

- Bowel Dis. 10: 182-192.
11. Nonaka, S., Naito, T., Chen, H., Yamamoto, M., Moro, K., Kiyono, H., Hamada, H. and Ishikawa, H. 2005. Intestinal $\gamma\delta$ T cells develop in mice lacking thymus, all lymph nodes, peyer's patches, and isolated lymphoid follicles. *J. Immunol.* 174 (in press)
 12. Kobayashi, R., Kohda, T., Kataoka, K., Ihara, H., Kozaki, S., Pascual, D.W., Staats, F., Kiyono, H., McGhee, J.R. and Fujihashi, K. 2005. A novel botulinum neurotoxin vaccine prevents mucosal botulism. *J. Immunol.* (in press)
 13. Kweon, M-N., Yamamoto, M., Rennert, P.D., Park, E-J., Lee, A-Y., Chang, S-Y., Hiroi, T., Nanno, M. and Kiyono, H. 2005. Prenatal blockage of LT β R and TNFR55 signaling cascade resulates in the acceleration of tissue genesis for isolated lymphoid follicles in the large intestine. *J. Immunol.* (in press)
 14. Kai, Y., Takahashi, I., Ishikawa, H., Hiroi, T., Mizushima, T., Matsuda, C., Kishi, D., Hamada, H., Tamagawa, H., Ito, T., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Matsuda, H. and Kiyono, H. 2005. Colitis in mice lacking the common cytokine receptor γ chain is mediated by IL-6-producing CD4⁺T cells. *Gastroenterology* (in press)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

地域集団でのコホート研究による便中細菌診断妥当性の研究
—Th2 型免疫反応の生理的あるいは病理的意義の解明—

分担研究者 出原賢治
佐賀大学医学部分子生命科学講座教授

研究協力者 有馬和彦, 金地佐千子, 増本清成, 金地泰典 (佐賀大学医学部分子生命科学講座助手)
高井敏朗 (順天堂大学医学部アトピー疾患研究センター助手)

研究要旨 アレルギー反応の発症において Th2 型免疫反応が重要な役割を果たしている。このため、Th2 型免疫反応の生理的あるいは病理的意義の解明は、アレルギー疾患の本質を明らかにし、アレルギー疾患に対する予防と治療の対策を講じることにつながると思われる。我々は以前、気道上皮細胞における IL-4 あるいは IL-13 による誘導遺伝子の内に扁平上皮細胞癌抗原 (SCCA) 1 と SCCA2 という二つのプロテアーゼ阻害分子が存在することを明らかにした。本研究の目的は、この SCCA 分子の生体内での生理的あるいは病理的役割の解明により、Th2 型免疫反応の生理的あるいは病理的意義を明らかにすることである。今年度は SCCA 分子のマウスオルソログの解析を行った。SCCA 分子のマウスオルソログである Serpnb3a、b3b、b3c、b3d 遺伝子はマウス第 1 染色体上でクラスターを形成していた。Serpnb3a はカテプシン L、Der p 1、カテプシン G、マスト細胞キマーゼ全ての酵素活性を阻害したが、Serpnb3b はカテプシン L とカテプシン G の活性のみを阻害し、異なる阻害パターンを示した。また、Serpnb3a はほぼ全ての組織に発現していたが、Serpnb3b はケラチノサイトに限局して発現しており異なる発現プロファイルを示した。今後、これらの SCCA 関連分子の生理的あるいは病理的意義を明らかにして、Th2 型免疫反応の生体内での役割を解明したいと考えている。

A. 目的

気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎を始めとするアレルギー反応の発症においては Th2 型サイトカインの産生を伴う Th2 型免疫反応が重要な役割を果たしていることが知られている。近年のアレルギー疾患増加を説明する有力な説として衛生仮説があるが、これでは細菌感染の減少、抗生物質の頻回使用、食生活の変化といった近代的生活環境が Th2 型免疫反応の増強を引き起こしていると提唱されている。このため、Th2 型免疫反応の生理的あるいは病理的意義を明らかにすることにより、本来生体に備わっている防御機構とそれが攪乱されたことによって生じているアレルギー疾患の本質を明らかにすることができると考えられる。さらに、その結果、アレルギー疾患に対する予防と治療の対策を講じることが可能になると思われる。我々は以前、気道上皮細胞を IL-4 あるいは IL-13 で刺激した際に誘導される遺伝子を DNA マイクロアレイ法にて同定し、誘導遺伝子の内に扁平上皮細胞癌抗原 (SCCA) 1 と SCCA2 という二つのプロテアーゼ阻害分子が存在することを明らかにした。また、産生された SCCA 分子がダニアレルゲンの生物活性を阻害する新規の生体防御機構が存在することを示した。本研究においては、この SCCA 分子の生体内での生理的あるいは病理的役割を明らかにして、それにより Th2 型免疫反応の生理的あるいは病理的意義を明らかにすることを目的としている。今年度は SCCA 分子のマウスオルソログを同定してその機能解析を行った。

B. 方法

SCCA 分子のマウスオルソログである Serpnb3a、

Serpnb3b、Serpnb3c のリコンビナントタンパク質を発現精製して、それらの機能解析を行った。また、Serpnb3a、Serpnb3b の発現分布を解析するとともに、ケラチノサイトにおける両者のタンパク質発現を解析した。

C. 結果

Serpnb3a、Serpnb3b、Serpnb3c、さらに Serpnb3d 遺伝子はマウス第 1 染色体上でクラスターを形成していた。Serpnb3a はカテプシン L、Der p 1、カテプシン G、マスト細胞キマーゼ全ての酵素活性を阻害したが、Serpnb3b

はカテプシン L とカテプシン G の活性のみを阻害した。Serpnb3c には阻害活性は見られなかった。Serpnb3a はほぼ全ての組織に発現していたが、Serpnb3b はケラチノサイトに限局して発現していた。さらにケラチノサイトは Serpnb3a と Serpnb3b を分泌することを確認した。

D. 考察

今年度の本研究では、プロテアーゼ阻害物質である SCCA 関連分子のマウスオルソログを同定し、その機能解析を行った。ヒト SCCA 分子と同様にマウス SCCA 分子も内在性あるいは外来性のシステインあるいはセリンプロテアーゼを阻害することが明らかとなった。しかし、阻害パターンや発現プロファイルはヒトとマウスの SCCA 分子で大きく異なっていた。今後、これらの SCCA 関連分子の生理的あるいは病理的意義を明らかにして、Th2 型免疫反応の生体内での役割を解明したいと考えている。

E. 結論

SCCA 分子のマウスオルソログである Serpnb3a, Serpinb3b, Serpinb3c を同定し、その機能解析を行った。Serpnb3a と Serpinb3b は異なる阻害パターンと発現プロファイルを示しながらプロテアーゼ阻害活性を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Izuhara K, Arima K.
Signal transduction of IL-13 and its role in the pathogenesis of bronchial asthma.
Drug News & Perspect. 17(2) : 91-98, 2004.
- 2) Izuhara K, Arima K, Yuyama N, Sakata Y, Masumoto K.
Application of functional genomics to bronchial asthma.
Curr Pharmacogenomics, 2 : 351-356, 2004.
- 3) Sakata Y, Arima K, Takai T, Sakurai W, Masumoto K, Yuyama N, Suminami Y, Kishi F, Yamashita T, Kato T, Ogawa H, Fujimoto K, Matsuo Y, Sugita Y, Izuhara K.
The squamous cell carcinoma antigen 2 inhibits the cysteine proteinase activity of a major mite allergen, Der p 1.
J Biol Chem, 279(7) : 5081-5087, 2004.
- 4) Kuzuya Y, Adachi T, Hara H, Anan A, Izuhara K, Nagai H.
Induction of drug-metabolizing enzymes and transporters in human bronchial epithelial cells by beclomethasone dipropionate.
IUBMB Life, 56(6) : 355-359, 2004.
- 5) Sakata Y, Arima K, Takeshita K, Takai T, Aoki S, Ogawa H, Sugihara H, Fujimoto K, Izuhara K.
Characterization of novel squamous cell carcinoma antigen-related molecules in mice.
Biochem Bioph Res Co, 324: 1340-1345, 2004.
- 6) Seki N, Miyazaki M, Suzuki W, Hayashi K, Arima K, Myburgh E, Izuhara K, Brombacher F, Kubo M.
IL-4-induced GATA-3 expression is a time-restricted instruction switch for Th2 cell differentiation.
J Immunol, 172(10) : 6158-6166, 2004.
- 7) Kanaji T, Russell S, Cunningham J, Izuhara K, Fox JE, and Ware J.
Megakaryocyte proliferation and ploidy regulated by the cytoplasmic tail of glycoprotein Ib α .
Blood, 104:3161-3168, 2004.
- 8) Nishi N, Miyazaki M, Tsuji K, Hitomi T, Muro E, Zaito M, Yamamoto S, Inada S, Kobayashi I, Ichimaru T, Izuhara K, Nagumo F, Yuyama N, and Hamasaki Y.
Squamous cell carcinoma-related antigen (SCCA) in children with acute asthma.
Ann Allergy Asthma Immunol, in press.
- 9) Izuhara K, Arima K, Masumoto K, Kanaji S, Kanaji T.
IL-4 and IL-13: Their pathological roles in allergic diseases and their potential in developing new therapies-Update.
Medical Chemistry Reviews - online, in press.
- 10) Arima K and Izuhara K.
The IL-13/IL-13 receptor interaction, an emerging therapeutic target in allergic diseases. Allergology Int, in press.
- 11) 出原賢治.
IL-4/IL-13 誘導遺伝子とアレルギー疾患発症との関連.
中島重徳, 小林節雄, 宮本昭正 編: 喘息と関連遺伝子. 67-71, ライフサイエンス出版、2004.
- 12) 出原賢治, 有馬和彦
IL-13.
笠倉新平, 松島綱治 編: サイトカイン・ケモカインのすべて-基礎から最新情報まで-. 67-71、日本医学館、2004.
- 13) 有馬和彦, 金地佐千子, 金地泰典, 出原賢治.
免疫沈降法.
中内啓光 編: すべてのバイオ研究に役立つ免疫学的プロトコール. 106-112, 羊土社, 2004
- 14) 金地佐千子, 有馬和彦, 金地泰典, 出原賢治.
ウェスタンブロッティング法.
中内啓光 編: すべてのバイオ研究に役立つ免疫学的プロトコール. 113-119, 羊土社, 2004
- 15) 出原賢治.
転写因子と免疫疾患.
臨床検査 48(8) : 903-907, 2004.
- 16) 有馬和彦, 出原賢治.
IgE 産生と遺伝因子
喘息 17(1) : 27-32, 2004.
- 17) 坂田資尚, 有馬和彦, 高井敏朗, 櫻井済, 増本清成,

