

白斑(15.8%), 狭窄(39.7%), 狭小化した食道(5.4%), 食道粘膜の脆弱, 浮腫(59.3%), 異常所見なし(8.8%)と報告されている<sup>4)</sup>。小児では1/3が内視鏡的には正常であるとも報告されており注意が必要である。CT, EUS(endoscopic ultrasonography)による食道壁の肥厚の有無を確認することも必要で, 厚生労働省の研究班の実態調査では22例にCTまたはEUSが施行され, 14例に食道壁の肥厚が認められている。

末梢血での好酸球増多の頻度は, 5%以上であった症例は22例(76%), 500/ $\mu$ l以上を認めた症例は14例(48%)であった。海外レビューでは30.8%の患者で末梢血中の好酸球増多を認めると報告されている。また, 成人でのEEでは末梢血中の全IgEは60~69%で上昇しているとされている。EEの診断においてもっとも重要視されるのは, 食道上皮内の多数の好酸球浸潤であるが, GERD患者でも食道内に好酸球浸潤がみられるため, 本疾患の診断との鑑別が問題となることがある。ただし, 好酸球浸潤の程度はGERDでは少ないことで区別される(5~10/HPF以下)。GERDの患者数は多いため, 本疾患とのオーバーラップがみられることがあり注意が必要である。

もう一つのEEの組織学的特徴は好酸球性微小膿瘍で, 食道上皮に4ないしそれ以上の連続した好酸球の集合体と定義される。これは25~45%の患者にみられ<sup>1)</sup>, この微小膿瘍は内視鏡で観察される白苔(白色滲出物)に一致していると考えられる。

## 治療

厚生労働省の研究班の報告では, EEの治療指針の案<sup>4)</sup>としてはプレドニゾロン20~40mg/日の内服, あるいは吸入用フルチカゾンの投与をあげているが, 投与量, 減量スピード, 中止の時期, 再発, 再燃時の対応については一定の見解は示されていない。

ステロイドを中止すると, 症状と食道内好酸球浸潤が3~6カ月以内に再発することがあり, 長期的な治療法に関してどのように行っていくべきかについては結論が得られていない。本邦の実態

調査でのステロイド療法については, 90%以上の例において少なくとも一時的な改善がみられている。海外レビューでは, コルチコステロイドの全身投与, 局所投与の有効性が示されている。コルチコステロイドの全身投与は症状を1週間以内に, 組織所見を4週間以内に改善することが報告されている。また, コルチコステロイドの吸入薬を用いた食道の局所ステロイド療法も即効性に症状軽減をもたらし有効率は95%であったと報告されている。

抗アレルギー薬の有効性については一定しないとされている。ロイコトリエンD<sub>4</sub>受容体拮抗薬, mepolizumabによる抗IL-5療法, アザチオプリンなどを使用した報告があるが, ある程度の効果は認められるものの中止後の再発率も高く, 副作用などの問題からも第一選択の治療法とは現時点では考えられていない<sup>2)</sup>。これ以外の治療についても報告が散見されるが, 先述したようにGERDとのオーバーラップも多いことと, pHモニタリングでEE例の18%に異常がみられるという報告があることから, 本疾患の診断の前に, 診断的アルゴリズムの一つとしてPPIを使うことを推奨している報告もある<sup>2)</sup>。

投薬以外では食事療法が有効な例もみられる。アレルギーテストに基づいた食事制限(大豆, 卵, 麦, ピーナッツ, 海産物などを除去)をしたところ, 76%の患者で50%以上の好酸球減少が得られた報告もある<sup>2)</sup>。つかえ感や他の食道の症状が, ある特定の食物に曝露された後に起こることがあり, 食物摂取が食道のアレルギー反応の原因となり, 急性の粘膜浮腫をきたす結果であると推測されている。

食道狭窄を認める場合, しばしば拡張術が行われることがあるが, 3~8カ月で再発することが多いとされている。本疾患の食道粘膜は脆弱で, 「クレープペーパー」と形容されること<sup>6)</sup>があり, 粘膜裂創をきたしやすい。このため重大な合併症として穿孔が起こりやすいと考えられている。ただ, Jacobsらの報告では, 拡張術の穿孔率は671の拡張術に対し1例のみ(0.1%)であり, 特別に高くない可能性もある<sup>7)</sup>。いずれにしてもEEによる炎症がコントロールできない場合, 反復して拡張が

必要となることが考えられるため、EEの病勢を制御するための治療を行うとともに、拡張術の施行にあたっては適応をよく検討する必要があると思われる。

## 症 例

ここに参考として本邦初のEE症例を呈示する。本例は症例報告として、“Journal of Gastroenterology”に2006年に報告しており、詳しくは文献での原文を参照されたい。

症例は69歳、男性、4週間続く腹痛と食欲不振で入院となった。他院でPPI投与された経緯があるが、症状改善はなく、また食道由来の嚥下障害や胸痛などの症状は認めなかった。過去に上部内視鏡検査歴はなく、糖尿病、気管支喘息、高血圧などあり吸入ステロイド、テオフィリン、SU薬、カルシウム拮抗薬を数年間内服していた。

検査所見では末梢血の好酸球の増加(2179/ $\mu$ l)、ハウスダストや真菌などに対するIgEの上昇を認めた。CTでは食道の著明なびまん性壁肥厚を認め、バリウム透視では中～下部食道の狭小化を認めたが通過は良好であった。胃、十二指腸には異常はみられなかった。上部内視鏡検査では、食道粘膜は蒼白で、白苔付着(真菌感染に類似)、リング状所見を認め(図1)、生検で大きな粘膜の裂創を形成した。病理組織学的には好酸球浸潤20/HPFで、EUSでは粘膜下層の著明な壁肥厚(図2)を認め、通常より低エコーに描出された。24時間pHモニタリング検査では異常酸逆流は認めなかった。食道内圧検査では、高振幅の食道収縮(>150 mmHg)を伴う高頻度の食道の非蠕動性収縮を認めた。

以上の検査所見からEEと診断し、経口的なプレドニゾン40mgの内服から治療を開始した。2週間後生検組織では好酸球浸潤は改善し、プレドニゾンを漸減したが、治療開始して3、7カ月後のEUSと食道造影では、食道狭窄と粘膜下層の肥厚に明らかな改善はなかった。

本症例では、喘息に対し数年前からフルチカゾン吸入をしていたがEEのコントロールは不良であった。過去にフルチカゾンを1760 $\mu$ g/日を6週

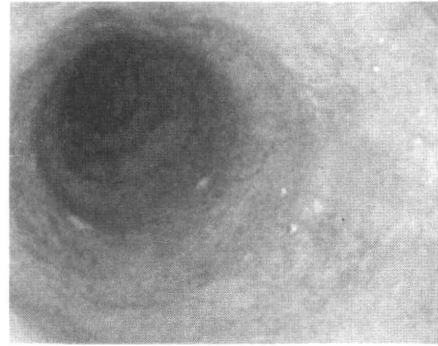


図1 上部内視鏡所見<sup>1)</sup>  
(巻頭カラー参照)

食道粘膜は蒼白で、白苔付着、リング状所見を認める。

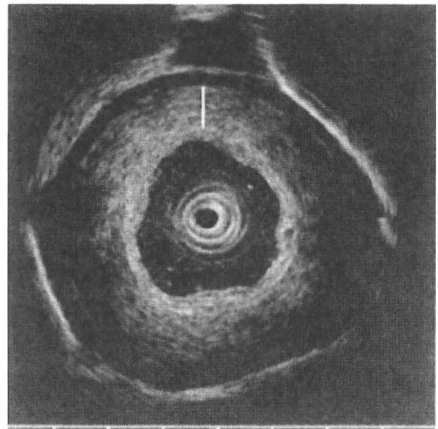


図2 EUS所見<sup>1)</sup>

粘膜下層の著明な壁肥厚所見(白線)を認める。

間継続したケースで改善がみられた報告があるが<sup>8)</sup>、喘息に対するフルチカゾンの通常量は200 $\mu$ gであるため、EEの治療効果に十分量ではなかったからかもしれない。

また、EEでは特徴的な食道壁の肥厚を示すことがあるが、本症例でもEUSで食道の粘膜下層に著明な壁肥厚がみられている。ステロイド治療後でも通常の粘膜下層より低エコーで描出された理由については、浮腫性の変化、炎症、線維化などが考えられたが、好酸球の減少後でも壁肥厚が残存していたため、長期間の炎症が粘膜下層に線維化をもたらしたと考えられた。

また、EEの患者においては食後の非蠕動性収縮や食道の高振幅の収縮がみられることが報告されており、本症例でもこのような収縮異常が認め

られた。このため、異常な食道運動機能を有する患者を診断した時にも、EE も考慮するべきであると思われる。

### おわりに

本疾患は比較的まれな疾患であるが、臨床医、病理医の認識が高まりつつあり、今後増加していく可能性があると思われる。日常見逃されているケースも多々あることが予想され、アレルギー歴の聴取や原因不明のつかえ感、胸やけ、胸痛などの症状があれば積極的な食道生検が必要であり、まず「探す」ことから始めなければならない。本邦でも実態調査が進み、少しずつ病態が解明されつつあるが、今後さらなる症例の蓄積とそれに基づく標準的治療法の確立が望まれる。

### 文献

- 1) Furuta K, Adachi K, Kowari K, et al : A Japanese case of eosinophilic esophagitis. *J Gastroenterol* **41** : 706-710, 2006
- 2) Gonsalves N, Kahrilas PJ : Eosinophilic oesophagitis in adults. *Neurogastroenterol Motil* **21** : 1017-1026, 2009
- 3) Mackenzie SH, Go M, Chadwick B, et al : Eosinophilic oesophagitis in patients presenting with dysplasia—a prospective analysis. *Aliment Pharmacol Ther* **28** : 1140-1146, 2008
- 4) 木下芳一 : 好酸球性食道炎/好酸球性胃腸炎の疾患概念の確立と治療指針作成のための臨床研究, 平成 21 年度総括・分担研究報告書, 2010, pp9-24
- 5) Dauer EH, Freese DK, El-Youssef M, et al : Clinical characteristics of eosinophilic esophagitis in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **114** : 827-833, 2005
- 6) Straumann A, Rossi L, Simon HU, et al : Fragility of the esophageal mucosa : a pathognomonic endoscopic sign of primary eosinophilic esophagitis?. *Gastrointest Endosc* **57** : 407-412, 2003
- 7) Jacobs JW Jr, Spechler SJ : A systematic review of the risk of perforation during esophageal dilation for patients with eosinophilic esophagitis. *Dig Dis Sci* **55** : 1512-1515, 2010
- 8) Arora AS, Perrault J, Smyrk TC : Topical corticosteroid treatment of dysphagia due to eosinophilic esophagitis in adults. *Mayo Clin Proc* **78** : 830-835, 2003
- 9) Katzka DA : Demographic data and symptoms of eosinophilic esophagitis in adults. *Gastrointest Endosc Clin N Am* **18** : 25-32, 2008
- 10) Lamb CA, Kanakala V, Stirling RW, et al : Clinical lesson : eosinophilic oesophagitis, a new diagnosis to swallow. *Frontline Gastroenterol* **1** : 25-29, 2010
- 11) Infante JM, Lamana LF : Eosinophilic esophagitis misdiagnosed twice as esophageal candidiasis. *Gastrointest Endosc* **71** : 394-395, 2010
- 12) Dellon ES, Gibbs WB, Fritchie KJ, et al : Clinical, endoscopic, and histologic findings distinguish eosinophilic esophagitis from gastroesophageal reflux disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **7** : 1305-1313, 2009
- 13) Hong S, Vogel NM : Food allergy and eosinophilic esophagitis : Learning what to avoid. *Cleve Clin J Med* **77** : 51-59, 2010

## 好酸球性食道炎の診断と治療

木下芳一<sup>1)</sup> 石原俊治<sup>1)</sup> 天野祐二<sup>2)</sup> 藤代浩史<sup>3)</sup>1) 島根大学 第2内科, 2) 島根大学附属病院 光学医療診療部,  
3) 島根県立中央病院 内視鏡科

## 要 旨

好酸球性食道炎は食物や空気中の物質が抗原となってアレルギー反応が食道の粘膜上皮を中心におこり、食道上皮中に多数の好酸球の浸潤がみられる稀な疾患である。好酸球の上皮内浸潤を中心とした慢性炎症のため食道粘膜下層の浮腫や線維化がおこる。このため食道の運動に異常が生じ、嚥下障害や食べ物のつまりを主とする症状が出現し食道狭窄が生じることもある。内視鏡検査では食道粘膜の縦走溝、白斑、多発輪状狭窄がみられることもあるが、確定診断は食道粘膜の生検による上皮内好酸球の存在(15-30個/高倍率視野)をもっておこなう。治療には局所作用型のグルココルチコイドの食道粘膜への投与を第一選択とすることが多い。

**Key words** eosinophil/eotaxin/endoscopy/allergy/interleukin-13

## I はじめに

好酸球性食道炎は食道の上皮層中に多数の好酸球の浸潤が慢性的に持続する疾患で、好酸球による慢性炎症が原因となって食道扁平上皮の透過性の亢進、増殖促進、粘膜下層の浮腫と線維化がおこる。これらの変化のために食道の運動や知覚に異常がおこり、嚥下障害、食べ物が食道内につかえる、胸やけなどの不快な症状が出現するとともに食道の狭窄が生じる可能性がある<sup>1)</sup>。

本疾患は好酸球性胃腸炎とは異なって病変が食道にみられる疾患として報告がなされてから、すでに30年が経過している<sup>2),3)</sup>。しかし小児に加えて成人にも発症例が増加しつつあることが注目され始めたのはごく最近のことである。好酸球性食道炎に関しては早くから研究が開始されていた欧米での基礎、臨床研究がほとんどで、日本での研

究は始まったばかりである。著者は、厚生労働科学研究費補助金、難治性疾患克服研究事業にもとづく研究の一部として2009年に好酸球性食道炎の日本での疫学実態調査をおこなった<sup>4)</sup>。そこで本総説では、多くの研究成果が集積されつつある好酸球性食道炎の病態、診断、治療に関する欧米の最新のデータを紹介するとともに、実態調査にもつづいた日本人患者の特徴についても解説をこころみる。

## II 病 態

好酸球性食道炎の病態に関しては、患者の半数に喘息、アトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患の合併がみられ、かつ血中のIgEが上昇している例が多いためTh2系の免疫反応が活性化していること、特に好酸球の産生増加と関係のあるIL-5の関与が大きいことが推定されていた<sup>5),6)</sup>。また、IL-5は好酸球を食道に集積させる上で重要な役割を演じていることも示された。皮膚のpin prick testやpatch testをおこなうと食物抗原やアスペルギルスに対して陽性反応を示す例が多いことが報告されている。さらに食物アレルギーの原因となりやすい乳製品、小麦、卵、大豆、ピー

## 想定される好酸球性食道炎の病態

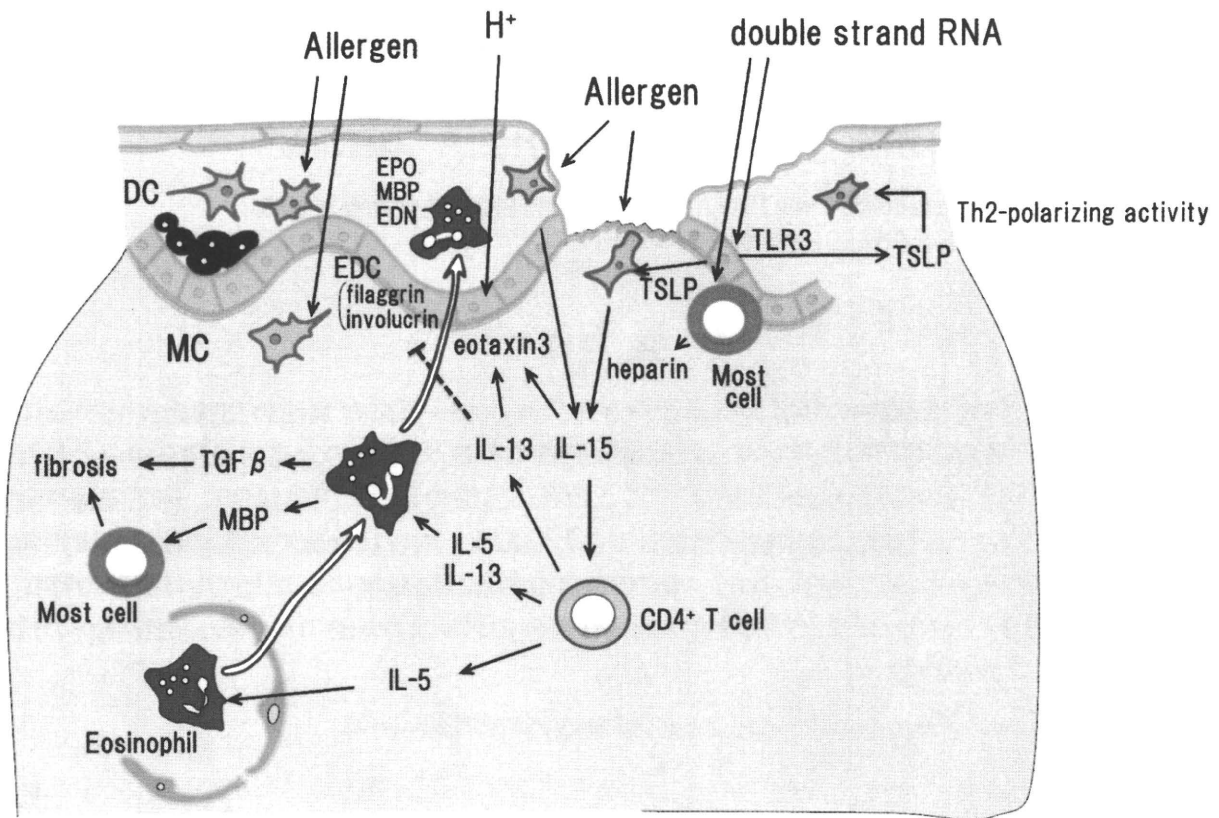


Figure 1 現在考えられている好酸球性食道炎の発症機序.

ナッツ, 魚/甲殻類などを食事から除く除去食またはアミノ酸成分栄養食に食事内容を変更すると, 小児例を中心に症状が軽快することも知られている<sup>7),8)</sup>. このため, これらの多種の食品や空気中の抗原が好酸球性食道炎の Th2 系の免疫反応の抗原となっていると考えられる.

系統的な病態の解明に向けた研究も多方面からおこなわれている. まず, 好酸球性食道炎例と健常者の食道粘膜から生検をおこない mRNA を抽出した後マイクロアレイを用いて食道粘膜に好酸球性食道炎例で高発現する遺伝子と発現が低下する遺伝子を検索している. その結果, 好酸球性食道炎例では eotaxin-3 というケモカインの発現が正常例の 50 倍以上に増加していること, filaggrin という扁平上皮の分化とともに発現するたんぱく質の遺伝子発現が 10 分の 1 に減少していることが明らかとされている<sup>9)</sup>. eotaxin-3 は, IL-5 とともに好酸球を食道上皮に浸潤させる強力なケモカインであること<sup>10)</sup>, 食道粘膜上皮中に散在する樹状細胞や単球が産生する IL-15 が Th2 免疫反応を誘導するとともに食道扁平上皮に作用して

eotaxin-3 の産生を亢進させること, IL-15 は健常者に比べて好酸球性食道炎患者の食道粘膜では産生量が 10 倍程度亢進していること<sup>11)</sup>, Th2 細胞が産生する IL-5 は好酸球の食道への浸潤を誘導するが, 同様に Th2 細胞の産生する IL-13 は好酸球性食道炎患者では食道粘膜中の濃度も血中濃度も上昇していることが明らかとされた. また増加した IL-13 は扁平上皮細胞の eotaxin-3 産生を増加させるとともに分化した扁平上皮にのみ発現する filaggrin や involucrin などの epidermal differentiation complex に関係する遺伝子発現を低下させることが示された<sup>12)~14)</sup>. これらの成績を総合すると, 食物抗原や空気中の抗原で刺激された食道粘膜上皮中の樹状細胞が, 直接に IL-15 の産生を介して, また Th2 系の免疫反応を誘導してリンパ球に IL-5, 13 を大量に産生させて食道上皮の正常な分化を阻害するとともに, eotaxin-3 の発現を刺激して食道粘膜上皮中への好酸球浸潤を促進していることが示されたことになる (Figure 1).

好酸球性食道炎では家族性発症例と散発例にお

いて病像の違いはみとめられていないが<sup>15)</sup>、家族内発症も報告されているため遺伝的な素因がありうるであろうと考えられる。遺伝的素因に関係する遺伝子を明らかとすることができれば本疾患の病態を明らかとする大きな手がかりとなるため、まず好酸球性食道炎例で食道での発現が50倍も増加している eotaxin-3 遺伝子の多型についての解析がなされた<sup>9)</sup>。その結果、eotaxin-3 遺伝子の 3'untranslated region の rs2302009 の SNP に T → G への多型があれば好酸球性食道炎の有病率が上昇すること、すなわち好酸球性食道炎例は健康者の3.6%に比べて13.7%とこのSNP部位に有意に多くのGG多型を有することが明らかとなった。

ところが、好酸球性食道炎例でも eotaxin-3 の遺伝子座にリスクを有する例はわずか13.7%であったため、他のリスク遺伝子をもとめて genome-wide association study がおこなわれ、全遺伝子をカバーする550,000のSNPsの多型と好酸球性食道炎発症の関係が検討された<sup>16)</sup>。その結果、5番染色体長腕上の5q22座に存在するSNPに有意な関与が指摘された。この部位にはWDR36とthymic stromal lymphopoietin (TSLP)という2つの遺伝子が存在しているが、好酸球性食道炎例で発現が亢進しているのはTSLPのみのためTSLPが好酸球性食道炎の発症に関与する遺伝子だろうと考えられている。TSLPは上皮細胞が産生するIL-7に似たサイトカインで、樹状細胞を活性化してTh2細胞を増加させることが知られている<sup>17),18)</sup>。このため好酸球性食道炎の発症にはTSLPを介するTh2免疫系の活性化も重要であろうと考えられる。

さらに、興味のあることにTSLPの受容体の遺伝子多型や扁平上皮の分化蛋白であるfilaggrinの遺伝子多型も、好酸球性食道炎の発症と関係するとする報告がなされている<sup>14),19)</sup>。したがって現在明らかになりつつあるTh2系の活性化とそれに続くeotaxin-3の産生や扁平上皮の分化障害が好酸球性食道炎の発症機序の重要なポイントである可能性は高いと考えられる。

このように、すべての発症機序が明らかとなったわけではないが、食物・空気中の抗原がeotaxin-3, TSLP, TSLP受容体, filaggrin等の遺伝子にリスク多型をもつ個人に作用すると、①上皮が

未熟で透過性が高くなりやすい、②強いTh2免疫反応をおこしやすい、③好酸球を呼び寄せるサイトカインが産生されやすいため、食道の局所で強いTh2免疫反応がおこって好酸球の密な食道粘膜上皮内浸潤がおこり食道の慢性炎症に発展することになるのでであろうと考えられる<sup>20)</sup>。

### III 診 断

好酸球性食道炎の診断は、食道に起因すると考えられる種々の症状がある例に上部消化管内視鏡検査をおこない、食道粘膜の生検組織中に多数の上皮内好酸球をみとめ、好酸球が増加する他疾患を除外することができれば確定することができる。以下に診断の実際を順を追って述べる。

#### 1) 患者基本情報

好酸球性食道炎は男性に多く欧米の報告では76%が<sup>1)</sup>、日本の厚生労働省研究班の調査では80%が男性であった<sup>4)</sup>。年齢は、欧米の報告では14-89歳で平均38歳と若い年代層に多い。日本で成人を対象としておこなった調査では26-79歳で平均年齢は51歳であった<sup>13),4)</sup>。本疾患の発症率は、米国での検討では1990年代前半は人口10万人あたり年間1人以下であったが、2000年代の前半では10人にまで増加しており急速に増加していると考えられている<sup>21)</sup>。また好酸球性食道炎の有病率は人口の5%に達するという報告もある<sup>22)</sup>。最近おこなわれたSystematic reviewでは人口10万人あたり30人前後(0.03%)、好酸球性食道炎を疑うような症状のある例では2.8%程度が平均的な有病率であろうとされている<sup>23)</sup>。日本でも2006年の第1例目の報告以来<sup>24)</sup>その報告例が増加してきている。

#### 2) 家族歴、既往歴

アレルギー疾患を合併している例、あるいは過去に合併していた例が欧米での調査では半数以上にあたると報告されている<sup>8),25)</sup>。日本での調査でも2009年に集積できた36例のうち44%にアレルギー疾患の合併があり、喘息は特に多く22%の例が喘息を合併していた<sup>4)</sup>。米国では家族内集積に関する報告もあり、有名なOlmstead countyでの調査では成人例の23%、小児例の38%に家族歴があると報告されている<sup>21)</sup>。日本国内での家族内集積の報告は今のところない。

#### 3) 主訴

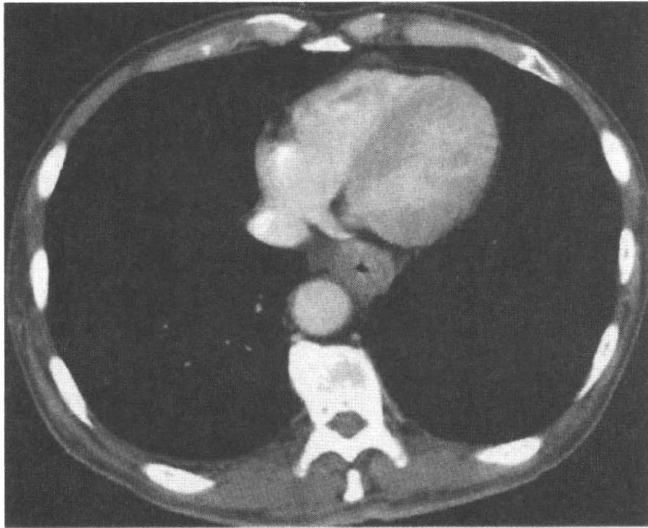


Figure 2 好酸球性食道炎例の胸部CT. 食道壁の著明な肥厚をみとめる (文献24より引用).

胸やけ、呑酸、嘔吐、嚥下困難、食物のつかえ、腹痛等の種々の症状が主訴となりうることが知られている。小児例では食べ物のつかえが主訴となることは少ないが、成人では患者の93%が嚥下障害、42%が食べ物のつかえ、38%が呑酸を訴えると欧米では報告されている<sup>1),26),27)</sup>。日本での調査でも成人では嚥下障害を訴える頻度が最も高く60%であった。

欧米で作成されている診断基準では、上記の症状が高用量のプロトンポンプ阻害薬(PPI)を用いた胃酸分泌抑制療法に反応しないことを診断に必要な項目の1つとしてあげているものが多い<sup>1),28)</sup>。これは、胃食道逆流症(GERD)例、特にmucosal breakを有しない非びらん性胃食道逆流症(NERD)例では、胸やけ、呑酸、嚥下困難等の症状を訴え内視鏡検査で食道に異常を発見することが困難であること、生検をおこなって検討するとGERD例でも食道粘膜に好酸球浸潤が存在することがあり、好酸球性食道炎とNERDの鑑別診断が時に困難であるため附加されたと考えられる診断の基準である<sup>29)~32)</sup>。好酸球性食道炎がPPI治療に反応しないことが確実であれば、この基準を用いることに問題はないが、実際にはPPIで症状が軽快する好酸球性食道炎の報告もみられる。好酸球性食道炎の発症において、食道上皮が産生するケモカインであるeotaxin-3の重要性についてはすでに解説したが、pH4程度の酸性条件下ではIL-13で刺激をした時に食道上皮細胞か

らのeotaxin-3の遊離が増加することが分かっている<sup>14)</sup>。健常者でさえ胃酸は食道内に短時間逆流している。そこで好酸球性食道炎例にPPIを投与すると食道内への生理的範囲の胃酸の逆流が減少し、eotaxin-3の遊離も減少して好酸球性食道炎の病理像および症状が軽快することが推定される。このため、PPIを投与することで症状が軽快しても、それだけで好酸球性食道炎を否定することは、必ずしも容易ではないと判断する方が正しいと考えられる。

#### 4) 血液検査

血液検査をおこなうと末梢血中での好酸球増加は、成人では10-50%、小児では20-100%の間でみとめると報告されている。日本の調査では、好酸球性食道炎例のうちに末梢血好酸球増加をみとめる例は約30%で、好酸球性胃腸炎例の90%と比較して低頻度であった<sup>4)</sup>。

末梢血中のIgEも70%の例で高値を示すと報告されている。ところが、末梢血中の好酸球もIgEも血液データのみで好酸球性食道炎の診断をおこなったり、病勢を判定するには感度や特異度に問題があり参考データと考えられる。そこで、末梢血中のeotaxin-3や好酸球由来のeosinophil-derived neurotoxinの測定をおこなって好酸球性食道炎の診断マーカーとしようとするところみもおこなわれている<sup>30),33)</sup>。

#### 5) 食道レントゲン検査、CT検査

胸やけや呑酸が主訴となっている場合にはまずGERDの存在が疑われる。GERDの診断には食道レントゲン検査の有用性は低いため、本検査がおこなわれることは少ない。ところが、嚥下障害を訴える例や小児例では食道レントゲン造影検査がおこなわれることもある。レントゲン検査では、食道の狭窄やその口側の拡張が描出されることがあり、狭窄の様子が1-2mmの輪状の多発性狭窄となる場合がある<sup>28),34)</sup>。またCT検査をおこなえば食道壁の肥厚を同定することが可能であり<sup>35)</sup>、日本における研究班の集計でも好酸球性食道炎例の64%において食道壁の肥厚が同定されている(Figure 2)<sup>4)</sup>。

#### 6) 内視鏡検査

内視鏡検査では種々の食道粘膜の異常が報告されており、117例(9例が小児で、108例が成人)の好酸球性食道炎の内視鏡像を集計したMüller S

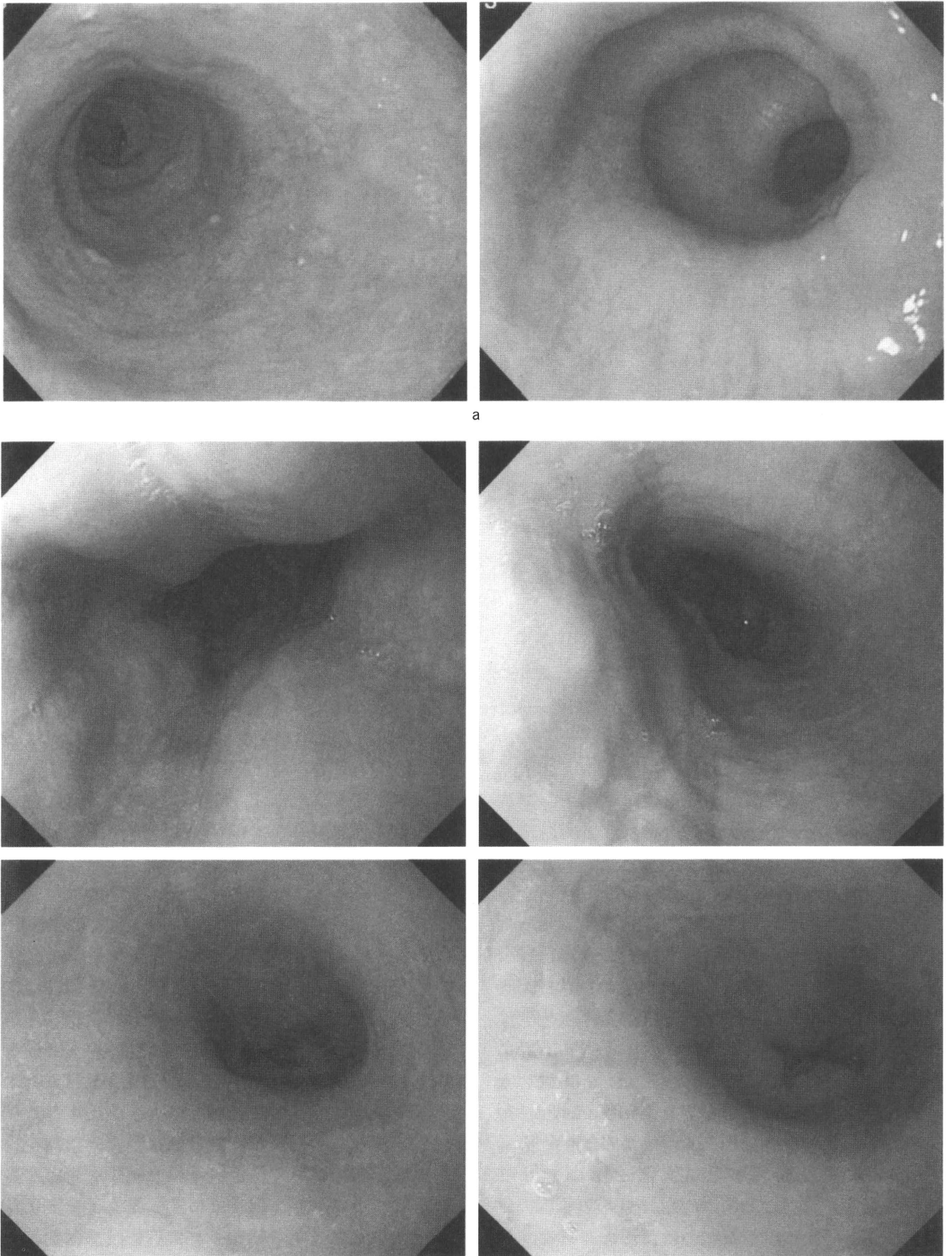


Figure 3 好酸球性食道炎例の食道内視鏡写真。  
a：日本で第1例目の食道内視鏡像。白斑と多発の輪状狭窄をみとめる（文献24より引用）。  
b：最近経験した別の好酸球性食道炎例の食道内視鏡像。縦走溝をみとめる。

