抽出物を使用して DNA が単離され、ヌクレオシドまで消化された後に 8-OH-2'-デオキシグアノシン (8-OH-dG) が HPLC で定量された。皮膚全体のパラフィンブロックから単離された DNA を用いて、c-Ha-ras 遺伝子のコドン 61 における突然変異が測定された。過酸化水素投与に対する応答は、いずれの用量においても、すべての影響評価項目で陰性であった。陽性対照物質 DMBA は、DNA 損傷、c-Ha-ras 変異、表皮過形成、皮膚細胞充実性の変化を誘発した。実験で用いられた  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度の計算値は 0.2、1.6、3.2%である。過酸化水素は、刺激性のない低い濃度で適用頻度が低い場合には、Sencar マウス皮膚において検出可能な細胞増殖も *in vivo* 突然変異も誘発しなかったことから、この組織モデルでは重大な発がん性は示されなかったと考えられる。8-OH-dG の分析に関しては、最終投与からサンプリングまでの空白期間が 2 日間あり、損傷が修復されている可能性もあることから、ある程度不確定性が残ると考えられる。

### 作用機序の検討

ヒドロキシルラジカルは、DNA 塩基 (8-OH-dG などの損傷を引き起こす) または DNA の糖リン酸骨格を攻撃し、デオキシリボースの断片化を引き起こすことがある。過酸化水素でみられるような *in vitro* 条件下における酸化剤による DNA 損傷、すなわち一本鎖および

頻度は少ないが二本鎖の切断が、種々の哺乳動物細胞で起こることが示された。その例としては、ラット肝細胞 (Olson, 1988)、マウスリンパ腫細胞 (Garberg et al., 1988)、ウシ水晶体上皮細胞 (Kleiman et al., 1990)、チャイニーズハムスターV79-379A 細胞 (Prise et al., 1989)、V79 チャイニーズハムスター線維芽細胞、SV40 ヒト形質転換細胞およびヒト一次線維芽細胞 (Mello Filho and Meneghini, 1984)、P388D1 マウスマクロファージ、大動脈内皮細胞およびヒト末梢血リンパ球 (Schraufstatter et al., 1986; Van Rensburg et al., 1992) がある。JB6 細胞では、 $H_2O_2$  ( $10^{-6} \sim 10^{-4}$  M) による単回の処理を受けると DNA の一本鎖切断が誘導されるが、接着非依存性の成長は誘導されなかった (Gensler and Bowden, 1983)。ネズミチフス菌 TA100 細胞では、DNA 中の 8-ヒドロキシデオキシグアニジン含量が、過酸化水素により用量依存的に増加した (Kasai et al., 1986)。

酸化剤損傷に対するラットの気管上皮細胞および中皮細胞 DNA の相対的感受性を検討し、 $H_2O_2$  曝露後の損傷を評価するためにコメットアッセイが用いられた。コメットアッセイは、ゲルミクロ電気泳動法であり、この方法により DNA 鎖切断を細胞単位で視覚的に評価することができる。ラットの新鮮単離気管上皮細胞と中皮細胞が、 $1 \sim 50 \mu M$  の  $H_2O_2$  に 10 分間曝露された。一部の実験では、過酸化水素の前にカタラーゼまたはデフェロキサミンが、細胞懸濁液に添加された。コメットアッセイの結果、過酸化水素曝露後に DNA 鎖切断細胞数および細胞当たりの DNA 切断数が、両細胞型で同じように用量反応的に増加したが、最高濃度でも損傷がみられない細胞が存在した。それに対して、培養 V79 肺線維芽細胞では、その 100%で、25 および  $50 \mu M$  の  $H_2O_2$  により明らかに DNA 鎖切断がみられた。主として DNA 鎖の切断を防ぐのはカタラーゼで、 $50 \mu M$  の  $H_2O_2$  に対する防御ではデフェロキサミン (鉄キレート剤) の役割は部分的なものにすぎなかった。DNA 修復を評価するために、細胞が  $10 \mu M$  の  $H_2O_2$  に 10 分間曝露され、洗浄後、培地で培養された。コメットを呈する中皮細胞および上皮細胞の割合は両細胞型ともに 2 時間目までに対照レベルまで戻った。両細胞型における過酸化水素誘導 DNA 損傷の発現機序は、鉄が触媒するヒドロキシラジカルの生成に関連すると考えられた (Churg et al., 1995)。

