

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591372

研究課題名（和文） 未消化食物由来ペプチドによる食物アレルギーおよび炎症性腸疾患発症に関する検討

研究課題名（英文） The etiology of food allergy and inflammatory bowel diseases in children in relation to peptides derived from digested food proteins.

研究代表者

大塚 宜一 (OHTSUKA YOSHIKAZU)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90338335

研究成果の概要（和文）：

食物アレルギーや炎症性腸疾患の病態を解明する目的で、食物の未消化産物との関連を検討した。その結果、未消化産物の明らかな抗原性は確認できなかった。一方、それぞれの消化管粘膜の生検標本を用い microarray 法、RT-PCR 法、免疫組織染色法などの検討を行ったところ、新生児・乳児消化管アレルギーにおいて CCL21、CXCL13 の、また、小児炎症性腸疾患において CXCL9、CXCR3 などの発現亢進を認め、それぞれの病態に食物の侵入経路であるリンパ濾胞との関わりが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the etiology of food allergy and inflammatory bowel diseases (IBD) in children in relation to peptides derived from digested food proteins, their antigenicity was analyzed; however, no specific reactions were confirmed in serum derived from food allergy or IBD. We have also investigated the mucosal samples taken from food protein-induced proctocolitis (FPIP) and IBD with microarray, RT-PCR, immunohistochemistry and found that the lymphoid hyperplasia with eosinophilic infiltration into the colonic mucosa in response to CCL11 and CXCL13 signaling is important in FPIP while CXCL9 and CXCR3 are the key molecules in pediatric IBD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：消化、食物アレルギー、炎症性腸疾患、新生児・乳児消化管アレルギー
リンパ濾胞

1. 研究開始当初の背景

消化管粘膜は、常時大量の食物や細菌・ウイルスなどのさまざまな物質に暴露されている。口から摂取されたこれらの物質は腸管

に入った後、消化酵素により消化される。蛋白質がアミノ酸まで消化されると、抗原提示細胞には認識されない。しかし、十分に消化されないペプチドは抗原提示細胞に認識さ

れ免疫応答が始まる。通常は、それらのペプチドに対して免疫が獲得され、自己蛋白や生体に必要な物質に対しては寛容が誘導される。しかし、新生児や乳児では、消化機能およびバリア機能が未熟であり、また、ウイルス性胃腸炎に罹患することも多く、その結果、十分に消化されていないペプチドが、腸管内腔および粘膜内へ侵入しやすい。さらに、抗原提示の増強、免疫細胞の活性化や寛容の破綻からアレルギーや炎症反応が生じやすいと考えられる。一方、炎症性腸疾患 (IBD) においても、defencin に代表される粘膜の防御機能の低下に加え(Cunliffe RN et al. Gut. 2001 48:176-85)、臨床的に elemental diet が治療となること、経口栄養の再開とともに炎症が再燃しやすいこと、また、小児期は抗原の侵入経路であるリンパ濾胞が発達していることなどより、抗原特異的および非特異的な食物由来のペプチドに対する過剰な免疫応答が食物アレルギーや IBD の病因もしくは増悪因子である可能性が示唆される。

2. 研究の目的

- (1) ヒトの消化機能の評価：食物アレルギーの原因に多い卵白を *in vitro* でペプシン、トリプシン、キモトリプシンなどのヒトの消化酵素で消化し、その未消化産物の存在と抗原性に関して検討する。
- (2) 食物アレルギーの消化管粘膜における病態をリンパ濾胞の発達と絡め検討する。
- (3) 小児炎症性腸疾患の消化管粘膜における病態をリンパ濾胞の発達と絡め検討する。

3. 研究の方法

- (1) ヒトの消化機能の評価：
 - ① 卵白を *in vitro* でペプシン、トリプシン、キモトリプシンなどの消化酵素で消化し、その未消化産物の存在を確認した。
 - ② 食物アレルギー患児の血清を用い、未消化産物のペプチドに対する反応性を western blot 法などで検討した。
- (2) 食物アレルギーの消化管粘膜における病態の検討。

新生児・乳児消化管アレルギーのうち、下血を主訴とした患児 (food-protein induced proctocolitis: FPIP) 5 名 (平均 2.7 か月) と粘膜に明らかな炎症所見を認めなかったコントロール 6 名 (平均 8.53 歳) を対象とし、

 - ① 内視鏡所見および病理像を検討した。
 - ② S 状結腸の生検組織を用いシグナル伝達分子の発現を microarray 法にて網羅的に検討した。
 - ③ RT-PCR を用い、上記変化を確認した。
 - ④ 免疫組織染色を用い、上記変化を確認した。

