

幼児・思春期を中心とした小児の好酸球性消化管疾患の診断治療法開発・病態
解明に関する研究

研究分担者 山田 佳之 群馬県立小児医療センター アレルギー感染免疫科 部長

研究要旨：好酸球性消化管疾患（EGID）は好酸球性食道炎（EoE）、胃腸炎（EGE）、大腸炎（EC）に大別される。アレルギー性炎症が主たる病態と言われている。診断には生検が必要である。これまで研究分担者らは小児 EoE を中心に研究を行ってきた。昨年度からはさらに新生児から成人までを検討することとなり、分担研究として幼児から思春期での EGID を中心に研究を行っている。食道以外の消化管では生理的好酸球の存在のため EGID の診断が困難なことがあり、好酸球数の正確な測定や様々な関連分子による染色を用いることでより明確な分類・評価が可能と考え検討をした。また Th2 病勢マーカーとして最適な分子を探るための基礎的検討を行った。さらに長期ステロイド使用中の EGE 患者で多種抗原除去療法（MFED）を用いて治療し、ステロイドの漸減中止が可能であった。また 2 次性 EGID として好酸球増多症候群（HES）/慢性好酸球性白血病（CEL）に関連したキメラ遺伝子・変異発現のスクリーニングを行った。食物アレルギーの増加からも今後の EGID 患者数増加が予測されるため、本邦での十分な検討が必要と考えている。

A. 研究目的

好酸球が関与する消化管疾患は好酸球性消化管疾患（Eosinophilic Gastrointestinal Disorders [EGID]）として総称されており、好酸球性食道炎（Eosinophilic Esophagitis [EoE]）、胃腸炎（Eosinophilic Gastroenteritis [EGE]）、大腸炎（eosinophilic Colitis [EC]）に大別される。診断には生検が必要とされている。EGIDの主な原因はアレルギーとされている。IgE型と非IgE型の中間に位置するといわれており、原因抗原の同定は必ずしも容易ではない。また好酸球増多症候群（Hypereosinophilic syndrome [HES]）をはじめ、他の好酸球性疾患に続発した症状として発見されることも多い。これまで研究分担者らは本研究班の研究者の多くとともに難治性疾患克服研究事業として小児EoEおよび新生児・乳児食物蛋白誘発胃腸炎の研究を行ってきた。昨年度からはさらに研究を進展させ、班全体としては新生児から成人までを検討することとなり、その中で幼児から思春期までのEGIDの研究を深めることを中心にEGIDの現状把握、病態解明、検査法開発等を行うことを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1. EGID患者検体での免疫染色

免疫組織化学的にeotaxin-3と肥満細胞トリプターゼ（MCT）の染色に加え、今年度は抗MBPモノクローナル抗体の染色について検討した。またH&E

染色での安定した組織好酸球数の測定に向けて準備を行った。

2. 病勢指標となる細胞表面分子に関する検討

前年度、制御性T細胞（Treg）、Tヘルパー17細胞（Th17）がTh1/Th2代用指標に影響すると考え、これらの影響の少ないTh1およびTh2の指標になりうる分子を探るため、CD4陽性リンパ球でのケモカイン受容体等の発現、細胞内サイトカインの発現、また制御性T細胞（Treg）、Tヘルパー17細胞（Th17）でのこれらの発現をフローサイトメーターで検討した。今年度は、さらに時間と検体量に利点がある全血での検討を行った。

3. 小児EGIDでの多種抗原除去療法（MFED）の検討

EGE患者において施行した。食事療法として6種抗原（卵、牛乳、小麦、大豆、ピーナッツ/種実類/木の実類、甲殻魚介類/貝類）とこれまでに症状を誘発した食品群の除去（MFED）を行い、症状改善後に一群ずつゆっくりと再導入した。本年度はステロイド減量のための使用についても検討した。