ヒト単核白血球を  $H_2O_2$  に曝露 (最高  $300 \mu M$ ) し、ADP リボース化反応の活性化および核様体沈降法で評価したところ、DNA 損傷の誘導が示された。不定期 DNA 合成はわずかに誘導されただけであったことから、UDS をほとんど伴わないショートパッチ修復機構により DNA 損傷が修復されたか、修復が阻害されたか、もしくはその両者が併発していることが示唆された。ロングパッチ DNA 修復の誘発物質である N-アセトキシ-2-アセチルアミノフルオレンにより誘導された DNA 損傷の修復が、 $H_2O_2$  の曝露 ( $25$  または  $100 \mu M$ ) により用量依存的に阻害され、その阻害は ADP リボース化に依存していた。それに対して、 $H_2O_2$  誘導性 DNA 鎖切断の修復は約 8 時間以内で完結し、その修復は ADP リボース化に無関係であった (Pero et al., 1990)。

別の試験で、採取直後のヒト末梢単核白血球を  $H_2O_2$  に事前に曝露（25～200  $\mu M$ 、1 時間）し、不定期 DNA 合成を測定したところ、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンにより誘導された損傷に対する DNA 修復活性の著しい阻害がみられた。4 名の健常者から別の日に採取した各 2 個の試料を用いて  $H_2O_2$  に対する応答が比較された。被験者内および被験者間変動を調節しても、 $H_2O_2$  による DNA 修復の阻害は用量依存的であり有意であった。また、過酸化水素の用量とは関係なく、同一被験者でも別の日に採取された試料の DNA 修復活性には大きな差がみられた。したがって  $H_2O_2$  には DNA 損傷誘発作用だけでなく、DNA 修復抑制作用がある可能性がある（Hu et al., 1995）。

### 変異原性に関する結論

過酸化水素は種々の *in vitro* 試験系で変異原であり、遺伝毒性物質である。応答の観察結果は、分解酵素（カタラーゼ）の存在、フェントン反応によるヒドロキシルラジカルの生成量、細胞の修復能により差がみられた。*In vivo* 遺伝毒性に関しては、最新の方法を用いて行われた試験で DNA 修復が検討された。それらの試験は、過酸化水素が 30 分間静脈内注入されたラットの肝細胞（CEFIC, 1997b）における試験、2 週間飲水曝露のに関連して行われたマウスにおける小核形成試験（Du Pont, 1995）、ならびに単回腹腔内注射（CEFIC, 1995b）後に行われたマウスにおける小核形成試験であり、結果はすべて陰性であった。*in vivo-in vitro* 不定期 DNA 合成試験においては、過酸化水素の静脈内投与の結果、曝露期間は限られていても過酸化水素が標的（肝臓）細胞に達する可能性がかなりあることが確認された（CEFIC, 1997b）。飲水投与による小核試験（Du Pont, 1995）では、過酸化水素の全身的な運命が不明で、骨髄で多染性／正染性赤血球比の低下がみられなかった。もう 1 つの小核試験（CEFIC, 1995）では、高用量の過酸化水素の単回腹腔内注射により、何らかの理由で骨髄に対する毒性の発現（PE/NE が低下）がみられたが、小核形成がみられなかったことについては過酸化水素の寿命が極めて短いと考えられることから慎重な評価が必要である。がん原性の予備検討として、標的組織に対する *in vivo* 遺伝毒性および変異原性を検討する目的で、0.2～3.2%過酸化水素エタノール溶液が Sencar マウスの皮膚に週 2 回、4 週間適用された（Society for Plastic Industry, 1997）。DNA 損傷の誘発（8-OH-dG の増加）、c-Ha-ras 変異、表皮過形成、および皮膚細胞充実性の変化を示す徴候はなかった。したがって、過酸化水素は、低濃度で適用頻度が低い場合には、この組織モデルにおいて局所突然変異を誘導しなかった。結論として、入手可能な試験においては、過酸化水素に *in vivo* 条件下で重大な遺伝毒性／変異原性があるということは立証されなかった。しかし、過酸化水素に直接接触したときの、ほかの関連標的組織に対する遺伝毒性および変異原性に関してデータベースの一層の充実が望まれる。作用機序についての試験では、細胞が酸化剤誘発性 DNA 損傷の修復に順応するということが示唆されたが、一方では、過酸化水素がほかの種類の活性化学物質により加えられた DNA 損傷の修復を妨害する可能性があるこ

