

ファルマシア

別刷

ナノマテリアルの毒性予測

発がん性を中心に

菅野 純

Jun KANNO

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター毒性部長

1 はじめに

ナノマテリアルの毒性研究は始まったばかりのため、曝露後の短期間における影響に関するものに限定されることが多く、評価に時間のかかる影響の知見は乏しい。そのなかで、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)に含まれるアスベスト様の形状の粒子については、既存の知識から容易に予想される中皮腫誘発性の検討を行った。これは、ナノテクノロジー製品の大量生産・消費の開始以前の段階、すなわち国民への曝露が起こっていない現段階において、逐次、開発側へ毒性情報を伝達することで産業活性化と安全確保の両立を図ることが重要であると考えた結果である。1980～1990年代の間違った毒性評価によりアスベスト禍が拡大してしまっているが、ハイテクの旗手たるナノマテリアルはこの轍を踏んではならない。

2 毒性学とは

毒性学は生体と外来性物質(xenobiotics)との相互作用を研究する分野であり、主目的は「人(ヒト)の安全」である。この場合の守るべき「ヒト」には、2つのタイプがある。第1は顔の見えるヒト、例えば目の前の相手、家族、同僚など。毒入りの団子を食べたら、誰でも目の前で症状が出る。「子供が誤って、殺虫剤を飲んでしまったのですが…」「それは大変、すぐに病院に行って処置してもらってください」。第2は個々の顔が見えない多数のヒト、例えば国民、消費者、労働者。アフラトキシンを1 ng/kg 体重/日 毎日摂取すると肝臓がんで死ぬ人の数が100万人につき0.1～3人増える。¹⁾ 全国で10～300人。この人たちの顔は見えないし、「私、汚染されたお米を食べちゃったんですけど、肝臓がんになるのでしょうか?」と聞かれても答えに窮するタイプ。

毒性のもう1つの重要な観点は、先にも述べた時間軸がある。「急性毒性」「慢性毒性」「遅発性毒性」等として表現される。

さて、毒性評価(有害性評価)には多くの場合、人の身代わりとして実験動物が用いられ、その毒性所見を人に外挿することが行われる。これは、実験動物も人も基本的に同等の生体反応を示すという前提に基づいてきた。現在の毒性学は、先端的分生生物学的手法を取り入れ、生体反応メカニズムに踏み込むことにより、種差や個体差(SNPsなどを勘案した)の問題に対しても科学的な検討が進もうとしている。また、遺伝子改変動物やトキシコゲノミクスなどの新技術の導入により、評価の高精度化と迅速化が進んでいる。

蛇足になるが、「動物で起こったからといって人で起こるとはかぎらないよ」というコメン

トは医薬品の毒性評価の際には比較的気軽に交わされるが、それは「治験」の段階で人によってテストされるからであろう。一般の物質では「治験」は行われないので、まずは「動物で起こったことは人でも起こるかもしれない」と考えるのが基本である。

3 “Paracelsus Is Not Enough”

15 世紀の錬金術師かつ医師であった Paracelsus (パラケルスス) の有名な言葉が毒性学の基礎としてしばしば引用される。 “All things are poison and not without poison ; only the dose makes a thing not a poison.” これは「すべてのものは毒であり、毒でないものはない。量だけがものを毒でなくする」、あるいは「有害でない物質はなく、用量によって毒であるか薬であるかが決まる」と訳されたり、解釈されたりしている。しかし、その起源は水銀のような毒物でも薄めて使うと薬になる (癲癇に効いたという話らしい) という「ホルミシス」現象を目指していたことのようなのである。ここでの「毒」と「薬」の間の用量作用関係や「薬」用量とゼロの間の用量域は、明確には考慮されていない。この流れを汲んで、現代の薬の場合も薬効が期待される薬用量での投与が前提であり、副作用としての毒性は無意識のうちに薬効量より高い用量を想定して語られることが多い。「用量ゼロ」は「服用しない」ことであり、そこと薬用量との間の半端な投与量の領域は考慮外である (図 1)。