6. EGIDでのマイクロアレイによる検討

好酸球性消化管疾患患者の生検組織からRNAを抽出しマイクロアレイ（発現アレイ）を用いて研究代表者施設にて検討している。

5. 抗原リンパ球刺激試験（ALST）の検討

研究代表者施設にて乳関連抗原について系が確立されており検討した。

8. 好酸球増多症候群 (HES) との鑑別のための遺伝子スクリーニング

HESを疑われた患者において、好酸球増多に関連した骨髄増殖性新生物の検索として *FIP1L1-PDGFR* 融合遺伝子、*JAK2* 変異、*TEL-PDGFRB* 融合遺伝子について検討した。

(倫理面への配慮)

群馬県立小児医療センター倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. EGID 患者検体での免疫染色

最終的に EGID 患者 (胃腸炎 8 名、腸炎 3 名、食道炎 7 名 [2 次性 EGID を含む]) および疾患対照群) の病理診断のために採取された消化管生検標本が準備できた。eotaxin-3、MCT については研究協力者の平戸純子を中心にこれまでの検体を用いて系を確立したが、今年度は共同研究者の米国メヨークリニック Hirohito Kita 博士の教室での免疫染色プロトコルに従い、抗 MBP モノクローナル抗体を用いた染色の条件設定を行った。高親和性の抗 MBP 抗体、抗 EDN 抗体を用いた検討についても、入手でき次第、同時に検討を行う予定である (群馬県立小児医療センター 加藤政彦博士との共同研究)。また H&E 染色での組織好酸球測定は 4 人の臨床検査技師に病理医の指導のもと好酸球数が既存の検体を用い独立的に測定し、大きな測定誤差が見られた場合には供覧し標準化をはかった。

2. 病勢指標となる細胞表面分子に関する検討

群馬大学 村上博和博士との共同研究として、Th1、Th2 マーカーとして最適な分子を探るため、ケモカインレセプターを中心に検討してきた。前年度から Th17 や Treg とオーバーラップのあるケモカインレセプターは Th2 疾患の指標としては感度が落ちる可能性があると考えられた。本年度は時間と検体量を節約できる全血を用いた検討を行った。全血検体においてもこれまでの検討とほぼ同様の結果が得られた。他施設からの検体の受け入れや小児の検討に使用が可能と考えている。

3. 小児 EGID での多種抗原除去療法 (MFED) の検討

プレドニゾン投与により寛解を維持しているが比較的ステロイド依存性の強い新規患者において多種抗原除去療法 (MFED) を行った。成分栄養を使用中であったので、QOL を上げるためまず MFED に変更した。変更後、長期ステロイド投与中であったので 4 か月程度をかけて漸減中止した。減量途中からは 1-2 週間ごとに 1 食品群ずつ再導入し

たが、症状の再燃はなく再導入することができた。その後、軽度の再燃を思わせる症状を示すことはあるが寛解を維持できている。MFED 併用はステロイド減量にも有効となる可能性が考えられた。

4. EGID でのマイクロアレイによる検討

2 名の EoE 疑い (結果的に 2 名とも EoE は否定的) と EGE 患者 3 名 (4 回) の消化管生検検体 (上下消化管複数箇所) の病理検査時に採取した検体を提出し現在、検討中である。

5. 抗原リンパ球刺激試験 (ALST) の検討

一次性 EGE と診断した 4 名において、研究代表者施設にて乳関連抗原について検討された。2 名が乳関連抗原に対して陽性反応を示した (陰性のうち 1 例は参考値)。

5. 好酸球増多症候群 (HES) との鑑別のための遺伝子スクリーニング

EGID 診療での HES のスクリーニングとして対応している。(*JAK2* 変異、*PDGFRB* 遺伝子再構成・変異については岡山大学小児科 嶋田 明博士との共同研究)。新規に 1 名の HES 疑い患者の検討を行ったが陰性であった。本年度はさらに広く *FIP1L1-PDGFR* 融合遺伝子発現を検出できるように新規にプライマーを設定した。EoL-1 の陽性コントロールで確認し、以前の検体についても検討したがこれまでのプライマーと同様にいずれも陰性であった。

