

200936154A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

新生児食物蛋白誘発胃腸炎（N-FPIES）の
疾患概念確立、実態把握、
診断治療指針作成に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 野村 伊知郎

平成 22（2010）年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

新生児食物蛋白誘発胃腸炎（N-FPIES）の
疾患概念確立、実態把握、
診断治療指針作成に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 野村 伊知郎

平成 22（2010）年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
新生児食物蛋白誘発胃腸炎（N-FPIES）の疾患概念確立、実態把握、 診断治療指針作成に関する研究-----	9
国立成育医療センター アレルギー科 野村伊知郎	
II. 分担研究報告	
1. 診断法開発；末梢血リンパ球刺激試験の有用性に関する研究-----	19
国立成育医療センター 免疫アレルギー研究部 松本健治	
2. 診断治療指針を改定し、インターネットで広く医学情報公開を行う-25	
国立成育医療センター 新生児科 伊藤裕司	
（資料）新生児食物蛋白誘発胃腸炎（N-FPIES）診断治療指針	
3. 診断法開発；便 Eosinophi-Derived Neurotoxin の有用性-----	31
国立成育医療センター 消化器科 新井勝大	
4. 新生児施設における N-FPIES の臨床像・頻度に関する研究-----	37
千葉大学大学院医学研究院小児病態学 下条直樹	
5. N-FPIES の消化管組織に関する研究-----	41
順天堂大学医学部 大塚宜一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	49
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	53

難治性疾患克服研究事業(H21-難治-一般-099)

研究班名簿

区分	氏名	所属等	職名
研究代表者	野村伊知郎	国立成育医療センター アレルギー科	医師
研究分担者	松本健治 新井勝大 伊藤裕司 下条直樹 大塚宜一	国立成育医療センター 免疫アレルギー研究部 国立成育医療センター 消化器科 国立成育医療センター 新生児科 千葉大学 小児科 順天堂大学 小児科	室長 医長 医長 准教授 准教授
研究協力者 (五十音順)	磯崎 淳 伊藤浩明 池上 香 勝沼俊雄 木村光明 木許 泉 後藤志歩 近藤 應 正田哲雄 杉浦時雄 高増哲也 竹内 幸 竹中 学 寺田明彦 坂野公彦 福家辰樹 保科弘明 細川真一 萬木 晋 三浦克志 森田慶紀 渡辺博子 渡邊美砂 赤澤 晃	横浜市立みなと赤十字病院 小児科 あいち小児保健医療総合センター アレルギー科 日本医大千葉北総病院 小児科 東京慈恵会医科大学 小児科 静岡県立こども病院 感染免疫アレルギー科 愛知県春日井市民病院 小児科 名古屋記念病院 小児科 岐阜県総合医療センター 新生児内科 横浜市立みなと赤十字病院 小児科 名古屋市立大学 小児科 神奈川県立こども医療センター アレルギー科 豊橋市民病院 小児科 岐阜県総合医療センター 小児科 大同病院 小児アレルギー科 大阪府立母子保健総合医療センター 新生児科 浜松医科大学 小児科 杏林大学 小児科 国立国際医療センター 小児科 国立病院機構神奈川病院 小児科 宮城県立こども病院 総合診療科 千葉大学大学院医学研究院 小児病態学 国立病院機構神奈川病院 小児科 東邦大学 第一小児科 国立成育医療センター 総合診療部	医長 中央検査部長 医師 准教授 医長 医長 医師 医師 医師 助教 医長 副部長 医師 主任部長 医員 医師 助教 医員 医員 部長 専属大学院生 医員 助教 医長

研究協力者 (五十音順)	阿部 淳	国立成育医療センター 免疫アレルギー研究部	室長
	伊藤直樹	国立成育医療センター 新生児科	医師
	大矢幸弘	国立成育医療センター アレルギー科	医長
	垣内五月	国立成育医療センター 新生児科	医師
	斎藤博久	国立成育医療センター 免疫アレルギー研究部	部長
	津村由紀	国立成育医療センター アレルギー科	レジデント
	中谷夏織	国立成育医療センター アレルギー科	レジデント
	成田雅美	国立成育医療センター アレルギー科	医師
	二村昌樹	国立成育医療センター アレルギー科	医師
	堀向健太	国立成育医療センター アレルギー科	レジデント
	萬木暁美	国立成育医療センター アレルギー科	併任医師
	森田英明	国立成育医療センター 免疫アレルギー研究部	研究員
	山本貴和子	国立成育医療センター アレルギー科	レジデント
	吉田幸一	国立成育医療センター アレルギー科	レジデント

新生児食物蛋白誘発胃腸炎(N-FPIES)の疾患概念確立、
実態把握、診断治療指針作成に関する研究

平成 21 年度

I. 総括研究報告

新生児食物蛋白誘発胃腸炎(N-FPIES)の疾患概念確立、実態把握、 診断治療指針作成に関する研究

研究代表者 野村伊知郎 国立成育医療センター アレルギー科 医師

研究要旨

新生児食物蛋白誘発胃腸炎(N-FPIES)は1995年頃から急激に報告数が増加してきた。診断が難しいことも多く、重い合併症を残すことがある。実態に関しては謎が多く、発症率、診断検査法、病態などほとんど明らかになっていない。これを解決するために、①発症率を調査し、②疾患コホート研究を行って実態を把握する。③簡明な診断治療指針を作成し、インターネットで広く医学情報公開をする。④診断検査法を開発する。⑤リンパ球刺激試験を refine し、抗原検索の有用な手段にする。⑥病態解明のための消化管組織検査を行う、などを計画した。