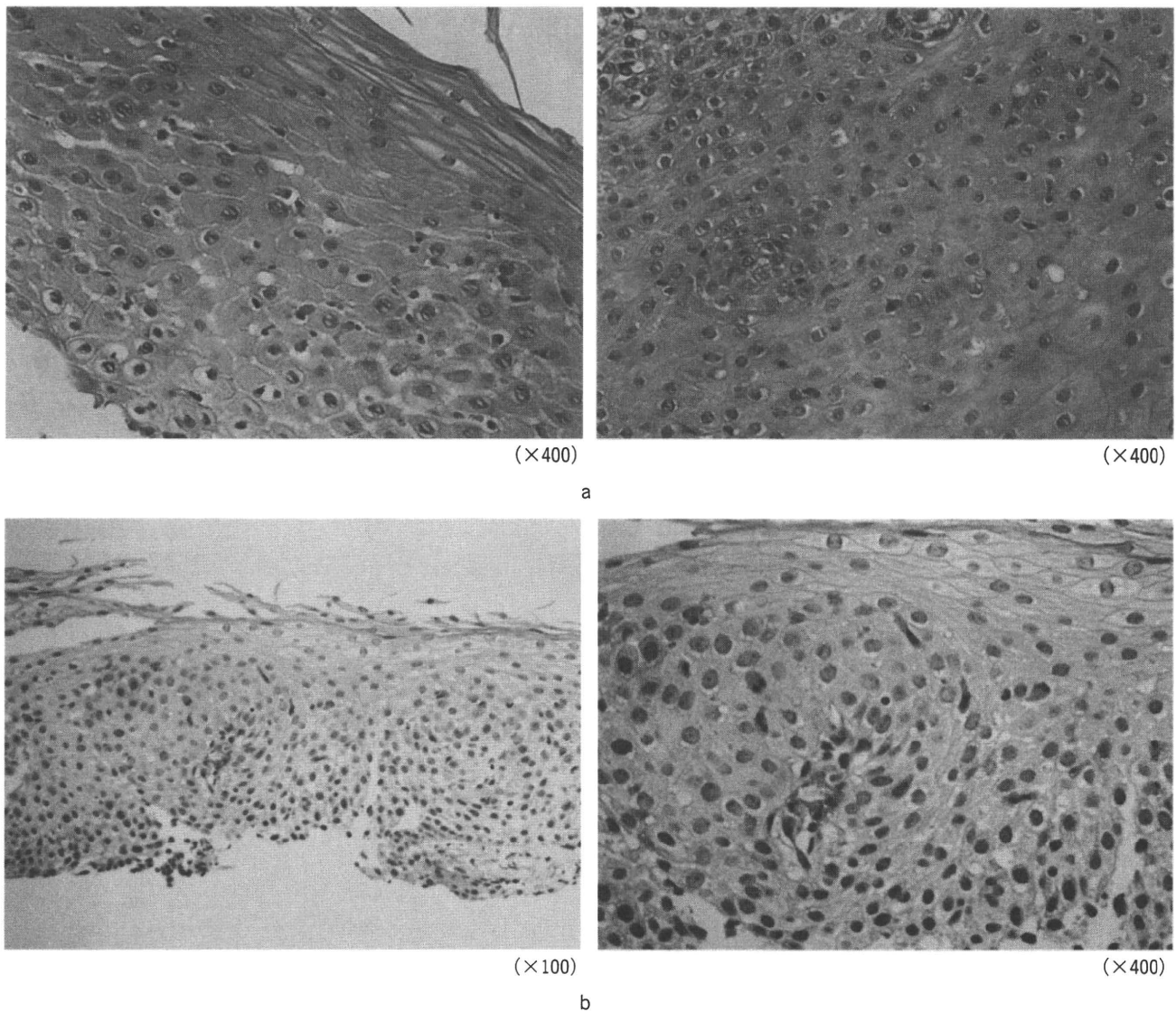


Figure 4 好酸球性食道炎例の食道生検組織像。

a：日本での第1例目の食道粘膜生検組織。1視野（HPF）あたり20個以上の上皮内好酸球をみとめる（文献24より引用）。

b：最近経験した別の好酸球性食道炎例の食道粘膜生検組織。

らの報告によると、26%の例に白色の点状浸出物の附着、26%に縦走する溝状裂孔、26%に発赤、19%に輪状の狭窄、16%に局在性の狭窄、15%にしわ状パターンを示す食道粘膜、14%にcobble stone-likeのパターンを示す食道粘膜、14%に肉芽、10%になだらかな凹凸を有する粘膜、7%に血管透視の不良、4%に長い狭窄、2%にscarがみられたとされている<sup>27)</sup>。ただし、彼らの報告によると25%の例では内視鏡検査で異常を発見することができなかつたとされており、内視鏡検査で好酸球性食道炎を疑うことはできるが好酸球性食道炎の存在を否定をすることはできないことが分かる<sup>36)</sup>。さらに、生検をおこなうと食道粘膜が薄

く、クレープのように広い範囲にわたってはがれることが特徴の1つであるとする報告もみられる<sup>37)</sup>。日本での集計でも内視鏡像では、白斑が最も多く次いで縦走する溝状の陥凹が多く観察されている（Figure 3）。

内視鏡検査の感度は十分ではないため、内視鏡検査が正常であっても好酸球性食道炎を否定することはできないが、特異度に関しても十分ではなく好酸球性食道炎で観察される内視鏡像は他の疾患においても観察される像である。実際、白斑を食道カンジダ症と考え、好酸球性食道炎の診断に至るまでに長期を要した例の報告や正診されるまでGERDと診断されていた例の報告がみられ



Figure 5 生検組織採取後の好酸球性食道炎例の食道内視鏡像。粘膜の大きな欠損をみとめる (文献 24 より引用)。

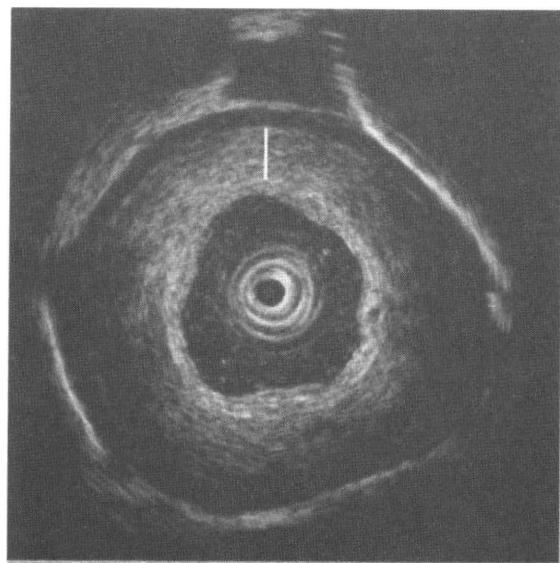


Figure 6 好酸球性食道炎例の超音波内視鏡検査。著明な食道壁の肥厚をみとめる (文献 24 より引用)。

る<sup>38),39)</sup>。

多数例を集積し、より詳細な内視鏡検査をおこなって内視鏡診断の感度と特異度を向上させていく努力が必要であろうと考えられる。

#### 7) 内視鏡下生検診断

内視鏡検査で異常が見つかる場合だけではなく内視鏡検査でまったく異常がなくても、好酸球性食道炎を疑わせる嚥下障害、胸やけ等の症状がある場合には生検をおこなうことが必要である。好酸球性食道炎例の 25-30% は内視鏡検査で異常を発見できず<sup>27)</sup>、診断のよりどころが生検診断となるため、生検をおこなっておくことが重要となる (Figure 4)。

好酸球性食道炎例の食道生検をおこなった報告では、上部食道では食道上皮内に 1-157 (平均 63.3) 個の好酸球/400 倍の高倍率視野 (HPF) をみとめ、中部食道では 3-182 (平均 62.1) 個/HPF、下部食道では 18-244 (平均 91.5) 個/HPF の好酸球がみられるとされている<sup>27)</sup>。多くの報告では有意差には至らないが下部食道の方が上部食道より浸潤好酸球数は多いと報告されている<sup>40)</sup>。好酸球性食道炎の診断確定のための食道上皮内好酸球数の算定をどのようにおこなうかについてのコンセンサスはないように思われる。20/HPF 以上の好酸球が生検組織の 1 つ以上にみられれば診断基準を満たすとするものが多いが、15/HPF~30/HPF まで報告により基準にばらつきがみられ

る<sup>1)</sup>。

1 人の患者からおこなう生検個数に関しては、診断の基準を 15/HPF 以上の食道上皮内好酸球とした場合には 1 個の生検では、生検診断の感度はわずか 55% であり、感度を 100% とするには 5 個の生検組織を採取することが必要であると報告されている<sup>40)</sup>。このため、好酸球性食道炎を疑う症状を有する例では内視鏡検査時に異常が発見されれば、その部位から、発見されなくても複数個の生検組織を採取するべきだと考えられる。特に白斑の存在部位を生検すると好酸球が上皮内に集積した eosinophilic microabscess が得られる可能性が高いとされている<sup>41)</sup>。

好酸球性食道炎例の食道上皮には多数の好酸球の浸潤以外に、eosinophilic microabscess、重層扁平上皮の内腔側に近い部分への多数の好酸球の浸潤、基底層細胞の過形成、上皮乳頭の延長などが観察される。また上皮内に好酸球とともに mast cell の浸潤が多いことも最近注目されている<sup>42)</sup>。GERD においても、これらのいくつかの特徴はみられるが、GERD 例では好酸球数が 20/HPF 以上となることはなく、好酸球の浸潤は主に上皮の基底層側で、microabscess や mast cell は見当たらないと報告されている<sup>29)</sup>。

好酸球性食道炎を疑って生検をおこなう場合には、食道粘膜が弱く傷つきやすくなっており生検で上皮が大きくはがれやすく傷が大きくなりやす

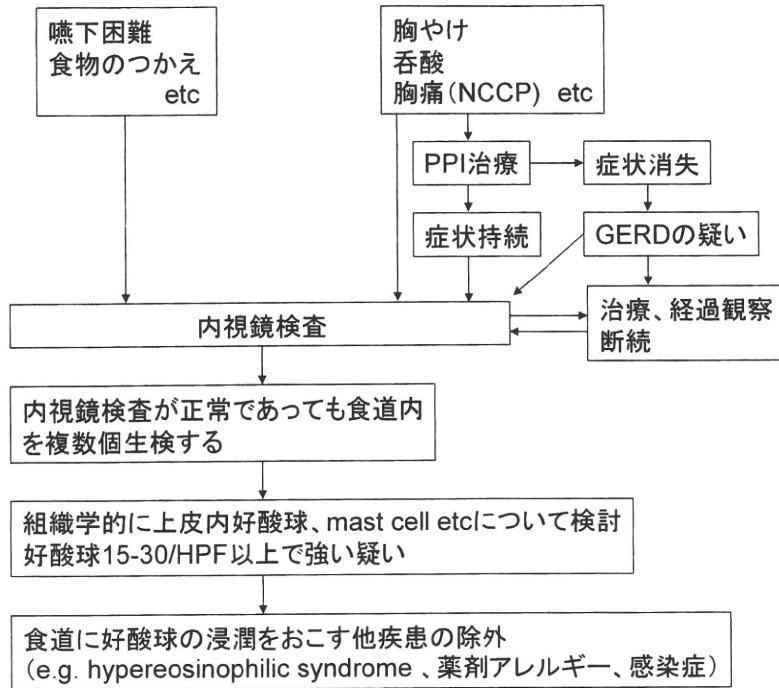


Figure 7 好酸球性食道炎の診断プロセス.

いことに気をつける (Figure 5)<sup>43)</sup>. また好酸球性胃腸炎例の数%は食道にも好酸球の浸潤をみとめる. このため好酸球性食道炎と確定診断をおこなうためには, 食道とともに, 胃, 十二指腸の生検をおこない異常な好酸球の浸潤が胃や腸にはないことを確認しておくことも重要である<sup>28)</sup>.

8) 食道内 pH モニタリング検査

成人の好酸球性食道炎例に食道内 pH モニタリング検査をおこなえば 82% の例で, 小児では 90% の例で正常であり病的酸逆流はないとの検査成績が得られると報告されている<sup>1)</sup>.

好酸球性食道炎と GERD は異なった病因・病態の疾患であり, 生検組織にも差がみられるが, 時に鑑別が困難な場合もある. 特に, IL-13 による eotaxin-3 の食道上皮細胞からの遊離が酸の存在によって亢進することを考えると<sup>14)</sup>, 好酸球性食道炎の病態と GERD の病態に一部重なりも存在することになる. このため, 好酸球性食道炎と GERD の鑑別診断が困難場合には本検査をおこなうことも考慮するべきである.

9) 食道内圧モニタリング検査

食道の内圧測定をおこない収縮能を評価すると好酸球性食道炎例の約半数で, 何らかの収縮異常がみられると報告されている<sup>44), 45)</sup>. 異常としては食道体部の蠕動性収縮運動の異常が最も多く, 次

いで下部食道括約筋収縮圧の低下が多い. 小児においては, このような食道収縮能の低下は報告されておらず, 収縮能障害は粘膜の慢性炎症に起因する二次的な変化である可能性が高く食道内圧検査の診断上の役割りは大きくないと考えられている<sup>1)</sup>.