D. 考察

食道では本来好酸球が存在しないために組織好酸球数そのものが、診断や治療指標として有用であることが示されている。しかしながらその他の消化管では生理的な状態ですでに好酸球が存在しており生理的な状態と病的な状態の区別がしばしば困難であることから、免疫染色での分類を検討している。EoE において非常に親和性の高い抗 EDN 抗体を用いることにより、H&E 染色での好酸球の存在と EDN 染色陽性部位の時相差が報告されている (Kephart GM, et al. *Am J Gastroenterol*, 2010)。このことを応用することで、EGE においても組織好酸球数では判断の難しい診断や病勢の把握がより正確に出来るのではないかと考えている。さらに抗 MBP モノクローナル抗体を用いることで H&E よりも正確な好酸球数測定が可能になると言われており検討した。また組織好酸球数の測定には機器と測定者の標準化が必要であり、病理の指導のもと、機器の扱い等に対して十分な背景のある臨床検査技師に測定法を取得してもらい標準化を測った。

また EGID の病勢指標として組織好酸球以外の簡便なものの開発が重要と考えている。かなり以前か

ら Th1/Th2 分類に有用なケモカインレセプターや CRTH2 の発現が報告されてきたが、現在では Th17 や Treg の研究が進み、それぞれとケモカインレセプターとの関連も報告されていることからより Th1/Th2 分類の指標になりうる分子を探すための基礎的検討を行ってきた。これらの表面分子での指標の確立の意義は時間と検体量を要する細胞内サイトカインあるいはサイトカイン産生の検討の代用をはかるためである。そのことからさらに全血を用いた検討を行い確認した。これにより小児や貴重検体での検討も可能になると考えており、臨床応用に近づけることができた。

EGE 症例ではしばしば IgE と非 IgE の混合型アレルギーのため原因の同定が困難であり、群馬県立小児医療センターでは経験的な除去食とその後の再導入を行う多種抗原除去療法 (MFED) を行ってきた。前年度に続きさらに新規の EGE 患者に MFED を施行した。EGE 患者で成分栄養と全身性ステロイドで管理されていた場合にも MFED に置き換え、ステロイドを漸減中止することができたことから有用な方法と考えている。

新たな関連分子の検索として発現アレイによる組織のマикроアレイの検討が研究班として研究代表者を中心に行われている。

また幼児以降や成人でもミルク抗原によるリンパ球刺激試験が樹立され、研究代表者施設で行った。今回の少数例でも実際の負荷の結果と一致する症例も存在し、有用と考えている。

HES の一臓器症状として EGID を発症した場合には、HES としての治療を行う必要がある。ステロイドなどの共通した治療もあるが、WHO の骨髄増殖性新生物 (MPN) の分類では好酸球増多を伴う MPN は独立したカテゴリーに分類されており、イマチニブなどの分子標的薬が著効する場合があります、治療選択が変わることから、PDGFRB や PDGFRB の遺伝子再構成は見落としのないようにしたい。そのために EGID 患者が慢性的に高度な末梢血好酸球増多を伴っている場合には、これらのスクリーニングが重要である。小児での報告は少ないが、本年度も末梢血好酸球増多を伴った EGID 患者にて検討を行なった。