(3) 小児炎症性腸疾患の消化管粘膜における病態の検討。

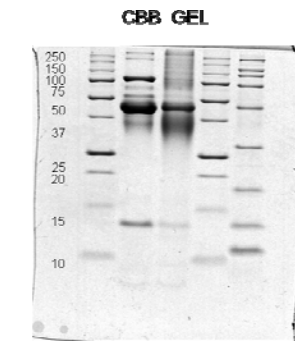
小児期発症の活動期および寛解期のクローン病 (CD) および潰瘍性大腸炎 (UC) 患児と対象児、各々 3 名ずつを対象とした。[活動期 UC (14.56 ± 0.54 歳), 寛解期 UC (13.50 ± 6.67 歳), 活動期 CD (13.27 ± 1.10 歳), 寛解期 CD (8.08 ± 3.50 歳), 正常対象 (8.53 ± 5.34 歳)] 対象児は、血便などを主訴に大腸内視鏡検査を行った児で、消化管粘膜と組織像の双方に明らかな異常を認めなかったものを用いた。

- ① S 状結腸の生検組織を用いシグナル伝達分子の発現を microarray 法にて網羅的に検討した。
- ② 免疫組織染色を用い、上記変化を確認した。

4. 研究成果

(1) ヒトの消化機能の評価：

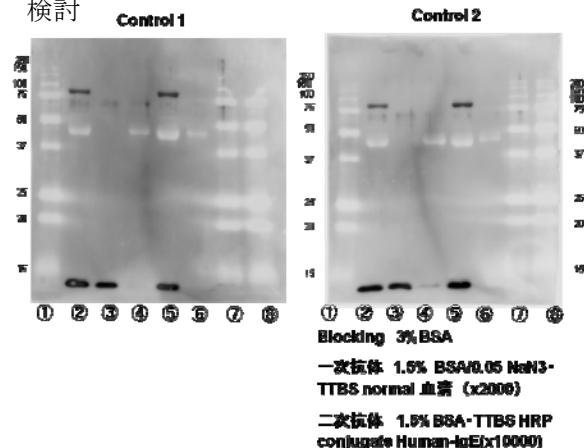
① 卵白の未消化産物の存在を確認

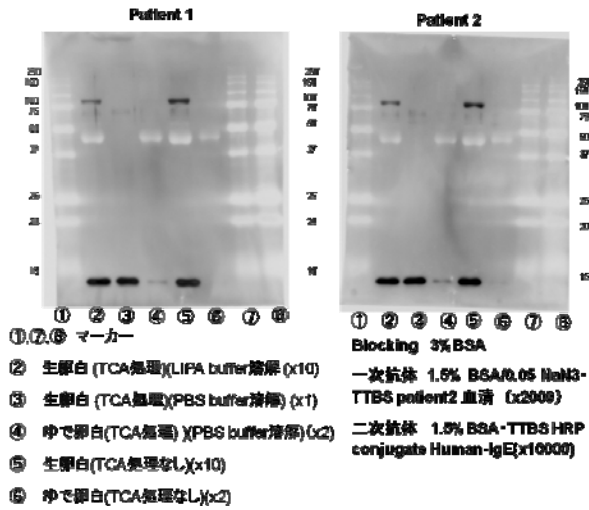


- ①, ④ マーカー (Ln Stained std)
- ② 生卵白 (TCA処理) (x10)
- ③ ゆで卵白 (TCA処理) (x2)
- ⑤ Broad Range 0.2ug / lane

卵白をペプシン、トリプシン、キモトリプシンで消化すると、それぞれ未消化産物が存在することが確認された。

② 食物アレルギー患児の血清との反応性の検討





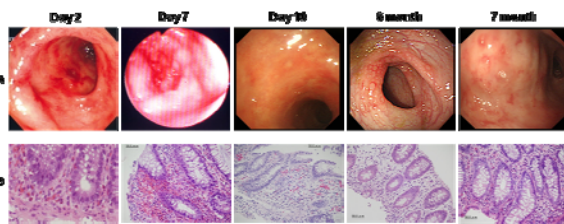
卵白をペプシン、トリプシン、キモトリプシンで消化した未消化産物と、卵白アレルギー患児の血清を反応させたところ、卵白に反応を認めないコントロール患児の血清との反応性と明らかな差異は確認できなかった。

③ まとめ

食物 (卵白) 抗原は、ペプシン、トリプシン、キモトリプシンなどの消化酵素により、十分消化されていないことが示唆された。一方、それらのペプチドに対する反応性は、健康児およびアレルギー児において明らかな差異は認められず、アレルギー児で認められる未消化産物に対する反応は、その他の免疫機序を介した過敏症が原因である可能性が示唆された。

(2) 食物アレルギーの消化管粘膜における病態の検討

① 内視鏡および病理所見

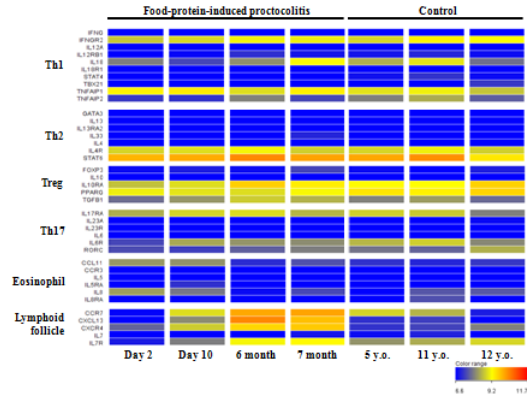


新生児・乳児消化管アレルギーのうち大腸病変が主体の患児 (FPIP) の内視鏡検査では、易出血性を伴った粘膜の著明な炎症所見を確認し、特に6か月および7か月の乳児を中心にリンパ濾胞増殖所見を認めた (上段 A)。一方、新生児では、より著明な好酸球浸潤を確認した (下段 B)。

② microarray を用いた検討

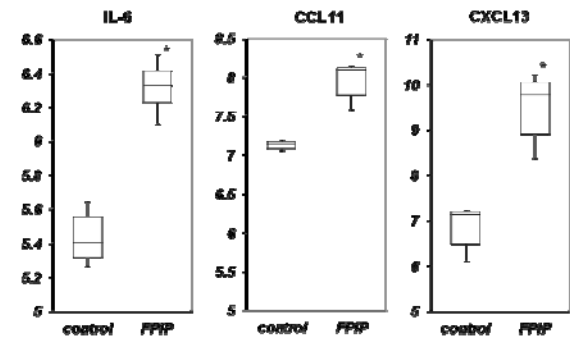
FPIP の粘膜では IL-6, CXCL13, CCL11 などの発現がコントロールと比し有意に亢進していた。また、CCL11 の発現は新生児期患児に、CXCL13 の発現は乳児期患児により強く

認めた。



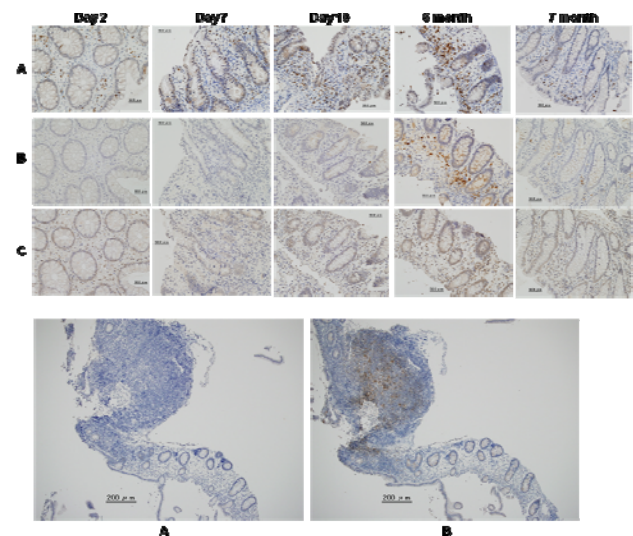
③ RT-PCR

前述の変化を RT-PCR 法にて確認した。RT-PCR においても、FPIP の粘膜では IL-6, CXCL13, CCL11 などの発現がコントロールと比し有意に亢進していることが確認出来た。 (* $p < 0.01$)



④ 組織染色

組織染色では CD3 陽性細胞の浸潤を認める (上段 A) 一方、リンパ濾胞を中心に CXCL13 の発現が確認され (下段 B)、粘膜においては多くの IgA 陽性細胞を認めた (上段 B) が、IgE 陽性細胞の浸潤は認めなかった (上段 C)。

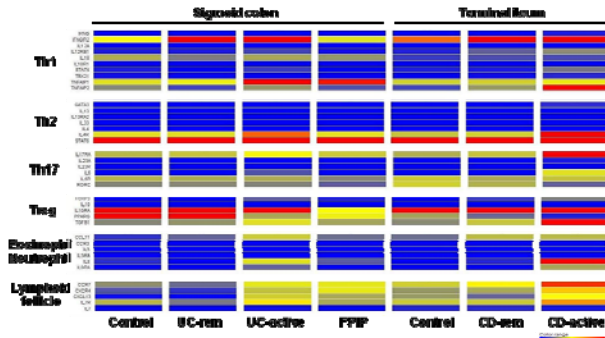


⑤ まとめ

今回の検討では、対象者に年齢的ばらつきが大きく、一概に結論付けることは難しいが、FPIP の病態としてリンパ濾胞形成因子である CXCL13 や好酸球誘導因子である CCL11 などの関与が示唆された。