以下、この①から⑥の項目に従って記載する。

研究デザインなど方法

- ① 東京都のすべての産科、小児科、総合病院にアンケート送付し発症率調査を行った。
- ② 230名の患者について、症状、検査所見などを解析した。
- ③ 年に2回の班会議を通じて、診断治療指針の改良を繰り返した。
- ④ 末梢血好酸球数、便 Eosinophil-Derived Neurotoxin (EDN)、血清サイトカインを、患者と対照者で測定し、比較した(case-control study)。
- ⑤ リンパ球刺激試験は、抗原の LPS の混入を測定し、除去を行った後、患者及び対照者で測定した(case-control study)。
- ⑥ 新生児用のファイバー検査の設備を整え、N-FPIES 患者、対照児で腸粘膜を採取し、RNA を抽出、マイクロアレイ研究を行った。

結果

- ① 初めて一般人口を対象とした発症率 0.21%が得られた。
- ② 大きく分けて4つのサブグループに分類されることが判明した。
- ③ これまでに蓄積されてきた事実に基づいて診断治療指針を改定した。
- ④ 末梢血好酸球は対照者の平均値+3SD をカットオフラインとすると、尤度比 10 以上と診断的価値の高さを示す結果を得た。便 EDN の測定は、1 万 ng/g 便をカットオフポイントとすると、これも尤度比 28.7 と高い診断的価値を示した。サイトカインの結果も興味深いものであった。
- ⑤ 疾患サブタイプにより陽性率が大きく異なっていた。
- ⑥ 着々と組織が集められ、マイクロアレイ解析が開始できた。

結語

研究の結果、N-FPIES の実態が徐々に明らかになりつつある。医学情報のインターネットによる公開などにより、全国で最善の診断治療が実施され、診断検査法の開発、病態の解明も進んでおり、今後もこれを継続してより正確な診断治療が行える環境を整え、後遺症に苦しむ患者、保護者を一人でも減らしたいと願っている。

研究分担者

松本健治	国立成育医療センター免疫アレルギー 研究部室長
伊藤裕司	国立成育医療センター新生児科医長
新井勝大	国立成育医療センター消化器科医長
下条直樹	千葉大学小児科准教授
大塚宜一	順天堂大学小児科准教授

A. 研究目的

我が国において新生児の食物蛋白誘発胃腸炎（N-FPIES；欧名にあたるのは Food Protein-Induced Enterocolitis, FPIES であるが、疾患概念に差があり、日本に特有という意味を込めて、N-FPIES を暫定的に使用させていただく）は、1995 年頃より急激に報告数が増加してきた。現在、新生児での推定発症率は 0.1%ともいわれており、全国で年間 1000 名程度が新たに発症していると考えられている。N-FPIES は、多彩な症状を示し、検査所見も非特異的で、診断が非常に難しい場合が多い。そのため、死亡例、壊死性腸炎、消化管破裂、消化管閉鎖を起こした症例、また発熱、CRP 陽性から敗血症と誤診された症例など、数多く報告されてきた。不可逆的後遺症を残した例や死亡例は各都道府県数名ずつ存在している。患者、家族にとり悲劇であり、かつ新生児科医を中心とした医療関係者にとっても大きな負担、不安の原因となっている。

不明な点が多い本症の実態を明らかにするとともに、信頼性の高い診断検査を確立すること、得られた情報をインターネットホームページで公開するなどして、本症を早期に診断し、患者を重篤な合併症から、家族を不安から救うことは急務である。具体的には主に、6 項目の研究を行っている。以下、この項目に従って記述してゆく。

- ① 発症率を求めるために全数調査を行う。
- ② 疾患コホート；これまで登録された患者と今後オンライン登録される患者(最終的に 1000 名以上を予定)について、起始コホートを形成し、不耐を起こす食物、負荷試験による確定診断、アウトグロウ時期、合併症の発生を見る。これには経時的な情報の更

新が必要となるため、最も実現可能性が高いと考えられる、インターネットオンラインシステムを作成する。この情報センターを構築、維持する(成育医療センター)。

- ③ 研究により得られた evidence をもとに診断治療指針を改訂する。
- ④ 急性期の診断検査法がないため、有望な検査法と予想された、便 Eosinophil-Derived Neurotoxin (EDN)、末梢血好酸球数、末梢血サイトカイン測定を開発する。特に、有望な便 EDN については、有用性が明らかになれば、保険収載を目指す。
- ⑤ 不耐を起こす食物の同定検査として、食物負荷テスト以外に現在唯一実行可能と考えられているのが、リンパ球刺激試験である。これを refine することが、治療、離乳食開始に必要である。同時に、炎症の主体となっているリンパ球サブセットを同定してゆく。本年度中に 70-100 例の検査を行うとともに、主体となるリンパ球サブセットを推定する。
- ⑥ 新たな疾患概念を構築する上で、病理組織の研究は重要である。Microarray によって発現解析を行い、炎症に関連した重要な分子を同定するとともに、浸潤している免疫細胞について、免疫組織染色、in situ hybridization によってその性質を見極めていく(成育医療研究センター、順天堂大学、千葉大学)。本年度中に数名の検体を採取、解析を開始する。

B. 研究方法

- ① 発症率
発症率を明らかにするために、東京都において一年間に発症した患者数の調査を行った。東京都のすべての産科、小児科の病院、医院にアンケートを送付した。
- ② 疾患コホート
これまでに登録された 230 名について、データ解析を行った。また、全国から、経時的に正確なデータを得るために、インターネット上で行うオンライン患者情報登録システムを構築、完成 (<http://www.fpies.jp/>) した(図 1)。年間 350 症例程度が登録されるとの予測をしている。今後全国