E. 結論

EoE に関しては、患者数の多い欧米で診断・治療それぞれに研究が進んでいる。その手法を参考に日本に比較的多い EGE で検討を進めてきた。その中でアレルギーとしての共通点から、同様に行える検査や治療と、組織好酸球数のようにまだまだ多くの問題を含んでいるものが明らかになってきた。今後、班全体の登録システムにより多数かつ幅広い年齢の患者が登録されることになることから未解決の部分の研究も加速すると考えている。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada Y, Kato M, Isoda Y, Jinbo Y, Hayashi Y. Eosinophilic gastroenteritis treated with a multiple-food elimination diet. *Allergol Int*, 2014 in press
- 2) Kato M, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y. Age at onset of asthma and allergen sensitization early in life. *Allergol Int*, 2014 in press
- 3) Yamada Y, Nishi A, Kato M, Toki F, Yamamoto H, Suzuki N, Hirato J, and Hayashi Y. Esophagitis with eosinophil infiltration associated with congenital esophageal atresia and stenosis. *Int Arch Allergy Immunol*. 161 suppl 2, 2013 159-163
- 4) Ishioka T, Yamada Y, Kimura H, Yoshizumi M, Tsukagoshi H, Kozawa K, Maruyama K, Hayashi Y, Kato M. Elevated MIP-1 and IL-17 production in experimental asthma model infected with respiratory syncytial virus. *Int Arch Allergy Immunol*, 161 suppl 2, 2013 129-137
- 5) 山田佳之. 消化管アレルギーとはどんなアレルギーなのでしょう? 小林場之助 兵庫食物アレルギー研究会編 0・1・2・3 歳の食物アレルギー-権威対応マニュアル東京 診断と治療社. 2013;10-13
- 6) 山田佳之. 最近注目されている消化器疾患・検査 好酸球性食道炎. 小児科診療. 第 76 巻 2 号, 2013; 297-301
- 7) 山田佳之, 中山佳子. 小児における好酸球性消化管疾患の診断 胃と腸 医学書院 第 48 巻第 13 号, 2013; 1904-1910

2. 学会発表

- 1) Yamada Y, Ohtsuka Y, Nomura I, Matsumoto K, Ida S, Taguchi T. A survey of pediatric patients with esophageal eosinophilia in Japan. 13th Asian Pan-Pacific Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (APSPGHAN) and 第 40 回日本小児栄養消化器胃腸学会 東京 2013.11.1
- 2) Watanabe S, Yamada Y, Murakami H. Chemokine Receptors On Regulatory T Cell Surface, Surrogate Markers For Intracellular Th1 and Th2 Cytokines. 2014 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAAI) Annual Meeting, San Diego, U.S.A. 2014.3.4
- 3) Nomura I, Matsuda A, Shoda T, Morita H, Arai K, Shimizu H, Yamada Y, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Interleukin-33 and Thymic Stromal Lymphopoietin Are Preferentially Elevated In The Sera Of Infants With Eosinophilic Gastroenteritis. 2014 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology (AAAAI) Annual Meeting, San Diego, U.S.A. 2014.3.4
- 4) 山田佳之, 加藤攻彦, 林 泰秀. 主要食物抗原除去が奏功した好酸球胃腸炎. 第 116 回日本小児科学会学術集会, 広島, 2013.4.20
- 5) 山田佳之, 加藤攻彦. 好酸球胃腸炎に対する多種主要食物抗原除去療法. 第 25 回日本アレルギー学会春季臨床大会, 横浜, 2013.5.11

- 6) 山田佳之, 土岐文章, 西 明, 山本英輝, 磯田有香, 中里美早紀, 神保裕子, 鈴木則夫, 加藤政彦, 平戸純子. 多種主要食物抗原除去療去にて寛解した好酸球性胃腸炎. アレルギー・好酸球研究会2013, 東京, 2013.6.15
- 7) 山田佳之, 加藤政彦. 経過中にプロトンポンプ阻害薬反応性食道好酸球増多を認めた好酸球性消化管疾患の1例. 第50回日本小児アレルギー学会, 横浜, 2013.10.20
- 8) 山田佳之, 加藤政彦. プロトンポンプ阻害薬により改善を認めた食道好酸球増多症例の検討. 第63回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 2013.11.30

3. 講演

- 1) 山田佳之. 好酸球性消化器疾患の現状と病態について. 第10回山形小児アレルギー研究会, 山形, 2013.7.19
- 2) 山田佳之. 好酸球性消化管疾患について. 第16回埼玉小児アレルギー研究会, 大宮, 2013.10.3

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし