

# 環境要因による免疫系に対する影響

— 免疫学的バイオマーカーを用いた環境リスク検出・評価の試み —

吉田 貴彦

旭川医科大学健康科学講座

## The effects of environmental factors on immune system

— Evaluation of the environmental risks by  
immunological biomarkers —

Takahiko Yoshida

Department of Health Science, Asahikawa Medical College

### I. 序論

#### 1. 背景

我が国における1970年代までの高度成長期には環境は高度の汚染状態にあり、多くの公害が顕在化していた。それらの汚染状況を把握するために、典型的環境汚染物質を対象として全国的な環境測定体制が敷かれた。こうした高度成長期に見られた高度環境汚染は、後追いの対策であったにせよ科学技術の発達による環境汚染低減技術の開発・普及に支えられた環境行政対策が功を奏して大幅に改善されるに至り、もはや過去の事例として記憶されて久しい。先進国にあっては古典的となった環境汚染は、現在、急激な開発の中にある発展途上国において顕著であり、地球的な環境汚染が危惧されるに至っている。一方、一見して環境汚

染から開放されたかのような我が国をはじめとした先進国においては、膨大な数の化学物質が次々と研究開発され、産業現場、日常生活に導入され、その一部が広く環境に放出・拡散することとなった。しかし、かつての典型的な環境汚染の反省からその汚染の度合いは比較的強く抑えられている。こうした中、1990年代に入って微量の環境汚染物質による野生生物への生態影響が問題となった。内分泌攪乱化学物質による問題はその典型例であり、ヒトに対しても何らかの健康障害が起こっている可能性が指摘されている。こうした近年の環境汚染は微量ではあるが多岐にわたる化学物質、特に石油系合成化学物質が関与する複合汚染が問題となっている。さらに、ダイオキシンなど廃棄物等の焼却などにもなって生ずる非意図的生成

《Key words》 immunological biomarker, environmental risk factor, immune system, immune disease, allergic disease

別刷請求宛先：吉田貴彦

〒078-8510 旭川市緑ヶ丘東2-1-1-1 旭川医科大学健康科学講座

Reprint Requests to Takahiko Yoshida, Department of Health Science, Asahikawa Medical College, 2-1-1-1 Midorigaoka Higashi, Asahikawa, Hokkaido 078-8510 Japan

化学物質による環境汚染の発生も認識されるようになり、未知の環境汚染化学物質が拡散する恐れも指摘されるようになった。

こうした状況に対応して、環境省は化学物質による環境汚染を把握するために重点的に測定すべき対象化学物質を漸次増やし全国的な測定体制を整備し測定事業を展開してきた（化学物質環境安全性総点検調査、指定化学物質等調査、非意図的生成化学物質汚染実態追跡調査、化学物質環境実態調査）。ところが科学技術の発達とともに環境中に放出される化学物質の数は膨大なものとなり、さらに生体への影響が指摘される化学物質も次第に多くなっている。しかし、環境中において測定できる化学物質の数には限度がある。また、未知の化学物質による環境汚染によって生体影響が惹起されている可能性もある。こうした状況を踏まえ、鋭敏な健康指標を用いて全国的な国民の健康度の把握を行い、健康指標の異常傾向が検出された地域に何らかの環境リスクが存在することを疑い、詳細な環境汚染状況調査を実施するといった環境へのアプローチ法が検討されている。

## 2. バイオマーカー

健康度の概念について統一された見解は無いが、疾病状態でない事を健康としてとらえることは可能であろうし、ある検査指標の値が特に疾病を持たない人々における検査値の分布の範囲にとどまることも健康度の高いことを示すことと成ろう。ここで、検査指標が当該地域に在住する者から得られる生体試料を用いて測定されるものであれば、その目的から環境リスクを検出・評価するためのバイオマーカーに相当する。バイオマーカーとは生体外から作用する因子によって惹起される健康障害について生体試料を用いて客観的に数値としてとらえる指標と定義されており、その値の変動の大きさによって、外部から健康が受けた不の影響の大きさを評価できるものである。さらには健康障害の顕在化以前に正常域を逸脱して変動する指標であって、目的とする健康障害の発生を予見しうる事、すなわち感度が良い事がバイオマーカーに求められる必須条件となる。一方、多岐にわたる環境汚染化学物質を環境リスクの対象として捉

えるので、指標の値の変動をもって特定の汚染物質を特定し得るような特異性は特には求められない。

さて、神経・免疫・内分泌軸は生体防御機構の中心となるとともに、生体の恒常性を保つ重要な位置を占める。健康度を客観的に計測・評価しうる確固たる指標が確立されていない現在、神経・免疫・内分泌軸に属する機能を指標として用いることは妥当と考えられる。ことに、それぞれの機能は互いに影響を及ぼしあっていることから、神経・免疫・内分泌軸のいずれかが影響を受けても、3つの機能の指標の変容として検出できると考えられ、環境リスクによる影響を広い範囲で捉える事が可能となる。この内、免疫機構は細胞性免疫と体液性免疫のバランスを保って機能しており、多くの因子群が関与するネットワークを形成する複雑系であるために、特に外来の影響を受けて変動しやすいと考えられるため、免疫機構は感度が良い生体指標となると考えられている。こうした免疫機構の特殊性を考慮すると免疫学的指標は環境リスクを検出・評価するための優れたバイオマーカーとなる可能性がある。

## 3. 免疫学的指標についての文献検索とレビュー

本稿では、免疫学的機序が関与する疾病発症の予見性の面から免疫学的検索法の有用性を論じた文献をレビューし、目標疾患に先行して変動が見出されるといふバイオマーカーの特性について免疫指標の検証を試みる。次いで、免疫学的機序が関与する疾病の発症に影響した環境要因を論じた文献または環境要因と免疫学的検索法との関連を検討した文献をレビューし、免疫指標について環境リスク検出・評価のための実践の面から検証を試みる。さらに筆者が係わってきた「生活環境汚染物質による小児（3歳児）での毒性評価のための免疫指標の開発に関する研究」（第13回日本臨床環境医学会にて発表）から得られた自験例を交えて論ずることとする。

米国国立図書館のPubMedにて、biomarker、immune response、asthma、などをキーワードとして1995年以降の文献を検索した。検索された論文と一部著者が関わった論文のうち、免疫学的機

序が関与する疾病発症の予見性の面から免疫学的検索法の有用性を論じた文献、免疫学的機序が関与する疾病の発症と環境要因との関連を論じた文献または免疫学的検索法と環境リスク要因との関連を検討した文献を収集しレビューを行った。ただし、アレルギー性疾患は即時型アレルギーと遅延型アレルギーに分類されるものの、疫学調査などで扱われているものは主に一般人にも認識されやすい喘息、鼻炎、結膜炎、アトピー性皮膚炎などの即時型アレルギーであるので即時型アレルギー全体を対象疾患としてレビューする。

## II. 疾病発症予見性からみた免疫指標

横断的研究によって、アレルギー性疾患の診断ないし症状の既往を過去に持つか現在有している者に対して免疫学的検索を行い何らかの有意な相関が見出された場合、それらの免疫学的検索法はアレルギー性疾患のバイオマーカーとして利用できる可能性がある。ただし、見出される免疫指標の変容とアレルギー性疾患などの症状の発現の前後関係が明確でない。すなわち、発症にともなって変動したにすぎない指標である可能性もある。そのため、症状発現の病態等を考慮に入れて判断を試みる。

アレルギー性疾患の診断ないしアレルギー症状の既往が無い者について予め免疫学的検索を行い、将来にわたってアレルギー性疾患の発症ないし症状の出現を調査するコホート研究が行われるならば、観察された免疫指標の変容と続発する症状・病態との前後関係が明確となり、当該免疫指標が免疫疾患の発症を予見可能とするバイオマーカーとなりうる事が強く示唆されることとなる。

### 1. 喘息の既往と相関を持つ、ないし喘息の発症を予見する免疫指標

Zeiger 等は、1歳時点までの卵白アレルギー感作が7歳時点までの喘息発症に有意な相関がある事を認め、皮膚穿刺試験による卵白アレルギー陽性が喘息の予見的バイオマーカーとなる事を示している。さらに、他のバイオマーカーとアレルギー性疾患についても検討しており次項において述べるが、喘息については臍帯血血清 IgE 抗体0.5

IU/ml 以上であっても予見的相関性が無いなど、バイオマーカーとなる免疫指標が比較的少ないとしている<sup>1)</sup>。

Duffy 等はオーストラリアにおいて、喘鳴疾患および気管支過敏の形成に寄与する危険因子を特定するために、成人の一卵性および二卵性双子に対する疫学調査を行った。免疫指標として血清 IgE 抗体、IgA 抗体を測定した。また、感作状態の把握のために皮膚穿刺試験(11アレルギー)をおこなった。さらに、気管過敏状態の把握のためにスパイロメトリーを施行し、吸入試験によりFEV1の20%低下および気管支拡張剤投与による低下回復が確認された場合に気道過敏状態と判定した。一卵性および二卵性双子のアレルギー疾患関連症状等についての一貫性の解析の結果から、オオアワガエリ、クサヨシなどの花粉抗原等の室外アレルギーによる感作は遺伝的要因の影響を受けやすい一方、ハウスダスト、ダニ、イヌ表皮、ゴキブリ抗原等の室内アレルギーによる感作は遺伝に左右されにくい事が示された。すなわちハウスダスト、ダニアレルギーへの感作の指標(特異的IgE陽性)はバイオマーカーとして優れており、都会における喘息患者の発症を予見しようとしている。同様、ネコ表皮アレルギーへの感作の指標もバイオマーカーとなり喘息発症を予見しようとしている。一方、草類花粉アレルギーなどの室外アレルギーへの感作は喘息発症のリスクとしては小さく、バイオマーカーとなりにくいとしている<sup>2)</sup>。

Lindfors および Melen 等は、スウェーデン、ストックホルム市の医療機関の小児アレルギー外来を受診した1歳から4歳の小児について、免疫学的検索を行いつつアレルギーへの感作と続発する喘息の重症度についてコホート研究を行った。免疫指標としてアレルギー特異的IgE抗体(ネコ表皮、イヌ表皮、樺、DPTワクチン、オオアワガエリ、ウサギ表皮)を測定し、アレルギーによる感作成立の有無を皮膚穿刺試験で確認した。環境リスク要因として室内飼育の犬、猫のペット由来アレルギーとタバコ煙への曝露状況および家屋内の結露状況が調査された。0歳から4歳、特



に0歳から2歳までの期間に猫飼育によるネコ表皮アレルギーへの曝露および両親の喫煙による環境タバコ煙曝露がネコ表皮アレルギー特異的IgE抗体の高値と皮膚テストでの陽性化をもたらし、重症の発症と更なる増悪をもたらすことが見出され、かつ2歳時点でネコ表皮アレルギー特異的IgE抗体高値の者ほどそれらのオッズ比が高かった。以上より、幼少期の吸入性アレルギー（ネコ表皮）特異的IgE抗体価が成長後の喘息の発症を予見し、さらに環境リスクにも影響を受けることからバイオマーカーとして有効であることが示された<sup>3,4)</sup>。