しかし、広い毒性学の立場からは種々の用量作用関係が想定される。図 2 で A の閾値のない場合、B の閾値のある場合あるいは、C の異なった効果が用量域ごとに現れては消える場合、などである。パラケルススは、強いて言えば B+C に近いのかもしれないが、線は飛び飛びの不連続なものになるであろう。少なくとも、彼の言葉は「毒性には必ず閾値がある」と解釈されることが多い。

ところが、DNA を障害するアフラトキシンや、いったん身体に入ったら出て行かないアスベストのように、メカニズム的に閾値がない可能性がある、あるいは不可逆的であることが想定される毒性では、「閾値がない」として対処する必要があるのである (図 3)。このような意味も含めて現代の毒性学は、パラケルススの言葉だけでは不十分なのである。

想定される用量作用関係に毒性実験の計画が依存する。C の場合に単一用量の実験を組むこ

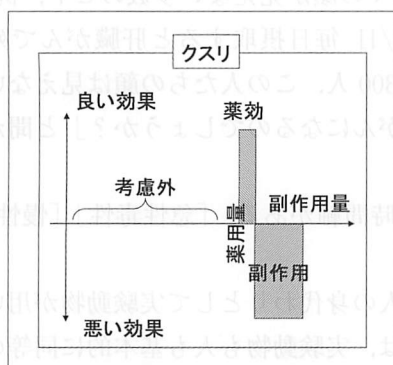


図 1 薬の世界の用量作用域の特徴

薬の場合、「用量ゼロ」は「服用しない」ことであり、そこと薬用量との間の半端な投与量の領域は考慮外である。これは実は Paracelsus の言葉にも当てはまり、薬以外の化学物質の毒性評価には適応できない場合が存在する。

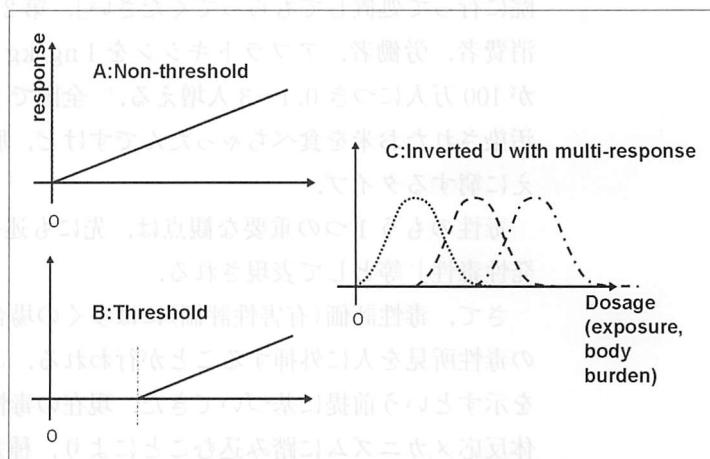


図 2 毒性の多種多様な用量作用関係

毒性学的に用量相関性には少なくとも 3 つのタイプが想定される。A は閾値のない場合、B は閾値がある場合、C は用量域により質的に異なった反応が入れ替わり現れる場合。アスベストは A であるとして取り扱うことで、ほぼ意見が一致している。

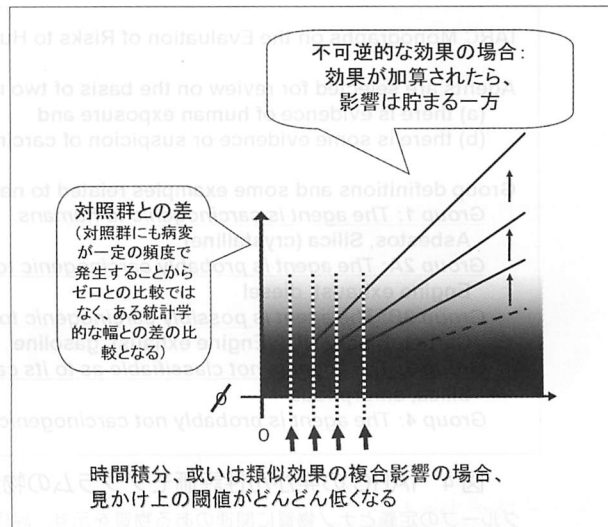


図3 閾値の設定が困難な例

一般的に、化学物質等の曝露影響を考察する際、不可逆的な影響であると考えられ、かつ、閾値があるのか決めるのが難しいメカニズムが想定される場合は、実質的に閾値がないとして取り扱うことが合理的である。そして、ゼロに近いところをも含むものの用量においても毒性があると考えて対処する必要がある。「高用量で毒性が出たからといって、低用量で出るとは限らない」とは決して言えない状況が存在する。

