

重金属による免疫毒性とその発現機序

大沢 基保

Heavy Metal-induced Immunotoxicity and Its Mechanisms

Motoyasu OHSAWA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Sagamiko-cho,
Sagamihara, Kanagawa 229-0195, Japan

(Received September 22, 2008)

Immunotoxic effects of heavy metals, as a typical environmental agent, and their mechanisms are reviewed based on our findings on autoimmune response induced by exposure to cadmium (Cd) as CdCl₂. Adverse immune effects of chemicals, defined as immunotoxicity, have been used as a sensitive biomarker for assessing health effects of environmental chemicals. My initial research focused on renal toxicity of heavy metals was developed to elucidate characteristics and mechanisms for immune-mediated nephritis induced by heavy metals. In our studies the most interesting finding was autoantibody production enhanced by the oral exposure to Cd at environmental levels. It was observed simultaneously with enhancement of non-specific antibody production and suppression of primed-antigen specific antibody production. Immunostimulation including induction of autoantibodies was found to be the primary immunotoxic effect of Cd, because of the dose-sensitivity, and to be associated with polyclonal B cell activation (PBA). Further mechanism studies on the PBA induced by Cd *in vitro* showed that it was mediated by T cells, *via* cytokines, dominantly Type-2 cytokines, and recognition of MHC-II antigens of cell surface. The similarity among PBAs induced by inorganic salts of Cd, mercury and lead suggests that it would be the common effect among the metals to be involved in their pathogenesis of nephritis. Finally possible health significance of chemical-induced PBA is discussed associated with an increasing trend of autoimmune diseases in industrialized countries.

Key words—immunotoxicity; heavy metal; cadmium; autoantibody; polyclonal B cell activation; cytokine

1. はじめに

化学物質と生体の相互作用の探求に興味を持ち、筆者は Toxicology and Environmental Health を研究領域として、環境物質と生体防御の関係について研究をしてきた。職業病としての重金属中毒の診断指標の開発から研究を開始し、その後環境物質のトキシコロジーに関する研究に携わり、免疫毒性学の基礎固めに取り組んできた間に早くも約 30 年近くが経過した。今回、本誌にこれまでの研究を回顧し、総説としてまとめる機会が与えられたので、これまでのカドミウム (Cd: 以下 Cd と記載するが、実験で用いた Cd 化合物はすべて CdCl₂ である) を

中心とする重金属の免疫毒性研究の一端を紹介し、化学物質の毒性評価に係わる今後の課題を展望してみたい。

19 世紀以来の化学の著しい進歩は、ヒトの生活環境中の物質環境を大きく変化させてきた。地下の鉱物資源を活用することにより地表における微量元素の分布が変化し、また、工業的に有益な人工的合成物質が大量に増え、さらに、最近では遺伝子組換え技術による人工的生体物質の開発が加速化して物質環境の新たな変化も進行している。生物としての人類は、そのような物質環境の種々の変化に適応してきたが、ときに適応能力を超えた環境物質の質的量的変化により健康の障害が発生した。化学物質の潜在的な健康影響の早期検出と評価及びその機序解明は、健康障害の防止という実際面でも、また、ヒトの生体防御機構と物質環境への適応能力の解明という学問面でも重要な課題となっている。

筆者が化学物質の有害影響に興味を持ったのは、

帝京大学薬学部 (〒229-0195 神奈川県相模原市相模湖町寸沢嵐 1091-1)

現所属: 財食品薬品安全センター・秦野研究所 (〒257-8523 神奈川県秦野市落合 729-5)

e-mail: ohsawa.m@fdsc.or.jp

本総説は、平成 19 年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

鉛工業の急発展に伴い環境汚染による水俣病やイタイイタイ病などの健康被害が明らかになってきた頃であった。大学院時代は遠藤浩良先生に内分泌生理化学の指導を受け、ホルモンによる腎機能調節の生理化学的研究をテーマとしてきた。その後上記のような時代背景に触発され、重金属化合物のような毒性物質による生体機能の調節破綻についての生化学的研究を通して、本来の生体の調節機構とその意義を解析しようと思いついた。その研究は、重金属に対する生体防御の機構の解析、さらに生体防御の主役である免疫系への有害影響、すなわち化学物質による免疫毒性の解析へと展開されることになった。筆者らの免疫毒性研究の成果は、最近の IPCS (国際化学物質安全性計画) の Environmental Health Criteria の免疫毒性に関する専門書¹⁾にも取り込まれ、研究成果が生かされたことは喜びである。

2. カドミウムによる腎障害指標の開発

研究活動を始めた労働省労働衛生研究所では、重金属中毒の診断指標の開発がテーマとなり、まずは重金属暴露による早期の中毒症状の解析から研究を始めた。当時職業暴露により健康障害を生じ得る重金属として Cd と水銀 (Hg) が注目されていた。Hg については、主に水銀蒸気の吸入による神経毒性が研究されていた。Cd については、Cd を含む粉じんを吸入した作業における呼吸器障害 (肺気腫) と腎障害 (タンパク尿) が主たる職業性障害として知られていた。一方、当時富山県で発生した骨障害と腎障害が主症状であるイタイイタイ病は、鉛の河川流入により Cd に汚染された水や農作物の摂取が係わっているとみられはじめていた。そこで、大学院時代の腎機能研究の経験を生かして、Cd 中毒に共通に特徴的かつ早期の診断指標として、腎障害によるタンパク尿を詳しく解析することに着手した。

2-1. 近位尿細管障害指標となる尿中 β_2 -ミクログロブリンの単離・同定 Cd の慢性暴露は、低分子タンパクを多く含む低分子タンパク尿を生じる。²⁾ 蓄電池工場での作業歴を有する慢性 Cd 中毒患者の尿から、 β_2 -ミクログロブリン、遊離 L 鎖、レチノール結合タンパクなどの特徴的な低分子タンパクが単離された³⁾が、これらの過剰な尿排泄は、腎尿細管での再吸収障害がある場合に特徴的であることが示唆されていた。⁴⁾ 一方、イタイイタイ病の

腎障害は、タンパク尿、アミノ酸尿などを特徴的な症状とし、Cd の慢性中毒である可能性が指摘されていた。⁵⁾

このことから、イタイイタイ病患者の尿中タンパクから低分子タンパクを単離し同定することを試みた。イタイイタイ病の患者さんから提供された 24 時間タンパク尿を硫酸沈殿及び分子篩フィルターろ過で低分子タンパク画分を回収し、さらにゲルろ過と陰イオン交換カラムで精製し、ポリアクリルアミド電気泳動で単一バンドを示す分子量 1 万数千の主要タンパク質を得た、これを泳動ゲルから抽出してアミノ酸組成を分析し、職業性慢性 Cd 中毒者の尿中 β_2 -ミクログロブリンのアミノ酸組成に一致したことから、 β_2 -ミクログロブリンであると同定した。⁶⁾ これは、イタイイタイ病にみられるタンパク尿と慢性 Cd 中毒で生じるタンパク尿とで、主要な低分子タンパク成分が一致することを初めて示したもので、この生化学的指標によりイタイイタイ病の腎障害も尿細管障害型であると推定され、Cd の関与を強く示唆するものであった。

2-2. リンパ球増殖反応と β_2 -ミクログロブリンの生成 このように、生化学的指標は化学物質中毒の病型分類に役立つことが示された。特に、 β_2 -ミクログロブリン尿は近位尿細管障害の鑑別指標として今日臨床検査でルーチンに用いられている。しかし、 β_2 -ミクログロブリンはすべての細胞に存在する主要組織適合抗原クラス I 分子 MHC-I の L 鎖を構成し、がんや自己免疫疾患などの増殖性疾患では血中 β_2 -ミクログロブリン濃度が増加し、⁷⁾ それが β_2 -ミクログロブリン尿の発生に寄与する可能性も考えられた。一方、Hg, Cd, 亜鉛 (Zn), ニッケル (Ni) などの無機塩の重金属イオンは、ヒト末梢血の白血球培養物に非特異的なリンパ球増殖反応を生じさせる。⁸⁾ そこで、最も強い増殖反応を生じる Hg 塩 (HgCl₂) をヒト末梢血白血球培養に添加し、 β_2 -ミクログロブリンの産生能を調べた。その結果、Hg 塩はリンパ球の DNA 合成を誘導し、それに伴い β_2 -ミクログロブリン産生を亢進して培地中に遊離・放出すること、また、それらの効果は T リンパ球マイトゲン (PHA) と相加的であることを見出した。⁹⁾ これらにより、Hg²⁺ イオンは T リンパ球マイトゲンと異なる機序により非特異的にリンパ球を活性化し、それに伴い β_2 -ミクログロブ

リン産生を誘導することが明らかとなった。これにより、無機塩の Hg や Cd はリンパ球を活性化して、 β_2 -ミクログロブリン産生を亢進することが予想された。

環境化学物質の影響指標開発の目的は、より鋭敏なかつ毒性学的に意義のある影響指標を用いて健康影響を早期に検出し、健康障害の発生を予防することにある。そこで、より早期の健康影響に係わる指標を求めて、環境物質による影響指標の研究の重点を、免疫細胞とその機能に対する重金属の影響に移すことにした。

3. 環境化学物質の免疫影響

3-1. 毒性標的としての免疫系 免疫は、異物に対する生体防御や生体成分の均質性を維持する生体調節に係わる基本的な生命維持機能である。免疫機能は、栄養物質の欠乏や細胞障害性物質あるいは細胞間の情報伝達を乱すような物質による影響を受け易く、生体の栄養条件や環境条件を鋭敏に反映し易い。¹⁰⁾ これには、免疫系の次のような特徴が関与している。すなわち、1) 免疫系は多種類の細胞から構成され、直接接触あるいは液性因子を介する細胞間相互作用による高度な調節ネットワークが働いていること、2) 免疫系細胞、特にリンパ球は機能の発現の際に活発に増殖・分化すること、3) 免疫系細胞は、リンパ器官と末梢組織の間を循環・移行することなどが挙げられる。このため、免疫系は毒性感受性の高い標的と考えられ、環境化学物質の影響を調べるための標的として注目されるようになった。

免疫反応に関与する細胞はリンパ球系、網内系、骨髄細胞系に分けられる。免疫応答の主体はリンパ球である。リンパ球は、さらに細胞性免疫の主役となる T 細胞、液性免疫の主役となる B 細胞、それらの機能の調節に係わる調節性 T 細胞、非特異的免疫に関与するナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) などに分けられる。このリンパ球系細胞の毒性生化学的特徴として、有機物質の解毒に係わる P-450 などの異物代謝酵素の活性¹¹⁾や重金属の解毒に係わるタンパク質メタロチオネイン (MT) の量や誘導能^{12,13)}が著しく低いことが挙げられる。このような細胞の自己防御能の低さが、リンパ球においてはその機能発現である免疫機能の有害物質に対する感受性の高さをもたらすと解される。

3-2. 免疫毒性の発現様式 化学物質によって引き起こされる免疫異常を免疫毒性と称する。免疫毒性変化は、ほかの毒性変化に比べてより鋭敏に検出されることから、今日では健康影響を検出するための早期の毒性影響指標 (バイオマーカー) とみなされている。

リンパ球は毒性物質に対する感受性が高く、免疫機能は一般に抑制されると考えられる。重金属の生体暴露による免疫影響についての報告を調査してみると、事実、重金属化合物の過剰な環境暴露による免疫影響は、抗原特異的な抗体産生で示される液性免疫能や遅延型過敏症反応で示される細胞性免疫能の抑制についての報告が多い。¹⁴⁾ 一方、職業病の事例で知られているように、重金属は比較的高濃度の経皮、吸入暴露により接触性皮膚炎や喘息などのアレルギー症も引き起こす。さらに、動物実験では Cd や無機 Hg (HgCl_2) の経口暴露は免疫複合体の沈着による自己免疫性腎炎を発症¹⁵⁻¹⁷⁾させ、異常な免疫亢進も起こす。Hg については、無機及び有機 Hg の創傷治療薬の皮膚塗布暴露によっても、同様の腎炎が生じる。¹⁶⁾ また、歯科用アマルガムの埋込みや水銀蒸気の吸入暴露などが自己免疫性腎炎の発症に係わる可能性も指摘されている。^{18,19)}

このように、免疫毒性は免疫抑制及び異常な免疫亢進として発現し、前者は免疫不全により感染や発がんに対する生体防御能の低下に至り、後者はアレルギー症や自己免疫症の発生に至る (Fig. 1)。これらの多様な影響は化学物質のどのような条件で発生するのだろうか。しかし、それまでの研究は、個別の免疫毒性の発現について調べたものがほとんどで、特に、免疫抑制と免疫亢進の関係を同一条件の基で論じるものはなかった。そこで、Cd 暴露を例として、種々の免疫毒性の関係を総合的に調べることにした。

3-3. Cd 暴露の免疫毒性

3-3-1. Cd による免疫抑制 毒性量の Cd 投与により抗体産生などの免疫抑制が生じることは知られている。そこで、Cd (0.5 又は 1.0 mg/kg/day の subtoxic dose) をマウスに 5 日間連続皮下投与する亜急性毒性実験を行った。²⁰⁾ Cd 投与群では胸腺の退縮と脾臓の肥大が生じた。脾リンパ球の組成は B リンパ球の比率が有意に増加し、B 細胞の活性化による抗体産生の亢進が予想された。しかし、Cd の

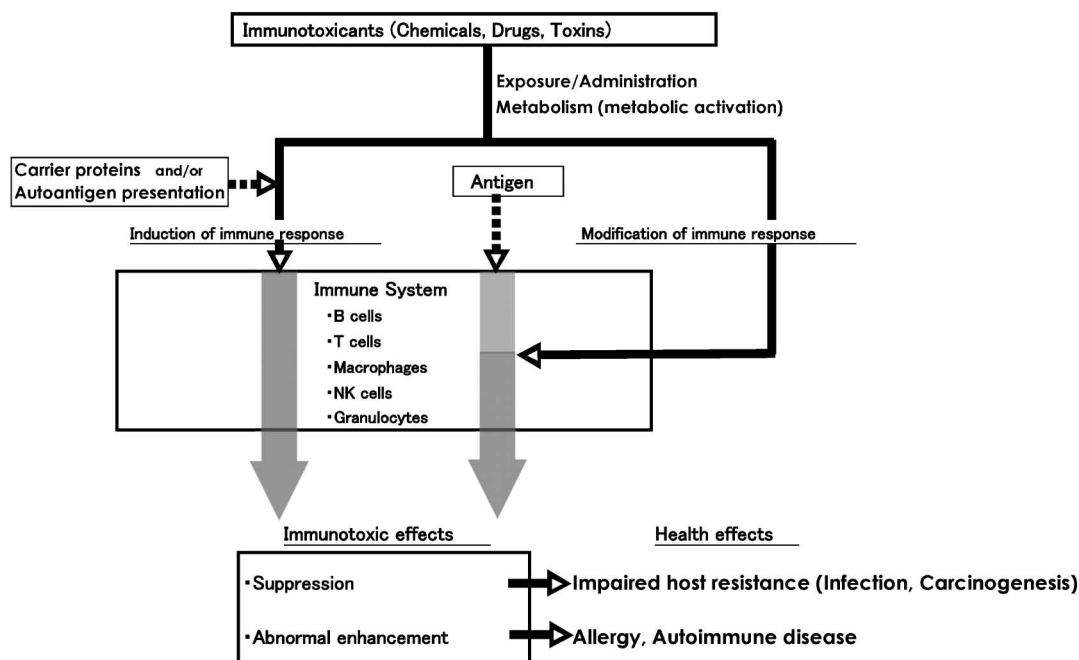


Fig. 1. Mode of Action of Chemical-induced Immunotoxic Effects

投与後にヒツジ赤血球 (SRBC) で抗原感作し、感作抗原に対する抗体産生能 (IgM 抗体プラーク形成反応) と遅延型過敏症反応 (足蹠腫脹反応) を調べると、細胞性免疫能の指標である遅延型過敏症には有意な影響はなかったが、抗体産生は有意に抑制され、液性免疫能が選択的に抑制されていた。さらに、Cd 投与後にマウスから得た脾細胞を培養してマイトゲン刺激によるリンパ球の増殖反応を調べると、Cd 投与群では T, B 両リンパ球の増殖反応は抑制されていた。²¹⁾ この免疫抑制の程度にマウス系統差がみられたが、これは血中の Cd 濃度の高さと同相関し、リンパ球そのものの感受性の系統差とは相関しなかった。リンパ球の増殖反応の抑制は Cd の細胞毒性によるためであるが、Cd の防御タンパク MT の肝誘導能が高いマウスの方が Cd の血中濃度を低下させ、標的の免疫細胞への影響を弱めたものと考えられた。また、マウス培養脾細胞のマイトゲン反応について種々の無機の重金属塩の影響と比較すると、Hg, Ni, ビ素 (V) は B 細胞のマイトゲン反応をより鋭敏に抑制し、鉛 (Pb) はあまり強い影響を示さない一方、Cd は他の重金属塩と異なり、T 細胞のマイトゲン反応を鋭敏に抑制した。²²⁾ このように、Cd はリンパ球の免疫応答において、特徴的な直接的影響 (免疫応答の初期ではより鋭敏な T 細胞の増殖反応阻害、及び後期の免疫反応では選択

的な B 細胞の抗体産生機能の抑制) を生じることが明らかとなった。

3-3-2. Cd 経口暴露は免疫亢進を生じる これまでの比較的高濃度の短期暴露に比べ、実際の環境暴露はより低濃度の長期暴露による健康影響が問題となる。そこで、3-300 ppm (mg/l) の Cd を含む飲料水をマウスに 10 週間摂取させ、その免疫影響を調べた。ICR マウスへの Cd の長期経口暴露では、動物に明らかな臨床的症状はみられないが、免疫系に変化が生じていた。亜急性毒性実験と異なり、Cd 暴露群では胸腺の退縮はみられず、脾臓の細胞数、特に B 細胞数の暴露濃度依存的な増加が観察された。²⁰⁾

この長期暴露条件下で SRBC 抗原に対する免疫反応を調べると、抗原感作後の抗原特異的な免疫反応のうち遅延型過敏症反応には有意な影響はないが、抗原特異的な抗体産生は 30 ppmCd 以上の暴露群で抑制された。²³⁾ 前述の亜急性毒性実験と合わせて、Cd は液性免疫能により選択的な影響を及ぼすことが明らかになった。しかし、抗原感作のない条件では、SRBC に対する抗体の産生は逆に増加し、非特異的な抗体産生が亢進していた (Table 1)。しかも、その効果は 3 ppmCd という低濃度暴露によっても生じていた。この非特異的な抗体産生亢進は自己抗体である抗核抗体 (ANA) にも及び、異常

Table 1. Alterations in Immunological Function in ICR Mice Exposed to Cadmium in Drinking Water for 10 Weeks

	Concentration of Cd in the drinking water (ppm)			
	0	3	30	300
DTH reaction to SRBC ^{a)} ($\times 10^{-2}$ mm)	184 (12)	162 (15)	192 (12)	170 (12)
PEC response to SRBC ^{b)} After priming with SRBC (PFC/ 10^6 spleen cells)	1010 (43)	1011 (81)	850 (96)	768 (67) \times
(PFC $\times 10^{-5}$ /spleen)	2.31 (0.27)	1.99 (0.26)	1.54 (0.24)	1.61 (0.19)
Without priming (PFC/ 10^6 spleen cells)	40 (12)	104 (19) *	102 (32)	145 (44) *
(PFC $\times 10^{-3}$ /spleen)	1.30 (0.28)	2.43 (0.29) #	1.90 (0.29)	1.90 (0.20)
Induction of ANA ^{c)} (No. of positive mice/No. tested)	1/12	5/10 *	8/9 \times	9/10 \times
(%)	8	50	89	90

Results represent the mean (standard error) except ANA data. * $p < 0.05$, # $p < 0.01$, $\times p < 0.001$, a) Delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction was determined by footpad swelling test. b) Plaque-forming cell (PFC) response of spleen cells to sheep red blood cells (SRBC) was determined 4 days after priming with SRBC or immediately without priming at week 10. c) Induction of anti-nuclear antibodies (ANA) was detected by indirect immunofluorescence staining of mouse liver cell line preparations. Sera with ANA titer more than 40 were represented as positive in ANA induction.

に高い血清 ANA-IgG 抗体価を示す個体の割合はすべての Cd 暴露群で有意に増加し、高濃度暴露群ではほとんどの個体で ANA 抗体価の異常亢進を示した (Table 1)。このときの 3 ppmCd 暴露群のマウス血中及び脾臓中の Cd 濃度は、フレイムレス原子吸光法では対照群との間に差が検出されず、非特異的な抗体産生亢進は物質の臓器蓄積の指標からは推測できない極めて鋭敏な影響であることが分かった。これは同時に、既報の Cd の種々の影響指標と比べても、免疫系が感受性の高い毒性標的であることをも示していた。

3-4. Cd 暴露と自己免疫反応

3-4-1. Cd 暴露と自己免疫性腎炎 Hg 塩や金 (Au) 製剤は、ヒトや実験動物に腎糸球体の障害を主とする自己免疫性の腎炎 (免疫複合体の沈着が引き金となるループス型腎炎) を生じる。²⁴⁾ Cd も実験動物にループス型腎炎を生じるが、Cd の経口暴露による異常な免疫亢進については、Cd の長期経口暴露によるウサギでの腎アミロイドーシスの発生、²⁵⁾ ラットでの腎糸球体への免疫複合体沈着と腎炎の発生¹⁵⁾ や腎基底膜成分 (ラミニン、タイプ-IV プロコラーゲン) に対する自己抗体の誘導²⁶⁾ などの腎炎に関連する自己免疫反応が報告されていた。その後、Cd 暴露によりラットの腎細胞にストレスタンパク HSP-70 が発現し、それに対する自己抗体の

反応による間質性腎炎の発症も見い出された。²⁷⁾ これらに筆者らの ANA 誘導の結果も加えると、Cd による異常な免疫亢進である自己免疫反応の誘導は、Cd 暴露に共通する免疫影響と考えられる。また、多数例の Cd の職業暴露による腎障害の発症者の調査²⁸⁾ では、大部分のタンパク尿は糸球体障害型であり、現在では Cd 暴露による糸球体型及び糸球体型 + 尿細管型のタンパク尿の病態に免疫反応が関与していると考えられている。

これらのことから、次のことが言える。1) Cd 暴露の免疫系に対する影響は、液性免疫能により選択的である。2) Cd 暴露は、強い抗原刺激のないナイーブな状態では非特異的な抗体産生亢進を生じる。3) この免疫亢進は、より低濃度の Cd 暴露で生じることから免疫系に対する感度の高い一次的な Cd の影響と推定される。4) 非特異的な抗体産生亢進は、自己抗体 (ANA) の産生促進のように異常な免疫亢進も引き起こす。5) 高濃度の Cd 暴露による特異抗体産生の抑制は、一次的な免疫亢進状態での抗原感作に伴う二次的な影響か、Cd による一般的な細胞毒性に由来すると考えられる。すなわち、Cd の経口暴露は、一次的には自然免疫状態での抗体産生能を非特異的に亢進し、それに伴い自己抗体の産生も誘発するという異常な免疫亢進状態を生じると考えられる。6) Cd の慢性中毒では、こ

の自己免疫反応により産生された自己抗体の免疫複合体が腎臓に沈着し、自己免疫性糸球体腎炎が生じうると推測される。

3-4-2. Cd 暴露による抗体産生亢進の特徴

Cd 暴露による非感作状態での非特異的抗体産生亢進は、血清 ANA 抗体価を指標として調べると、Cd の 2 週間連続皮下投与の亜急性毒性実験によっても生じる。²⁹⁾ その特徴をまとめると、1) Cd 投与による ANA 誘導は皮下投与（非経口暴露）でも生じ、Cd そのものによる影響と考えられる。2) ANA 誘導能に重金属種差がある。すなわち、等モル用量 ($0.9 \mu\text{mole/kg/day}$) の各無機塩投与による ANA 誘導能の比較では、Cd, Hg では有意に陽性であり、Pb は誘導傾向を、生体必須金属である Zn と Fe(II) は陰性であった。3) ANA 誘導能にマウスの系統差がみられる。組織適合抗原性の H-2 ハプロタイプの異なる 3 系統の近交系雄マウス (BALB/c, C3H/He, C57BL/6) で比較すると、BALB/c マウスでより感受性が高い。BALB/c マウスはヘルパー T 細胞のサブセットバランスで Th2 優位とされる系統で、後述するように Cd が Th2 タイプ反応により強く働くことを反映したものと考えられる。また、BALB/c マウスの性差比較では雄の方に感受性が高い傾向が見い出された。4) ANA

のほかに DNA に対する抗体も誘導される。これらの抗体は IgG 抗体であるが、既に述べた PFC 反応は IgM 抗体による反応であるので、Cd 暴露による非特異的免疫亢進はポリクローン B 細胞活性化 (PBA) によるものであった。これは、次節の脾リンパ球培養実験でも確認された。

3-4-3. 非特異的な抗体産生亢進は、Cd のリンパ球に対する直接影響である 実験動物で観察された Cd 暴露による非特異的免疫亢進の影響を試験管内でも再現できるか、マウスの脾細胞培養系で調べた。^{30,31)} ICR マウスの脾細胞培養に CdCl₂ を添加し、その細胞の非特異的な SRBC-PFC (IgM) 反応と培地の抗 DNA 抗体濃度を測定すると、対照培養に比べ $10 \mu\text{M}$ 以下の濃度の Cd は PFC (IgM) 反応をほぼ培養 4 日目をピークに、培地中の抗 DNA-IgG 抗体濃度を経日的に、それぞれ顕著に増加した (Fig. 2)。これにより、Cd の経口暴露による非特異的免疫亢進は、脾リンパ球に対する Cd の直接影響として試験管内でも再現され、PBA 反応であることが確認された。Cd の経口暴露による免疫影響は、前述の培養脾細胞の増殖反応が Cd により阻害される知見と考え合わせて、これらの Cd の直接影響の反映と考えられる。この直接影響は、BALB/c マウスの脾細胞でも示され、培地中には ANA のほ

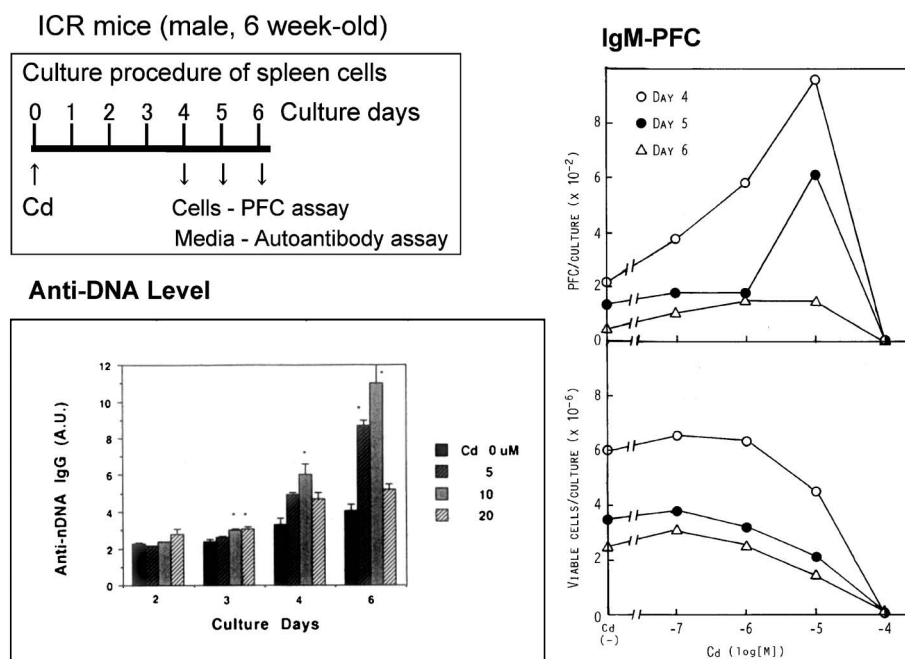


Fig. 2. Cd-induced Non-specific Antibody Production in Cultured Spleen Cells

かに native DNA (臨床的には抗 dsDNA 抗体とみなされている), ヒストンに対する抗体も誘導された. さらに, Cd 添加により全 IgM, IgG 濃度も有意に増加し, 非特異的な抗体産生の亢進が明らかになった.

この BALB/c マウス脾細胞の培養系を用いて Cd による PBA 反応の誘発作用の特徴について検討した結果, 次のような特徴が明らかになった.²⁹⁻³²⁾ 1) T 細胞の共存が必要である: 胸腺欠損の BALB スードマウスの脾細胞では Cd 添加により PBA は誘導されないが, これに BALB/c の脾細胞から調製した T 細胞を共存させると, PBA 反応は誘導される. 2) 培養培地中の液性因子が PBA 誘導に関与している: Cd 処理培養培地の添加だけでも PBA 反応を部分的に誘導できる. 3) MHC クラス II 分子が PBA 誘導に関与している: MHC クラス II 分子の Ia に対する抗体の共存下で培養すると, Cd の PBA 誘導が部分的に阻害される (抗 CD4-, 抗 CD8-抗体の添加は影響しない). また, Cd 処理培養脾細胞のフローサイトメトリー解析では, IA⁺-B 細胞比率が増加し B 細胞表面の Ia 抗原密度も増加する. これらのことから, Cd による PBA 誘導は

T 細胞依存性で, 液性因子と MHC クラス II 分子が介在し, 自己抗体の産生亢進を伴うことが明らかとなった.

ところで, PBA 反応の亢進により, なぜ自己抗体の産生も著しく亢進するのであろうか. この説明のヒントとなる卓抜なる研究がある. 自然免疫状態すなわち免疫学的にナイーブな幼若マウスの脾細胞中のリンパ球クローンのレパートリーを限界希釈法で調べた研究³³⁾で, 大部分は ANA や ssDNA, nDNA などの核成分やケラチン, アクチンなどの自己抗原に対する抗体を産生する自己反応性クローンであり, 非自己抗原に対する抗体産生クローンの割合はかなり少なく, それらのクローン増殖には抗原感作を要することが分かった. このことが, 抗原非感作時に Cd により PBA が生じると, 自己抗体の産生誘導が引き起こされ易いことの理由と考えられる (Fig. 3).

4. 重金属による自己免疫反応誘発の機序

4-1. 化学物質による自己免疫反応の誘発機序

化学物質暴露による自己免疫誘発には, Table 2 に示すような機序が挙げられる. 水銀の例を述べると, HgCl₂ 暴露も Cd と同じように ANA や抗核小

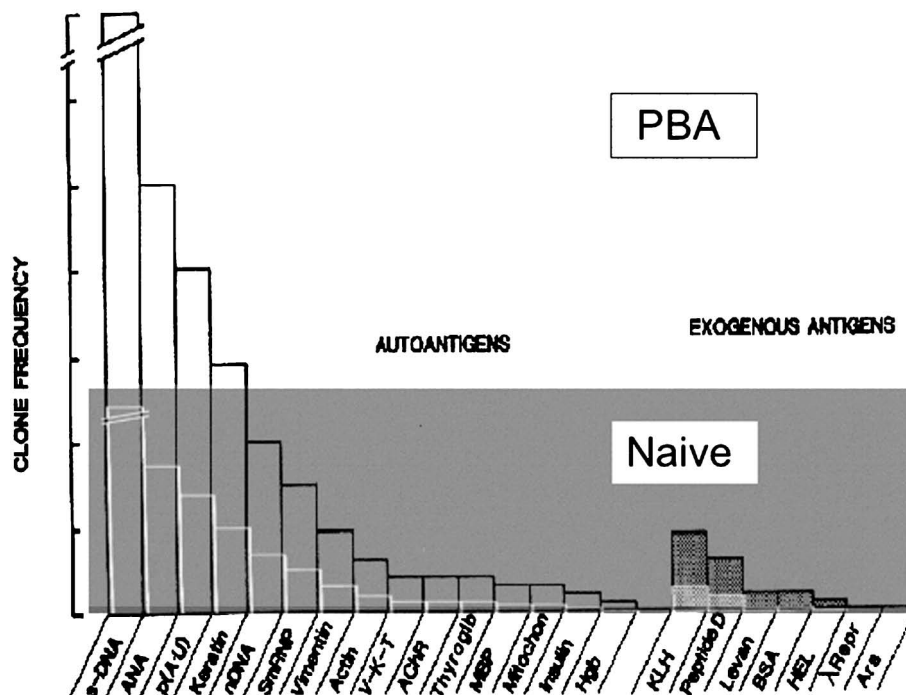


Fig. 3. Schematic Explanation for Enhanced Production of Autoantibodies by Polyclonal B cell Activation

White line columns represent the natural antibody repertoire in normal naive mice cited from Souroujon *et al.*³¹⁾ Black line columns represent a proposed schematic model for enhancement of autoantibody production by polyclonal B cell activation (PBA) in Cd-exposed mice.

Table 2. Some Proposed Mechanisms for Chemical-induced Autoimmune Responses

Mechanism	Examples
1. Expression of neoantigens —expression of cryptic epitopes in self-proteins modified by chemicals	Mercury salts, halothane
2. Cross reaction —cross reaction of MHC-restricted drug-reactive T cells with MHC-autopeptide complexes	Auto-allergenic drugs
3. Release or presentation of isolated autoantigens —release of intolerant tissue proteins by injury of tissues such as eyes, brain, thyroid and reproductive organs	Au (III) salts
4. Impairment of immunologic tolerance —inhibition of negative clonal selection at developmental stage	Cyclosporine A
5. Dysfunction of immune regulation —inhibition of CD8 ⁺ -T cell function, and/or disturbance of Th1/Th2 cell balance or Type 1/Type 2 cytokine balance	Mercury and cadmium salts

体抗体 (ANoIA) の誘導による免疫複合体の沈着を生じ、自己免疫性の腎炎を引き起こす。その機序として、HgCl₂ が核小体成分であるフィブリラリンの抗体を顕著に誘導することから、Hg 修飾によりフィブリラリンの潜在的自己抗原決定基 (cryptic epitope) が発現し、それが自己反応性の T, B 細胞を活性化し得ることが示されている。^{34,35)} また、HgCl₂ は PBA 活性も示し、自己抗体の産生を誘発する。³⁶⁾ このように、いくつかの機序が重なって自己免疫反応を引き起こしていると考えられる。Table 2 の機序のうち、PBA とそれに伴う自己抗体産生亢進に結び付くものとして、5 番目の免疫調節機能の障害が「引き金」となっている可能性が高い。そこで、この観点から Cd による PBA 反応誘発の機序をさらに検討した。脾細胞培養において Cd 処理により CD4⁺、CD8⁺-T 細胞の比率は変化しない³⁰⁾ ことから、CD4⁺-T 細胞のサブセットのバランスあるいはそれらにより産生されるサイトカインのバランスの変化に焦点をしばって解析した。

4-2. サイトカインバランス変化と PBA 反応誘発の関係 近年、CD4⁺-T 細胞すなわち Th 細胞のサブセット Th1 細胞と Th2 細胞のバランスの偏りが、種々の免疫関連疾病の発生に関係することが明らかとなってきた。^{37,38)} さらに、Th1 特異的に産生される Type 1 サイトカインと Th2 特異的に産生される Type 2 サイトカインのサイトカインバランスと生理的変化や病理的、毒性的変化との関連が明らかにされてきた (Table 3)。^{39,40)} アジュバント刺

激下のマウスに Type 2 サイトカインのインターロイキン (IL)-4 の抗体を投与してバランスを Type 1 サイトカイン優位にすると、実験的アジュバント関節炎が発生し易くなる⁴¹⁾ ように、Type 1 と 2 のサイトカインの間には相互作用があり、自己免疫疾患の発症にそのバランスの乱れが重要な役割を果たしている。ループス型腎炎のように自己抗体が介在する全身性自己免疫疾患の発症には、Type 2 サイトカイン (あるいはその産生細胞である Th2 細胞) の優位性の関与が仮定されている。

そこで、マウス脾細胞培養の Cd による PBA 反応実験系におけるサイトカインバランスについて検討した。⁴²⁻⁴⁴⁾ この PBA 反応系では、Cd の添加は抗 DNA-IgG に加えて非特異的な全 IgG の産生を亢進し、IgG のサブクラス別に測定すると、Th2 細胞依存性の IgG1 と Th1 細胞依存性の IgG2a の産生誘導を、ともに顕著に増加した。このうち IgG1 の方が IgG2a よりも増加程度が大きく、Cd は Th1, Th2 細胞の両方を活性化するが、より Th2 細胞優位に作用していた (Fig. 4)。このことをサイトカインバランスから確かめるため、培地中のサイトカイン濃度をサイトカイン抗体マイクロアレイ法で測定し比較した (Fig. 5)。IL 類を始め 14 種のサイトカインの一斉分析の結果、Cd 添加により IL-5 と IL-6 の経日的な増加が観察された。特に、IL6 は早期から産生誘導され量的にも増加が顕著であり、これに比して IL-2 やインターフェロン- γ (IFN- γ) の変化は少なかった。サイトカイン誘導パターンで

Table 3. Examples of Dominant Type 1 and Type 2 Cytokine Profiles

Type 1 cytokines Dominant cell-mediated immunity		Type 2 cytokines Dominant humoral immunity
Pathophysiological:		
	<u>Infection</u>	
Leishmania (protective)		Leishmania (susceptible)
Tuberculosis (protective)		Tuberculosis (susceptible)
HIV infection (resistant)		HIV infection (susceptible)
	<u>Autoimmunity</u>	
Type 1 diabetes		Atopic diseases
Autoimmune thyroiditis		Lupus (SLE)
Crohn's disease		Hypereosinophilia
	<u>Others</u>	
Acute GVH disease		Chronic GVH disease
Recurrent abortions		Successful pregnancy
Youth and adults		Infants and elderly
Toxicopharmacological:		
Chemical contact allergy		Chemical respiratory allergy
		HgCl ₂ -induced glomerulonephritis
		Pb-induced B cell differentiation
		Anti-rheumatoid effect of thalidomide (?)
		Rutin
	TCDD (type 1 decreased)	
	Mild Zn deficiency (type 1 decreased)	
	Indomethacin (type 1 decreased)	

Modified from Shearer, 1997.³⁹⁾

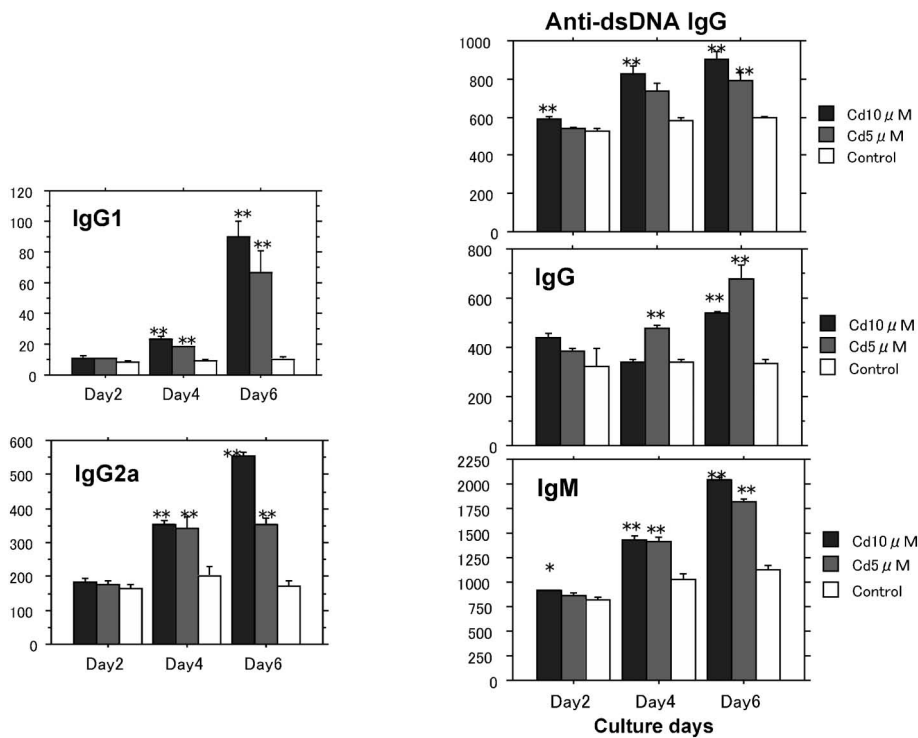


Fig. 4. Cd-induced Polyclonal B Cell Activation in Cultured Spleen Cells

All bars represent standard errors of the mean (n=4). *p<0.05, **p<0.01 by Dunnett's t-test. IgG1 and IgG2a levels were measured as indicators of immunoglobulin production with Th2 (type 2 cytokine) and Th1 (type 1 cytokine)-dependency, respectively.

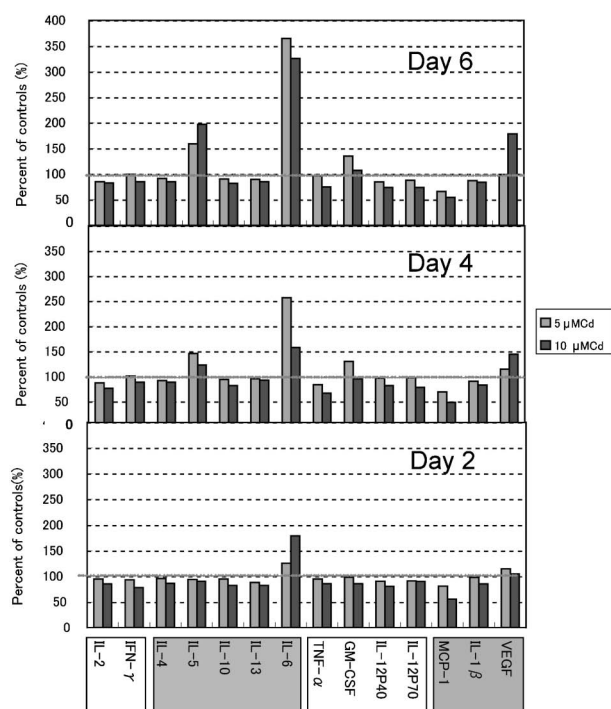


Fig. 5. Cd-induced Cytokine Profile in Cultured Spleen Cells (Time Course)

Vertical lines indicate relative cytokine levels in the medium of spleen cell cultures (the Cd-treated to controls). Day in graphs means culture days. Fourteen cytokines are grouped into four types due to the producing cell features: cytokines produced basically by Th1, Th2, Th1 and Th2, or many types of cells.

みても主に Th2 細胞が産生する Type 2 サイトカインの産生が誘導されており, Cd が Type 2 サイトカイン優位に働いていることが確認された. この Type 2 サイトカインの PBA 誘導への関与の程度を確認するため, 最も顕著に増加した IL-6 の抗体添加による中和実験により Cd の PBA 誘導効果への影響を調べると, IL-6 抗体の添加は Cd による培地中 IL-6 濃度の上昇を特異的に阻害し, それに伴い非特異的な抗体産生亢進を顕著に抑制した. しかし, 抗体濃度そのものは大きく減少したが, Cd による各抗体の産生亢進効果は有意に残っていた. また, 脾細胞培養への T リンパ球マイトゲンのコンカナバリン A 添加は IL6 を顕著に産生するが, 非特異的な抗体産生亢進を起こさなかった. また, 最近の知見では, Th 細胞のサブセットとして Th1, Th2 に加えて Th17, Threg の 4 種の存在が明らかされてきており, 免疫機能の Th 細胞による調節はこれら 4 種の細胞の機能バランスによるという説も唱えられている.⁴⁵⁾ 抗 IL-17 抗体による中和の予備実験では, Cd による PBA 反応に対する影響はなく,

IL-17 の産生細胞である Th17 細胞の関与の可能性は低い.

これらのことから, Cd による PBA 反応において, 1) IL6 が早期から顕著に誘導され, 2) IL-6 は非特異的な抗体産生の量的亢進に必須な液性因子として関与しているが, 3) Cd による抗体産生の誘導効果は IL-6 単独では説明できず, 4) IL-6 以外の因子 (IL-5 や MHC クラス II 抗原の発現増加など) の関与も必要なことなどが明らかとなった. これまでの知見を総合すると, Cd 誘導 PBA による非特異的な抗体産生と自己抗体産生の亢進の作用機序には, Cd の Th 細胞への作用によるサイトカイン (主として IL-6 などの Type 2 サイトカイン) の誘導と, B 細胞や抗原提示細胞への作用による MHC クラス II 抗原の発現増加などが複合的に関与していることを明らかにすることができた (Fig. 6). *In vitro* 実験では, Th17, Treg 細胞などの関与の可能性はあまり高くないと予想されるが, 今後の検討されるべき課題である.

4.3. 重金属による免疫亢進作用とその意義

PBA 反応は, Cd のほかに Hg や Pb でも誘導される. 近年 Hg や Pb などの無機化合物による PBA 反応の特徴も明らかになってきたが, それらは Cd の PBA 反応の特徴と比較すると極めて類似性が高い (Table 4). したがって, これらの重金属の免疫毒性は, 通常の状態では非特異的な免疫亢進作用であることを強く示唆している. この免疫亢進作用は, それ自体で自己抗体の産生を亢進するが, 自己免疫の遺伝的素因を有する個体に暴露されたときには, 自己免疫の発症を促進することが予想される. 実際に, これら重金属は遺伝的自己免疫性腎炎のモデルマウスへの暴露により, 自己抗体の産生や腎炎の発症を促進する (Table 5).^{27,46-49)} この場合, 重金属はアジュバント様の役割を果たしていることになる. 自己免疫性腎炎素因モデルマウスの実験では, 死細胞と不完全フロイントアジュバントの両方の投与が, ループス型腎炎の発症時期を早め死亡率を高めることから, 自己免疫性腎炎の発症促進要因として, 炎症などにより死細胞から放出される自己抗原の刺激と環境アジュバントの協調的役割が重視されている.⁵⁰⁾ 重金属はその細胞毒性とアジュバント的な免疫亢進作用を有することから, まさに自己免疫症の発症促進条件を十分に備えた物質と

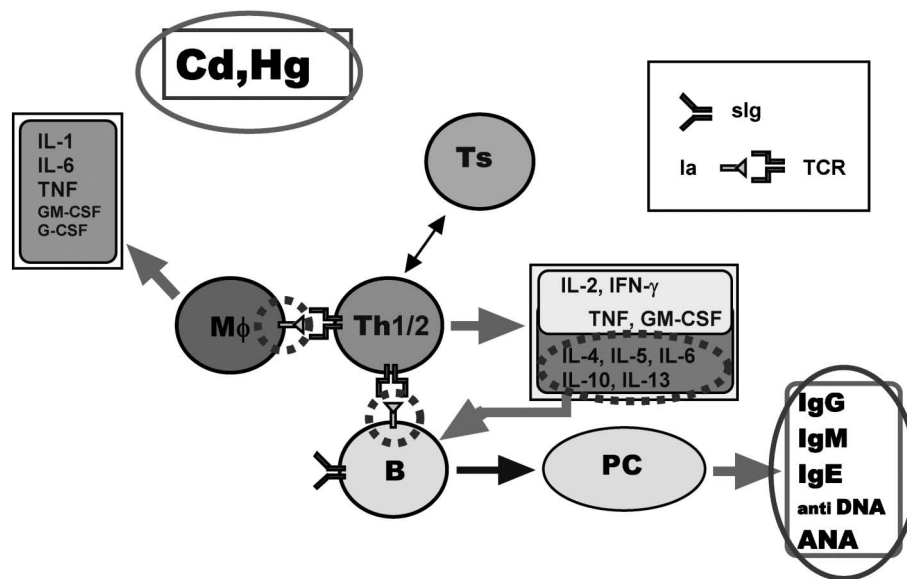


Fig. 6. Possible Mechanisms for Cd-and Hg-induced Polyclonal B cell Activation

Cd and Hg as inorganic salts induce polyclonal B cell activation thereby causing nonspecific production of antibodies including autoantibodies, mainly in association with induction of type 2 cytokines and enhanced expression of MHC-II antigens (e.g. Ia) as shown with broken circles. Mφ: macrophages, Th1/2: Th1 or Th2 cells, Ts: T suppressor cells, B: B cells, PC: plasma cells, sIg: surface immunoglobulin, Ia: Ia antigen, TCR: T cell receptor.

Table 4. Analogies of Immunostimulatory Effects among Cd, Hg and Pb

	Cd	Hg	Pb
Autoimmune diseases			
in human	?	yes	?
in animals	yes	yes	?
Autoantibody induction			
in human	yes?	yes	yes?
in animals	yes	yes	?
Polyclonal/oligoclonal			
B cell activation	yes	yes	yes
T cell requirement	yes	yes	yes
Th2 cell activation	yes?	yes?	yes
Induced cytokines	IL-5, 6	IL-4	IL-4, 5
MHC-II dependency	yes	yes	yes

All findings in the table are for inorganic salts of each metal except Hg in human cases, with is not specified for chemical species.

言える。このことは、Table 6 に示すように、種々の重金属暴露による神経タンパクも含む多種の自己抗体の誘導についての報告^{1,22,29,51)}からも示唆される。

5. 環境化学物質による自己免疫反応誘発の毒性的・衛生的意義

重金属特に Cd を中心に、その免疫毒性としての PBA に伴う自己免疫反応誘発について述べてきた。今日 70 種以上の自己免疫疾患群が知られてい

るが、最近の自己免疫症についての疫学調査⁵²⁾によると、米国では 1996 年時点の 28 種の自己免疫症の罹患率は全人口の約 3% (2000 年の NIH 専門委員会によると自己免疫症の罹患率を全人口の少なくとも 5%) と推定している。先進工業国のデータのメタアナリシスでは、いくつかの自己免疫症が経年的に増加傾向を示しており、その要因として環境化学物質の影響が示唆されている。¹⁾ Hg と Cd をはじめとする重金属類は、発がん物質の多段階作用に似て、Fig. 7 に模式化したように、自己反応性クローンの出現あるいはその活性化の各段階に働いていると考えられる。これら重金属の免疫亢進作用は、細胞障害作用による自己抗原の過剰提示と環境アジュバントとしての免疫毒性により、自己免疫症の誘発のリスク因子となっている。取り分け遺伝的素因を有する高感受性集団において、それら因子は自己免疫症の発症リスクを高めている。今後は環境化学物質について、このような自己免疫反応誘発性の簡便な検出系の確立が必要である。

環境アジュバント作用は、これまで述べてきた非特異的な免疫亢進のほか、生体に備わっている免疫寛容を阻害することにより抗体産生を亢進させ、アジュバント類似の効果としてアレルギー反応を現すことがある。生体は食物から摂取された異種タンパク質に誘導される経口寛容機構により、体内に取

Table 5. Autoimmune Manifestations in Lupus-Prone Mice EXposed to Heavy Metals

Prone mice	Exposure*	Autoimmune manifestations	Ref. No.
Cd			
MRL/1 mice	30 mg/l	Accelerated production of autoantibodies	27
NZB/W mice	10 mg/l	Accelerated production of autoantibodies exacerbation of immune complex deposition in kidneys and proteinuria	46
Hg			
MRL/1 mice	40 µg/d	Augmented autoimmune responses	47
NZB/W mice	40 µg/d	Augmented autoimmune responses	47
Pb			
NZB/W mice	10 mM	Developing of autoantibodies and glomerulonephritis and increase of death rate in males	48
NZM mice	1.3 mM	Exacerbation of developing lupus-type nephritis	49

* Mice were exposed to metals in the drinking water. All metals were given as inorganic salts.

Table 6. Induction of Autoantibodies Associated with Exposure to Heavy Metals in Humans and/or Laboratory Animals

Metals	Reported Autoantibodies
Cadmium	Anti-laminin, ANA, anti-DNA, anti-neural proteins
Cadmium + Nickel	Anti-oxidized DNA base
Chromium	ANA
Chromium + Manganese + Nickel	Anti-oxidized DNA base
Cobalt	Anti-neural proteins
Gold	ANA, ANoLA, anti-DNA, anti-TBM, anti-tubulin anti-myosin, anti-thyroglobulin
Lead	Anti-neural proteins
Mercury*	Anti-fibrillar, anti-laminin, anti-DNA, ANA, ANoLA anti-thyroglobulin, anti-neural proteins
Platinum	Anti-nucleoplasmic protein

Prepared in reference to refs. 1, 24, 31, 51, ANA: anti-nuclear antigens, ANoLA: anti-nucleolar antigens, anti-TBM: anti-tubular basement membrane

* Inorganic mercury for animal cases, but not specified chemical form of mercury for human cases.

り込まれた同タンパク質に対する免疫反応を抑制し、アレルギー反応の発生を防いでいる。⁵³⁾ シクロホスファミド⁵⁴⁾やディーゼル排気微粒子⁵⁵⁾は、経口寛容機構を阻害し、抑制されていた抗原タンパクに対する抗体産生を亢進させる。これは一見アジュバント様の効果であるが、その機序はPBAの誘発による直接的な免疫亢進とは異なる。近年アレルギー症も著しい増加の傾向にある。筆者らが行った都市部の3歳児検診時のアレルギー特異的IgEの保有

率調査(2000-2003年, 612例, 7種のアレルゲンについて調査)では, 28.4%の3歳児に陽性値が認められた。⁵⁶⁾ この割合が経年的に, また加齢とともにどのように変わるのか, そして生活環境中のアジュバント様物質の係わりの有無の検証は, 環境アレルギーの実証的研究の方向を示していると考えられる。

作用機序が異なるもののアジュバント様作用という免疫毒性は, 自己免疫症やアレルギー症のリスクに係わる毒性指標として, 環境化学物質の安全性評価の試験項目に加えられるべきであろうと考える。このためには, 環境化学物質の免疫毒性のHigh through put screeningが必要である。筆者らは, Pokeweed マイトゲンによる *in vitro* 非特異的抗体産生系による screening 法の開発⁵⁷⁾を試み, 250種以上の化学物質を試験し, 15.7%の物質に抗体産生の抑制影響を, また3.8%の物質に非特異的抗体産生の亢進を見出した。⁵⁸⁾ しかし, この方法では異常免疫亢進である自己抗体の産生誘導を調べることが難しいので, よりの確に異常免疫亢進を確認できる試験系の開発が望まれる。

6. おわりに

重金属, 特にCdのような限られた物質による生体影響の研究から, 化学物質と免疫系の関係, それも潜在的なリスクとなる毒性影響としての免疫毒性の発現とその機序, さらにその意義に関する研究を行ってきた。環境汚染による中毒現象の初歩的な観察に始まり, 得られた成果を再び生活環境における健康事象の解釈に適用する段階に戻ってきたように思う。限られた観察事象をその背景にある生命さら

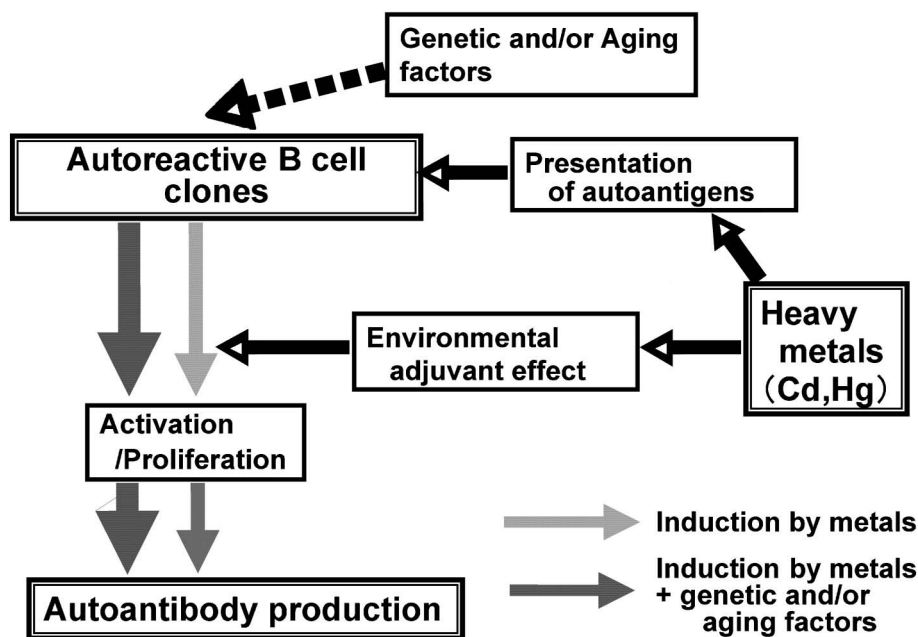


Fig. 7. Possible Two Step Implication of Environmental Immunotoxicants in Abnormal Immunoenhancement Followed by Excess Production of Autoantibodies

には健康事象に深めるに当たり、困難な分野に踏み込んでしまったという実感がある。それには、免疫毒性の概念や事象そのものを確立しなければならなかった過程もある。しかし、同時に未開の分野を切り拓く喜びも少しは味わえたように思う。

今日の生活環境や医薬環境では、高分子物質やバイオ産物が急増している状態であり、従来新規に開発された物質の安全性評価は物質開発のスピードに比して牛歩の感がある。今後変化していく物質環境の中で、安全性評価の対象として高分子物質や生体関連物質の割合が急速に増してくると思われるが、そのときには生体の防御能、すなわち免疫系への影響の予測と評価が最も求められるであろう。これまでの筆者の研究の成果と考え方が、そのために少しでも役立ち得ることを願っている。

謝辞 筆を置くに当たり、これまでの研究の過程で困難なテーマの研究に真摯に協力がつ貢献して頂いた共同研究者の諸氏、並びに帝京大学薬学部の教室員、研究員、大学院生、卒業研究生の方々に心からお礼を申し上げます。また、免疫毒性研究の遂行と普及に当たり助言や励ましを頂いた日本免疫毒性学会設立の同志の皆様や Dr. J. Vos と Dr. M. Luster, さらに重金属毒性研究の視点を養って下さ

った Dr. L. Magos や諸先輩の先生方に深く感謝の意を表します。

REFERENCES

- 1) WHO/IPCS, "Principle and Methods for Assessing Autoimmunity Associated with Exposure to Chemicals," Environmental Health Criteria 236, ed. by WHO Collaborating Center for Immunotoxicology and Allergic Hypersensitivity, Geneva, 2006, pp. 1-333.
- 2) Vigliani E. C., *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **30**, 329-340 (1969).
- 3) Berggård I., Bearn A. G., *J. Biol. Chem.*, **243**, 4095-4103 (1968).
- 4) Peterson P. A., Berggård I., *J. Biol. Chem.*, **246**, 25-33 (1971).
- 5) Murata I., Hirono T., Saeki Y., Nakagawa S., *Bull. Soc. Int. Chir.*, **1**, 34-42 (1970).
- 6) Ohsawa M., Kimura M., *Experientia*, **29**, 556-558 (1973).
- 7) Evrin P. E., Peterson P. A., Wide L., Berggård I., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **28**, 439-443 (1971).
- 8) Utakoji T., *Symp. Cell. Biol.*, **23**, 231-234 (1972).
- 9) Ohsawa M., Kimura M., *Biochem. Biophys.*

- Res. Commun.*, **91**, 569–574 (1973).
- 10) Dean J. H., Luster M. I., Munson A. E., Amos H., “Immunotoxicology and Immunopharmacology,” Raven Press, New York, 1985, pp. 1–511.
 - 11) Guengerich F. P., Mason P. S., *Mol. Pharmacol.*, **15**, 154–164 (1979).
 - 12) Mayo K. E., Palmiter R. D., *J. Biol. Chem.*, **256**, 2621–2624 (1981).
 - 13) Koizumi S., Sone T., Kimura M., Otsuka F., Ohsawa M., “Metallothionein II,” *Experientia Suppl.*, Vol. 52, eds. by Kägi J. H. R., Kojima Y., Birkhauser Verlag, Basel, 1987, pp. 519–523.
 - 14) Ohsawa M., *Eisei Kagaku*, **36**, 255–266 (1990).
 - 15) Joshi B. G., Dwivedi C., Powell A., Holscher M., *J. Comp. Pathol.*, **91**, 11–15 (1981).
 - 16) Druet P., Pelletier L., Rossert J., Druet E., Hirsch F., Sapin C., “Autoimmunity and Toxicology,” eds. by Kummüller M. E., Bloksma N., Seinen W., Elsevier Sci. Pub., Amsterdam, 1989, pp. 347–361.
 - 17) Gleichmann E., Kimber I., Purchase I. F. H., *Arch. Toxicol.*, **63**, 257–273 (1989).
 - 18) Eneström S., Hultman P., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **106**, 180–203 (1995).
 - 19) Schuppe H. C., Ronnau A. C., Schmiedeberg S. V., Ruzicka T., Gleichimann E., Griem P., *Clin. Dermatol.*, **16**, 149–157 (1998).
 - 20) Ohsawa M., Sato K., Takahashi K., Ochi T., *Toxicol. Lett.*, **19**, 29–35 (1983).
 - 21) Ohsawa M., Masuko-Sato K., Takahashi K., Otsuka F., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **84**, 379–388 (1986).
 - 22) Otsuka F., Ohsawa M., *Chem.-Biol. Interact.*, **78**, 193–205 (1991).
 - 23) Ohsawa M., Takahashi K., Otuka F., *Clin. Exp. Immunol.*, **73**, 98–102 (1988).
 - 24) Bigazzi P. E., *Lupus*, **3**, 449–453 (1994).
 - 25) Castano P., *Path. Microbiol.*, **37**, 280–301 (1971).
 - 26) Bernard A., Lauwerys R., Gengoux P., Mahieu P., Foidart J. M., Druet P., Weening J. J., *Toxicology*, **31**, 307–313 (1984).
 - 27) Weiss R. A., Madaio M. P., Tomaszewski J. E., Kelly C. J., *J. Exp. Med.*, **180**, 2239–2250 (1994).
 - 28) Lauwerys R. R., Bernard A., Roels H., Buchet J. P., Vian C., *Environ. Health Perspect.*, **54**, 147–152 (1984).
 - 29) Ohsawa M., Otsuka F., Takahashi K., “Trace Elements in Clinical Medicine,” ed. by Tomita H., Springer Verlag, Tokyo, 1990, pp. 165–171.
 - 30) Ohsawa M., *Prog. Clin. Biol. Res.*, **380**, 283–298 (1993).
 - 31) Ohsawa M., *Cancer Causes Control*, **8**, 514–517 (1997).
 - 32) Ohsawa M., Proceedings in II International Symposium on Occupational and Environmental Allergy and Immune Diseases ’99, Chieti, Italy, April, 1999, p. 26.
 - 33) Souroujon M., White-Scharff M. E., Andre-Schwartz J., Gefter M., Schwartz R. S., *J. Immunol.*, **140**, 4173–4179 (1988).
 - 34) Arnett F. C., Fritzler M. J., Ahn C., Holian A., *J. Rheumatol.*, **27**, 405–410 (2000).
 - 35) Nielsen J. B., Hultman P., *Environ. Health Perspect.*, **110 Suppl. 5**, 877–881 (2002).
 - 36) Hirsch F., Couderc J., Sapin C., Fournie G., Druet P., *Eur. J. Immunol.*, **12**, 620–625 (1982).
 - 37) Moore K. W., O’Garra A., Malefyt R. D., Vieira P., Mossman T. R., *Ann. Rev. Immunol.*, **11**, 165–190 (1993).
 - 38) Romagnani S., *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **80**, 225–235 (1996).
 - 39) Shearer G. M., *Mech. Ageing Dev.*, **94**, 1–5 (1997).
 - 40) Ohsawa M., Proceedings of the 6th Annual Meeting of Japanese Soc. of Immunotoxicol., Sendai, Sept. 1999, pp. 5–6.
 - 41) Yoshino S., Murata Y., Ohsawa M., *J. Immunol.*, **161**, 6904–6908 (1998).
 - 42) Takahashi K., Ohno R., Tsurugai A., Igarashi Y., Otsuka F., Ohsawa M., Abstracts of papers, the 126th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Sendai, March 2006, No. 3, p. 178.
 - 43) Ohsawa M., Takahashi K., Proceedings of the 14th Annual Meeting of Japanese Soc. of Immunotoxicol., Kobe, Sept. 2007, p. 61.
 - 44) Ohsawa M., Abstracts of papers, the 129th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Yokohama, March 2008, No.1, p. 112.
 - 45) Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T.,

- Strom T. B., Oukka M., Wener H. L., Kuchroo V. K., *Nature*, **441**, 235–238 (2006).
- 46) Leffel E. K., Wolf C., Poklis A., White Jr. K. L., *Toxicology*, **188**, 233–250 (2003).
- 47) Pollard K. M., Pearson D. L., Hultman P., Hildebrandt B., Kono D. H., *Environ. Health Perspect.*, **107 Suppl. 5**, 729–735 (1999).
- 48) Lawrence D. A., Mudzinski S., Rusofsky U., Warner G., “Immunotoxicology,” eds. by Berlin A., Dean J., Draper M. H., Smith E. M. B., Spreafico F., Dordrecht, Martinus-Nijehoff, 1987, pp. 293–307.
- 49) Hudson C. A., Cao L., Kasten-Jolly L., Kirkwood J. N., Lawrence D. A., *J. Toxicol. Environ. Health*, **A23**, 895–918 (2003).
- 50) Bondanza A., Zimmermann V. S., Dell’Antonio G., Cin E. D., Balestrieri G., Tincani A., Amoura Z., Piette J. C., Sabbadini M. G., Rovere-Querini P., Manfredi A. A., *Arthritis Rheum.*, **50**, 1549–1560 (2004).
- 51) Bigazzi P. E., *Environ. Health Perspect.*, **107 Suppl. 5**, 753–765 (1999).
- 52) Jacobson D. L., Gange S. J., Rose N. R., Graham N. M., *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **84**, 223–243 (1997).
- 53) Mowat A. M., “Handbook of Mucosal Immunology,” eds. by Ogra P. I., Mestecky J., Lann M. E., Strober W., McGhee J. R., Bienesstock J., Academic Press, San Diego, 1994, pp. 185–210.
- 54) Kim J.-H., Ohsawa M., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 854–858 (1995).
- 55) Yoshino S., Ohsawa M., Sagai M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **287**, 679–683 (1998).
- 56) Takagi K., Teshima R., Okunuki H., Hachisuka A., Sawada J., Kojima K., Takahashi K., Ohsawa M., Yoshida T., *Allergol. Int.*, **54**, 581–587 (2005).
- 57) Takahashi K., Ohsawa M., Utsumi H., *J. Health Sci.*, **48**, 161–167 (2002).
- 58) Ohsawa M., Takahashi K., Tokunaga H., Abstract papers of the 10th International Congress of Toxicology, Tampere, Finland, June 2004, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **197**, 282 (2004).