即時型アレルギーの代表的疾患である喘息を目的疾患として、バイオマーカーとしての免疫指標について検討した結果、血清総IgE抗体値、アレルギー特異的IgE抗体陽性が、有用かつ十分に確立されたものであることが確認された。

## 2. その他のアレルギー性疾患の発症を予見する免疫学的指標

喘息以外のアレルギー性疾患と免疫指標についての横断的研究をまとめる。

Zeiger等は免疫学的バイオマーカーとして出生時の臍帯血血清IgE抗体、1歳時点での鼻汁中好酸球ないし好塩基球の存在などを測定し、7歳時のアレルギー性疾患の発症状況についてコホート研究を行った。臍帯血血清IgE抗体が0.5IU/ml以上である事が7歳時点でのアレルギー性疾患の発症を予測するかが検討され、喘息、蕁麻疹については有意性が無かったものの、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎（鼻汁中好酸球、好塩基球陽性症例も含む）、皮膚穿刺試験で確認される食餌性アレルギー感作、吸入性アレルギー感作について有意な相関が認められた。また、1歳時点での鼻汁中好酸球ないし好塩基球の存在が7歳時点でのアレルギー性疾患の発症を予測するかについても検討されている。鼻汁中好酸球と喘息発症に相関が認められなかった以外、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹、アレルギー性鼻炎、いずれかのアレルギー性疾患のカテゴリーにつき卵白アレルギー感作、鼻汁中好酸球、好塩基球の存在の3指標とも有意な相関が認められた。その他、生後4

ヶ月時点の卵白アレルギー感作が7歳時の蕁麻疹と、1歳時点の牛乳アレルギー感作が7歳時の喘息と、1歳時点のピーナッツアレルギー感作が7歳時のアトピー性皮膚炎および喘息とそれぞれ有意に高いオッズ比を示した。以上から、臍帯血血清IgE抗体、1歳までの鼻汁中好酸球および好塩基球の存在などの指標がアレルギー性疾患の予見的バイオマーカーとして有用である事が示唆された<sup>1)</sup>。

Kuyucu等はトルコの学童（8-11歳）に対して横断的疫学調査を行い、International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) 第2相で推奨されている基本6アレルギーを用いた皮膚穿刺試験のいずれかに陽性を示した者が、いずれにも陰性であった者に比して末梢血血清総IgE抗体価がおよそ2倍の高値であることを示している。同時に検査時点での皮膚穿刺試験で判定された感作状態をもってアレルギー疾患を有すると判定して過去に存在した環境リスクとの相関を検討し、託児所への通所が感作を有意に高める一方、6ヶ月以上の母乳哺育、妊娠中の母体の喫煙はアレルギー感作に対し抑制的に作用する事を見出している。アトピー素因を持つ母親から出生した児に限った解析では、託児所への通所、生後半年以内の母親の喫煙がそれぞれ独立にアレルギー感作のリスクを増大させるなど、異なる結果が示されている。間接的ではあるが、総IgE抗体価が環境リスク評価のためのバイオマーカーとして有用である事が示された<sup>5)</sup>。

Kaan等は、臍帯血を出生時に採取し血清IgE抗体およびニコチンの代謝産物であるコチニンを測定した。新生児の17.8%に0.5IU/ml以上のIgE抗体が検出された。非白色人種、冬季の出生、母親の喘息既往のある児においてIgEが有意に高値であったが、コチニンとの相関は無かった。コホート調査もなされており、出生時の臍帯血総IgE抗体価が高値であった者の生後12ヶ月時における食餌性蕁麻疹のオッズ比の上昇が認められたが、他のアレルギー性疾患との関連は見出されなかった。臍帯血総IgE抗体価の食餌性蕁麻疹の発症予測性が示されたが、妊娠中母体の喫煙など

の環境リスク検出性は見出されなかった<sup>6)</sup>。

Schafer 等は、ドイツの旧東ドイツおよび旧西ドイツの都市部を大気汚染地域、旧西ドイツ地域の田園地方を対照地域とし、在住する5-7歳の小児においてアトピー性湿疹の症状と血清中 IgE 抗体価の相関を検討した。アトピー性湿疹の症状の強さは血清中 IgE 抗体価と相関した。さらに遺伝素因が血清中 IgE 抗体価の値に対して最も大きな影響要因となるものの、大気汚染が環境リスクとして非特異的刺激や免疫変容の作用を介して IgE 産生を増加させ、結果としてアトピー性皮膚炎の症状を強めることを報告している。硫黄酸化物による大気汚染の優位な東側ドイツ工業地帯において光化学オキシダント汚染の優位な西側ドイツ都市よりもアトピー性皮膚炎の発症率が高かった。さらに、ガスレンジフードの無い室内でのガス使用により発生する窒素酸化物、交通量の多い道路に近接した居住、ペットの飼育がアトピー性皮膚炎と相関する事、また、母親の妊娠・授乳中の喫煙によりアトピー性皮膚炎の発症が増加する事を報告した。血清中 IgE 抗体はアトピー性皮膚炎の発症を予見し、間接的証明ではあるが環境リスクの影響も受けるので、有効なバイオ・マーカーとなることが確認された<sup>7)</sup>。

Devereux 等は臍帯血から分離した単核球を *in vitro* 培養系においてマイトジェンや各種アレルゲンの刺激下に培養し細胞増殖活性を測定し胎児の免疫応答を検討した。臍帯血中の単核球が、経胎盤的に曝露された外来抗原のうち、オオアワガエリ (timothy) 花粉抽出物、ハウスダスト・ダニ抽出物に、それぞれ76%、27%が感作されている事が確認された。特定のアレルギー性疾患の予見を目的としたコホート研究は行われなかったものの、アトピー性疾患の兄弟を持つ事、出生順位の早い事、母体の喫煙中の喫煙、母体が妊娠中に抗酸化作用物質 (ビタミンEなど) の摂取欠乏などの素因や胎児期に受けた要因が胎児期の外来抗原感作の成立を有意に高める事が確認されている<sup>8)</sup>。これらの結果は妊娠中に受けた環境要因が生後のアレルギー性疾患発症に関連するとして報告と一致することから、免疫指標として用いた臍

帯血単核球の細胞増殖活性がバイオマーカーとして有用である事が間接的に判断できる。

以上より、臍帯血を含む末梢血血清総 IgE 抗体価、アレルゲン特異的 IgE 抗体の存在、鼻汁中の好酸球ないし好塩基球の存在、臍帯血単核球の増殖活性などが、アレルギー性疾患にかかわるバイオマーカーとして用いる事が可能と考えられる。

### 3. 環境リスクと相関が見られた免疫指標

毒性学的な観点から、各種の化学物質を曝露した実験動物ないし被験者に免疫学的検索を行い、その変動をもって生体影響を評価する研究手法がある。免疫機構を標的臓器として考えることから免疫毒性学と呼ばれ、1980年代に普及し始めた概念である<sup>9~14)</sup>。疫学調査にも応用され、疾病とのつながりが論じられない場合もあるものの、免疫応答の変容を検出することをもって当該集団における環境リスクの存在とその影響の大きさを評価できる。このような研究に用いられる免疫指標はバイオマーカーに位置づけて考える事ができる。以下に、それらの研究をレビューする。

#### 1) 産業現場での応用

著者の Yoshida 等は、半導体製造作業において砒素に曝露する作業者の末梢血リンパ球増殖活性が対照群に対して亢進する事を見出した。培養実験系および動物実験の結果から総合的に判断して、作業者の健康管理に応用できるバイオマーカーとして末梢血リンパ球増殖活性を位置付けている<sup>15)</sup>。

Governa 等は、職域にて n-ヘキサンまたはスチレンに曝露しながらも臨床診察かつ生化学的一般検査に何らの所見も見られない労働者から得た末梢血単核球遊走能が正常対照者に比して有意に低下することを報告している。さらに、それらの労働者を3週間曝露の無い状況に置いたところ遊走能の低下が回復することも確認している。また、比較的低濃度の鉛曝露によっても同様の遊走能低下が観察されている。従って、末梢血単核球遊走能は職業上に低濃度で曝露する化学物質の良いバイオマーカーとなる可能性が示唆される<sup>16)</sup>。

Tuschl 等は、オーストラリアの溶接金属ヒュー

ムに曝露する作業員において Phytohemagglutinin (PHA) 刺激による末梢血 T 細胞幼若化応答の減弱およびリンホカイン刺激細胞傷害 (LAK) 活性の抑制が見られる事を報告している。うち LAK 活性の抑制は有意差があった。一方、リンパ球混合試験、リンパ球分画、顆粒球と単核球のオプソニン化大腸菌食作用における活性酸素産生能、白血球食作用、血清免疫グロブリン産生には何らの変化も無かったとしている<sup>17)</sup>。見出される免疫応答の変容と実際に作業員が訴える症状との関連を説明付ける事は簡単な事ではないものの、特定の因子に曝露する集団において変動が観察される免疫指標はバイオマーカーとなる可能性があると言えよう。

Stiller-Winkler 等は農業に従事して農薬に曝露する群と対照群の血清を比較し曝露群において soluble tumor necrosis factor receptor II (sTNF RII) の有意な上昇と IgM 抗体価の低下を観察し、その影響の程度は曝露期間と相関することを示し、これらの免疫指標が良いバイオマーカーとなると報告している<sup>18)</sup>。

Bogadi-Szare 等は靴製造業に従事しベンゼンおよびトルエンに曝露する女性労働者において、曝露と免疫指標との関連について検討した。曝露濃度との間に量的相関は無いものの、許容濃度に相当する 15ppm 以下 (1.9 から 14.8ppm) のベンゼンに曝露する群において有意な末梢血 B リンパ球数の低下が見出された。量影響関係が見られなかったのは、低いレベルでのベンゼン曝露であったためと考察されている。血清 IgG、IgM、IgE、IgA 抗体の各濃度および末梢血リンパ球の T、B 細胞比率についても曝露との相関が検討されており、靴製造作業員において B 細胞比率のみ対照群に比して有意に低値であった。また、ベンゼン気中濃度と血清 IgG 濃度とに量影響関係が認められた。一方、トルエン気中濃度は 11.4 から 49.9 ppm であったが、いずれの免疫指標との間にも有意な差を認めなかった。交絡因子として年齢、喫煙、飲酒の影響を検討したが免疫指標に与える影響は認められなかった<sup>19)</sup>。末梢血 B 細胞数および血清 IgG 濃度は低濃度ベンゼンの生体影響を

反映するバイオマーカーとして有用であると考えられる。

Biró 等はベンゼン、トルエン、多環芳香族炭化水素曝露と免疫指標との関連を報告している。喫煙や加齢が CD4 リンパ球を増加させるなど多くのリンパ球分画を増減させる事が判明したので、それら交絡要因を調整したうえで各溶剤曝露の影響について検討した。各有機溶剤は、末梢血リンパ球を活性化して局所の免疫制御を担う代表的リンパ球である CD25<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>T 細胞数を変化させる (スチレンで減少、ベンゼン、多環芳香族炭化水素で増加) など、有機溶剤曝露が種々の末梢血リンパ球分画に多様な変化をもたらす事が示された<sup>20)</sup>。以上より、末梢血リンパ球分画解析は環境リスクを検出・評価するためのバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

## 2) 一般環境での応用

Hadnagy 等は、大気汚染に曝露した成人において血清中の免疫指標を横断的に検索した。炭鉱産業ないしコークス製造所による大気汚染地域住民において対照地域住民に比して、血清補体 C3c 成分とともに血清 IgA および血清 IgM 抗体が異常高値を示す例が有意に多かった。気中浮遊粒子状物質への慢性曝露が免疫機構の活性化とともに気道の慢性刺激として作用し慢性気道疾患のリスク増大を引き起こしたものと推測されている<sup>21)</sup>。

Riedler 等はオーストリア、ドイツ、スイスの農家の 6 - 13 歳の子供について、喘息、枯草熱、アトピー性皮膚炎についての質問票調査とアレルゲン感作状況の把握のため末梢血血清を用いてアレルゲン特異的 IgE 抗体を測定し、相関を求めた。農家の子供は対照群の子供に比して、1 歳までに家畜小屋を訪れる割合が高く、かつ過ごす時間が長い者が多く、生牛乳の摂取の機会がある者が多かった。母体について、妊娠中に生牛乳の摂取する者が多く、また家畜小屋で作業をする者が多かった。農家の子供の喘息および枯草熱の既往、鼻汁や眼の痒み、特異的 IgE が陽性である率は対照群の子供に比べて優位に低かった。こうした農家に特異的なアレルゲンへの曝露レベルが高いほどその傾向が強かった。さらに彼等は、農家で



育った以外の子供でも家畜に接する機会が多い場合にはアレルギー性疾患への罹患や特異的 IgE 陽性となる率が少ないと報告しているが、農家の子供での結果はその裏付けとなると考察している<sup>22)</sup>。Platts-Mills 等も家屋内でのペット等の飼育が、動物由来のアレルゲンに曝露することによって Th2 優位な免疫バランスのもとに特異的 IgG および IgG4 抗体が産生され、結果として喘息の発症が抑制されると報告している<sup>23)</sup>。

アレルゲン特異的 IgE 抗体の存在は各種アレルゲンの存在する環境を反映するのでバイオマーカーと成り得ると言えよう。農家の環境で育った子供に見られる免疫学的変容の説明として、Lauener 等は、スイスの農家の小児について末梢血を採取し、CD14、Toll-like receptor2 (TLR2)、Toll-like receptor4 (TLR4) の mRNA 発現量を測定し、アレルギーおよび喘息に関するアンケート調査との結果を比較検討し、CD14 と TLR2 の mRNA 高発現が農家の環境における細菌やリポポリサッカライド (LPS) などの細菌成分への曝露機会の多さと有意に関連することを報告している<sup>24)</sup>。末梢血 CD14、TLR2 mRNA 発現量は特定の免疫疾患の予測につながるものではないが、小児の環境細菌曝露のバイオマーカーとなると考えられる。

Bilrha 等は、カナダ内陸部のセントローレンス川流域の漁民家族(淡水魚を食用する機会が多い)から出産時に臍帯血を得て、環境汚染物質である有機塩素化合物(PCB、DDE、HCB など)やメチル水銀を測定するとともに、単核球(リンパ球)分画の表面マーカー解析、in vitro リンパ球培養上清中のサイトカイン(IL-10、TNF- $\alpha$ )を測定した。PHA の in vitro 刺激にて産生されたサイトカイン量は有機塩素化合物曝露量と負の相関があり、特に TNF- $\alpha$  は約 2 分の 1 と有意に低値であった。一方、メチル水銀はサイトカイン産生量と相関がなかった。リンパ球の分画は環境汚染物質と相関しなかった<sup>25)</sup>。臍帯血リンパ球のマイトゲン刺激による TNF- $\alpha$  産生が、母体を介した経胎盤的な有機塩素系化学物質曝露によって起こるとされる胎児の免疫毒性の発現を予見する

バイオマーカーと成り得ることが示された。

環境リスクと相関が認められた免疫指標はバイオマーカーとしての性格を持つと理解して差支えなかろう。血清 IgG、IgM、IgE、IgA などの免疫グロブリン、アレルゲン特異的 IgE 抗体、血清補体、末梢血単核球のリンパ球分画、遊走能、T 細胞増殖活性(幼若化応答)、LAK 活性、サイトカイン産生、CD14 および TLR2 の mRNA 発現など、多くの指標がバイオマーカーとして用いることが可能であろう。

### Ⅲ. 自験例に基づく検討

#### 1. 研究の背景

著者の研究グループは、2001年度から2003年度の厚生労働科学研究費補助金「生活環境汚染物質による小児での毒性評価のための免疫指標の開発に関する研究」を受けて、環境リスクを検出・評価できる生体影響指標(バイオマーカー)を確立する一環として、小児を取り巻く生活環境中の環境リスクを検出・評価することの可能なバイオマーカーとして免疫学的検索法(免疫指標)を検証する研究を行った<sup>26~29)</sup>。

#### 2. 検討に用いた対象者

関東地方の3市、北海道の1市において、3歳児健康診断時に文章にて親権者のインフォームドコンセントを得た小児を対象に、採血による免疫指標の測定と質問票等による生活環境調査を行った。2001年度から2003年度の厚生労働科学研究に加え、先行して実施した2000年度厚生省委託事業<sup>30)</sup>による、2000年から2003年までの4年間の調査対象者全て、681名をまとめて解析に供した。

#### 3. バイオマーカーとして検討した項目の選定

本研究の目的は、環境リスクの検出・評価に用い得る免疫学的バイオマーカーであって、かつ、一般健常者集団においてスクリーニング的検査が可能なもの確立であった。そのため、低侵襲性でありかつ多くの検体数を処理する事が求められ、検体採取から測定までの保全性に優れ、前処理から測定までの手順が簡易でなければならぬ等の制約があった事から、限られた検索法とせざるを得なかった。そこで先行して行った動物実験<sup>31,32)</sup>

から、制約の中で実施可能であり感度の優れた項目を選定しヒトのフィールドに適応することとし、末梢血を検体とし、かつ培養を要せず簡易に測定可能である項目を採用した。

肘静脈より得た末梢血を検体とし、採血後12時間以内に血清分離し凍結保存し一括して、総 IgE 抗体、抗麻疹 IgG 抗体、抗風疹 IgG 抗体、アレルギー特異的 IgE 抗体（食餌性アレルギーとして卵白、小麦、大豆、牛乳、室内吸入性アレルギーとしてハウスダスト 1、コナヒョウヒダニ、ネコ表皮）の測定に供した。末梢血の一部は、ISOGEN LS ないし PAXgene Blood 試薬（QIAGEN）を添加し凍結保存し、mRNA を抽出し RT-PCR 法にて mRNA 発現量の測定に供した。以上の免疫指標についてバイオマーカーとしての是非を検討した。

#### 4. 喘息などアレルギー疾患と免疫指標との相関

本研究は横断的研究であるので、予見的なバイオマーカーについて検討する事は出来ないので、調査時点での問診票から得たアレルギー関連症状および疾患と免疫指標との相関について検討した。その結果、医師によるアレルギー関連疾患の診断やアレルギーに関連する自覚症は、総 IgE 抗体価、いずれかのアレルギー特異的 IgE 抗体陽性（室内吸入アレルギー、食餌性アレルギー、全てのアレルギー）、IL-4 mRNA 発現量、IFN- $\gamma$ /IL-4 mRNA 発現比率、抗風疹 IgG 抗体価などと相関があり、これらアレルギー関連免疫指標がアレルギー疾患および同関連症状の指標となることが再確認された。

#### 5. 環境要因と免疫指標との相関

本研究で採用した免疫バイオマーカーが環境リスクの検出・評価に対しての有用性について検討した概略を示す。居住地としての地域別の検討では、北海道 A 市で関東圏の H、Y、T 市に比して総 IgE 抗体価が有意に低く、IFN- $\gamma$ /IL-4 mRNA 発現比は A、T 市で他市に比べて有意に低く Y 市で最も高かった。食餌性アレルギー特異的 IgE 抗体陽性者の率は A 市で低く、T 市で高いなどの地域的な差があった。こうした地域毎の免疫指標の相違に、気候、自然植生に起因する環境アレルギー、地域の気候・特性に起因する家屋特性が影

響する部分が大いといと推測された。同時に行った生活・環境についての調査票によって、北海道 A 市で関東地区に比して、木造家屋、一戸建て、床が板材、ペット飼育、ベッド使用の率が高く、無排気型燃焼暖房器具の使用、築後 3 年以内新築家屋居住が少ないなどの傾向があった。また、A 市で同居喫煙者が多く、幹線道路への近接居住が多い、血中金属では鉄、鉛が高く、アルミニウムが低いなどの環境面の差も見られた。こうした環境要因が免疫指標に影響する可能性が考えられる。

4 年間の調査対象者全てを対象とした解析では、幹線道路への近接居住者においてアレルギー自覚症状を有する率が高く、コンクリート造居住者が木造居住者に比してアレルギー特異的 IgE 陽性者の率が高く、IFN- $\gamma$  および IL-4 の mRNA、特に前者の発現量の高値、ペット飼育者でサイトカイン類の mRNA 発現の低値、居間の室内塵発生のある者で IL-4 が高値などの免疫指標と環境要因の関連性が観察された。また、同居喫煙者が居る者で総 IgE 抗体価が低値、アレルギー特異的 IgE 陽性者の割合も低くかった。免疫指標と環境要因にいくつか関連傾向があったが一貫した傾向が無く、かつ常識的説明と符合しない組合せもあった。こうした結果は、地域毎の環境要因の相違により相関性が攪乱された結果と考えられた。そこで、調査地域毎に環境要因と免疫指標の相関を解析したところ、異なる項目の組み合わせに関連性が見出された。複数地域にいずれかの免疫指標と有意に関連が検出された環境要因は、ペット飼育歴、寝室の室内塵発生などであった。また免疫指標側から見て、環境要因と相関が多く見つかった項目は、総 IgE 抗体、IFN- $\gamma$ 、IL-4 の mRNA 発現量であった。さらに、免疫指標との関連は、性別、両親のアレルギー素因の有無にも見られるため、多くの交絡因子の補正を行った上で慎重に解釈する必要があると考えられる。総合的に判断すると、室内アレルギーへの曝露を増加させる要因と免疫機能、特に体液性免疫への偏りを示す免疫指標に有意な相関があるようである。他の免疫指標も、頻度は劣るものの環境要因と相関性を示す場合があることから、免疫指標バッテリーを組み



我々の住む環境中に潜む未知の環境リスクを幅広く検出する工夫がなされれば有用が高いと考えられる。

調査の過程で、気候や自然といった大きな環境要因から、家屋内の生活様式と言った小さな環境要因までもが免疫系に影響することが再確認された。集団において観察された免疫指標の変容と環境要因の関連から、個々のアレルギーなどの発症の予測や原因環境因子を特定する事は難しいが、集団において免疫バイオマーカーが変動を示した場合には、当該地域に何らかの環境リスクが存在することが推定され、必要な対策を策定するなどの対応が可能となるものと思われる。

#### IV. 考察

世界的に先進国において、アトピー性疾患すなわち喘息、湿疹、鼻炎が増えており、特に小児においてその傾向が顕著である。英国において1964年と1994年に、学校児童の喘息有症率が4.1%から19.6%に増加したとの報告がある。わずか30年間に於ける急激な増加に關与する要因は、遺伝学的要因の変化とは到底考えられず環境要因ないしライフスタイル要因の変化が大きいと考えられている<sup>33)</sup>。そのため、世界各国でアレルギー性疾患の増加を来した要因、特に環境要因について多くの研究が行われている。喘鳴疾患は先進国に罹患率が高く、発展途上国の田園地帯では低いとされ、都市における大気汚染などの環境汚染物質の存在が注目されている。アレルギー性枯草熱の発症には遺伝傾向があり、さらに社会経済的背景、高レベルのアレルゲンと自動車排ガス曝露といった環境要因が関連すると報告されている。さらに喘息の発症率について地理的な要因が大きく関与し都会で高いとの報告がある<sup>34)</sup>。

今回レビューしたように環境リスクが免疫疾患に影響するとした疫学研究報告は比較的多い。一方、免疫学の発展に伴い、多くの免疫学的検索法が研究され、免疫疾患について多くの検査所見が蓄積されている。免疫疾患、特にアレルギー性疾患の発症に前もって変動する免疫学的検査法についての研究報告では、免疫指標がバイオマーカー

として有すべき疾病予見性の側面について評価することが出来る。また、環境リスクについての免疫学的研究報告では、環境リスクと免疫指標との関連性が論じられておりバイオマーカーが有すべきもう一つの側面を確認することができる。免疫指標についてバイオマーカーとしての2つの性格を併せ持つとして抽出できた項目は以下の通りである。

血清総 IgE 抗体価、アレルゲン特異的 IgE 抗体の存在、免疫バランスの制御にかかわるサイトカインである IL-4 および IFN- $\gamma$  (mRNA で評価される場合が多い)、およびその両者 mRNA 発現比率、鼻汁中の好酸球ないし好塩基球の存在、臍帯血単核球 (リンパ球) の増殖活性などが、特にアレルギー性疾患にかかわるバイオマーカーとして用いる事が出来る。さらに、末梢血単核球遊走能、血清 IgG、IgM、IgA などの免疫グロブリン、血清補体、末梢血 T 細胞増殖活性、リンホカイン刺激細胞傷害 (LAK) 活性、末梢血リンパ球分画、末梢血単核球サイトカイン産生、末梢血単核球 CD14 および TLR2 mRNA 発現などもバイオマーカーとして用いる事が出来よう。その他、ワクチンの接種後の抗原特異的抗体は人工的に惹起した抗原への曝露であって、バイオマーカーとして利用することが可能であろう。筆者等が行った3歳児での調査では、ほぼ同時期に8割程が接種される風疹ワクチン、9割ほどが接種される麻疹ワクチンによって産生される抗風疹 IgG 抗体価、抗麻疹 IgG 抗体価は、バイオマーカーとして用いることが出来ると考えられる。

レビューした研究報告においても、筆者等が行った3歳児での調査においても、免疫指標が調査の対象である環境リスクはもとより多くの要因に影響を受けることが明らかとなっている。すなわち、住居環境、季節要因、生活様式、食餌様式、社会要因、性差・出生順位、遺伝的要因など多岐に渡る。例えば、喘鳴疾患について考えるならば、呼吸器感染症の既往、食餌性因子、その他の多くの因子がかかわると言われている。特に小児での喘息の増加は、生後早期でのアレルゲンへの感作成立が原因と見られている一方、環境衛生の極度の

向上による呼吸器感染症への罹患の顕著な減少が関与するとの報告もある。環境要因に加え多くの生活様式の変化が複合してアレルギー性疾患の増加が起きていると考えられる。免疫指標がこうした多くの要因に影響を受けることは、免疫指標の感度の良さとも受け取れるが、免疫指標を用いる調査によって当該地域の環境リスクを検出・評価しようとする際に、目的とする影響が見出しにくいことともなるので、データの解釈には十分に注意する必要がある。

遺伝的素因はアレルギー疾患の発症に関与する最も大きな単独要因の一つであるが、遺伝子は先天的に決定していることであり環境リスクの存在を反映しないため、環境リスクを検出・評価するためのバイオマーカーと成り得ない。ただし、特定の遺伝的素因を持つ者において、高頻度でアレルギー疾患を発症することも事実であるため、環境リスクを感度良く検出するために、アトピー素因などの当該遺伝的素因を持つ者を調査の対象とすることは一考に値しよう。著者等の3歳児での調査により、性差（男性）、同一母胎からの出生の順位（第1出生児）などでアレルギー疾患などの発症の頻度が高いことも見出されている。

免疫機構は神経系、内分泌系とともに、神経-内分泌-免疫軸を形成しており、生体の恒常性維持にとって重要な位置を占めている。また、生物群にとって種の保存の観点からも重要である。環境要因によって免疫系の変容が起こることは好ましいことではなく、今後、環境リスクの検出・評価を目的として免疫学的バイオマーカーを用いた疫学調査が全国的に展開され、免疫応答の変容が見出される地域での原因の特定と有効な対策の実施が望まれる。