とはまずない。しかし、アスベスト様のメカニズムにより中皮腫発がんが想定される場合は、確認を目的として十分量による単一用量実験が許容される。もしこの量で中皮腫が誘発されなければ、この検体にそのような発がん性はほぼないといえる。

4 時間との戦い？

新素材から画期的新製品が生み出されると、それらは新規化学物質としての新たなベネフィットを持つが、同時に新たな毒性を現わすことにもなる。歴史的な「革新的マテリアル」には、一世を風靡しつつも負の遺産を残し消え去ったものが幾つかあったが、それらの共通点には「難分解性・高蓄積性」と関連する発がん性を含む「慢性毒性」がある。「胎児毒性」が加わった物質もある。いずれも「急性毒性」が弱いと判定され、それが「毒性は弱い」との誤認識を生み、不適切な使用が拡大したという共通性がある。問題は、時間のかかる慢性影響の知見が出揃うのを待たずにアクションが起こされる事にある。

この意味で、WHOの1機関である International Agency for Research on Cancer (IARC) の発がん性評価の経緯には注目すべき点がある(図4)。まず、IARCがどのようにして無数にある物質や曝露状況の中から評価対象を選び出すのか。一般公募及び専門家委員(がん、化学発がん系の毒性学者、疫学者等の専門家からなる)が持ち寄った候補から、同専門家による諮問委員会により選定され、評価する優先順位がつけられる。例えば、二酸化チタン。対象に加えられたのは相当昔であるが、1989年の評価では情報不足により Group 3、調査継続とされた²⁾(注：人に発がん性がないと判定された場合は Group 4)。その後、2009年版では吸入試験結果等から Group 2 B、調査継続と再評価された。³⁾ 評価の背景を吟味せず Group 3 であるから「無害」と判断するのは早計である。

IARC Monographs on the Evaluation of Risks to Humans (~Vol. 93)

Agents are selected for review on the basis of two main criteria:

- (a) there is evidence of human exposure and
- (b) there is some evidence or suspicion of carcinogenicity.

Group definitions and some examples related to nano particles

Group 1: The agent is carcinogenic to humans.

Asbestos, Silica (crystalline)

Group 2A: The agent is probably carcinogenic to humans.

Engine exhaust, diesel

Group 2B: The agent is possibly carcinogenic to humans.

Carbon Black, TiO₂, Engine exhaust, gasoline

Group 3: The agent is not classifiable as to its carcinogenicity to humans.

Silica, amorphous

Group 4: The agent is probably not carcinogenic to humans.

図4 IARCの発がん性評価モノグラムの物質選択基準(Vol. 93)

グループの定義とナノ物質に関連のある物質を示す。評価は Volume 99 まで進んでいる
(<http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/index1.php>).

5 ナノマテリアルは「粒子状物質(Particulate matter ; PM)」でもありうる

従来から、毒性学のなかで難易度の高い分野に粒子状物質毒性学(particulate matter toxicology)がある。ごく単純化してその特徴を述べると、①難分解性のPMは、経口曝露では難消化性であるので非吸収性であり、便中に排泄されるから低毒性であることが多い。②難分解性のPMは、吸入曝露時には粒子の大きさや形により、呼吸器のどこにまで到達するか、そしてどのように排除されるかが異なる。場合によっては排除されずに蓄積する。③血管内投与された場合は、異物としての血液凝固系への影響(塞栓、血栓塞栓、播種性血管内凝固(DIC)誘発など)、血管内皮への直接影響(血管攣縮など)、アジュバント効果などによる免疫系への複雑な影響などが考えられる。易分解性のPMの方が吸収が早く急性毒性は強いかもしれない。「経口毒性がほとんどないから吸い込んでも安全」ということは、特にPMの場合あてはまらない。

PM毒性の有名な特殊例が「アスベスト様繊維」による中皮腫と肺がん、肺線維症である。中皮腫発がんのメカニズムとして frustrated phagocytosis による酸化的ストレス説がある。ただし、肺がんもまったく同じメカニズムであるかどうかははっきりせず、尖った硬いアモサイト類と曲がりやすいクリソタイルの肺がん誘発性の違いもよく分かっていないようである。

なお、「異物発がん」という毒性学分野があり、一般に異物を齧歯類の皮下に埋植すると悪性線維性組織球腫(MFH)様の悪性腫瘍(肉腫)をその部位に生じることが知られている。やや古い報告であるが、各種アスベストを大量にマウスの腹部皮下に注射したところ、局所には肉腫が発生し、一部が腹腔及び胸腔の漿膜(中皮)へアスベストが移動し、そこでの悪性中皮腫の発生を認めている。⁴⁾ これから、移動先の中皮に中皮腫を誘発したアスベストは、皮下では通常の異物発がんと同じく肉腫を誘発することが分かる。また、アスベストを経口投与した場合の発がん性は吸入した場合に比べるとはるかに低い。

6 アスベストの毒性の特徴

アスベストを大量に吸入すると、ほぼ全員に胸膜肥厚が起こり、そのような患者から高率に

中皮腫や肺腺がんが発生する。微量を吸い込んだ人には胸膜肥厚は起こらない(X線検査やCT, MRIで見つからない)。言い換えると、胸膜肥厚の発症には「閾値がある」。しかし、中皮腫発がんには「閾値が設定できない」ことが強く想定されている。よって微量を吸い込んだ人は量によって、100万人につき何人中皮腫になるかが計算可能である。これは「顔の見えない」タイプの毒性である。

7 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)

以前から報告されている中皮腫発がん性の高い繊維状粒子のサイズは、およそ長さが5~20 μm 、直径が100 nm 前後。^{5~8)} 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)には、上記の条件に当てはまる繊維状粒子を含むものがある。ここでは、*p53* ヘテロ欠失マウス(*p53* KO)に MWCNT を腹腔内投与したとき、陽性対照物質のクロシドライト(青石綿)と同様に中皮腫が誘発されたことを示した(図5)。⁹⁾ 詳細は原著に譲るが、マウス1匹につき3 mg を投与。これは大量であるが、1動物につき5 μm より長い繊維が10億本という人造鉱物繊維に関する指針によって推奨されている最大値に近い。中皮腫誘発性があれば確実に検出できることを旨に、この第1回目の実験を最適化した。第2回目の実験は、投与量を第1実験の10分の1(高用量群)、100分の1(中用量群)、1,000分の1(低用量群)に下げて行った。360日余観察した結果、高用量群ではほぼ100%、中用量群では60%、低用量群では約20%のマウスの腹腔に腫瘍が誘発された(詳細解析中)。

8 *p53* ヘテロ欠失マウス(*p53* KO)

がん抑制遺伝子 *p53* のヘテロ欠失マウス(*p53* KO)は、*rasH2* トランスジェニック、*TgAC* トランスジェニック、あるいは、*XPA* ホモ欠失マウスモデルと共に、短期発がん試験系として国際的な評価の対象となったものの1つである。¹⁰⁾ 従来の1年半~2年を費やすがん原性試験を2種以上の動物種で行うという慣例に対して、特に医薬品のがん原性試験において第2種