- 松尾洋, 出原賢治.
IL-4/IL-13 が誘導するタンパク質分解酵素阻害物質による主要ダニ抗原 Der p1 の阻害.
呼吸 23(2) : S26-S28, 2004.
- 18) 金地佐千子, 出原賢治.
IL-4/IL-13 と気管支喘息.
喘息 17:15-21, 2004.
- 19) 坂田資尚, 出原賢治.
IL-13.
アレルギーの臨床 24(8) : 604-609, 2004.
- 20) 出原賢治, 有馬和彦.
IL-4, IL-13 受容体と気管支喘息.
臨床免疫 42(6) : 686-691, 2004.
- 21) 有馬和彦, 出原賢治.
喘息関連遺伝子の解析と臨床応用への展望.
治療学 39(1) : 7-11, 2005.
- 22) 出原賢治.
ヒト IL-4, IL-13 受容体と気管支喘息.
アレルギー 印刷中
- 23) 出原賢治.
IL-4, IL-13 受容体と気管支喘息.
感染・炎症・免疫 印刷中
- 24) 坂田資尚, 有馬和彦, 出原賢治.
プロテアーゼ阻害因子によるアレルギー反応の制御. 臨床免疫 印刷中
2. 学会発表
- 1) Izuhara K.
Application of functional genomics to bronchial asthma.
1st International Basic and Clinical Immunogenomics. 2004, 10, 6. (口頭発表).
- 2) Izuhara K.
Identification and characterization of the IL-13-inducing genes in bronchial epithelial cells.
25th Collegium Internationale Allergologicum Symposium. 2004, 8, 25. Abstract book : 64 (4) : 351 (口頭発表).
- 3) T Kanaji, N Hamasaki, Izuhara K., J Ware.
GPIb α dimer formation and cell surface expression: A filamin binding domain is essential for dimer formation but not for assembly of the GPIb/IX complex.
Japan-United Kingdom platelet Conference. 2004, 9, 3. (口頭発表).
- 4) Kanaji T, Hamasaki N, Izuhara K., J Ware.
GPIb α dimer formation and cell surface expression: A filamin binding domain is essential for dimer formation but not for assembly of a GPIb/IX complex.
The American Society of Hematology 46th annual meeting and Exposition. 2004, 12, 4-7. Blood 104(11) : 434a (Poster Session 709-1)
- 5) Kanaji S, B Jacquelin, M Chang, DJ Nugent, Komatsu N, Izuhara K., TJ Kunicki.
Thrombopoietin initiates demethylation -based transcription of GP6 during megakaryocyte differentiation.
The American Society of Hematology 46th annual meeting and Exposition. 2004, 12, 4-7. Blood 104(11) : 958a (Poster Session 709-III).
- 6) Sakata Y, Arima K, Izuhara K.
Characterization of two novel members of the mouse clade B serpin family.
第 77 回日本生化学会大会. 2004, 10, 14. 生化学 76(8) : 818 (ポスター).
- 7) Arima K, Sato K, Terade T, Matsuo Y, Izuhara K.
Identification of critical residues of the Human IL-13 receptor involved in ligand binding.
第 77 回日本生化学会大会. 2004, 10, 14. 生化学 76(8) : 831 (ポスター).
- 8) C Goda, T Kanaji, Arima K, S Kanaji, Izuhara K.
Characterization of a novel isoform of natural killer cell transcript 4.
第 77 回日本生化学会大会. 2004, 10, 14. 生化学 76(8) : 855 (ポスター).
- 9) 出原賢治.
気管支喘息とサイトカイン.
第 44 回日本呼吸器学会学術講演会. 2004, 4, 1. 日本呼吸器学会雑誌 42 : 8 (教育講演)
- 10) 出原賢治.
ヒト IL-4, IL-13 受容体と気管支喘息.
第 16 回アレルギー学会春季臨床大会. 2004, 5, 13. アレルギー 53(2, 3) : 196 (教育講演).
- 11) 出原賢治.
アレルギー炎症と Th2 型サイトカイン.
第 41 回日本小児アレルギー学会. 2004, 11, 28. 日本小児アレルギー学会会誌 18(4) : 399 (招待講演).

- 12) 金地佐千子, 出原賢治.
IL-4/IL-13 の B 細胞に対する新規の生物活性.
第 54 回日本アレルギー学会総会. 2004, 11, 6. アレルギー 53(8,9) : 829 (シンポジウム) .
- 13) 出原賢治.
サイトカインとアレルギー—最近の進歩.
第 54 回日本アレルギー学会総会. 2004, 11, 6. アレルギー 53(8,9) : 828 (シンポジウム) .
- 14) 有馬和彦, 松尾洋, 出原賢治.
インターロイキン-13/インターロイキン-13 受容体相互作用様式の解析.
第 34 回日本免疫学会総会・学術集会. 2004, 12, 2. 日本免疫学会総会・学術集会記録 34 : 186 (ポスター) .
- 15) 坂田資尚, 有馬和彦, 松尾洋, 出原賢治.
ヒト及びマウスセルピンによるダニ抗原 Der p1 の酵素活性阻害機構の解析.
第 9 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会. 2004, 7, 30. (ポスター講演)
- 16) 田中剛, 金地佐千子, 有馬和彦, 合田千穂, 安永晋一郎, 生澤公一, 柳原行義, 久保充人, 杉田雄二, 出原賢治.
IL-4 による B 細胞における aryl hydrocarbon receptor の誘導.
第 34 回日本免疫学会総会・学術集会. 2004, 12, 2. 日本免疫学会総会・学術集会記録 34 : 185 (ポスター) .
- 17) 合田千穂, 金地泰典, 有馬和彦, 金地佐千子, 田中剛, 出原賢治.
活性化 T 細胞および NK 細胞に発現するアポトーシス関連分子である natural killer cell transcript 4 の解析.
第 34 回日本免疫学会総会・学術集会. 2004, 12, 3. 日本免疫学会総会・学術集会記録 34 : 245 (ポスター) .

3. 知的所有権の取得状況
特に記載すべき事なし

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

地域集団でのコホート研究による便中細菌診断妥当性の研究

分担研究者 古賀 泰裕 東海大学医学部教授

経口免疫寛容成立における腸内細菌トランスロケーションの役割

Hygiene hypothesis ではアレルギー発症の環境要因として外来微生物による生体への侵襲が重要視されている。我々はこれと並んで腸内フローラを構成する腸内細菌の役割に注目している。本研究では腸内細菌の持つトランスロケーション能の有無が、宿主の経口免疫寛容能成立に重要な役割を持つことが示唆された。

A. 研究目的

アレルギー発症の環境要因として、感染症を引き起こす病原微生物と並んで、腸内フローラを構成する腸内常在細菌もアレルギー発症に関わる重要因子であることが強く示唆されている。腸内フローラを持たない無菌マウスでは GALT(gut-associated lymphoid tissue) が未発達で、Hygiene Hypothesis を裏付けるように Th2 免疫反応が過剰で、経口免疫寛容が成立し難い。我々は腸内フローラを構成する腸内細菌の持つどのような性質が GALT 成熟を促し経口免疫寛容を誘導するのかを明らかにすることを目的としている。その一つの試みとして本研究では、腸内細菌のトランスロケーション(translocation)能の有無が宿主の経口免疫寛容成立にいかなる影響を及ぼすかについて検討をおこなった。

B 研究方法

出生直後の無菌マウスの腸内フローラを腸内細菌群のなかの単一菌種で再建した。用いた菌株としては *E.coli* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 25923, *C.perfringens* JCM 05, *B.infantis* JCM 1222, および *B.longum* WB 05 である。また wild type EPEC 株(WT)および