10) 超音波内視鏡検査

食道内の high-resolution の超音波内視鏡検査をおこなって, 食道壁の肥厚部位を検討した報告がなされている (Figure 6). この報告によると食道の粘膜と粘膜下層に炎症に起因する著名な肥厚がみとめられ, これが食道壁全体の肥厚の主要因であろうとされている. また筋層が肥厚している例もあり, 食道の平滑筋の収縮トーンの上昇のために食道の筋層が厚く描出されているのであろうと考えられている<sup>35)</sup>. ただ一般の診療には超音波内視鏡検査の必要性はないと考えられている.

11) 全体の診断のプロセス (Figure 3)

好酸球性食道炎の診断には, まず症状から好酸球性食道炎の存在を疑うことから始まる. PPI 治療抵抗性の NERD は好酸球性食道炎の存在可能性が高い集団と考えられる<sup>46)</sup>. これらの例に内視鏡検査をおこなって特徴的な異常を見つけるとともに, 異常を発見できなくても複数個の食道粘膜の生検と, 胃, 十二指腸の生検をおこなう. 食

Table 1 好酸球性食道炎の診断指針 (案).

1. 症状 (嚥下障害, つかえ感等) を有する.
2. 食道粘膜の生検で上皮内に 20/HPF 以上の好酸球が存在している.  
(生検は食道内の数カ所を行うことが望ましい)
3. 内視鏡検査で食道内に白斑, 縦走溝, 気管様狭窄を認める.
4. CT スキャンまたは超音波内視鏡検査で食道壁の肥厚を認める.
5. 末梢血中に好酸球増多を認める.
6. 男性
7. プロトンポンプ阻害薬は無効でグルココルチコイド製剤が有効である.

1と2は必須 これら以外の他の項目も満たせば可能性が高くなる.

道上皮内に好酸球がみられる場合には, 好酸球の集積部位, mast cell の存在についても検討をおこなう. 好酸球が 15-30/HPF 以上存在し, 好酸球の食道内浸潤を引き起こす他の疾患を否定すれば診断が確定することになる (Figure 7). Table 1 に厚生労働省研究班で作成した診断の指針の案を示すので参考にさせていただきたい<sup>4)</sup>.

#### IV 治療

好酸球性食道炎例の長期経過についていくつかの報告がなされており, 共通した結論は好酸球性食道炎は短時間で治癒する急性疾患ではなく, 何年にもわたって炎症が持続する慢性疾患であるという点である<sup>1)</sup>. 実際, ヨーロッパで 30 例の成人例を 11 年間経過観察した報告でも, 炎症とそれに起因する症状が持続することが示されている<sup>47)</sup>. 長期経過例の半数以上に食道の種々のタイプの狭窄が発生すると報告されており, 症状を消失させるためだけでなく長期経過後の食道狭窄を予防するためにも治療介入が必要となる.

好酸球性食道炎に対して, 有効性が十分に確立した治療法が存在するわけではない. 炎症を抑制して症状を軽快させることができる治療法は存在するが, 本疾患の長期予後を改善することができるか否かについてはどの治療法にも十分なエビデンスはない.

##### 1) 胃酸分泌抑制方法

好酸球性食道炎と GERD の鑑別のために, PPI 治療抵抗性であることを必須項目とする診断基準もあり, 診断を確立させるためにも用いられることが多い. また, 診断が確立した好酸球性食道炎においても, 食道運動能が低下して GERD を合併した場合の治療や IL-13 刺激に対する eotaxin-3

の遊離を少なくして好酸球の浸潤を低下させることを目的として用いられることがある. ただし, PPI は好酸球性食道炎のあくまでも補助的な治療薬である<sup>1),28)</sup>.

##### 2) グルココルチコイド

グルココルチコイドは好酸球やリンパ球にアポトーシスを誘導したり, 炎症を抑制して好酸球性食道炎の慢性炎症を抑制することが期待される. 最初はグルココルチコイドの全身投与がプレドニゾロン 1-2 mg/kg/day を用いておこなわれ, 有効性は明らかであったが, 最近ではより副作用の少ない局所作用ステロイドの局所投与が主に用いられるようになってきた<sup>41),48)~50)</sup>. 局所ステロイドとしては, fluticasone, budesonide が主に用いられ, これらを口腔内に投与した後にゆっくり嚥下させ, 食道粘膜に作用させる. これらのグルココルチコイドは吸収されれば急速に肝臓で分解されるため全身的な副作用は多くはない. 成人なら fluticasone や budesonide を 880-1,760 μg/day の量で数回に分割して食道粘膜に局所投与する. このようなグルココルチコイドの局所投与は全身投与と同程度に有用であるが, 食道内局所投与用の薬剤がなく喘息用の吸入用製剤が流用されている点に今後の改善点があると考えられる.

グルココルチコイドは投薬中は有効であるが, その中止に伴って数カ月以内に半数以上の例で症状の再発が出現する. このような例にはアザチオプリンや 6-MP が有効であるとする報告もある<sup>51)</sup>.

##### 3) 開発中の治療

ロイコトリエンの受容体拮抗薬や TNF $\alpha$  の中和抗体が検討されたこともあるが, 好酸球性食道炎の病態を考えると, 現在, 欧米で盛んに検討が

おこなわれている抗 IL-5 中和抗体製剤に期待がもてると考えられる。実際、抗 IL-5 抗体は食道への好酸球の浸潤を減少させることが報告されている<sup>52),53)</sup>。

#### 4) 食事療法

食事療法は①抗原として疑われる食品を個々の患者で調べて除く方法、②一般的にアレルゲンとなりやすい食品を除く方法、③アミノ酸成分栄養とする方法の3タイプがおこなわれている。

抗原として疑わしい食品を選び出すために radioallergosorbent testing (RAST) が用いられたが、このテストだけでは正確に抗原を検出することが困難であることが分かり、最近の報告では、これに加えて skin prick test や skin patch test を加えて判断されることが多い<sup>4)</sup>。本法を用いて抗原として疑わしい食品を除いた食事療法をおこなうと 77% の例で症状や組織像の改善がみられるとする報告がおこなわれている<sup>54)</sup>。

アレルゲンテストをおこなわずに一般的にアレルゲンとなりやすい食品 6 種(乳製品, 卵, 小麦, ピーナッツ, 魚, 貝, 甲殻類)を、除いた食事を指導することで、症状の改善をおこなおうとする治療は広くおこないやすい食事療法である。本法を用いた検討では 74% の例で症状および組織学的な改善がみとめられたと報告されている<sup>55)</sup>。

アミノ酸成分栄養食は、小児では有効性が非常に高く 90% 以上の例で有効であると報告されている。効果のある例では 1 週間程度で症状が軽快し 4-5 週間で食道粘膜の好酸球の浸潤が消失するとされている<sup>56)</sup>。症状が消失し組織学的な異常が改善した後に、食品を選択しつつ一般食を再開していく治療がおこなわれることが多い。

#### 5) 食道狭窄のバルーン拡張術

好酸球性食道炎のために食道の狭窄がおこり食べ物のつかえや嚥下障害が出現している例に対してはバルーン拡張術がおこなわれている<sup>57)</sup>。バルーン拡張術を治療のプロセスの中でどの時点でおこなうかについては十分なエビデンスがあるわけではない。食事療法やグルココルチコイドを用いた治療をおこなって症状が軽快しない場合に拡張術をおこなうべきとする意見が多くを占めている。好酸球性食道炎例の食道粘膜は傷つきやすく<sup>58),59)</sup>、バルーン拡張に伴って穿孔のおこるリスクが高いとする報告があり、バルーン拡張にはよ

り慎重な適応基準を用いるべきであるとする意見もある。一方、エビデンスがあるわけではないが、グルココルチコイドの使用で食道壁の抵抗性が低下することを懸念して、狭窄が存在する場合には初期のうちにバルーン拡張をおこなうべきとする意見や、好酸球性食道炎例のバルーン拡張術の穿孔リスクは他疾患と比べて特に高いものではないとする意見もある<sup>60)</sup>。

一般的には、まず食事療法や薬物療法をおこない、その後必要に応じてバルーン拡張術をおこなうことが推奨されている。

## V おわりに

このように、好酸球性食道炎の研究は 30 年前にスタートし、最近 10 年間で目覚ましい進歩を遂げ多くの新しい事実が明らかとされてきた。ところが、本疾患の診断においても治療においても、解明すべき点、開発すべき項目が数多く残されている。まず診断においては、non-invasive な診断や病勢診断の参考となる血液等の検体検査を確立することが必要である。好酸球性食道炎と GERD の重なりについてもまだ十分解明されておらず、鑑別診断の方法を決定することが必要である。治療に関しては治療の長期成績を判定するための本疾患の natural history に関する情報が不足している。食事療法は患者の health-related quality of life (HRQOL) を低下させてしまうし、局所グルココルチコイド治療は有効性は高いが、治療中止後に大多数の例が再発してしまう。本疾患の病態にもとづく、より有効で長期予後を改善する副作用の少ない治療法を開発していくことも必要と考えられる。

## 文 献

1. Furuta GT, Liacouras CA, Collins MH et al. Eosinophilic esophagitis in children and adults: a systematic review and consensus recommendations for diagnosis and treatment. *Gastroenterology* 2007; 133: 1342-63.
2. Dobbins JW, Sheahan DG, Behar J. Eosinophilic gastroenteritis with esophageal involvement. *Gastroenterology* 1977; 72: 1312-6.
3. Picus D, Frank PH. Eosinophilic esophagitis. *AJR* 1981; 136: 1001-3.
4. 木下芳一. 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業: 好酸球性食道炎/好酸球性胃腸炎の疾患概念確立と治療指針作成のための臨床研究. 平成 21 年