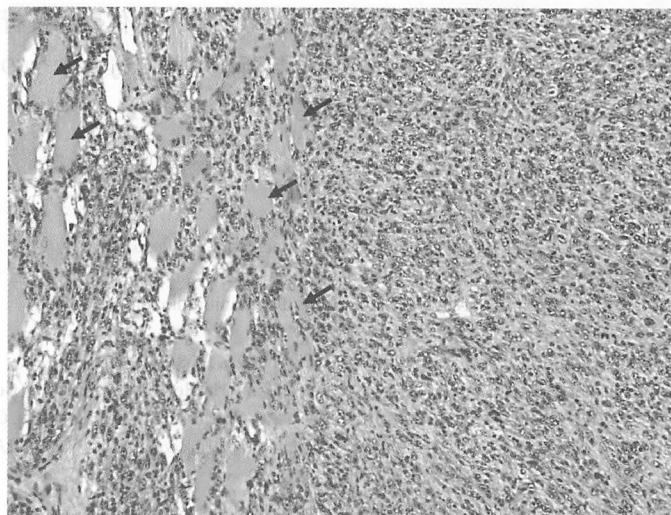


図5 MWCNTの*p53*ヘテロ欠失マウス腹腔内投与により誘発された中皮腫像

左半の斑状に見えるのが横隔膜の横紋筋線維(矢印)、右半分の中皮腫細胞が筋線維の間へ浸潤している。

目として用いることを検討するなかで取り上げられた、半年を目安とするモデル系である。我々は、発がん研究を含め、様々な毒性学研究のために p 53 KO を育成し使用している。この p 53 KO は、異物発がんの特殊例であるアスベスト中皮腫発がんに感受性を持つことが、ケース等によって示されている。^{11,12)} なお、この p 53 KO マウスに中皮腫はほとんど自然発生しないし、誘発されるという報告もアスベスト以外にはほとんどない。¹⁰⁾

9 陽性対照、陰性対照

陽性対照としてクロシドライト(青石綿)を用いた。陰性対照として、フラーレン顆粒(C₆₀)を、線維状でない炭素素材として採用した。C₆₀ は中皮腫を誘発せず、腹膜における異物反応それ自体も組織学的に異なっていた。副所見として、C₆₀ の凝集塊を貪食系細胞が更に小さな粒子に「消化」して全身に運び出していることを示唆する所見を得ている(詳細検討中)。

10 なぜ吸入曝露実験ではないのか

1970～1980 年代、アスベストの代替繊維を評価する際、齧歯類の吸入試験では発がん性が十分に検討できないことから、メカニズム的に同一と考えられる腹膜を標的とした腹腔内投与実験がもっぱら用いられたという経緯がある。¹³⁾ これは、齧歯類の気道系の形やサイズが人と異なることから、6 μm より長い繊維が齧歯類では肺の末梢に到達し難いことによると考えられている。現在でもアスベストや類似繊維状粒子の中皮腫発がん性を検討するための齧歯類による実験のほとんどが、内外を問わず腹腔内投与法を採用している¹⁴⁾理由はそこにある。

11 おわりに

新素材、新製品の性能が決まった時点で、その毒性が評価あるいは高精度で予測できれば、その情報を製造者側の開発戦略にフィードバックすることで、そのような毒性が国民に及ばないような製品の開発を促すことが可能となり、中長期的に利用者と製造者の win-win situation を作り出すことができよう。言い換えると、曝露評価を待たずに有害性評価の結果をリスクマネジメント(この場合は、製品開発現場へのフィードバック)に直結させることのメリットが大きいということである。その実現のためには、生体反応解析に対する十分な基礎知識と経験を備え、新たな毒性への迅速な対応と判断が可能な毒性学への、規制当局側のみならず開発・製造側からの更なる投資が期待される。

引用文献

- 1) <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v040je16.htm>
- 2) <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol47/volume47.pdf>
- 3) <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/93-titaniumdioxide.pdf>
- 4) Roe F. J. *et al.*, *Int. J. Cancer*, 2, 628 (1967).
- 5) Roller M. *et al.*, *Environ. Health Perspect.*, 105 Suppl. 5, 1253 (1997).
- 6) WHO (1986), *Environmental Health Criteria 53*, World Health Organization, Geneva.
- 7) WHO (1998), *Environmental Health Criteria 203*, World Health Organization, Geneva.
- 8) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, Vol. 81, IARC Press, Lyon, 2002.
- 9) Takagi A. *et al.*, *J. Toxicol. Sci.*, 33, 105 (2008).
- 10) Mahler J. F. *et al.*, *Toxicol. Pathol.*, 26, 501 (1998).
- 11) Marsella J. M. *et al.*, *Environ. Health Perspect.*, 105 Suppl. 5, 1069 (1997).
- 12) Vaslet C. A., *et al.*, *Toxicol. Sci.*, 68, 331 (2002).
- 13) Pott F. *et al.*, *Environ. Health Perspect.*, 102 Suppl. 5, 145 (1994).
- 14) Poland C. A. *et al.*, *Nat. Nanotechnol.*, 3, 423 (2008).