## 文献

- 1) Zeiger RS, Heller S: The development and prediction of atopy in high-risk children: Follow-up at age seven years in a prospective randomized study of combined maternal and infant food allergen avoidance. *J Allergy Clin Immunol* 95: 1179-1190, 1995
- 2) Duffy DL, Mitchell CA, et al: Genetic and environmental risk factors for asthma. A cotwin-control study. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 840-845, 1998
- 3) Lindfors A, van Hage-Hamsten M, et al: Influence of interaction of environmental risk factors and sensitization in young asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol* 104: 755-762, 1999
- 4) Melén E, Wickman M, et al: Influence of early and current environmental exposure factors on sensitization and outcome of asthma in pre-school children. *Allergy* 56: 646-652, 2001
- 5) Kuyucu S, Saraçlar Y, et al: Determinants of atopic sensitization in Turkish school children: Effects of pre- and post-natal events and maternal atopy. *Pediatr Allergy Immunol* 15: 62-71, 2004
- 6) Kaan A, Dimich-Ward H, et al: Cord blood IgE: its determinants and prediction of development of asthma and other allergic disorders at 12 months. *Ann Allergy Asthma Immunol* 84: 37-42, 2000
- 7) Schafer T, Vieluf D, et al: Atopic eczema and other manifestations of atopy: results of a study in East and West Germany. *Allergy* 51: 532-539, 1996
- 8) Devereux G, Barker RN, et al: Antenatal determinants of neonatal immune response to allergens. *Clin Exp All* 32: 43-50, 2002
- 9) Dean JH, Vos JG: Methods and concepts in immunotoxicology. Descotes J (eds): *Immunotoxicology of Drugs and Chemicals*. Elsevier, Amsterdam, 1986, pp3-18
- 10) Burleson GR, et al: Immunotoxicology. Burleson GR, Dean JH, Munson AE (eds): *Methods in Immunotoxicology*. Wiley-Liss Inc, New York, 1995, pp3-68
- 11) Bick PH: Immune system as a target organ for toxicity. *Environ Health Perspect* 43: 3-

- 7, 1982
- 12) 大沢基保：化学物質の免疫毒性. トキシコロジーフォーラム 8：684-692, 1985
  - 13) 大沢基保：免疫毒性と金属. 医学のあゆみ 136：89-93, 1986
  - 14) 吉田貴彦：免疫毒性とは一産業保健の立場から一. 日本化粧品科学会誌 13：30-37, 1989
  - 15) Yoshida T, Shimamura T, et al: The enhancement of the proliferative response of peripheral blood lymphocytes of workers in semiconductor plant. *Industrial Health* 25: 29-33, 1987
  - 16) Governa M, Valentino M, et al: Chemotactic activity of human polymorphonuclear leukocytes and industrial xenobiotics: a brief review. *Toxicology* 91: 165-177, 1994
  - 17) Tuschl H, Weber E, et al: Investigations on immune parameters in welders. *J Appl Toxicol* 17: 377-383, 1997
  - 18) Stiller-Winkler R, Hadnagy W, et al: Immunological parameters in human exposure to pesticides in the agricultural environment. *Toxicol Lett* 107: 219-224, 1999
  - 19) Bogadi-Šare A, Zavalić M, et al: Study of some immunological parameters in workers occupationally exposed to benzene. *Int Arch Occup Environ Health* 73: 397-400, 2000
  - 20) Biró A, Pállinger É, et al: Lymphocyte phenotype analysis and chromosome aberration frequency of workers occupationally exposed to styrene, benzene, polycyclic aromatic hydrocarbons or mixed solvents. *Immunol Lett* 81: 133-140, 2002
  - 21) Hadnagy W, Stiller-Winkler, et al: Immunological alternations in sera of persons living in areas with different air pollution. *Toxicol Lett* 88: 147-153, 1996
  - 22) Riedler J, Braun-Fahlander C, et al: *Lancet* 358: 1129-1133, 2001
  - 23) Platts-Mills T, Vaughan J, et al: Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population-based cross-sectional study. *Lancet* 357: 752-756, 2001
  - 24) Lauener R, Birchler T, et al: Expression of CD14 and toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' children. *Lancet* 360: 465-466, 2002
  - 25) Bilrha H, Roy R, et al: In vitro activation of cord mononuclear cells and cytokine production in a remote coastal population exposed to organochlorines and methyl mercury. *Environ Health Perspec* 111: 1952-1957, 2003
  - 26) 吉田貴彦、他：厚生労働科学研究費補助金・生活安全総合研究事業 平成13年度総括報告書「生活環境汚染物質による小児での毒性評価のための免疫指標の開発に関する研究」、2002
  - 27) 吉田貴彦、他：厚生労働科学研究費補助金・化学物質安全総合研究事業 平成14年度総括報告書「生活環境汚染物質による小児での毒性評価のための免疫指標の開発に関する研究」、2003
  - 28) 吉田貴彦、他：厚生労働科学研究費補助金・化学物質リスク研究事業 平成15年度総括報告書「生活環境汚染物質による小児での毒性評価のための免疫指標の開発に関する研究」、2004
  - 29) 吉田貴彦、他：厚生労働科学研究費補助金・化学物質リスク研究事業 平成13-15年度総合報告書「生活環境汚染物質による小児での毒性評価のための免疫指標の開発に関する研究」、2002-2004
  - 30) 大沢基保、他：環境基本計画推進調査事業 平成12年度委託事業結果報告書「環境リスク対策における予見的アプローチに関する調査研究（免疫影響）」、2001
  - 31) 大沢基保、他：環境基本計画推進調査事業 平成10年度委託事業結果報告書「環境リスク対策における予見的アプローチに関する調査



- 研究 (免疫影響)」、1999
- 32) 大沢基保、他：環境基本計画推進調査事業  
平成11年度委託事業結果報告書「環境リスク  
対策における予見的アプローチに関する調査  
研究 (免疫影響)」、2000
- 33) Woolcock AJ, Peat LK: Evidence for the in-  
crease in asthma worldwide. 1997 The ris-  
ing trends in asthma. Wiley, Chichester  
(Ciba Foundation Symposium 206) pp122-  
139, 1997
- 34) Schäfer T, Ring J: Epidemiology of allergic  
diseases. Allergy 52: 14-22, 1997