- 度総括・分担研究報告書, 2010.
5. Mishra A, Hogan SP, Brandt EB et al. An etiological role for aeroallergens and eosinophils in experimental esophagitis. *J Clin Invest* 2001 ; 107 : 83-90.
  6. Mishra A, Hogan SP, Brandt EB et al. IL-5 promotes eosinophil trafficking to the esophagus. *J Immunol* 2002 ; 168 : 2464-9.
  7. Spergel JM, Beausoleil JL, Mascarenhas M et al. The use of skin prick tests and patch tests to identify causative foods in eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2002 ; 109 : 363-8.
  8. Liacouras CA, Spergel JM, Ruchelli E et al. Eosinophilic esophagitis: a 10-year experience in 381 children. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005 ; 3 : 1198-206.
  9. Blanchard C, Wang N, Stringer KF et al. Eotaxin-3 and a uniquely conserved gene-expression profile in eosinophilic esophagitis. *J Clin Invest* 2006 ; 116 : 536-47.
  10. Rothenberg ME. Biology and treatment of eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology* 2009 ; 137 : 1238-49.
  11. Zhu X, Wang M, Mavi P et al. Interleukin-15 expression is increased in human eosinophilic esophagitis and mediates pathogenesis in mice. *Gastroenterology* 2010 ; 139 : 182-93.
  12. Blanchard C, Mingler MK, Vicario M et al. IL-13 involvement in eosinophilic esophagitis: transcriptome analysis and reversibility with glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol* 2007 ; 120 : 1292-300.
  13. Zuo L, Fulkerson PC, Finkelman FD et al. IL-13 induces esophageal remodeling and gene expression by an eosinophil-independent, IL-13 R alpha 2-inhibited pathway. *J Immunol* 2010 ; 185 : 660-9.
  14. Blanchard C, Stucke EM, Burwinkel K et al. Coordinate interaction between IL-13 and epithelial differentiation cluster genes in eosinophilic esophagitis. *J Immunol* 2010 ; 184 : 4033-41.
  15. Collins MH, Blanchard C, Abonia JP et al. Clinical, pathologic, and molecular characterization of familial eosinophilic esophagitis compared with sporadic cases. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008 ; 6 : 621-9.
  16. Rothenberg ME, Spergel JM, Sherrill JD et al. Common variants at 5q22 associate with pediatric eosinophilic esophagitis. *Nat Genet* 2010 ; 42 : 289-91.
  17. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol* 2002 ; 3 : 673-80.
  18. Bogiatzi SI, Fernandez I, Bichet JC et al. Cutting Edge : Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes. *J Immunol* 2007 ; 178 : 3373-7.
  19. Sherrill JD, Gao PS, Stucke EM et al. Variants of thymic stromal lymphopoietin and its receptor associate with eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2010 ; 126 : 160-5.
  20. Blanchard C, Rothenberg ME. Basic pathogenesis of eosinophilic esophagitis. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2008 ; 18 : 133-43.
  21. Prasad GA, Alexander JA, Schleck CD et al. Epidemiology of eosinophilic esophagitis over three decades in Olmsted County, Minnesota. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009 ; 7 : 1055-61.
  22. Ronkainen J, Talley NJ, Aro P et al. Prevalence of oesophageal eosinophils and eosinophilic oesophagitis in adults: the population-based Kalixanda study. *Gut* 2007 ; 56 : 615-20.
  23. Sealock RJ, Rendon G, El-Serag HB. Systematic review: the epidemiology of eosinophilic oesophagitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2010 ; 32 : 712-9.
  24. Furuta K, Adachi K, Kowari K et al. A Japanese case of eosinophilic esophagitis. *J Gastroenterol* 2006 ; 41 : 706-10.
  25. Brown-Whitehorn TF, Spergel JM. The link between allergies and eosinophilic esophagitis: implications for management strategies. *Expert Rev Clin Immunol* 2010 ; 6 : 101-9.
  26. Dellon ES, Gibbs WB, Fritchie KJ et al. Clinical, endoscopic, and histologic findings distinguish eosinophilic esophagitis from gastroesophageal reflux disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009 ; 7 : 1305-13.
  27. Müller S, Pühl S, Vieth M et al. Analysis of symptoms and endoscopic findings in 117 patients with histological diagnoses of eosinophilic esophagitis. *Endoscopy* 2007 ; 39 : 339-44.
  28. Straumann A. Eosinophilic esophagitis: a rapidly emerging disease. *Esophagus* 2008 ; 5 : 177-83.
  29. Genevay M, Rubbia-Brandt L, Rougemont AL. Do eosinophil numbers differentiate eosinophilic esophagitis from gastroesophageal reflux disease? *Arch Pathol Lab Med* 2010 ; 134 : 815-25.
  30. Bhattacharya B, Carlsten J, Sabo E et al. Increased expression of eotaxin-3 distinguishes between eosinophilic esophagitis and gastroesophageal reflux disease. *Hum Pathol* 2007 ; 38 : 1744-53.
  31. Lewis CJ, Lamb CA, Kanakala V et al. Is the etiology of eosinophilic esophagitis in adults a response to allergy or reflux injury? Study of cellular proliferation markers. *Dis Esophagus* 2009 ; 22 : 249-55.
  32. Kirsch R, Bokhary R, Marcon MA et al. Activated mucosal mast cells differentiate eosinophilic (allergic) esophagitis from gastroesophageal reflux disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007 ; 44 : 20-6.
  33. Konikoff MR, Blanchard C, Kirby C et al. Potential of blood eosinophils, eosinophil-derived neurotoxin, and eotaxin-3 as biomarkers of eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006 ; 4 :

- 1328-36.
34. Zimmerman SL, Levine MS, Rubesin SE et al. Idiopathic eosinophilic esophagitis in adults: the ringed esophagus. *Radiology* 2005 ; 236 : 159-65.
  35. Fox VL, Nurko S, Teitelbaum JE et al. High-resolution EUS in children with eosinophilic "allergic" esophagitis. *Gastrointest Endosc* 2003 ; 57 : 30-6.
  36. Straumann A, Beglinger C. Eosinophilic esophagitis: the endoscopist's enigma. *Gastrointest Endosc* 2006 ; 63 : 13-5.
  37. Moawad FJ, Veerappan GR, Wong RK. Eosinophilic esophagitis. *Dig Dis Sci* 2009 ; 54 : 1818-28.
  38. Infante JM, Lamana LF. Eosinophilic esophagitis misdiagnosed twice as esophageal candidiasis. *Gastrointest Endosc* 2010 ; 71 : 394-5.
  39. Veerappan GR, Perry JL, Duncan TJ et al. Prevalence of eosinophilic esophagitis in an adult population undergoing upper endoscopy: a prospective study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009 ; 7 : 420-6.
  40. Gonsalves N, Policarpio-Nicolas M, Zhang Q et al. Histopathologic variability and endoscopic correlates in adults with eosinophilic esophagitis. *Gastrointest Endosc* 2006 ; 64 : 313-9.
  41. Remedios M, Campbell C, Jones DM et al. Eosinophilic esophagitis in adults: clinical, endoscopic, histologic findings, and response to treatment with fluticasone propionate. *Gastrointest Endosc* 2006 ; 63 : 3-12.
  42. Abonia JP, Blanchard C, Butz BB et al. Involvement of mast cells in eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2010 ; 126 : 140-9.
  43. Furuta GT, Straumann A. Review article: the pathogenesis and management of eosinophilic oesophagitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006 ; 24 : 173-82.
  44. Lucendo AJ, Castillo P, Martín-Chávarri S et al. Manometric findings in adult eosinophilic oesophagitis: a study of 12 cases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007 ; 19 : 417-24.
  45. Korsapati H, Babaei A, Bhargava V et al. Dysfunction of the longitudinal muscles of the oesophagus in eosinophilic oesophagitis. *Gut* 2009 ; 58 : 1056-62.
  46. Poh CH, Gasiorowska A, Navarro-Rodriguez T et al. Upper GI tract findings in patients with heartburn in whom proton pump inhibitor treatment failed versus those not receiving antireflux treatment. *Gastrointest Endosc* 2010 ; 71 : 28-34.
  47. Straumann A, Spichtin HP, Grize L et al. Natural history of primary eosinophilic esophagitis: a follow-up of 30 adult patients for up to 11.5 years. *Gastroenterology* 2003 ; 125 : 1660-9.
  48. Lucendo AJ, Pascual-Turrión JM, Navarro M et al. Endoscopic, bioptic, and manometric findings in eosinophilic esophagitis before and after steroid therapy: a case series. *Endoscopy* 2007 ; 39 : 765-71.
  49. Konikoff MR, Noel RJ, Blanchard C et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fluticasone propionate for pediatric eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology* 2006 ; 137 : 1381-91.
  50. Dohil R, Newbury R, Fox L et al. Oral viscous budesonide is effective in children with eosinophilic esophagitis in a randomized, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2010 ; 139 : 418-29.
  51. Netzer P, Gschossman JM, Straumann A et al. Corticosteroid-dependent eosinophilic oesophagitis: azathioprine and 6-mercaptopurine can induce and maintain long-term remission. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007 ; 19 : 865-9.
  52. Stein ML, Collins MH, Villanueva JM et al. Anti-IL-5 (mepolizumab) therapy for eosinophilic esophagitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006 ; 118 : 1312-9.
  53. Straumann A, Conus S, Grzonka P et al. Anti-interleukin-5 antibody treatment (mepolizumab) in active eosinophilic oesophagitis: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. *Gut* 2010 ; 59 : 21-30.
  54. Spergel JM, Andrews T, Brown-Whitehorn TF et al. Treatment of eosinophilic esophagitis with specific food elimination diet directed by a combination of skin prick and patch tests. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005 ; 95 : 336-43.
  55. Kagalwalla AF, Sentongo TA, Ritz S et al. Effect of six-food elimination diet on clinical and histologic outcomes in eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006 ; 4 : 1097-102.
  56. Markowitz JE, Spergel JM, Ruchelli E et al. Elemental diet is an effective treatment for eosinophilic esophagitis in children and adolescents. *Am J Gastroenterol* 2003 ; 98 : 777-82.
  57. Nurko S, Teitelbaum JE, Husain K et al. Association of Schatzki ring with eosinophilic esophagitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004 ; 38 : 436-41.
  58. Cohen MS, Kaufman AB, Palazzo JP et al. An audit of endoscopic complications in adult eosinophilic esophagitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007 ; 5 : 1149-53.
  59. Kaplan M, Mutlu EA, Jakate S et al. Endoscopy in eosinophilic esophagitis: "feline" esophagus and perforation risk. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003 ; 1 : 433-7.
  60. Jacobs JW Jr, Spechler SJ. A systematic review of the risk of perforation during esophageal dilation for patients with eosinophilic esophagitis. *Dig Dis Sci* 2010 ; 55 : 1512-5.

## DIAGNOSIS AND TREATMENT OF EOSINOPHILIC ESOPHAGITIS

Yoshikazu KINOSHITA<sup>1)</sup>, Shunji ISHIHARA<sup>1)</sup>, Yuji AMANO<sup>2)</sup>  
AND Hirofumi FUJISHIRO<sup>3)</sup>

1) *Department of Gastroenterology and Hepatology, Shimane University School of Medicine, Izumo.*

2) *Division of Endoscopy, Shimane University Hospital, Izumo.*

3) *Division of Endoscopy, Shimane Prefectural Central Hospital, Izumo.*

Eosinophilic esophagitis is a rare type of esophageal disease that features dense intra-epithelial infiltration by eosinophils, which is caused by an allergic reaction to food or aeroallergens. Chronic eosinophil-related inflammation causes edema and fibrosis in the esophageal submucosal layer, while abnormal esophageal motor activity and fibrosis-related esophageal stenosis result in unpleasant symptoms including dysphagia and food impaction. In an endoscopic study of affected patients, longitudinal furrows, whitish stipple-like exudates, and multiple focal strictures were often found. For establishment of the diagnosis, dense infiltration of eosinophils (15-30 eosinophils/HPF) should be identified in an esophageal mucosal biopsy specimen. Local administration of glucocorticoids has recently been reported as useful first-line therapy for eosinophilic esophagitis.

TRANSLATIONAL PHYSIOLOGY

## Exacerbation of indomethacin-induced small intestinal injuries in *Reg I*-knockout mice

Hiroshi Imaoka,<sup>1</sup> Shunji Ishihara,<sup>1</sup> Hideaki Kazumori,<sup>1</sup> Yasunori Kadowaki,<sup>1</sup> Md. Monowar Aziz,<sup>1</sup> Farzana Binte Rahman,<sup>1</sup> Takayuki Ose,<sup>1</sup> Hiroyuki Fukuhara,<sup>1</sup> Shin Takasawa,<sup>2</sup> and Yoshikazu Kinoshita<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Shimane University, Faculty of Medicine, Izumo; and <sup>2</sup>Department of Biochemistry, Nara Medical University, Kashihara, Japan

Submitted 16 November 2009; accepted in final form 18 May 2010

**Imaoka H, Ishihara S, Kazumori H, Kadowaki Y, Aziz MM, Rahman FB, Ose T, Fukuhara H, Takasawa S, Kinoshita Y.** Exacerbation of indomethacin-induced small intestinal injuries in *Reg I*-knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299: G311–G319, 2010. First published May 27, 2010; doi:10.1152/ajpgi.00469.2009.—Nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-induced small intestinal injuries are serious clinical events and a successful therapeutic strategy is difficult. Regenerating gene (*Reg I*) protein functions as a regulator of cell proliferation and maintains intercellular integrity in the small intestine. The aim of this study was to evaluate the role of *Reg I* in NSAID-induced small intestinal injuries. First, to examine the effect of *Reg I* deficiency on such injuries, indomethacin, a widely used NSAID, was injected subcutaneously into 10-wk-old male *Reg I*-knockout (*Reg I*<sup>-/-</sup>) and wild-type (*Reg I*<sup>+/+</sup>) mice twice with an interval of 24 h, after which the mice were euthanized. Small intestinal injuries were assessed by gross findings, histopathology, and contents of IL-1 $\beta$  and MPO in the experimental tissues. Next, we investigated the therapeutic potential of *Reg I* in indomethacin-induced small intestinal injuries. Recombinant *Reg I* protein (r*Reg I*) was administered to 10-wk-old male ICR mice, then indomethacin was administered 6 h using the same protocol as noted above, after which small intestinal injuries were assessed after euthanasia. Our results showed that *Reg I*<sup>-/-</sup> mice had a greater number of severe small intestinal lesions after indomethacin administration. Histological examinations of the small intestines from those mice revealed deep ulcers with prominent inflammatory cell infiltration, whereas the mucosal content of proinflammatory agents was also significantly increased. In addition, r*Reg I* administration inhibited indomethacin-induced small intestinal injuries in ICR mice. In conclusion, *Reg I* may be useful as a therapeutic agent in NSAID-induced small intestinal injuries.

nonsteroidal anti-inflammatory drug; regenerating gene product I; intestinal permeability

NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS (NSAIDs) are known to damage the upper gastrointestinal (GI) tract as a serious adverse event (1). Recent advances in diagnostic methods, including double-balloon endoscopy (DBE) and capsule endoscopy (CE), enable examination of the entire small intestine (28, 44). Studies using these techniques have shown that the prevalence of small bowel mucosal breaks in patients receiving NSAIDs is higher than that reported previously (13, 26, 27). Although the clinical importance of NSAID-induced small

intestinal injuries has been acknowledged, suitable therapeutic strategies have not been sufficiently established. Recently, animal models with NSAID-induced small intestinal injuries have been successfully employed to reveal the mechanisms of NSAID-mediated tissue damage, as well as to delineate the effectiveness of several essential endogenous and exogenous factors for therapy (32, 49). However, owing to the complex mechanism of small intestinal damage induced by NSAIDs, a successful therapeutic strategy has not been clearly established.