その Tir 遺伝子を欠損させてトランスロケーション能を消失させた EPEC 株(Δ Tir)も同様に使用した。

腸管組織へのトランスロケーションの有無について検査するために、再建マウスの回腸、回盲部端より 2cm 採取し同等に 2 個に分割した後、一方は GM (ゲンタマイシン) 処理(translocation した細菌は生残)、他方は GM 非処理とした。

OVA に対する経口免疫寛容を誘導するために 5 週令の再建マウスに 1 日 1 回 5 mg の OVA を 4 回連続経口投与した。寛容成立の有無を調べるために OVA 1 μ g in Alum 0.1mg をその後 2 週間おきに 4 回腹腔内免疫し最後の免疫から 1 週間後に採血し OVA に対する血中抗体価を測定した。経口投与を行わず OVA 1 μ g in Alum 0.1mg 腹腔内免疫のみを行った群の血清を標準血清としその血清抗体価を 100 unit/ml とした。

C. 研究結果

腸管組織へトランスロケーションした *E.coli* ATCC 25922, *B.infantis* JCM 1222, *B.longum* WB 05 で腸内フローラを再建した宿主マウスではいずれも経口免疫寛容が成立した。一方、*S.aureus* ATCC 25923, *C.perfringens*

JCM 05 はトランスロケーションが認められず、かつ経口免疫寛容も誘導されなかった(表)。次に腸内細菌の持つトランスロケーション能とその細菌で腸内フローラが再建されたときの経口免疫寛容誘導能との関係をさらに明確にするために、conventional、germfree、WT 再建、 Δ Tir 再建マウスを用いて検討した。その結果、OVA 経口投与により免疫寛容が成立したのは conv.および無菌マウス腸内フローラを WT で再建した群であり、GF あるいは Δ Tir 再建群では成立が認められなかった。

(表) 腸内細菌トランスロケーション経口免疫寛容誘導

腸内フローラ再建に 用いた菌株	菌数 ($\text{Log}_{10}\text{CFU/g feces}$)			経口免疫寛容 誘導の有無
	回盲部	切除腸管組織		
	内容物	GM非処理	GM処理	
<i>E.coli</i> ATCC 25922	8.5 \pm 0.1	7.9 \pm 0.2	4.9 \pm 0.4	○
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	7.8 \pm 0.1	6.2 \pm 0.1	ND	×
<i>C.perfringens</i> JCM 05	8.1 \pm 0.3	7.0 \pm 0.4	ND	×
<i>B.infantis</i> JCM 1222	5.4 \pm 0.4	5.1 \pm 0.5	4.4 \pm 0.3	○
<i>B.longum</i> WB 05	5.5 \pm 0.6	4.6 \pm 0.4	3.9 \pm 0.8	○
REPEC	7.9 \pm 0.3	6.9 \pm 0.3	5.0 \pm 0.5	○
PEPEC Δ Tir	7.8 \pm 0.3	6.4 \pm 0.2	ND	×

D. 考察

Toll-like receptor(TLR)は腸管上皮細胞やGALT内の抗原提示細胞に多く発現している。したがって、腸内細胞はTLRを介して免疫系に多様なシグナルを絶えず送っており、この経路が腸内細菌の全身免疫に効果を及ぼす際に重要な役割を果たしていると考えられる。腸管上皮細胞におけるTLRの発現は管腔に面した部分よりも隣の細胞と接した側壁部にはるかに多いこと、TLRを発現する抗原提示細胞は大部分は粘膜固有層内に分布していることを考えると、腸内常在細菌であってもTLRを介して全身免疫系に十分な効果を及ぼすにはある程度の粘膜層への侵襲能が必要と考えられる。

E. 結論

腸内細菌の持つトランスロケーション能が、宿主の経口免疫寛容能成立に重要な役割を持つことが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Sudo N, Aiba Y, Oyama N, Yu XN, Matsunaga M, Koga Y, Kubo C. Dietary nucleic acid and intestinal microbiota synergistically promote a shift in the Th/Th2 balance toward Th1-skewed immunity. Arch Allergy Immunol. 2004 ;135(2):132-5.
- (2) Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, Kubo C, Koga Y. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. J Physiol. 2004 ;558 (Pt 1):263-75.
- (3) Fukuda S, Ishikawa H, Koga Y, Aiba Y, Nakashima K, Cheng L, Shirakawa T. Allergic symptoms and microflora in schoolchildren. J Adolesc Health. 2004;35(2):156-8.

2. 学会発表

- 第54回日本アレルギー学会総会
「シンポジウム 11、hygiene hypothesis とアレルギー」
腸内細菌とアレルギー疾患の発症について

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

なし

分担研究報告書

糞便細菌叢検査データの小児アレルギー早期予知への応用

分担研究者 園元謙二（九州大学大学院農学研究院教授）
中山二郎（九州大学大学院農学研究院助教授）

研究要旨

乳幼児における免疫系の発達は、腸内細菌に大きく影響を受けると考えられており、乳幼児期に発症するアトピー性皮膚炎、小児喘息、食物アレルギーなどの小児アレルギーの多くが、腸内細菌叢に起因すると考えられている。本研究では、腸内細菌叢とアレルギー発症の関連性を疫学的に調査し、小児アレルギーの早期予知のための糞便細菌マーカーを見出すことを目的としている。新生児ボランティア27名を対象とし、生後2ヶ月間の腸内細菌叢の変動を糞便細菌叢検査により調査した。また、生誕2年後のアレルギー発症状況をアンケートにより調査し、27名中6名においてなんらかの小児アレルギーの症状が見られることが明らかになった。糞便の細菌叢解析は、糞便からDNAを抽出後、PCR法にて全細菌の16S rRNA遺伝子(16S rDNA)を増幅させ、増幅断片の多様性をフィンガープリンティングするDGGE(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)法およびT-RFLP(末端標識制限酵素断片長多形解析)法により行った。抗生物質の連続投与がなかった25名においては、生後まもなく(48時間以内)に*Pseudomonas*属細菌などの好気性グラム陽性細菌が出現し、その後、3日目以降に、腸球菌、連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌群等の通性嫌気性菌が優勢になり、1ヶ月から2ヶ月後にはビフィズス菌等の偏性嫌気性菌が検出されるという共通の菌叢変遷パターンが観察された。しかし、生後直後に3日間抗生物質の連続投与を受けた2名の乳幼児(このうち1名の乳幼児は食物アレルギーの症状を示している)では、生後1週間に特定種の異常増殖が起こり、1~2ヶ月後には大腸菌群が優勢となる細菌叢変遷が見られ、生後初期の抗生物質投与は初期の細菌叢形成に大きな影響を与えることが示唆された。アレルギー発症と糞便細菌叢の統計的に有意な関連性は見出すことはできなかった。しかし、食物アレルギーを示した乳幼児にはT-RFLP解析においてビフィズス菌の存在が確認されないなどの傾向が見られた。今後、さらに50名規模の同調査を行い、糞便細菌叢とアレルギー発症の関連性を統計的に解析し、アレルギー発症の糞便細菌マーカーを見出していくことを計画している。