に登録を募って、最終的に 1000 名以上（それ以上の拡張も可能）の登録、データ蓄積を想定している。

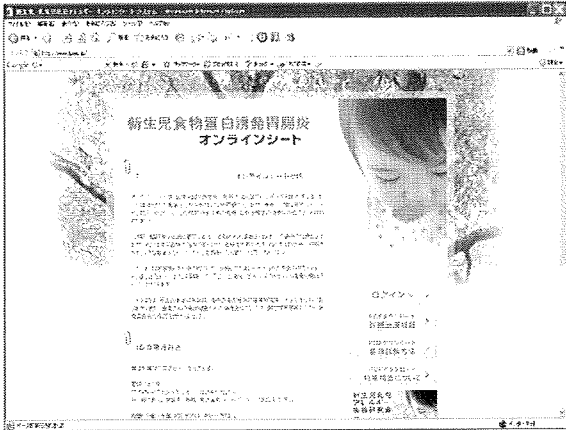


図 1. オンライン登録システム、表紙

③ 診断治療指針作成

2 回の班会議を行い、本年度の研究で判明した事実に基づいて、診断治療指針を改訂した（添付）。

④ 診断検査法開発； 便の Eosinophil-Derived Neurotoxin を測定した。N-FPIES 患者 8 名（うち 4 名は血便をきたしていた）と、新生児の疾患対照コントロールのべ 230 名で比較した

発症急性期の、末梢血好酸球数について、成育医療センター NICU で出生した対照新生児との比較を行った。また、発症急性期や食物負荷試験に際し血清中のサイトカインの測定を行った。

⑤ リンパ球刺激試験 推定される病態からは、末梢血単核球を特異抗原で刺激し増殖反応を見るリンパ球刺激試験が診断に有用と考えられるが、現在までの報告では有効性について一定の見解が得られていなかった。今回我々は特に刺激するアレルゲン製剤に含まれるリポ多糖(LPS) を測定、除去した上でを行った。

⑥ 病理組織研究 新生児用の消化管内視鏡を整備し、消化管粘膜の採取を行った。

（倫理面への配慮）

1. 医学的研究及び医療行為の対象となる個人への
人権の擁護

検査、各種データおよび評価結果などは個人情報である。この情報によって個人への不利益が派生することがないように、取り扱いと管理を厳重に行う。検査、各種データならびに評価結果は、解析する前に無作為に 4 桁からなるコード番号をつけ、その番号によって管理し、氏名、生年月日などは削除され、診断名に関してもコード化する。個人とこの符号を結び付ける対応表は、個人情報識別管理者（指定医師）において厳重に保管し個人情報を特定不可能な形式をとり、プライバシーの保護を確実に遂行する。このような管理を厳重に遂行することにより個人の解析結果は、分析を行う研究者にも誰のものか特定できなくなる。

2. 医学的研究及び医療行為の対象となる個人への
利益と不利益

今回の研究は通常の治療、診断でおこなっているものであり、これに伴う新たな苦痛、危険はない。その他の調査に関しても患者への時間制限もないため、不利益はないと思われる。利益についても発生しない。

また、結果は集計結果として解析、公表することを予定しており、個人データとしての公表することはないため、個人の不利益になることはない。しかしながら、研究者と対象者が治療をする側とされる側という特殊性から治療、診療に対しての理解と共に結果の解析への利用と公表への同意は自由意志でおこなう。協力、同意をしないからといって不利益な扱いを受けないことなど十分なインフォームド・コンセントを行い、強要にあたらないよう十分な配慮をおこなう。

3. 医学的研究及び医療行為の対象となる個人に理
解を求め同意を得る方法

本研究の対象患者が新生児、乳児であることから、被験者本人が十分な判断能力又は判断が困難であるため、近親者（両親）に対して以下の説明、同意（代諾）を頂く。対象者となる実施医師には、本研究の代表者および研究協力者が、本研究の目的と概要、プライバシーの保護と人権の尊重を患者説明文書などに従って詳細に説明する。同意（代諾）も同様に、同意（代諾）文書に署名をし

て頂くことで同意を得る。

本研究のすべての研究計画は、国立成育医療センター倫理委員会の承認を得ている（2009年9月）。

C. 研究結果

① 発症率

発送数 1085 件のうち、一次調査で回答は 249 件得られた。該当症例数は 64（東京都に住所があり、平成 20 年 9 月から 21 年 8 月までに発症）であった。しかし、回収率が 23%と低かったため、2 次調査（アンケート送付と電話調査）を行い、更に 259 件の回答を得た。合計回収率は 46.8%となり、該当症例数は 103 名となった。回収されていない施設でも同等の発症率であったと仮定すると、 $103 \div 46.8\% = 220.09$ 名が東京都において一年間で発症していたと考えられる。

東京都の出生数として、2008 年 9 月 1 日から 2009 年 8 月 31 日までの統計は入手できなかったが 2008 年の 1 年間の出生数は 106015 人であるため、これで近似すると

$$220.09 / 106015 = 0.002076$$

つまり発症率は 0.21%と算出された。

② 疾患コホート

これまでに登録された 230 名について、データ解析を行い、症状のタイプ、発症時期によって、いくつかのサブグループに分けられることがわかった（図 2）。

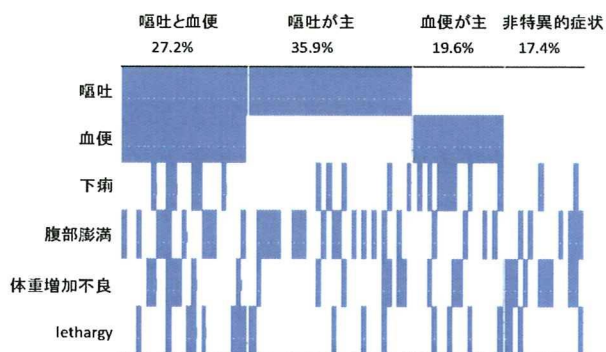


図 2. N-FPIES は大きく分けて 4 つのサブグループに分かれた。嘔吐すなわち上部消化管の炎

症が主と考えられるタイプ、血便すなわち大腸が炎症の主座と考えられるタイプ、非特異的の症状で、主に体重増加不良で気づかれる吸収障害が主のタイプがあった。

③ 診断治療指針作成

2 回の班会議を行い、本年度の研究で判明した事実に基づいて、診断治療指針を改訂した（添付）。

④ 診断検査法開発

末梢血好酸球数は、特に低出生体重児の患者で異常高値を示すことが多かった。対照患者や正常児でも生後 3 週ころをピークに増加するため、解釈には注意が必要である。そのため、生後の週数ごとに、対照者の値をまとめて、平均+3SDの棒グラフを示した（図 3）。これをカットオフポイントとすると、特に低出生体重児では尤度比が 10 以上となり、確定診断検査に近い値となった。