とを示す証拠もいくつか存在する (Churg et al., 1995; Pero et al., 1990; Hu et al., 1995)。

EU が準拠している基準によれば、過酸化水素は変異原には分類されない。

#### 4.1.2.8 がん原性

過酸化水素について実施されたがん原性試験の代表的なデータを、Appendix G に要約する。過酸化水素に関連のあるがん原性試験 2 試験が、経口投与（飲水投与）により実施され、その片方では C57BL マウス (Ito et al., 1981a; b)、もう一方では F344 ラット (Takayama, 1980) を用いて実施されたが、両者ともに試験報告書が不完全である。さらに過酸化水素については、Sencar マウスの皮膚 (Klein-Szanto and Slaga, 1982; Kurokawa et al., 1984) および ICR Swiss マウスの皮膚 (Bock et al., 1975) に対する発がんイニシエーションおよびプロモーション作用、ラットの十二指腸・小腸に対する発がんプロモーション作用 (Hirota and Yokoyama, 1981; Takahashi et al., 1986)、Syrian ハムスター頬粘膜に対する発がん性および発がんプロモーション作用 (Weitzman et al., 1986; Marshall et al., 1996) が研究されている。

#### 経口投与による発がん性または発がんプロモーションに関する試験

Ito ら (1981a, 1981b) は、カタラーゼ欠損 C57BL/6J マウス (雌雄各 50 匹) に、蒸留水で 0.1 または 0.4% に希釈した過酸化水素を、8 週目から 108 週目までの期間飲水投与（自由摂取）した。対照群のマウスには蒸留水が与えられた。隔日の午前中に新しい投与溶液が調製された。すべてのマウスについて観察は毎日、体重測定は月 1 回行われた。投与は 108 日目に終了し、全例を徹底的な剖検に供した。生存率は、0.4% 過酸化水素群では 63%、0.1% 過酸化水素群では 61%、対照群では 54% であった。高用量群雌では、体重増加量が対照群よりも少なかった。腺胃では、びらんおよび潰瘍の発現率（高用量 42%、低用量 20%、対照 4%）の用量依存的な上昇（小弯の幽門前方で最も頻度が高かった）がみられ、十二指腸の単発性または多発性結節も同様であった。結節は病理組織像により、過形成、腺腫、もしくはがんに分類された。十二指腸過形成の発現率は、投与により有意に上昇した（高用量 62%、低用量 4%、対照 9%）。十二指腸過形成が初めて認められたのは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与 60 日目であった。典型的な十二指腸腺腫の発現率は、全群で 6% 未満であった。限局性十二指腸がんが認められたのは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与群だけであった（高用量 5%、低用量 1%、対照 0%）。がんの侵入が筋層および小血管にみられたが、転移はみられなかった。ほかの腫瘍については、注目すべき所見はなかった。この試験では用量が 2 段階しかなかったが、低用量（1,000 ppm）でも胃・十二指腸病変を引き起こす明らかな作用が認められた。著者

らは摂取用量を報告していないが、おそらく約 300 mg/kg 体重/日であろうと考えられた。

次いで著者らは目的を絞って、試験をマウスのほかの系統に拡大した。群当たりの例数が異なる (2~29) C57BL/6N、DBA/2N、BALB/cAnN マウスに、0、0.1、もしくは 0.4%の過酸化水素希釈液 (溶媒は蒸留水) が、最長 740 日までのさまざまな期間で飲水投与された (Ito et al., 1982)。140 日間の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与後に、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が蒸留水に 10、20、もしくは 30 日間置き換えられた。ほかの動物群では、過酸化水素が 120~180 日間投与され、その後 30 日間は蒸留水を与えられた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 液は 1 日おきに新たに調製された。胃と十二指腸だけが検査された。C57BL マウスでは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 投与を 120 日間受けたマウスの 67%超で前胃病変が、また、60 日間受けたマウスの 80%超で十二指腸病変がみられた。投与停止後、病変はほとんどの場合に退縮し、消失さえ起った。0.4%および 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の投与を 420~740 日間受けたマウスでは、それぞれ 5%および 1%に組織学的基準に基づく十二指腸がんが認められたが、遠隔転移はみられなかった。対照群では、同じ観察期間に十二指腸がんはみられなかった。3 系統のマウスで病変の総発現率にあまり差はみられなかったが、1 匹当たりの平均病変数は C57BL マウスの方が DBA マウスおよび BALB マウスより多かった。C57BL マウスは、ほかの系統に比べて、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の結節誘発作用に対する感受性が高かった。この試験のもう 1 つの重要な所見は、十二指腸病変の経過に関するものであり、過酸化水素投与停止後に顕著に退縮する傾向がみられた。