A. 研究目的

乳児期の免疫系は主として消化管において形成されると考えられ、腸管内の細菌が個人の免疫系に大きな影響を与えていると予想される。したがって、腸内細菌叢と免疫能がアレルギー疾患発症幼児と健康幼児でどのように異なるかを明らかにすることはアレルギーの発症機序を明らかにし、その予防対策を構築する上で必要である。本研究では、多数の乳幼児の糞便細菌叢を網羅的に解析し、細菌叢プロファイルとアレルギー発症の相関関係を統計的に解析し、小児アレルギー発症のマーカーとなる便中細菌叢

パターンを見出し、さらにそのマーカーを用いた小児アレルギーの早期予知法を開発することを目標としている。

B. 方法・計画

福岡市内産婦人科井植病院において新生児ボランティアを募集した。第1期サンプリング(平成15年度8月出産分)では、36名の新生児を本試験への参加者として登録、第2期(平成17年度8月出産分)は50名を登録した。本研究への参加のインフォームドコンセントは登録時に両親から文書による同意を得る。各新生児の

さい帯血をサンプリングし IgE 値を測定する（アレルギー発症に関する先天的要因の指標とする）。糞便のサンプリングは、生後0日目から5日目までと、1ヶ月後、2ヵ月後に行った。糞便の細菌叢検査は、糞便から抽出される全細菌の16S rRNA遺伝子を用いてフィンガープリンティングを行う2つの方法、DGGE(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動: denaturing gradient gel electrophoresis)法と T-RFLP(末端標識制限酵素断片長多形解析: terminal restriction fragment length polymorphism)法を中心に用いて行った。第1期参加者に関しては、生後2年後にアレルギー発症の状況に関するアンケート調査を行った。第2期参加者のアンケート調査は平成18年度～19年度に行う予定である。

(倫理面への配慮)

上記研究における幼児ボランティアは、妊娠8ヶ月～9ヶ月目の母親学級にて病院長を通じて協力要請の説明文章を出し、参加承諾の同意を得たもののみを対象として行った。得られたサンプルはすべて匿名で扱い、得られたデータは外部には漏れぬよう厳重に保管している。以上の研究計画は京都大学倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

第1期サンプリング対象の27名の生後2ヶ月間の糞便細菌叢検査を行った。また、そのうちの9名に関してはDGGE解析もあわせて行った。T-RFLP解析法においては属レベルでの細菌種の同定が可能で、DGGE解析法では、種レベルの同定が可能であった。それぞれの乳幼児の細菌叢形成過程を比較すると、細菌種のレベルで見ると個人個人で異なっているが、属レベルでは次のような共通性が見られた。生後のまもなく(48時間以内)に *Pseudomonas* 属細菌などの好気性グラム陽性細菌の出現が見られた。その後、3日目以降に、腸球菌、連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌群等の通性嫌気性菌が優勢になり、1ヶ月から2ヶ月後にはビフィズス菌等の偏性嫌気性菌が検出されるという共通の菌叢変遷パターンが観察された。しかし、生後3日間抗生物質の連続投与を受けた2名の乳幼児では、生後1週間に特定種の異常増殖が起こり、1～2ヶ月後には大腸菌群が優勢となる細菌叢変遷が見ら

れ、生後初期の抗生物質投与は初期の細菌叢形成に大きな影響を与えることが示唆された。

第1期サンプリング対象者に対する生後2年後のアンケート調査では27名中6名がアレルギー症状を申告している。アレルギーの種類は、2名がアトピー性皮膚炎、2名が喘息、2名が食物アレルギー(うち1名はアトピー性皮膚炎の症状も示している)である。アレルギー発症者の糞便細菌叢と健常者の糞便細菌叢の比較解析結果については、考察にて述べる。

D. 考察

アトピー性皮膚炎あるいは喘息の症状を持つ4名の糞便細菌叢には健常者との明らかな相違点を見出すことはできなかった。食物アレルギーの2名に関しては、T-RFLP解析においてビフィズス菌の出現が見られなかった。一方、他のほとんどの乳幼児においては、生後2ヶ月までにビフィズス菌が出現していた。ビフィズス菌は、動物試験などにおいて、アレルギー発症に関しては抑制効果があることが示されており、この結果と矛盾しない。食物アレルギーの1名は生後直後の抗生物質の投与を受けており、ビフィズス菌の欠損を含め、異常な腸内細菌叢形成過程とアレルギー発症との関連性が示唆される。

今後、第2期サンプルも同様に解析し、細菌叢プロファイルとアレルギー発症との関連性を統計的に解析することで、日本人幼児のアレルギー発症のマーカーとなる特定細菌種の同定、あるいはアレルギー発症に高リスクを示す細菌叢の変動パターンを見つけ出すことができると期待される。また、現在、同研究課題の京大・白川グループにより実践されている、コホート研究におけるプロバイオティクス介入試験においても本糞便細菌叢検査を行い、当該試験においても本検査法が適用できることを実証していく予定である。

E. 結論

乳幼児の細菌叢形成過程は、細菌種のレベルで見ると個人個人で異なっているが、属レベルでは好気性菌から嫌気性菌へ移行する共通の変遷パターンを示した。しかし、生後直後に抗生物質の連続投与を受けた乳幼児においては、この変遷パターンを示さなかった。第1期27名を

対象とした本調査においては、統計的に有意なアレルギー発症と糞便細菌叢との関連性を見出すことはできていないが、考察に示したような、いくつかの傾向が見出されており、今後、この糞便細菌叢検査を用いた疫学調査をさらに大規模化して継続することにより、アレルギー発症のマーカーとなる特定細菌種の同定、あるいはアレルギー発症に高リスクを示す細菌叢の変動パターンを見つけ出すことができると期待される。そしてさらに、その糞便細菌マーカーを利用した小児アレルギー迅速簡便早期予知法の開発が行なわれ、それを利用した本格的な大規模疫学調査が展開へと発展していくことを期待する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Songjinda, P., Nakayama, J., Kuroki, Y., Tanaka, S., Fukuda, S., Kiyohara, C., Yamamoto, T., Izuchi, K., Shirakawa, T., Sonomoto, K. "Molecular monitoring of developmental bacterial community in the gastrointestinal tract of Japanese infants" *Biosci. Biotech. Biochem.* in press (2005).