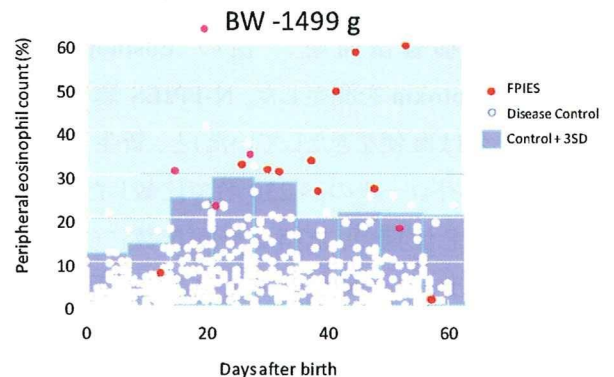


図3; 出生体重1500 g 未満の児におけるの急性期の末梢血好酸球数、疾患対照患者の平均値+3SDをカットオフポイントとすると、尤度比10以上となる。これ以上の値をとれば、確定診断に近いといえる。

便EDNの測定;N-FPIES患者8名（うち4名は血便をきたしていた）と、新生児の疾患対照コントロールのべ230名で比較したところ、著明な差を認めた（図4）。特に1万ng/g stoolをカットオフポイントとした場合、尤度比28.7と高い診断的価値を示した。

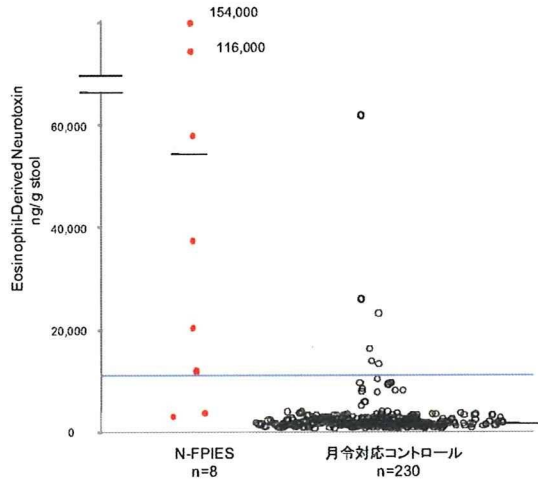


図4; 便中Eosinophi-Derived Neurotoxin検査結果; 便の蛋白分子抽出を行い、ELISA法によってEDN濃度を測定した。N-FPIES患者では著明な高値を示した。1万ng/g stoolをカットオフポイントとした場合、尤度比28.7と高い診断的価値を示した。

⑤ リンパ球刺激試験

我々は予備実験の段階で市販の精製抗原にはLPSが混入していることを発見した。また、抗原中に存在するLPSの濃度により、健常人でも抗原非特異的にリンパ球増殖反応を認めてしまうことを明らかにした。過去の報告では抗原中のLPSについて言及されていない。LPSにより抗原非特異的な増殖を認めるため、抗原特異的な増殖反応が評価できていなかった可能性が高い。そこで我々はLPS除去を行った精製抗原を用意しリンパ球刺激試験を開始した。その結果健常人では増殖反応を認めないのに対し、患者群では明らかに増殖反応を示すことがわかった。本年度はこの方法で全国から依頼された90症例の検査を行って、診断治療に貢献してきた。また、負荷試験により、確定診断が得られた症例に限ると、嘔吐を中心とした上部消化管症状がある者は、ほぼ全例が試験陽性を示し、他方、血便のみの下部消化管に限局している症例では試験陰性となることが明らかになりつつある。

⑥ 病理組織研究

新生児用の消化管内視鏡を整備し、10症例の組織を採取できた。クローン病3例、潰瘍性大腸炎3例、好酸球性胃腸炎4例であり、良好なRNAの抽出に成功し、マイクロアレイ研究が開始可能と

なった。現在解析中であるが、疾患特異的分子発現はもとより、消化管の採取場所によって発現の変動が大きいことが分かってきた。

D. 考察

① 発症率

東京都での一年間の発症者は、最少シナリオとしては、回答があった103人である。しかし、施設として全体数が把握されていないためか、本来本症を多数診療していると考えられる大学病院など3次病院からの返答が3件しかなく、少なかった。そのため、この最少シナリオの現実味は薄い。むしろ見逃されている症例を含め、これ以上の発症があると考えるべきであろう。

東京都の全数調査によって、今回初めて一般人口のN-FPIES発症率0.21%が得られた。これは、昭和大学小児科を中心に以前におこなわれた、ハイリスク新生児施設のみを対象とした調査とほぼ一致していた。

② 疾患コホート

本症のサブグループについては、図に示すように、欧米の疾患概念にあてはまる部分もあるが、嘔吐と血便が合併し、より重症である群については、新たな疾患概念でとらえる必要がある(図4)。