3 番目の試験では、C3H (カタラーゼ活性高値)、C57BL (カタラーゼ活性低値)、それらの F1 ハイブリッドである B6C3F1 および C3H/C<sub>57</sub><sup>b</sup> (低カタラーゼ血症突然変異種) の、4 系統のマウスが使用された。各群雌雄各 9~12 匹に、0.4%過酸化水素水が試験期間を通じて飲水投与された。投与開始後 6 から 7 か月目にマウス全例が剖検された。十二指腸腫瘍 (=過形成または新生物) の発現率および 1 匹当たりの平均腫瘍数は、C3H マウスでそれぞれ 11.1%および 0.11、B6C3F1 マウスで 31.8%および 0.36、C57BL マウスで 100%および 3.91、C3H/C<sub>57</sub><sup>b</sup> で 91.7%および 2.63 であった。十二指腸腫瘍の発現率と供試した系統のマウスの十二指腸粘膜、血液、および肝臓におけるカタラーゼ活性の間には、強い負の相関がみられた (Ito et al., 1984)。

Takayama ら (1980) は、F344 ラットを用いた過酸化水素の経口投与がん原性試験について報告した。各群雌雄各 50 匹に 0.6%または 0.3%の過酸化水素が連続 18 か月間飲水投与され、対照群には水道水が投与された。その後は全群に水道水が与えられ、6 か月間の観察期間後に剖検のために屠殺された。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液は週 4 回新たに調製された。被験物質投与群の動物では、体重増加量が対照群よりも低値であった。投与群動物では、投与停止後に体重が再び増え始めた。18 か月生存率は 97%で、投与群間で有意差はみられなかった。試験の初期の段階で、一部の動物に鼻出血がみられた。試験終了時、器官重量 (担がん器官以外) が測定 (相対重量は報告なし) され、無作為に選ばれた 1 群当たり 10 匹の血清

生化学的検査が一連の広範囲の項目について行われた。絶対および相対器官重量には差はないように思われたが、精巣重量は用量依存的に増加したように思われた。(表では統計学的有意差は示されていないが、検定が行われたかどうかは不明である。) 被験物質投与群と対照群の間で、担がん器官のスペクトル、腫瘍発現率、腫瘍進行期に有意差はみられなかった。ほとんどすべての雄ラットで腫瘍、特にライディッヒ細胞腫および内分泌腫瘍がみられた。この試験の対照動物では、一つには試験期間が長かったため、F344 対照動物の背景データに比べて腫瘍発現率が高かった。担がん器官の種類に差はなかった。胃腸管腫瘍は全くみられなかった。被験物質には、ラットに対する発がん性がないということが立証された。この試験は適切にデザイン(ただし、使用された用量は2段階のみ)され、慎重に実施されたことから、がん原性の評価には妥当なものであったが、報告内容が不完全なために確かな結論を導くことはできない。過酸化水素の1日摂取量は、雄ラットでそれぞれ433 mg/kg/日(0.6% $H_2O_2$ )および195 mg/kg/日(0.3% $H_2O_2$ )、ならびに雌ラットで677 mg/kg/日および306 mg/kg/日であった。ちなみに、日本におけるヒトの過酸化水素摂取量(おそらく食物から)は、4.3  $\mu$ g/kg/日と推定されている。

腸における発がんプロモーション効果の研究のために、各群雄3匹または8匹がメチルアゾキシメタノール酢酸(MAM)の投与(25 mg/kg 体重を隔週で3回腹腔内投与)または非投与のいずれかの条件で、1.5% $H_2O_2$ を10または21週間飲水投与された。対照群3匹には水が与えられた。MAM注射前4週間、注射の間、さらに試験終了まで $H_2O_2$ を投与されたラットにおける十二指腸がん(8/8)および空腸がん(5/8)の発現率は、MAM注射後に $H_2O_2$ 非投与である以外は同じように処置されたラット(それぞれ2/8および2/8)に比べて高かった。試験期間を通じて $H_2O_2$ 単独投与を受けたラット3例では、検査対象器官でがんの発現はみられなかった。MAM単独投与の動物群はなかった。報告されたのは、胃腸管の肉眼腫瘍だけである(Hirota and Yokoyama, 1981)。同じ目的で実施された別の試験では、雄のWistarラットに対して、腫瘍イニシエーション処置として8週間にわたってN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG)および10%塩化ナトリウム添加飼料が与えられ(ラット30匹)、それに続いて1% $H_2O_2$ の飲水投与が32週間行われた(ラット21匹)か、または1% $H_2O_2$ 投与だけが32週間行われた(ラット10匹)。胃十二指腸腫瘍のみが検査された。腺胃では、過酸化水素による腫瘍発現の増強はみられなかったが、胃底部における腺腫様過形成の発現率は高かった(発現率38%)。前胃では、事前のイニシエーションに関係なく、扁平上皮乳頭腫の発現率が有意に上昇した(MNNG+ $H_2O_2$ ラットでは発現率100%、 $H_2O_2$ ラットでは発現率50%)。イニシエーションにより予想どおり十二指腸腺がんが誘発された(発現率10%)が、後の $H_2O_2$ 投与の影響はなかった(Takahashi et al., 1986)。