2) 中山二郎、福井学、Songjinda, Prapa、田中重光、久貫良子、園元謙二“腸内フローラの構造解析: DGGE/TGGE 法による腸内細菌叢解析” *腸内細菌学雑誌*, 18, 147-153 (2004).

2. 学会発表

1) 田中重光、Songjinda Prapa、久田貴義、福田早苗、清原千香子、白川太郎、中山二郎、園元謙二“乳幼児における腸内細菌叢とアレルギー(第3報)-T-RFLP による腸内フローラの解析” 2004 年度日本農芸化学会本大会

2) Songjinda Prapa, 田中重光、黒木佑美子、久貫良子、福田早苗、清原千香子、白川太郎、中山二郎、園元謙二“乳幼児における腸内細菌叢とアレルギー(第4報)” 2004 年日本農芸化学会本大会

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

研究課題 地域集団でのコホート研究による便中細菌診断妥当性の研究

(分担課題名)小国町におけるアレルギー性疾患発症予防に関する前向き疫学調査

分担研究者 柴田瑠美子 国立病院機構福岡病院 小児科医長

研究協力者 西間三馨 国立病院機構福岡病院 院長

研究要旨：熊本県小国町フィールドにおいて、妊娠期から同意を得た新生児に二重盲検法による乳酸菌成分内服投与を行い、アトピー性皮膚炎発症予防効果と出生後および乳児期の便中細菌の変化との関連を検討するコホート研究を目的とした。対象児の1ヵ月から3歳までアレルギー疾患発症のアレルギー専門医による健診調査を開始した。

A 研究目的：新生児の腸内細菌の変化と免疫系発達およびアレルギーの発症が関連している可能性が指摘されている。とくに乳幼児アトピー性皮膚炎では、腸内細菌叢におけるビフィズス菌割合が少ないことが報告され、乳酸桿菌、ビフィズス菌内服によるアトピー性皮膚炎の改善効果や発症予防効果が認められつつある。これらの発症予防効果の判断においては、乳児の生活する環境要因、抗生剤使用、家族歴などが大きく左右する可能性があり、共通した生活環境背景での前向き疫学調査が必要である。熊本県小国町で、全住民を対象とするフィールド作成を行い、固定されたフィールドを対象に、特定の細菌成分を投与した介入試験を行い、前向きのアトピー性皮膚炎発症に関する疫学的な研究（健診調査）を行うことを目的とした。同時に便中細菌検査によるアレルギー発症の早期診断とこの検査のアレルギー発症予が可能かを検討する。

B 方法

熊本県小国町での研究会の協力の基に全ての妊娠女性を登録し、同意を得られた者を対象として研究の説明会を開催した。その

後同意書が得られた妊娠女性から出生した新生児を2群に分け、1群にはこれまでの研究で効果が明らかにされた乳酸菌成分を、他の1群には偽薬を3ヵ月間投与した。対象者の選択は第三者によるランダム化にて行った。1ヵ月、3ヵ月、1歳、2歳、3歳までアトピー性皮膚炎の発症状況を健診にて調査を行った。同時に出生児、1ヵ月、3ヵ月の腸内細菌検査用の便を採取した。健診では、問診による栄養法、栄養状態、母親、児の食事内容、アレルギー外の問題点の有無、抗生剤内服の有無などを調査し、皮膚所見および粘膜、気道症状を診察した。アレルギー疾患の診断は、日本皮膚科学会、厚生労働省研究班アトピー性皮膚炎重症度分類、日本小児アレルギー学会の診断基準により行った。

C 結果：平成16年9月以降、説明会、講演会により小国町在住の妊娠女性11例で同意が得られた。対象児の健診用のカルテを作成し、現在出生児7例の1ヵ月健診を行った。脱落例は、出生直後の重症黄疸、他の基礎疾患、下痢のため3例が対象外となった。家族による途中からの中断、除外は

1例であった。

これまで、町内の妊娠女性対象にアレルギー疾患に対する講演会を開催しており、今後の症例の登録増加に向け説明会を行っている。現在、小国町での対象児の追跡アレルギー健診を行っている。

D 考案

近年の厚生労働省研究班による疫学調査では、乳幼児アトピー性皮膚炎は4ヵ月、3歳で10年前の約2倍に増加しており、これらの30～60%に食物アレルギーが合併し増悪因子となっていることが明らかにされている。これらのアレルギーの増加を考える上で最も重要な衛生仮説では、感染刺激の減少、抗生剤投与などがあげられており、腸内環境の異常として腸内細菌の変化が注目されている。アトピー性皮膚炎乳児の腸内細菌叢におけるビフィズス菌割合が少ないことが報告され、乳酸桿菌、ビフィズス菌内服によるアトピー性皮膚炎の改善効果や発症予防効果が認められつつあるが、住環境が同一フィールドの乳児における乳酸菌成分の発症予防効果および便中ビフィズス菌改善効果を同時に確認した研究はない。

これらの便中乳酸菌成分による発症予防効果の判断においては、抗生剤使用、家族歴および出生月などが大きく左右する可能性があり、対象児の一定の数が必要である。熊本県小国町での全住民を対象とするフィールド作成により、調査システムは確立されており、解析可能な対象児の増加をはかり、専門医による健診調査を継続する必要があると思われる。

E 結語

熊本県小国町フィールドにおいて、生後からの二重盲検法、乳酸菌成分投与によるアトピー性皮膚炎発症予防効果をアレルギー専門医により健診調査し、便中細菌の変化との関係を検討する研究がスタートした。