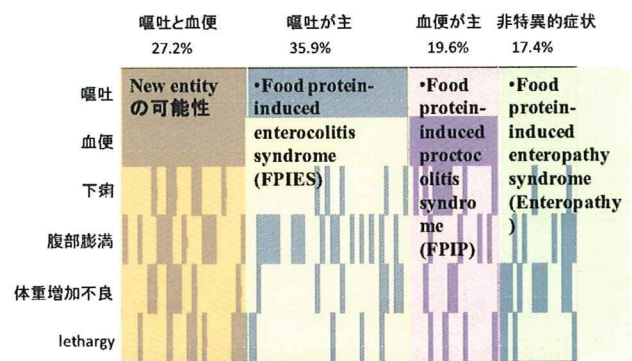


図4. 嘔吐が主であり、欧米の概念ではFPIESにあたる群が35.9%、血便のみが主症状で全身状態良好なFPIPに当たる群が19.6%、体重増加不良など非特異的症状が主となるEnteropathyにあたる群が17.4%であった。嘔吐と血便が合併し、より重症である群は27.2%あり、これはこれまでの欧米の概念にはおさまらず、新たな疾患概念の可能性はある。

③ 診断治療指針作成

診断治療指針は全国で使用されつつあり、患者の診断と治療に成果を上げていると考えられる。特に疾患のサブグループについて、末梢血好酸球数からの検査の読み方、症状タイプ別の負荷試験方法について追加を行った。

また、現在患者用ホームページ、冊子、医師用ホームページ改訂と冊子作成を行っている。

ゆくゆくは様々な疾患の診断治療指針作成時に欧米で標準となりつつある GRADE システムなどを導入し、よりエビデンス、使い勝手ともにレベルアップを図る予定である。

④ 診断検査法開発

EDN、末梢血好酸球などは急性期の診断を可能にし、特に EDN は保険収載を目指している。診断の困難な症例においても力を発揮すると思われる。

また、血清サイトカインは、病態を説明できる結果となり、興味深い。症例を増やして診断的価値の有無をはっきりとさせたい。

⑤ リンパ球刺激試験 本症のサブグループによって刺激試験の陽性率が大きく異なることは、新知見である。病態の差を解明する糸口となる可能性がある。

⑥ 病理組織研究; マイクロアレイを使用し良好な発現解析が行われており、将来新たな診断法の開発、病態の解明に力を発揮すると思われる。

E. 結論

① 発症率

東京都の全数調査によって、今回初めて一般人口における N-FPIES の発症率 0.21% が得られた。全国で一年間に 2000 名程度が新たに発症していると考えられた。

② 疾患コホート

詳細な臨床データを経時的に記入することのできるオンライン登録システムが完成し、千名以上の登録が行えるようになった。今後の疫学調査に大きな力を発揮すると思われる。

本症のサブグループが存在することが示された。

③ 診断治療指針作成

診断治療指針は全国で使用されつつあり、患者の診断と治療に成果を上げていると考えられる。

④ 診断検査法開発

EDN、末梢血好酸球などは急性期の診断を可能にし、特に EDN は保険収載を目指している。診断の困難な症例においても力を発揮すると思われる。

⑤ リンパ球刺激試験 全国の病院から依頼を受けており、この半年間で 90 症例の検査を行い、診断治療に貢献してきた。

⑥ 病理組織研究; 新生児用の消化管内視鏡を整備し、10 症例の組織を採取、発現解析を行い、順調に計画どおり進んでいる。

F. 健康危険情報

本症は、診断が難しい場合も多く、治療開始の遅れから、重大な合併症を起こす例、死亡例もある。急激な進行をとる場合もあるため、ある程度鑑別診断が済んだら、確定診断にこだわらずに、栄養変更などを行う治療的診断へ移行することが重要である(診断治療指針参照)。

また、負荷試験を行う場合はショックが起きること、重症下痢により脱水が起きることなどを念頭に、十分な準備の上行いたい。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 野村伊知郎、新たな疾患・病態の概念 新生児-乳児消化管アレルギー 小児科診療 72 巻 7 号、1225-1236 (2009.07)
- 2) 野村伊知郎、Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome (FPIES), 臨床、病態のまとめと診断治療指針作成、小児アレルギー学会雑誌、2009、第 23 巻第一号、34-47.

2. 学会発表

- 1) Nomura I et al. Elevation of Fecal Eosinophil-Derived Neurotoxin in Food

Protein-Induced Enterocolitis Syndrome American
Academy of Asthma, Allergy and Immunology
Meeting, March 2010, New Orleans

- 2) Morita H et al. Food protein-specific lymphocyte proliferation assay for the diagnosis of Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome American Academy of Asthma, Allergy and Immunology, March, 2010, New Orleans
- 3) 2009年12月 小児アレルギー学会シンポジウムを運営
- 4) 森田英明ほか、新生児・乳児消化管アレルギーの診断法について アレルゲン特異的リンパ球刺激試験 新生児乳児消化管アレルギーの診断と病態解明を目指して 日本小児アレルギー学会、2009.12.
- 5) 野村伊知郎、新生児・乳児消化管アレルギーの診断法について 好酸球関連物質について 日本小児アレルギー学会、2009.12.
- 6) 伊藤直樹ほか、新生児乳児消化管アレルギー (FPIES)は胎児期から発症する 日本未熟児新生児学会、2009.10.
- 7) 正田哲雄ほか、敗血症様の症状を呈した乳児消化管アレルギーの一例 日本小児アレルギー学会、2009.12
- 8) 近藤應ほか、当施設における新生児の便中 EDN の検討と新生児乳児消化管アレルギーの診断への応用、日本小児アレルギー学会、2009.12.
- 9) 野村伊知郎ほか、新生児-乳児消化管アレルギー、症例集積研究と診断検査法について、日本小児栄養消化器肝臓学会、2009.10.

