

#### 4) Discussion of threshold and risk

The existence of a threshold for the genetic effect and the multiple-hit theory are consistent with published data. Mechanistic data also support this theory. It has been reported that the clastogenic effect, caused by destruction of the spindle-forming apparatus (such as colchicine), has a clear threshold of specific chemical substances. ACM has been reported to bind to intracellular and cytoskeletal components and inhibit their function. The cytoskeletal proteins play a mechanistic role by varied processes of cellular maintenance, such as maintenance of cell division, axoplasmic transport, and cell morphology. Obstruction of this function is the foundation of the various toxic effects of ACM produced by the same dose. By exposure after the maturation division, chemically-induced chromosome translocations, which can often show recovery, generally demonstrate a nonlinear dose-effect relationship.

The metabolic capability of mammalian cells (especially the testes, germinal cells and skin) has to be taken into consideration in assessing risk. Regardless of whether the ACM-induced damage is caused by related molecules or, as has been proposed, through the effect of epoxide and glycidamide, these cells contain epoxide hydrase and glutathione transferase enzymes. Epoxide hydrase is an effective enzyme for detoxifying reactive epoxide. ACM is metabolized principally by glutathione transferase. The early capability to detoxify electrophilic substances can be found in newborn animals. A high level of glutathione transferase can be found in the testes of rodent neonates, and this rapidly approaches the level in the adult animal. The skin is also considered a metabolically-active organ, and considerable levels of glutathione transferase and epoxide hydrase (both of which are cytosol enzymes) were found by the study. When the quantity of ACM released is very small, or it is slowly released over a period of time, the probability of the reaction components reaching the cellular DNA is very small.

The sites of action of ACM in germinal cells are, as previously described, late-stage spermatid and early-stage spermatozoon stages. Because in most species the sperm pass the epididymis in 10~15 days, the exposure period of these cells to ACM is short. The sperm is continuously metabolically recycled. Sperm which was not ejaculated is either naturally eliminated or secreted in the urine. Excessive sperm is decomposed in the tail of the epididymis and, in some species, in the vas deferens. Sperm decomposition appears to normally be an ongoing phenomenon related to the distal part of the genital tract. It seems, therefore, that application of Minitran would not cause accumulation of ACM.

In risk evaluation by the American EPA, based on administration of  $1.6 \times 10^{-5}$  mg/kg/day ACM in humans (body weight of 60kg,  $0.016 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) for 70 years, the extra life span cancer risk was determined to be  $1 \times 10^{-5}$  (1/100,000). Minitran contains in average 6.3ppm ACM monomer residue, and the exposure dose of ACM is estimated to be  $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  in a 60kg person. Minitran administration is considered to be for approximately 10 years, and in a survey conducted in the US of 40,000 patients the average age of patients who used a nitroglycerin transdermal absorption agent was found to be approximately 57. If compared with the ACM intake from the close

environment during the life period, it appears that the limited intake of ACM from Minitran does not pose a significant risk.

In an epidemiological survey (1929~1983) of 2,293 subjects who were exposed at their workplaces to ACM at a concentration estimated as equivalent to  $0.3\text{mg}/\text{m}^3$ , no statistically significant differences were noted in the rate of death from all causes or the cause-specific death rate in workers exposed to ACM. Compared with an expected number of deaths caused by cancer of 73.4 subjects, 72 of the 2,293 subjected exposed to ACM died of cancer, and no increase in a particular type of cancer was noted. The most important finding was that the occurrence of skin tumors in topical application was lower than in oral application of ACM. In a comparison of oral and topical application in mice, the distribution and binding of radiation-labeled ACM molecules in the DNA of target tissues was not related to the formation of papillomas. The mechanism of ACM toxicity is thought to be protein modification, rather than spot mutation, so the existence of a threshold to this effect increases the safety level with respect to genetic gene alterations and cancer and reduces the risk. In administration from the Minitran patch, even in the worst case, the no-effect dose in a 2-year study in rats was at most  $3 \times 10^4$  (for a 60kg person). As shown in published data, the transdermal absorption of the monomer is incomplete (65% absorbed), and the safety factor of  $5 \times 10^4$  exceeds the no-effect dose for oral administration in rats, in which a greater reaction was induced.