F 健康危険情報 介入群になし

G 研究発表

論文

1. Tsukahara H, Shibata R, Ohta N, Sato S, Hiraoka M, Ito S, Noiri E, Mayumi M. High levels of Urinary pentosidine, an Advanced Glycation end product, in children with acute exacerbation of atopic dermatitis; Relationship with oxidative stress. *Metabolism* 52: 1601-1605, 2003.
2. 柴田瑠美子 アナフィラキシー型食物アレルギー 臨床麻酔 28: 1545-1550, 2004.
3. 柴田瑠美子、宇理須厚雄、有田昌彦 他. 食物アレルギー委員会報告 第3報 食物経口負荷試験 日本小児アレルギー学会誌 18: 217-219, 2004.
4. 柴田瑠美子 アトピー性皮膚炎と食物アレルギー アレルギー科 17: 542-548, 2004.
4. 柴田瑠美子 アレルギーの考え方と栄養指導 助産雑誌 58: 118-124, 2004.
5. 柴田瑠美子 食物アレルギー患者の検査 小児科診療 67: 1087-1091, 2004.
6. 柴田瑠美子 アナフィラキシーへの対応 食物アレルギー研究会会誌 4: 33-37, 2004
7. 柴田瑠美子 乳幼児アトピー性皮膚炎の疫学(頻度と要因) 皮膚の科学 3

(増刊4号) 1-4,2004.

学会発表

1. Shibata R, Nishima S; Measurement of serum specific IgE antibodies to fish and mollusks in children with seafood allergy. J Allergy Clin Immunol 116:s316-317,2004 AAAAI 2004, 3.19-24(San Francisco)
2. Takahata Y, Kamiya K, Mastumoto T, Sato T, Shibata R, Morimatu F; Development of rapid and simple diagnostic kit for food allergens by immunochromatography. J Allergy Clin Immunol 113:s237,2004. AAAAI 2004, 3.19-24(San Francisco)

3. 柴田瑠美子 アトピー性皮膚炎の治療と患者への指導：正しい食物アレルギーの指導 第21回日本難治喘息・アレルギー研究会 2004. 6.19-20、宇都宮.
4. 柴田瑠美子 食物アレルギーの解決されるべき課題：医療上の問題点（負荷試験、栄養指導等の保健適応、指示書等） 2004. 11.26-27、東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況
取得なし

参考資料

アトピーリスク児の妊娠中からの母親の除去食による発症予防効果（前方視的 RCT）

論文	妊娠中除去食	授乳中除去食	対象	追跡	発症予防効果	評価
Chandra RK、 1986年 文献14 Canada	妊娠期間中除去 （牛乳、卵、魚、 牛肉、ナッツ）	なし	121例 前子にAD	1年	効果なし 皮疹重症度は低い	非ブラインド No ITT
Msikelly 15 1988年 Wales	妊娠期間中 牛乳制限	妊娠中と 同じ	487例 家族歴あり	1年	湿疹発症率 効果なし	ITT解析
Lilja 1989年 16 Sweden	妊娠後期 卵、牛乳制限	なし	162例	1年半	効果なし	No ITT
Fath-Magnusson 1992年 18 Sweden	妊娠後期除去 卵、牛乳	妊娠中と 同じ	209例 家族歴	5年	効果なし	非ブラインド No ITT
Zeiger 1995年 17 USA	妊娠後期除去 牛乳、卵、魚、 牛肉、ナッツ	妊娠中と 同じ	209例 ハイリスク家 族	7年	1年後のAD、FA率、 ミルク陽性低率、7 年後165例差なし	非ブラインド No ITT
Hide 1994年 13 1996年 14 UK	妊娠後期 乳製品、卵、魚、 ナッツ制限、 HD対策	妊娠中と 同じ	前方視的 RCT 128例	4年	2歳AD；13.8%； 24%、4歳AD；8%； 15%、皮疹差なし	非ブラインド No ITT

生後の除去食と発症予防効果（授乳中、乳幼児食での除去食効果）（前方視的 RCT）

論文	対象	授乳中除去食	追跡	発症予防効果	評価
Chandra 1989年 21 Canada	97例母 乳栄養 124例人 工乳	母乳で乳製品、卵、 魚、ナッツ、大豆制限、 非制限、人工乳（分解 乳、大豆乳、普通乳）	1年半	湿疹頻度；母乳+除去食： 非除去22%；48% 分解乳21%、大豆乳63% 普通乳70%	非ブラインド No ITT 湿疹の判断が不明瞭
Lucas 1990年 22 UK	777例未 熟児	ドナー母乳 未熟児用人工乳 母親の搾乳	1年半	アトピー家族歴群 早期人工乳利用で湿疹増 加（odds3.6：0.7） 18カ月でのアレルギー疾 患頻度は差なし	ITT解析 High quality study 大規模研究 湿疹の判断が不明瞭

Mallet & Henocq 1992年 27 France	177 乳児	分解乳または普通乳 4カ月は母乳	4年	湿疹頻度 分解乳群 7.1% ; 普通乳 25.9% (p<0.001)	非ブラインド No ITT 脱落 30%
Httevig G 1989年 22, 23	115 例	3ヶ月母乳(卵、乳、 魚除去) : 非除去母乳 分解乳、卵魚9ヶ月以 降	10y	ADは2、6、48ヶ月で低率 18、120ヶ月では差なし	No ITT
Moore WJ 1985年 24 UK	525 例 250 : 対 照 275	母乳3ヵ月+除去 代替大豆乳	1y	解析なし	No ITT
Candra RK 1989年 25 Canada	288 例 72 例 x4 軍	分解乳、大豆乳、ミル ク、完全母乳4ヶ月	6ヵ月	皮疹重症度スコア差なし AD 頻度は分解乳で低率 (P<0.005)	No ITT