The regenerating gene (*Reg*) was originally isolated from rat regenerating pancreatic islets in 1988. *Reg I* (regenerating product I), one of four *Reg* subfamilies (14, 29, 30), is expressed in the GI tract of various species and plays important roles not only in regeneration but also in proliferation, inflammation, and carcinogenesis (36, 48). We previously found that *Reg I* is a potent regulator of cell growth that is required to generate and maintain the villous structure of the small intestine (31). These findings suggest that *Reg I* may be important for establishment of new therapeutic strategies for NSAID-induced small intestinal injuries on the basis of its abilities to control cell proliferation, and maintain intercellular integrity and gut homeostasis. In the present study, we used *Reg I*-knockout (KO) mice to evaluate the role of *Reg I* and its therapeutic potential in NSAID-induced small intestinal injuries. Our results indicate that *Reg I* plays a key role in the pathogenesis of NSAID-induced small intestinal injuries and may be useful as a therapeutic agent.

### MATERIALS AND METHODS

**Animals.** All of the following experimental procedures were approved by the animal care committee of Shimane University Graduate School of Medicine. ICR mice (Charles River Japan, Kanagawa, Japan) were used for the experiments to evaluate *Reg I* expression in the small intestine and the efficacy of recombinant *Reg I* (r*Reg I*) in mice with indomethacin administration. *Reg I*-KO (*Reg I*<sup>-/-</sup>) mice and wild-type (*Reg I*<sup>+/+</sup>) littermates were used in the experiment to evaluate the role of *Reg I* in indomethacin-induced small intestinal injuries. The *Reg I*<sup>-/-</sup> mice were generated on an ICR background as previously described (46). All mice were housed in cages with chopped paper bedding in an air-conditioned biohazard room with a 12-h light-dark cycle and allowed access to food and water.

***Reg I* mRNA expression in small intestine of wild-type mice with indomethacin administration.** Initially, we determined the time course changes of *Reg I* mRNA expression in the small intestine of wild-type mice after administration of indomethacin. Ten-wk-old male ICR mice were injected subcutaneously twice, with a 24-h interval, with indomethacin at a dose of 80 mg/kg body wt dissolved in 5%

Address for reprint requests and other correspondence: H. Imaoka, Dept. of Gastroenterology and Hepatology, Shimane Univ., Faculty of Medicine, 89-1 Enya-cho, Izumo 693-0021, Japan (e-mail: hiroshi.imaoka.md@me.com).

Table 1. Criteria for histological damage score

	Score
Width of ulceration	
No ulcer	0
Small ulcer (<3 mm)	1
Large ulcer (>3 mm)	2
Depth of lesion	
None	0
Mucosa	1
Submucosa	2
Muscularis propria	3
Serosa	4
Inflammation	
None	0
Mild	1
Moderate	2
Severe	3
Thrombi	
No	0
Yes	1
Maximum score	10

NaHCO<sub>3</sub>. Then the mice were euthanized at 3, 6, 12, or 24 h after the last indomethacin injection, and the small intestinal mucosal layer was scraped off and stored in RNAlater (Qiagen, Tokyo, Japan). The total RNA in each sample was extracted by using ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions, and 1 µg of total RNA was reverse transcribed into cDNA by using the random primer from an affinity script QPCR cDNA synthesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). Real-time PCR was carried out in a total reaction volume of 30 µl by use of SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) and run on a StepOnePlus unit (Applied Biosystems). The primers used for transcript confirmation were as follows: Reg I (sense), 5'-ATGCCTGATCGTCCTGTCTC-3'; Reg I (anti-sense), 5'-AGATCTGCATCAGCCCAAGT-3'; GAPDH (sense), 5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3'; GAPDH (anti-sense), 5'-TG-ACCAGGCGCCCAATA-3'. Changes in Reg I mRNA expression level were calculated after normalization against GAPDH. The ratios obtained after normalization are expressed as the fold change over corresponding vehicle-treated controls.

**Evaluation of indomethacin-induced small intestinal injuries in Reg I-KO mice.** To examine the effect of Reg I deficiency on indomethacin-induced small intestinal injuries, two doses of indomethacin (80 mg/kg, dissolved in 5% NaHCO<sub>3</sub>) were subcutaneously injected into 10-wk-old male Reg I<sup>-/-</sup> mice and Reg I<sup>+/-</sup> littermates with a 24-h interval. Following the second indomethacin treatment, the mice were fasted for 24 h to empty the intestines to clearly assess macroscopic lesions after euthanasia with di-ethyl-ether inhalation. Mice injected with the vehicle alone (5% NaHCO<sub>3</sub>) served as controls. Small intestinal injuries were evaluated by assessing the area of macroscopically visible ulcers or hemorrhagic lesions, the length of the small intestine, histopathology, and production of interleukin-1β (IL-1β) and myeloperoxidase (MPO) in the experimental tissues.

**Macroscopic evaluation of small intestinal injuries.** For each experiment, the small intestines were quickly removed and opened along the antimesenteric attachment. The area (mm<sup>2</sup>) of macroscopically visible ulcers or hemorrhagic lesions that had developed in the small intestine was measured by using the image analysis software Photoshop CS3 extended (Adobe Systems, San Jose, CA) and summed per small intestine.

**Microscopic evaluation of small intestinal injuries.** For histological examinations, injured segments of the small intestine were trimmed, fixed in 10% formalin, and processed as a tissue block for histopathological evaluation by hematoxylin-eosin staining. Two observers blinded to the treatment groups independently assessed each section using an optical microscope. For this evaluation, we used a previously

proposed histological damage scoring system (38, 47). As shown in Table 1, the histological damage score included the following four factors: width of the ulceration, depth of the lesion, degree of inflammatory infiltrate, and presence of thrombi.

**Inflammatory parameters of small intestinal injuries.** For assessment of proinflammatory agents, production of IL-1β and MPO in the experimental tissues was measured by enzyme immunoassay (EIA). First, the small intestinal mucosal layer was scraped off, weighed, and ground with liquid nitrogen-chilled mortar and pestles. The tissue was then completely lysed with 200 µl of lysis buffer (200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% glycine, 1 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptide, and 28 µg/ml aprotinin) for every 10 mg of tissue. Tissue lysates were centrifuged at 13,000 rpm at 4°C for 20 min and the supernatants were stored at -70°C until being assayed. The amounts of IL-1β and MPO were assessed by using EIA kits for IL-1β (R&D Systems, Minneapolis, MN) and MPO (Hycult Biotechnology, Uden, Netherlands), respectively.

**Therapeutic efficacy of recombinant Reg I protein in indomethacin-induced small intestinal injuries.** The therapeutic potential of Reg I was assessed by administration of recombinant Reg I protein (rReg I). Briefly, rReg I was prepared using a mammalian expression system in

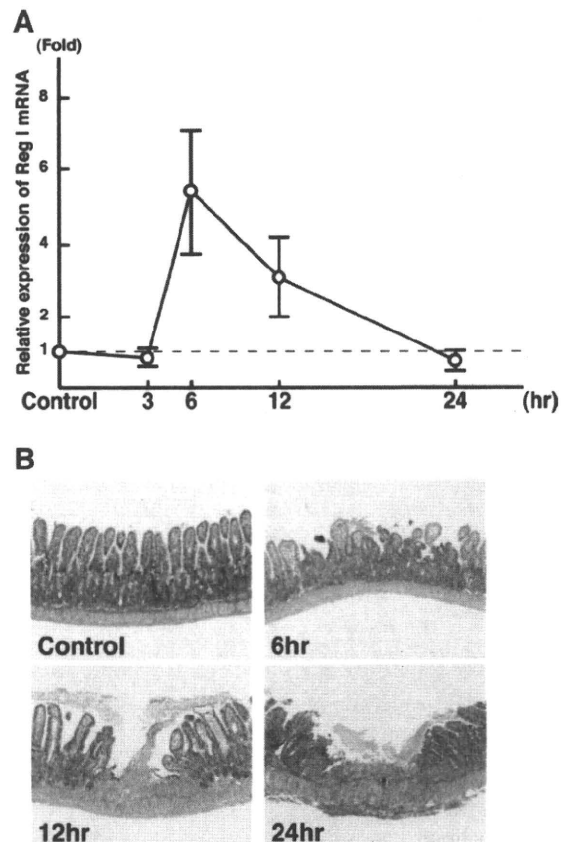


Fig. 1. Regenerating gene (Reg I) mRNA expression and histological findings in wild-type mice with indomethacin-induced small intestinal injuries. Ten-week-old male ICR mice were injected subcutaneously twice with indomethacin, with a 24-h interval, then 24 h after the last indomethacin injection the small intestines were dissected. A: time course changes of Reg I mRNA expression in the small intestines of wild-type mice after second injection of indomethacin. Total RNA was extracted from each small intestine sample and Reg I mRNA expression was evaluated by real-time PCR. Error bars indicate the standard error of mean values. B: representative histological images of small intestine samples from the experimental mice (hematoxylin-eosin, original magnification  $\times 40$ ).

our laboratory as described previously (16) and was diluted in distilled water. The rReg I solution or vehicle (distilled water) was injected into 10-wk-old male ICR mice at a dose of 500 ng/body into the lateral tail vein. Six hours after rReg I administration, indomethacin or the vehicle (5% NaHCO<sub>3</sub>) was injected subcutaneously twice, with a 24-h interval, at a dose of 80 mg/kg of body wt dissolved in 5% NaHCO<sub>3</sub>. Twenty-four hours after the last indomethacin injection, the animals were euthanized and small intestinal injuries were assessed with respect to the area of macroscopically visible ulcers or hemorrhagic lesions, the length of the small intestine, histopathology, and production of IL-1 $\beta$  and MPO in the experimental tissues.

**Effect of rReg I protein on IL-1 $\beta$  production by macrophages.** To evaluate the effect of rReg I protein on IL-1 $\beta$  production, an *in vitro* system was established. The mouse macrophage cell line RAW264.7 was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and grown in Dulbecco's modified Eagle medium (Invitrogen, CA), supplemented with 10% fetal bovine serum (ICN Biomedicals, Aurora, OH) and penicillin-streptomycin-amphotericin B (In-

vitrogen). Cells were cultured in 24-well plates (5 x 10<sup>4</sup> cells/well) pretreated with Reg I protein (1 ng/ml) for 6 h, then stimulated with lipopolysaccharide (LPS; 100 ng/ml) (Invivogen) for 24 h. IL-1 $\beta$  contents in the cell culture supernatants were determined by using an IL-1 $\beta$  EIA kit (R&D Systems).