破壊する。Sega らが行った研究では、タンパク質修飾のレベルは、染色体破壊や優性致死効果と相関があった。一本鎖あるいは二重鎖 DNA の分解は、プロタミンが最も激しく、アルキル化される胚芽細胞段階においても高いレベルで測定された。最終的には、優性致死変異あるいは染色体異常となる。

マウス小核試験での遺伝毒性のメカニズムも、同様のメカニズムによるものである。ACM は、様々な種類の細胞で細胞骨格タンパク質に結合することが認められている。Kneap 等は、様々な細胞のタンパク質との相互作用は、単一の塩基の変化よりも、総合的な染色体の損傷となることが予想されると提唱した。マウスの小核試験では、染色体異常誘発性の物質だけでなく、紡錘糸機能を阻害する物質も検出する。ACM は体細胞では非常に弱い変異原物質であり、プロタミンと比較すると、他の細胞タンパク質に対する親和性は低いと考えられている。

#### 4) 閾値と危険性の考察

遺伝的影響に対する閾値の存在や複数ヒット説は、公表されたデータと一致している。機械論的データもこの説を裏付けている。紡錘糸阻害（例えばコルヒチン）の破壊による染色体異常誘発効果を持つとする化学物質には明白な閾値があると述べられている。ACM には、細胞中で細胞骨格成分に結合し、機能を阻害する作用があることが報告されている。細胞骨格タンパク質には、細胞分裂、軸索原形質輸送、細胞形態の維持など幅広い細胞の維持過程で機能的な役割がある。その機能を妨げることは、同程度の投与量で発生する様々な ACM の毒性影響の基盤となるものである。細胞分裂後の暴露において、しばしば回復がみられる化学的に誘発された遺伝性転座は、一般に非線形の用量反応関係を示している。

また、哺乳動物細胞（特に精巣、胚芽細胞及び皮膚）の代謝能力は、危険性評価で考慮に入れるべきである。ACM による損傷が、親分子によるものか、あるいは代謝されているようなエポキシドやグリシドアミドの結果によるものかにかかわらず、これらの細胞はエポキシドヒドラーゼやグルタチオントランスフェラーゼ酵素を含んでいる。エポキシドヒドラーゼは、反応性エポキシドの解毒に有効な酵素である。ACM は主としてグルタチオントランスフェラーゼにより代謝される。求電子物質を解毒する早期の能力が新生動物で認められる。げっ歯類の新生児精巣では高濃度のグルタチオントランスフェラーゼが認められ、それは急速に成体レベルに近づく。皮膚も代謝的に異なる組織と考えられ、試験によってグルタチオントランスフェラーゼとエポキシドヒドラーゼ（共に細胞質ゾル酵素）の濃度が示されている。放出される ACM の量のごくわずかであり、また時間をかけてゆっくり放出される場合には、反応性成分が細胞の DNA に到達する確率は極めて低い。

胚芽細胞における ACM の作用部位は、後期精子細胞と早期精子段階であることはこれまでに述べた。ほとんどの種では精子は 10~15 日間で精巣上体を通過するので、これらの細胞が ACM に対して暴露する期間は短い。精子は継続的に代謝される。受精されなかった精子は自然に排出されるか、尿中に排泄される。余分な精子は、精巣上体尾や、一部の種の精管中で分解される。精子の分解は、生殖路の遠位部分と関連した正常で継続的な事象と考えられる。このため、ミートランの使用による ACM の蓄積性はないと思われる。

米国 EPA が行った危険性評価は、70 年間にわたる飲料水中の  $1.6 \times 10^{-6} \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  の ACM (体重 60kg のヒトで  $0.016 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) へのヒトの投与を基礎として、超過生涯危険性を  $1 \times 10^{-6}$  (100,000 分の 1) と定めている。ミートランは、平均 6.3ppm の残留 ACM モノマーを含み、これによる ACM の暴露量は、体重 60kg のヒトでは  $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と推定される。ミートランの投与は約 10 年間と考えられ、米国での 40,000 人の患者の調査では、ニトログリセリン経皮吸収剤を用いている患者の平均年齢は約 67 歳である。従って、生存期間中の周辺環境からの ACM の摂取と比較した場合、ミートランからの ACM への限局した摂取には重大な危険はない。

労働現場で  $0.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$  相当と推定される濃度の ACM を暴露した 2291 人を調べた (1929 年~1983 年) 疫学調査では、ACM に関与した労働者の中では、統計的に有意な全原因死亡率、あるいは死因別死亡率は認められなかった。癌死亡の予測数は 73.4 人であるのに対し、ACM に暴露した 2291 人中 72 人が