文献

1. Atherton DJ, Sewell M, Soothill JF, Wells RS, Chilvers CE, A double-blind controlled crossover trial of an antigen-avoidance diet in atopic eczema *Lancet*;1(8061):401-3,1978.
2. Lever R, MacDonald C, Waugh P, Aitchison T. Randomised controlled trial of advice on an egg exclusion diet in young children with atopic eczema and sensitivity to eggs. *Pediatr Allergy Immunol* 9:13-9,1998.
3. Isolauri E, Sutas Y, Makinen-Kiljunen S, Oja SS, Isosomppi R, Turjanmaa K. Efficacy and safety of hydrolyzed cow milk and amino acid-derived formulas in infants with cow milk allergy. *J Pediatr* 127:550-7,1995.
4. Cant AJ, Bailes JA, Marsden RA, Hewitt D. Effect of maternal dietary exclusion on breast fed infants with eczema: two controlled studies. *BMJ Clin RAS Ed*;293:231-3,1986.
5. Mabin DC, Sykes AE, David TJ. Controlled trial of a few foods diet in severe atopic dermatitis. *Arch Dis Child*;73:202-7,1995.
6. Neild VS, Marsden RA, Bailes JA, Bland JM. Egg and milk exclusion diets in atopic eczema. *Br J Dermatol.* 114:117-23,1986.
7. Munkvad M, Danielsen L, Hoj L, Povlsen CO, Secher L, Svejgaard E, Bundgaard A, Larsen PO. I, Antigen-free diet in adult patients with atopic dermatitis. A double-blind controlled study. *Acta Derm Venereol* 64:524-8,1984年
8. Graham M et al, *Br J Dermatol* 1984;110(4):457-67.1984年

9. Businco L, Benincori N, Nini G, Businco E, Cantani A, De Angelis M. Double-blind crossover trial with oral sodium cromoglycate in children with atopic dermatitis due to food allergy. *Ann Allergy* 1986;57:433-8,1986 年
10. Majamaa H & Isolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 99:179-85, 1997.
11. Resano A, Crespo E, Fernandez Benitez M, Sanz ML, Oehling A. Atopic dermatitis and food allergy. *Invest Allergol Immunol* 8:271-276,1998.
12. Sampson HA. Jerome Glaser lectureship. The role of food allergy and mediator release in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 81:635-45,1988.
13. Chandra RK. Five-year follow-up of high-risk infants with family history of allergy who were exclusively breast-fed or fed partial whey hydrolysate, soy, and conventional cow's milk formulas. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997 Apr;24(4):380-8.
14. Chandra RK, Puri S, Hamed A. Influence of maternal diet during lactation and use of formula feeds on development of atopic eczema in high risk infants. *BMJ* 299:228-30, 1989.
15. Miskelly FG, Burr ML, Vaughan-Williams E, Fehily AM, Butland BK, Merrett TG. Infant feeding and allergy. *Arch Dis Child.* 63:388-93, 1988.
16. Lilja G, Dannaeus A, Foucard T, graff-Lonnevig V, Johansson SGO, Omen H. Effects of maternal diet during late pregnancy and lactation on the development of atopic disease in infants up to 18 months of age. in two results. *Clin exp Allergy* 19:473-9,1989.
17. 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.* 1995 Jun;95(6):1179-90.
18. Fath-Magnusson K, Kjellman NI. Allergy prevention by maternal elimination diet during late pregnancy--a 5-year follow-up of a randomized study. *J Allergy Clin Immunol.* 89:709-13, 1992.
19. Hide DW, Matthews S, Tariq S, Arshad SH. Allergen avoidance in infancy and allergy at 4 years of age. *Allergy.* 51:89-93, 1996 .
20. Hide DW, Matthews S, Matthews L, Stevens M, Ridout S, Twiselton R, Gant C, Arshad SH. Effect of allergen avoidance in infancy on allergic manifestations at age two years. *J Allergy Clin Immunol.* 93:842-6, 1994 .
21. Chandra RK. Role of maternal diet and mode of infant feeding in prevention of atopic dermatitis in high risk infants. *Allergy.*;44 Suppl 9:135-9, 1989.
22. Htevig G, Kjellman B, Sigurs N et al. Effect of maternal avoidance of egg, cow's milk and fish during lactation upon allergic manifestations in infants. *Clin exp Allergy* 19:27-32,1989.

23. Htтеvig G, Sigurs N, Kjellman B. Effect of maternal dietary avoidance during lactation on allergy in children at 10 years of age. *Acta Paediatr* 88:7-12,1999.
24. Moore WJ, Midwinter RE, Morris AF, Colley JR, Soothill JF. Infant feeding and subsequent risk of atopic dermatitis. *Arch Dis Child* 60:722—6,1985.
25. Candra RK, Singh G, Shidhara B. Effect of feeding whey hydrolysate, soy and conventional cow milk formulas on incidence of atopic disease in high risk infants. *Ann Allergy* 63:102-6,1989.
26. Vandenplas Y, Hauser B, Van den BC, et al. The long – term effect of a partial whey hydysate formula on the prophylaxis of atopic disease. *Eur J Peditatr*:154:488-494,1995.
27. Maller E, Honocq A. Long Long-term prevention of allergic diseases by using protein hydrolysates formula in at-risk infants. *J Paediatr* 121:S95-S100, 1992.
28. Marini A, Agosti M, Motta G et al. Effects of dietary and environmental prevention programme on the incident of allergic symptoms in high atopic risk intfants: tree years' follow-up. *Acta Peadatr Suppl* 414:1-21,1996.
29. Halken S, Host A, Hansen LG et al. Preventive effect of feeding high-risk infants a casein hydrolysate formula: a prospective randomized, comparative clinical study. *Pediatr Allergy Immunol* 4:173-181,1993.
30. Oldelram H, Vanto T, Jacobsen L et al. whey hydrolysate compared with cow's milk-based formula for weanig at about 6 month of age in high allergic-risk infants: effects on atopic disease and sensitization. *Allergy* 51:192-195,1996.
31. Oldaeus G, Anjou K, Bjorksten B et al. Extensively and partially hydrolyzed infant formulas for allergy prophylaxis. *Arch Disd Child* 77:4-10,1997.
32. Halken S.,Hansen KS, Jacobsen HP et al Comparison of a partially hydrolyzed infant formula with two extensively hydrolyzed formulas for allergy prevention: a prospective randomized study. *Pediatr Allergy Immunol* 11:149-161,2000.
33. Friedman NJ, Zeiger RS: Prevention and natural history of food allergy. Leung DYM, Sampson HA, et al ed. *Pediatric allergy*, Mosby p495-509, 2003.