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 便 EDN 測定は、保険収載を目指している。

平成 21 年度

Ⅱ. 分担研究報告

「新生児食物蛋白誘発胃腸炎（N-FPIES）の疾患概念確立、実態把握、診断治療指針作成に関する研究」

分担内容；診断法開発、末梢血リンパ球刺激試験の有用性に関する研究

分担研究者 松本健治 成育医療研究センター免疫アレルギー研究部
協力者：森田英明 成育医療研究センター免疫アレルギー研究部
斎藤博久 成育医療研究センター免疫アレルギー研究部
木村光明 静岡こども病院感染免疫アレルギー科
新生児乳児アレルギー研究会所属医師（30名）

研究要旨

背景、目的

新生児食物蛋白誘発胃腸炎（以下 N-FPIES とする）はさまざまな症状を示す、非 IgE 依存性の免疫学的機序をもつと考えられている疾患である。免疫学的機序から細胞性免疫検査であるリンパ球刺激試験はなんらかの有用性を持つと考えられるが、まだその位置は定まっていない。今回、N-FPIES とコントロール患者で検討を行い、その有用性を確かめるとともに、診断検査として確立することを目的として研究を開始した。

方法

リンパ球刺激試験；末梢血もしくは臍帯血を採取し、単核球を分離、牛乳蛋白抗原（ α -カゼイン、 β -カゼイン、 κ -カゼイン、 α -ラクトアルブミン、 β -ラクトグロブリンとそれぞれ培養を行った。5 日間の培養後に ^3H -thymidine の取り込みが測定された。

また、抗原は LPS 除去をした上で行った。

患者および対照児；N-FPIES 患者は、負荷試験にて確定診断を受けた 5 名。対照は正常分娩で採取された臍帯血とアトピー性皮膚炎児にて行った。

結果

LPS は、市販のミルク抗原に高濃度に含有されていた。正常者のリンパ球が、LPS100pg/ml の濃度で刺激されてしまうことが判明し、これを除去することが不可欠であることがわかった。LPS 除去を行った抗原に対しては、対照は増殖を示さず、N-FPIES は全例で増殖を示した。

結語

LPS 除去は、リンパ球刺激試験の精度を高めるために、欠かすことができないことが明らかとなった。高い精度が保障されたリンパ球刺激試験は N-FPIES の診断に有用である。

A. 研究目的

N-FPIES は食物摂取に誘発されて新生児期、もしくは乳児期に嘔吐、血便、下痢をはじめとする消化器症状を示す疾患である。重症者はショック、

アシドーシス、低体温、メトヘモグロビン血症、イレウス、消化管破裂などが見られることがある。ほとんどの患者は皮膚プリックテストが陰性で、食物蛋白特異的 IgE 抗体も見られないことが多い。

そのため、本症は細胞性免疫が主体となっていると考えられている。

Foggら¹は、欧米のFPIESについてアトピーパッチテストが有用であるとの報告を行っているが、我々のデータではほとんど陽性者はみられていない。現時点では、問題となる食物蛋白の同定法は、食物負荷試験などによる症状再現を見るしかないのが現状である。食物負荷試験は危険を伴い、重症者では施行が困難である。In vitroでの同定法が熱望される由縁である。そのため、高精度のリンパ球刺激試験を発達させる必要がある。

欧米においては、Van Sickle²がFPIESの末梢血単核球のミルク蛋白に対する増殖が有意であったと報告しているものの、Hoffman³らは有意でなかったとしている。現在のところリンパ球刺激試験の有用性は、世界的に認められている段階にはないといえる。

lipopolysaccharide (LPS)がリンパ球刺激試験に及ぼす影響について、Mattern⁴らは低濃度のLPSによって量依存性に増殖が起きることを報告している。Eiwegger et al⁵らは、通常流通している牛乳がLPSを含有していることを報告している。そして、LPSが混入した抗原をリンパ球刺激試験に使用すると非特異的に増殖反応を起こしてしまい、検査を妨害するとしている。FPIESの報告でLPSをコントロールしながら行った研究はなく、これについて明らかにする必要がある。

B. 研究方法

N-FPIES患者；5名、月令1-60か月、すべて経口負荷試験で症状の再現が見られた患者である。食物特異的IgE抗体はすべて陰性であった。

対照；アトピー性皮膚炎、7名、月令6-60か月であり、牛乳に対するアレルギーをもたない児。健康新生児由来の臍帯血も10名から得た。

食物抗原について、ミルク蛋白； α -Lactalbumin (Sigma, L-6010), β -Lactoglobulin (Sigma, L-3908), α -Casein (Sigma, C-6780), β -Casein (Sigma, C-6905) and κ -Casein (Sigma, C-0406)が使用された。

LPSの除去；食物抗原はDetoxigel columns (Pierce,

Rockford, USA)で精製された。その後LPSが測定され、10 pg/ml以下しか含有されないことが確かめられた。

末梢血単核球と臍帯血単核球はlymphocyte separation medium (Wako, Osaka, Japan)で分離され、無血清培地(AIM-V with L-glutamine, penicillin and streptomycin, all GIBCO laboratories, Grand Island, NY)で培養された。

増殖の測定；細胞は一穴あたり、 1×10^5 cells (100 μ l)で96穴round-bottom plateに静置され、牛乳蛋白、またはLPS(*E coli* O26:B6, sigma)の存在下で5日間培養された。牛乳蛋白はLPS除去されて、100 mg/mlの濃度で培養液に加えられた。1 mCi of tritiated thymidine (Perkinelmer, MA, USA)でパルスを行い、16時間更に培養された後、UniFilter-96 (Perkinelmer, MA, USA)に回収された。Thymidine取り込みは、Top Count (Perkinelmer, MA, USA)を使用して測定され、結果は抗原刺激/抗原非刺激のstimulation index (SI)であらわされた。

(倫理面への配慮)

1. 医学的研究及び医療行為の対象となる個人への人権の擁護

検査、各種データおよび評価結果などは個人情報である。この情報によって個人への不利益が派生することがないように、取り扱いと管理を厳重に行う。検査、各種データならびに評価結果は、解析する前に無作為に4桁からなるコード番号をつけ、その番号によって管理し、氏名、生年月日などは削除され、診断名に関してもコード化する。個人とこの符号を結び付ける対応表は、個人情報識別管理者（指定医師）において厳重に保管し個人情報を特定不可能な形式をとり、プライバシーの保護を確実に遂行する。このような管理を厳重に遂行することにより個人の解析結果は、分析を行う研究者にも誰のものか特定できなくなる。

2. 医学的研究及び医療行為の対象となる個人への利益と不利益

今回の研究は通常の治療、診断でおこなっているものであり、これに伴う新たな苦痛、危険はない。その他の調査に関しても患者への時間制限もないため、不利益はないと思われる。利益についても発生しない。

また、結果は集計結果として解析、公表することを予定しており、個人データとしての公表することはないため、個人の不利益になることはない。しかしながら、研究者と対象者が治療をする側とされる側という特殊性から治療、診療に対しての理解と共に結果の解析への利用と公表への同意は自由意志でおこなう。協力、同意をしないからといって不利益な扱いを受けないことなど十分なインフォームド・コンセントを行い、強要にあたらぬよう十分な配慮をおこなう。

3. 医学的研究及び医療行為の対象となる個人に理解を求め同意を得る方法

本研究の対象患者が新生児、乳児であることから、被験者本人が十分な判断能力又は判断が困難であるため、近親者（両親）に対して以下の説明、同意（代諾）を頂く。対象者となる実施医師には、本研究の代表者および研究協力者が、本研究の目的と概要、プライバシーの保護と人権の尊重を患者説明文書などに従って詳細に説明する。同意（代諾）も同様に、同意（代諾）文書に署名をして頂くことで同意を得る。

本研究のすべての研究計画は、国立成育医療センター倫理委員会の承認を得ている（2009年9月）。

C. 研究結果

まず、LPS の混入がリンパ球の増殖反応に及ぼす影響を調べた。末梢血単核球もしくは臍帯血単核球を3種類のLPS濃度で5日間培養したが、図1のように100 pg/ml という微量の混入で増殖反応を起こすことがわかった。

次に市販されているミルク蛋白質のLPS濃度を

測定した(表2)。5種類すべてで400から206,700 pg/mg ものLPSの混入が認められた。このLPSを除去しなければ、正確なリンパ球刺激試験が行えないことが明らかとなったため、Detoxigel column を使用して精製したところ、 β -Lactoglobulinを除いては、著明に減少させることができた。

最後に、LPS が除去されたミルク抗原を使用して、リンパ球刺激試験を行った(図2)。N-FPIESでは、対照と比較して α -Casein, β -Casein, κ -Casein で有意な増殖反応を認めた。しかし、 α -Lactalbumin, β -Lactoglobulin では、対照と差がなかった。

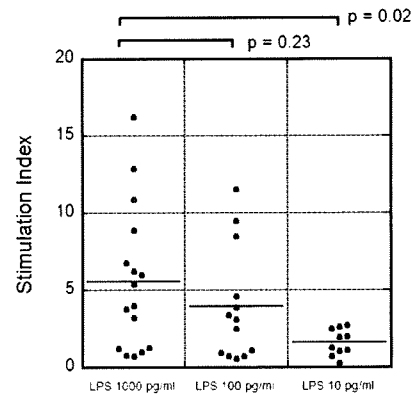


図1. 微量のLPS混入(100pg/ml)が正常対照のリンパ球増殖反応を引き起こす;LPSの混入がリンパ球の増殖反応に及ぼす影響を調べた。末梢血単核球もしくは臍帯血単核球を3種類のLPS濃度で5日間培養したが、図のように100 pg/ml という微量の混入で増殖反応を起こすことがわかった。

LPS contamination of milk proteins(pg/mg)		
Milk Proteins	Before removal	Post removal
α -Lactalbumin (sigma L6010)	184200	14
β -Lactoglobulin (sigma L3908)	206700	1880
α -Casein (sigma C6780)	540	23
β -Casein (sigma C6905)	500	34
κ -Casein (sigma C0406)	400	41

表2. 市販されているミルク蛋白質のLPS濃度を測定した。5種類すべてで400から206,700 pg/mg ものLPSの混入が認められた。Detoxigel column を使用して精製したところ、 β

-Lactoglobulin を除いては、著明に減少させることができた。

例数を増やし、感度、特異度、尤度比を算出してゆく予定である。

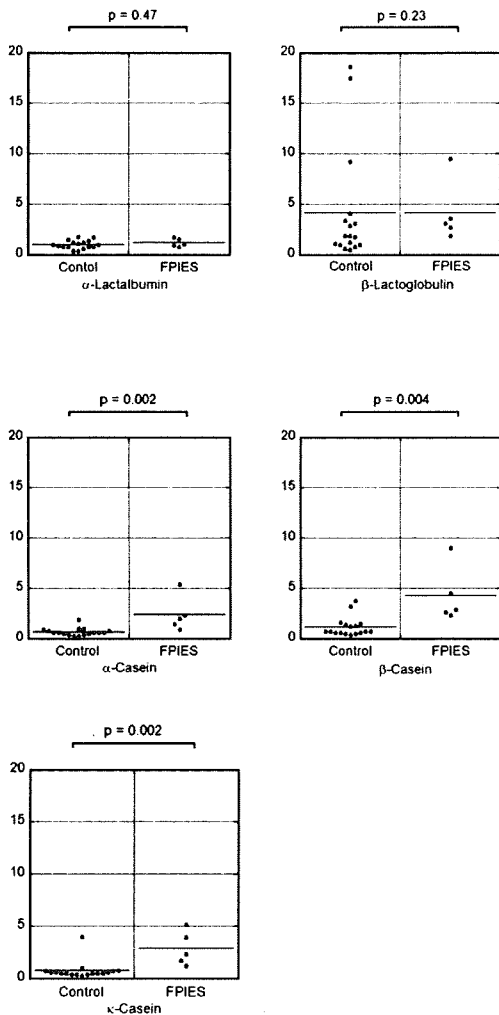


図 2；N-FPIES では、対照と比較してα-Casein, β-Casein, κ-Casein で有意な増殖反応を認めた。しかし、α-Lactalbumin, β-Lactoglobulin では、対照と差がなかった。

D. 考察

以前の報告ではLPSのコンタミネーションを検査したものはなく、今回初めてFPIESの牛乳蛋白からLPSを除去した精密なリンパ球刺激試験を行うことができた。LPSが混入していると、ごく微量でも増殖反応に大きく影響を与えてしまい、検査結果は当然不正確となる。LPSを除去すると明らかにFPIESで対照と比較して有意に増殖反応が観察された。今回開発された方法によって、つまり抗原のLPS濃度を10 pg/ml以下とすることで、正確な診断方法となることが期待される。今後症

E. 結論

1. 市販のミルク蛋白抗原には、高濃度のLPS混入が見られた。
2. LPS除去を行うことにより正確なリンパ球刺激試験が行えるようになった。
3. N-FPIESでは、精密な検査法を採用すると、対照と比して明らかな増殖反応が観察できた。
4. 正確な診断検査として有望であると考えられた。

<参考文献>

1. Fogg MI, Brown-Whitehorn TA, Pawlowski NA, Spergel JM. Atopy patch test for the diagnosis of food protein-induced enterocolitis syndrome. *Pediatr Allergy Immunol* 2006; 17:351-5.
2. Van Sickle GJ, Powell GK, McDonald PJ, Goldblum RM. Milk- and soy protein-induced enterocolitis: evidence for lymphocyte sensitization to specific food proteins. *Gastroenterology* 1985; 88:1915-21.
3. Hoffman KM, Ho DG, Sampson HA. Evaluation of the usefulness of lymphocyte proliferation assays in the diagnosis of allergy to cow's milk. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:360-6.
4. Mattern T, Thanhauser A, Reiling N, Toellner KM, Duchrow M, Kusumoto S, et al. Endotoxin and lipid A stimulate proliferation of human T cells in the presence of autologous monocytes. *J Immunol* 1994; 153:2996-3004.
5. Eiwegger T, Mayer E, Brix S, Schabussova I, Dehlink E, Bohle B, et al. Allergen specific responses in cord and adult blood are differentially modulated in the presence of endotoxins. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:1627-34.

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 野村伊知郎、新たな疾患・病態の概念 新生児-乳児消化管アレルギー 小児科診療 72 巻 7 号、1225-1236 (2009.07)
- 2) 野村伊知郎、Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome (FPIES), 臨床、病態のまとめと診断治療指針作成、小児アレルギー学会雑誌、2009、第 23 巻第一号、34-47.

2. 学会発表

- 1) Morita H et al. Food protein-specific lymphocyte proliferation assay for the diagnosis of Food Protein-Induced Enterocolitis Syndrome American Achademy of Asthma, Allergy and Immunology, March, 2010, New Orleans
- 2) 2009 年 12 月 小児アレルギー学会シンポジウムを運営
- 3) 森田英明ほか、新生児・乳児消化管アレルギーの診断法について アレルゲン特異的リンパ球刺激試験 新生児乳児消化管アレルギーの診断と病態解明を目指して 日本小児アレルギー学会、2009.12.
- 4) 野村伊知郎ほか、新生児-乳児消化管アレルギー、症例集積研究と診断検査法について、日本小児栄養消化器肝臓学会、2009.10.

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

「新生児食物蛋白誘発胃腸炎（N-FPIES）の疾患概念確立、実態把握、診断治療指針作成に関する研究」

分担内容；診断治療指針の改訂とインターネットによる医学情報公開に関する研究

分担研究者 伊藤 裕司 成育医療研究センター新生児科

協力者： 森田英明 成育医療センター免疫アレルギー研究部

福家辰樹 成育医療センターアレルギー科

新生児乳児アレルギー疾患研究会所属医師（30名）

研究要旨

背景、目的 2005年から診断治療指針を研究会で作製開始し、2007年に国立病院機構ネットワーク研究を受けて、本格的に研究班がスタートした。これまで年に2回の改訂を繰り返してきた。診断治療指針は全国で使用され成果をあげている。特に今回は

- (a) 欧米での病型との異同を明らかにすべきとの意見が多く、N-FPIESにおいてもサブグループに分かれることが明らかとなってきたため、これについて記載する必要が高まってきた。
- (b) また、我が国のN-FPIESに適した独自の負荷試験方法の記載も必要になった

以上のために、改訂を行った。

方法

研究班会議で20名以上の専門医師の出席を得て、討議を行い作成された。

- (a) 欧米の概念についてNowakらが提出したreviewをもとに和訳し掲載、症例の位置づけを行えるようにした。しかし、日本のN-FPIESはこれに当てはまらず、新しい概念も含んでいるため、日本で経験された症例のサブグループ分けをした図も付与した。
- (b) 負荷テストで一番問題となる点は、負荷によりショック、消化管穿孔をはじめとする重篤な症状が発生することにある。そのため、危険度から最重症群、中等症～重症群、軽症群の3つのグループに分けた。そして、具体的な摂取量、時間経過、検査のタイミング、方法を記載し、全国である程度統一した負荷テストを行えるようにした。

結果

診断治療指針が改訂され、インターネットホームページにアップロードされた。具体的な方法の提示が増え、より使用しやすくなったと考えている。

結語

3年前、診断治療指針は第一に合併症を防いで後遺症をなくすことを目的としていたが、研究班の活動を通じて本症の医学情報が浸透させることができ、目的を果たせたと考えている。現在はいかに正確な診断を下し、最少限の食物除去で治療ができるかなどに問題は移行しつつある。今後もよりよい診断治療指針となるよう努力していきたい。