### 口腔における発がん性および腫瘍プロモーション試験

Syrian ハムスター各群雄 5～11 匹の左頬嚢に 9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセン (DMBA) (0.25%重鉍油溶液) が単独で週 2 回塗布されるか、または同じ部位にさらに 3%過酸化水素もしくは 30%過酸化水素のいずれかが毎週 2 回、別の日に塗布された。ハムスター9 匹から成る第 4 群では、左頬粘膜に 30%過酸化水素だけが週 2 回塗布された。22 週後の病理組織学的検査では、30% $H_2O_2$  単独処置群のすべての動物で角質増殖および過形成が、また 9 例中 4 例でクロマチン増多細胞および軽度の異形成が認められた。腫瘍はみられなかった。DMBA 単独処置により頬表皮がんが誘発され、発現率は 43% (7 例中 3 例) であったが、DMBA+3% $H_2O_2$  処置群では動物の 55% (11 例中 6 例)、また、DMBA+30% $H_2O_2$  処置群では動物の 100% (5 例中 5 例) で発がんがみられた (Weitzman et al., 1986)。適用された物質の容量 (用量) は記載されていない。検査されたのは適用部位の腫瘍のみであった。ヒトの口腔発がんのモデルとしてハムスターの頬嚢が用いられた。試験の規模は小さいが、プロモーション効果は明らかにならないと思われる。

その後行われた試験では、過酸化水素および炭酸水素ナトリウムを含む歯磨剤の口腔に対する発がん性および発がん増強作用が検討された (Marshall et al., 1996)。Syrian ハムスター各群雌雄各 25 匹を用いた、頬嚢への適用による二通りの試験が行われた。試験 A では、0.5%DMBA (0.1 mL)、および 0.75% $H_2O_2$ /5% $NaHCO_3$  入り 2 重相歯磨剤 (0.2 mL) が頬嚢に対して週 5 回、20 週間単独使用または併用された。試験 B では、0.5%もしくは 0.25%DMBA (0.1 mL) が単独で使用されるか、または 1.5% $H_2O_2$ /7.5% $NaHCO_3$  入り 2 重相歯磨剤 (0.2 mL) と併用されるか、または 0.25%DMBA+3% $H_2O_2$ / $NaHCO_3$  (0.1 mL+0.2 mL) が適用された。DMBA は週 3 回、過酸化水素調製物は週 5 回、16 週間にわたって適用され、その後 4 週間の観察期間が設定された。試験 A では対照処置として綿棒に含ませた鉍油が用いられ、さらに未処置の反対側の頬嚢が比較に用いられた。試験 A では、 $H_2O_2$  放出 2 重相歯磨剤には発がん性はみられず、DMBA 単独使用と比べた場合でも、併用による腫瘍発現促進作用はみられなかった。試験 B では、0.5%DMBA と  $H_2O_2$  放出 2 重相歯磨剤の併用により腫瘍形成の潜在期間が DMBA 単独使用に比べて延長した (0.25%DMBA との併用ではみとめられなかった)。0.25%DMBA+3% $H_2O_2$ / $NaHCO_3$  投与動物では、腫瘍形成および全般的な腫瘍発現率が有意に低かった。クロトン油 (1%) でも、0.25%DMBA と併用された場合には腫瘍形成率が低下した。DMBA 非投与動物では、軽度の角化症が 1 群当たり 1、2 匹でみられた以外に異常はみられなかった。過酸化水素単独の使用は検討されていない。著者らは、併用の結果、例えば 2 重相歯磨剤によるヒドロキシラジカル生成の抑制などの化学的相互作用が起きたのかもしれないと述べている。

### 皮膚における発がん性および腫瘍プロモーション試験

過酸化水素にマウス皮膚に対する腫瘍プロモーションまたは完全発がん性があるかどうか、3つの試験で検討された。最初の試験では、雌の ICR Swiss マウスが用いられ、9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセン (DMBA) 125 µg によるイニシエーション後に、30匹の皮膚に対して 3% $H_2O_2$  水溶液 0.2 mL が週 5 回、56 週間にわたって適用された。皮膚腫瘍が発現した動物はいなかった (Bock et al., 1975)。Klein-Szanto および Slanga (1982) は、雌の Sencar マウスを用いて腫瘍プロモーション・完全発がん性試験を行った。各群 60 匹のマウスの背部の皮膚に、(a) 9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセン (DMBA) 適用後に 0.2 mL の 30% $H_2O_2$ 、 $H_2O_2$  (30%) +アセトン (1:1)、 $H_2O_2$ +アセトン (1:2)、 $H_2O_2$ +アセトン (1:5) のいずれかの溶液が週 1 回または 2 回、25 週間にわたって、または、(b)  $H_2O_2$  (30%) +アセトン (1:1) の 1 回適用後にプロモーターとして TPA (12-O-テトラデカノイル-ホルボール-13-アセテート) が、または (c)  $H_2O_2$  (30%) +アセトン (1:1) が週 2 回適用された。完全発がん性試験の期間は計 50 週間であった。対照群動物には溶媒が適用された。 $H_2O_2$  にはイニシエーターとしての効果も完全発がん性物質としての効果もなかったが、著者らによると、「ごく弱い」プロモーターの機能はみられたということである。3 番目の試験では、各群雌 20 匹の Sencar マウスの背部皮膚に、DMBA (9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセン) 適用後に 0.2 mL の 5% $H_2O_2$  アセトン溶液が週 2 回、または 0.2 mL の 5% $H_2O_2$  アセトン溶液が週 2 回、51 週間適用された。対照群動物には溶媒が適用された。過酸化水素には、プロモーション効果も完全発がん性もみられなかった。プロモーション試験ではマウスの 45% で表皮過形成がみられたが、過酸化水素の完全発がん性試験では表皮過形成がみられたのは 1 例 (5%) にすぎなかった (Kurokawa et al., 1984)。

### がん原性に関する結論

カタラーゼ欠損マウスを用いた飲水投与試験においては、過酸化水素により用量反応的な十二指腸過形成 (高頻度)、および限局性十二指腸がん (低頻度) が誘発されることが示された (Ito et al., 1981a;b; Ito et al., 1982)。その後に行われた系統の異なるマウスを用いた試験では、十二指腸腫瘍 (過形成または新生物) の発現率と十二指腸粘膜、血液、肝臓のカタラーゼ活性の間に強い負の相関がみられた (Ito et al., 1984)。ラットにおける同様の試験では、過酸化水素の飲水投与は腫瘍発現と関連性がないようであり、胃腸管腫瘍は全くみられなかった (Takayama, 1980)。発がん性・腫瘍プロモーション試験では、過酸化水素の適用により、メチルアゾキシメタノールアセテートにより生じたラット腸内の発がんイニシエーションに対するプロモーション効果 (Hirota and Yokoyama, 1981)、9,10-ジメチル-1,2-ベンズアントラセン (DMBA) により生じた Syrian ハムスター頬嚢の発がんイニシエーションに対するプロモーション効果 (Weitzman et al., 1986)、DMBA 処置後の Sencar マ

ウス皮膚の発がんイニシエーションに対する「ごく弱い」プロモーション効果 (Klein-Szanto and Slaga, 1982) があることが示された。同様のデザインを用いたほかの試験では、発がん性もプロモーション作用もみられなかった (Takahashi et al., 1986; Marshall et al., 1996; Bock et al., 1975; Kurokawa et al., 1984)。しかし、1%過酸化水素が 32 週間飲水投与されたラットでは、前胃に扁平上皮乳頭腫が誘発された (Takahashi et al., 1986)。

感受性のある系統のマウスでは、過酸化水素に弱いながらも十二指腸に対する局所的発がん作用があることは明らかであるが、その病変は退縮する傾向が強く、投与停止後は消失さえ起るという明確な傾向がみられた。発がん作用の機序は不明である。過酸化水素が DNA 損傷を生じるとすれば、遺伝毒性機序を無視することはできない。残念ながら、さまざまな病期の病理組織学的損傷を有する標的組織に対する細胞毒性試験については情報が得られていない。腫瘍プロモーションに関しては、いくつかの機序、すなわち直接的遺伝毒性、DNA 修復障害、慢性炎症が作用していることが考えられる。

過酸化水素について示されたがん原性の特殊な性質、および現時点で得られているすべての証拠を考慮すると、過酸化水素を実質的に重要な発がん物質とみなす必要があるかどうかについては多少の疑いが生じる。マウスにおける完全発がん性試験ならびにいくつかのプロモーション試験でみられた弱い作用からは、プロモーション型の効果および潜在的な遺伝毒性の機序が存在する可能性が示唆される。哺乳動物細胞が、内因性代謝で生じる活性酸素種に対して必然的に防御を確立してきたという事実を考え合わせると、過酸化水素で生じた損傷は多分非確率的であり、したがって用量/用量率閾値があると思われる。しかし、このことは、分類に取りかかる契機としては不十分である。

#### 4.1.2.9 生殖毒性

##### 受胎能

適切な方法でなされた生殖毒性試験データは入手できなかった。Wales ら (1959) は、3 群のアルビノマウス (各群雄 12 匹) に 0.33、1、3%過酸化水素を飲水投与した。溶液は週 2 回交換された。高濃度 (3%) 群のマウスは水を飲もうとせず、5 日後、体重が約 20%減少したため試験から除外された。残りの 2 群は各群 3 匹のサブグループに分割された。7 日目に最初のサブグループの雄 1 匹に対して雌 2 匹の割合で同居飼育がなされ、過酸化水素投与開始から 28 日目に再度、同居飼育 (ほかの雌 2 匹と) がなされた。21 日目に雄 2 群と雌が同居飼育された。その 1 群に過酸化水素が継続投与され、他群では過酸化水素が水道水に交換された (雌が過酸化水素を摂取しないようにした)。4 番目のサブグループの

雄マウスは 21 日目に屠殺され、精巣上体の精子が検査された。アルビノウサギ 3 匹の飲料水も 0.33、1、3%過酸化水素に交換され、6 週間にわたって 1 週間間隔で精液が検査された。処置雄マウスと交配したすべての雌マウスが数日以内に妊娠し、各例で正常な同腹仔数の健康な新生仔が出生した。試験最終時点近くまで 1% $H_2O_2$  の飲水投与を受け続けた妊娠マウスの分娩は、水道水が与えられた母動物に比べて多少遅延した（しかし、この作用はわずかで一貫性のないものであった）。投与 3 週間後ではマウス（3 匹）の単位容積当たりの精子数、形態、運動性は正常のようであった。6 週間曝露された 3 匹のウサギの精子にも、認識できる異常はなかった。この限定的な試験では、対照動物は設定されておらず、確かな結論を導くことはできないが、投与による生殖に対する重大な有害作用は考慮する必要がないように思われる。

同じ研究者（Wales et al., 1959）が *in vitro* 試験において、ウサギの精液は外因性過酸化水素に対する抵抗性（3,000 ppm でも精子を完全に運動不能にすることはできなかった）がウシ、ニワトリ、イヌ、ヒツジ、マウス、ヒトの精液より高いことを示した。ウサギの精漿にはカタラーゼによるものと思われる、とりわけ高い過酸化水素分解能がみられた。

古い別の試験では、離乳したばかりの雌 Osborne-Mendel ラットに 0.45% $H_2O_2$  が飲水投与され、5 か月間それが維持された。その後水道水が与えられ、正常な雄との交配が行われた。正常な同腹仔 6 匹が均等に 2 群に分割され、片方には 0.45% $H_2O_2$ 、もう一方には水道水が与えられた。それぞれの投与方法で 9 か月間飼育された。正常な同腹仔が出生したことから、過酸化物の長期間投与では、雌ラットの生殖能に対する毒性は発現しないように思われた。雄新生仔 6 匹に関する 9 か月間の経過観察の結果で、注目すべき影響は体重差だけであった。すなわち、水道水摂取群で平均 521 g に対して  $H_2O_2$  摂取群で 411 g であった（Hankin, 1958）。動物数が少なく限定的なこの試験から確かな結論を導き出すことはできない。

生殖機能に対する影響の所見も含まれた、過酸化水素に関する簡単な試験報告がある（Antonova et al., 1974）。ラットの雌雄に、過酸化水素が  $LD_{50}$  の 1/10~1/5 の用量（明記されてはいない）で、1 日 1 回 45 日間強制経口投与された。高用量群の雌では性周期の変化が、雄では精子の運動性の低下がみられたが、精巣重量に対する影響はみられなかった。別の試験では、ラットの雌雄に過酸化水素が 0.005、0.05、0.5、5、50 mg/kg 体重の用量で 1 日 1 回 6 か月間強制経口投与され、交配が行われた。50 および 0.5 mg/kg 群では投与期間中に雌で性周期の乱れが生じたが、5 mg/kg ではみられなかった。50 mg/kg 群の雄では精子の運動性が低下した。精巣の形態や重量には変化はみられなかった。高用量群の雌で分娩に至ったのは、対照群では 9 例中 7 例であったのに対し、9 例中 3 例であった。さらに、対照群雌に比べて高用量群雌では同腹仔数が減少し、新生仔の体重増加量が低下した。報告が不十分なため、この試験における所見の評価は不可能である。