**Statistical analysis.** All values represent means  $\pm$  SE. Since all data had statistically nonnormal distributions, nonparametric statistical methods were used to analyze the data. Comparisons between two groups were made by a Mann-Whitney *U*-test. A *P* value of <0.05 was considered to be statistically significant and all *P* values are two sided. Data were analyzed via statistical software IBM SPSS Statistics for Macintosh version 18.0 (SPSS, Chicago, IL).

## RESULTS

**Increased Reg I expression in the small intestine of wild-type mice after indomethacin administration.** First, we examined the time course of changes in Reg I mRNA expression in the

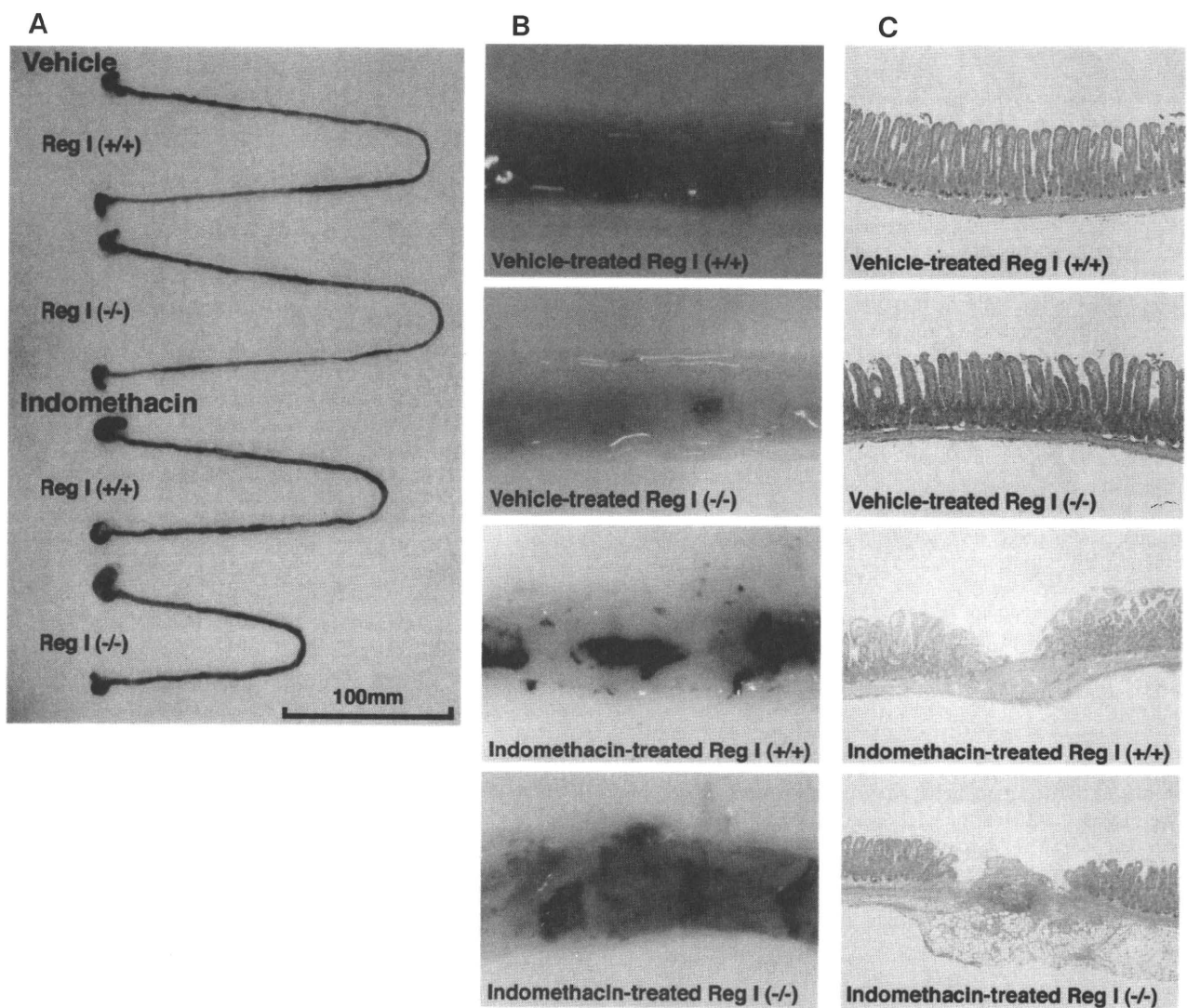


Fig. 2. Representative images of small intestines dissected from Reg I<sup>-/-</sup> and Reg I<sup>+/+</sup> mice at 24 h after the last injection of indomethacin or the vehicle. Ten-week-old male Reg I<sup>-/-</sup> mice and Reg I<sup>+/+</sup> littermates were injected subcutaneously twice with indomethacin, with a 24-h interval, then 24 h after the last indomethacin injection the small intestines were dissected. A: gross findings of small intestines. B: macroscopically visible injured lesions. C: histological findings (hematoxylin-eosin, original magnification  $\times$ 40).

small intestines of wild-type mice and compared these with microscopic findings to clarify the pattern of Reg I expression in indomethacin-induced small intestinal injuries. A single dose of indomethacin treatment was not adequate to create significant injuries in the intestinal mucosa (data not shown); thus we gave two doses of indomethacin with a 24-h interval and noted that Reg I mRNA expression rapidly increased and peaked at 6 h after the second indomethacin injection, followed by a gradual decline toward a normal level (Fig. 1A).

Similar to the findings noted above, histological assessment did not reveal any significant damage in the intestinal tissues after the first dose of indomethacin (data not shown), whereas those were clearly distinguished as early as 6 h after the second injection, and the small intestinal mucosa showed an altered villous morphology with disarrangement. Mucosal damage was maximal at 12 h and histopathological examination showed development of small intestinal ulcers (Fig. 1B). These results indicate that after indomethacin administration, the expression of Reg I mRNA is upregulated in the early phase of small intestinal injuries, followed by the development of small intestinal ulcers.

**Exacerbation of indomethacin-induced small intestinal injuries in Reg I-KO mice.** On the basis of speculation that upregulated-Reg I plays some role in the pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal injuries, we administered indomethacin to both *Reg I*<sup>+/+</sup> and *Reg I*<sup>-/-</sup> mice. Figure 2, A–C, shows representative pictures of small intestines dissected from the experimental mice at 24 h after the last injection of indomethacin or the vehicle. The small intestines of the indomethacin-treated mice were filled with melena, and the length of the small intestine in the indomethacin-treated *Reg I*<sup>-/-</sup> mice was significantly shorter than that in the indomethacin-treated *Reg I*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 3A;  $P < 0.01$ ). Administration of indomethacin provoked lesions in the small intestine, whereas both vehicle-treated *Reg I*<sup>-/-</sup> and *Reg I*<sup>+/+</sup> mice had no small intestinal lesions (Fig. 2B). The area of macroscopically visible lesions in the *Reg I*<sup>-/-</sup> mice was significantly greater than that in the *Reg I*<sup>+/+</sup> mice at 24 h after the last injection of indomethacin (Fig. 3B;  $P < 0.01$ ). Histological examinations revealed deep ulcers with prominent inflammatory cell infiltration and vascular thrombosis present in both *Reg I*<sup>+/+</sup> and *Reg I*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2C). However, this trend was more conspicuous in *Reg I*<sup>-/-</sup> mice, and the histological damage scores of indomethacin-treated *Reg I*<sup>-/-</sup> mice were significantly higher than those of *Reg I*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 3C;  $P < 0.05$ ). In contrast, histological examinations showed no active inflammation in either vehicle-treated *Reg I*<sup>-/-</sup> or *Reg I*<sup>+/+</sup> mice.

Since the scores assessed by histopathological examinations were significantly different between *Reg I*<sup>-/-</sup> and *Reg I*<sup>+/+</sup> mice, we further evaluated the expression of proinflammatory cytokines and MPO in the small intestine samples obtained from indomethacin- or vehicle-treated mice. Twenty-four hours after the second indomethacin injection, both IL-1 $\beta$  and MPO contents in the mucosa were significantly higher in *Reg I*<sup>-/-</sup> mice than in *Reg I*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 3, D and E;  $P < 0.05$ ), whereas, as expected, those were unchanged in vehicle-treated mice. These findings suggest that Reg I may play a protective role in indomethacin-induced small intestinal injuries.

**Inhibitory effect of rReg I on indomethacin-induced small intestinal injuries.** On the basis of the above experiments using *Reg I*-KO mice, we speculated that rReg I administration might

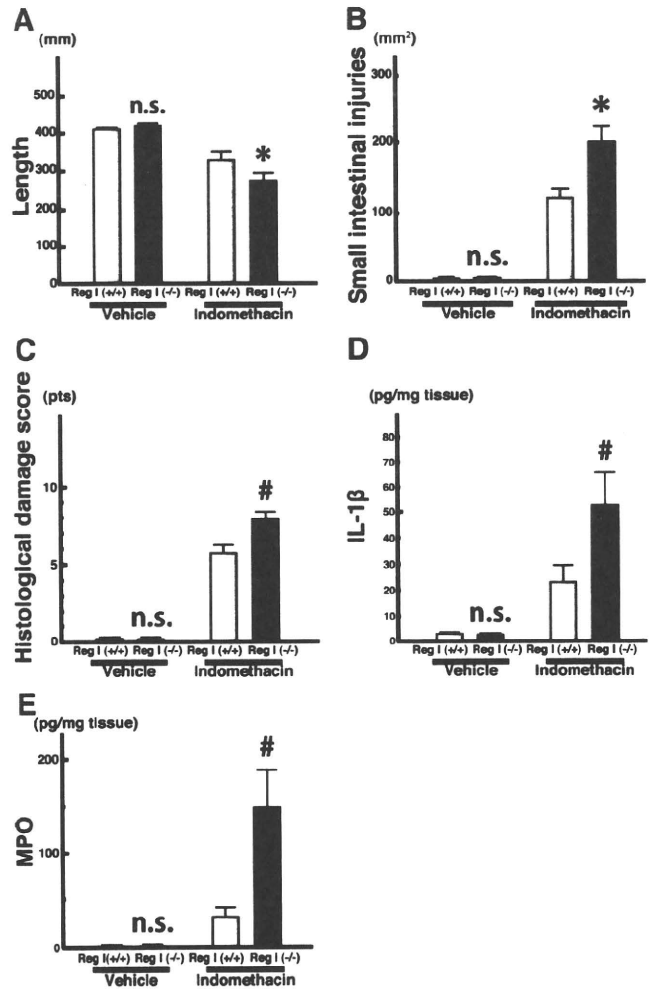


Fig. 3. Exacerbation of indomethacin-induced small intestinal injuries in *Reg I*<sup>-/-</sup> mice. Shown are the length of the small intestine (A), the area of macroscopically visible injured lesions (B), histological damage scores (C), and inflammatory parameters in the experimental mice (D and E). For measurement of IL-1 $\beta$  and MPO contents, total protein was extracted from each small intestine tissue sample. IL-1 $\beta$  and MPO content were evaluated by enzyme immunoassay (EIA). Error bars indicate the standard error of mean values obtained independently from 7 mice. # $P < 0.05$ , \* $P < 0.01$  vs. *Reg I*<sup>+/+</sup> mice; n.s., not significant.

prevent indomethacin-induced small intestinal injuries. To test our speculation, we injected rReg I into the mouse model of indomethacin-induced small intestinal injuries. Figure 4, A–C, shows the gross and microscopic findings of the small intestines from both rReg I-treated mice and vehicle-treated mice at 24 h after the last indomethacin injection. Although the small intestines of the experimental animals were shortened, this shortening in rReg I-treated mice was attenuated compared with vehicle-treated mice (Fig. 5A;  $P < 0.01$ ). The area of small intestinal injuries in the rReg I-treated mice was significantly smaller than that in the vehicle-treated mice (Fig. 5B;  $P < 0.01$ ). Microscopically, more shallow ulcers with less inflammatory cell infiltration were observed in the rReg I-treated mice. Consequently, the histological damage scores for the rReg I-treated mice were lower than those of the vehicle-treated mice (Fig. 5C;  $P < 0.05$ ).