## 発生毒性

Wistar ラットを用いた試験により、発生毒性が検討されている (Moriyama et al., 1982)。過酸化水素水溶液が 10、2、0.1、0.02% となるように粉末飼料と混合され、その混合飼料が各群 5~8 匹の妊娠ラットに「妊娠の重要な時期」中の 1 週間にわたって投与された。妊娠 20 日目に胎仔が検査のために摘出された (試験 A)。別の各群 2、3 匹のラットが同様に処置されたが、正常分娩まで飼育され、その後、新生仔が約 4 週間追跡調査された (試験 B)。試験 A では、高用量群で母動物の体重に目立った増加がみられなかった。摂餌量は、ほかの用量群 (対照群との差はなし) に比べて、3 分の 1 に減少した。胎仔吸収が増加し、胎仔体重が低下した。胎仔の大部分が瀕死状態であった。被験物質投与群のいずれにおいても外表奇形はみられなかった。内部器官 (眼、脳の頭頂領域、心肺領域、体幹) の出血が、0.1~10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の用量範囲で用量依存的に増加した。高用量側 2 群で用量依存的な骨格形成不全がみられた。試験 B では、10% 群の新生仔が生後 1 週間以内にすべて死亡し、体重は低値で、生産仔数が減少した。ほかの用量群では、新生仔の発育に対する重大な影響はみられなかった。曝露および作用の発現機序にかなりあいまいな点があり、試験の妥当性に疑念が生じた。飼料中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度は、24 時間後に 1/10 に、72 時間後までに事実上ゼロまで低下したと報告されている。著者らは、「残存量を測定して摂取量を推計した」と述べているが、飼料を新たに調製した頻度が報告されていない。それでも母動物は実際に過酸化水素を摂取したようであり、高用量では母動物の体重増加量が比較的低値であった。胎盤重量には顕著な群間差はみられなかった。著者らは、胎仔発生に関する所見は、飼料中の必須栄養素が過酸化水素により分解されたことによるものと考えている。

3 日間ニワトリ胚エアチャンバー法により、7 種の有機過酸化物とともに、過酸化水素も試験された (Korhonen et al., 1984)。総有効用量 (ED<sub>50</sub>) (すべての死亡、奇形を含む) は、2.7 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/卵であった。供試された一連の過酸化物 8 種類の中で、過酸化水素が示した胚毒性は弱いものであった。全般的に考えると、過酸化物には (それほど) 強い奇形誘発作用はないと考えられた。

## 生殖毒性に関する結論

生殖・発生毒性を完全に評価できる適切な動物試験データは、得られなかった。内容が制限されたものではあるが、マウスとラットを用いた過酸化水素飲水投与試験が 2 試験あり、その試験では、雌雄の生殖機能に対する重大な障害はないことが示唆された (Wales et al., 1959; Hankin, 1958)。さらに、カタラーゼ欠損マウスを用いた適切な 90 日間飲水投与試験 (FMC, 1997)、ならびにカタラーゼ欠損マウス (Ito et al., 1981a; b) および F344 ラット (Takayama, 1980) を用いたがん原性試験では、精巣や卵巣は毒性標的器官と判定されな

かった。唯一入手できた発生毒性試験は、Wistar ラットに過酸化水素を混合した粉末飼料を投与したものであり、その試験では胎仔毒性が示された (Moriyama et al., 1982) が、曝露および作用発現の機序 (著者らは、有害な影響は飼料中の必須栄養素が過酸化水素により分解されたことによるものと考えている) についてかなりあいまいな点が含まれていた。多少の懸念が新たに出てきたとしても、その試験は評価に用いることができない。

以上のように過酸化水素の発生毒性に関しては、データの不足が明らかである。しかし、産業界は、技術会議レベルで同意された生殖毒性審査に関して重要度の引き下げを要請している。なされた判断は、従来 of 試験手順 (飲水投与など) では特異的な胚毒性および胎児性が発現しにくいという考えであり、それは第 1 に、過酸化水素が (その分解産物である酸素や水とは対照的に) 胎仔に達するかどうかは疑わしく、第 2 に、母体における局部的影響から栄養障害や一般毒性が引き起こされることもあると予想されたことによる。