(3) 炎症性腸疾患の消化管粘膜における病態の検討。

① microarray を用いた検討

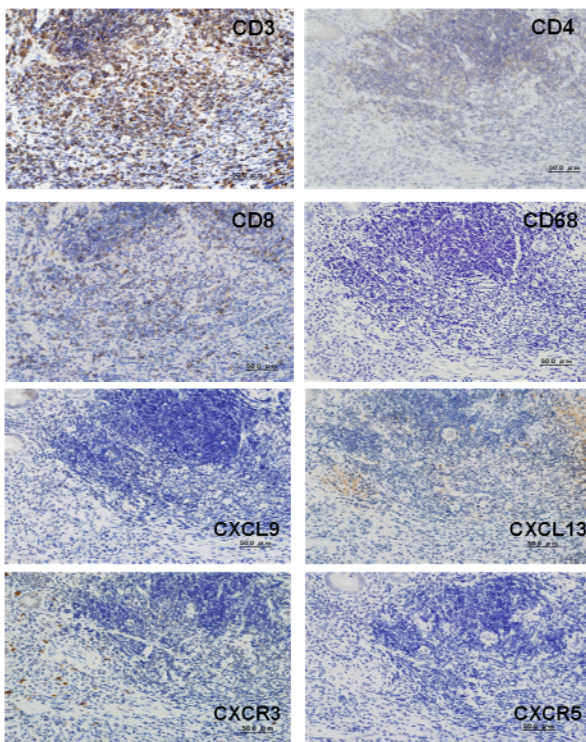


急性期の小児 CD および UC の粘膜で IFN- γ , IL-6, IL-8, STAT4, GATA3, CCR7, CXCL-9, -10, -11, -13 などの発現亢進を確認した。特に CD では CXCL-9, -10, -11 の発現がより亢進していたが、UC では MMP-7, -3, -10 の発現がより亢進していた。

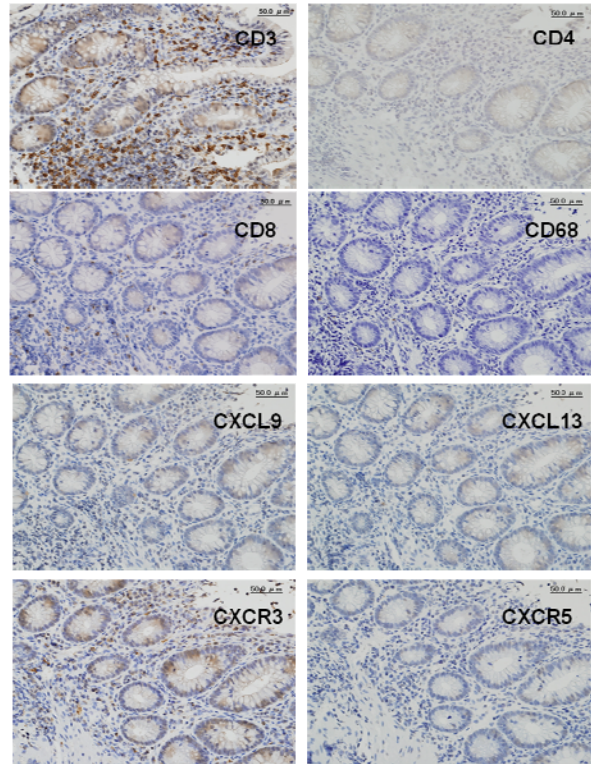
② 組織染色

CD、UC のいずれにおいても免疫組織染色で CD3 陽性細胞浸潤および CXCL-9 と CXCR-3 の病変部局所での発現亢進を確認した。

CD の病理



UC の病理



③ まとめ

小児期発症の IBD、特に CD の病態において CXCL-9 および CXCR-3 が重要な因子であることが示唆された。

5. 総括

食物アレルギーや炎症性腸疾患の病態を解明する目的で、食物の未消化産物との関連を検討した。未消化産物の明らかな抗原性は確認できなかったが、その侵入経路にあたるリンパ濾胞を絡めた病態が強く示唆された。今後、各疾患におけるリンパ濾胞を含めた、さらなる検討の必要性が示唆された。

6. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

- [雑誌論文] (計 11 件) 全て査読有り
- ① Ohtsuka Y, Ikegami T, Izumi H, Namura M, Ikeda T, Ikuse T, Baba Y, Kudo T, Suzuki R, Shimizu T. Effects of Bifidobacterium breve on inflammatory gene expression in neonatal and weaning rat intestine. *Pediatr Res.*, 71; 2012, 46-53
 - ② Ohtsuka Y, Jimbo K, Inage E, Mori M, Yamakawa Y, Aoyagi Y, Suzuki M, Kudo T, Suzuki R, Shimizu T. Microarray analysis of mucosal biopsies in neonates with rectal bleeding: Is it really an allergic disease? *J Allergy Clin Immunol.*, Feb.11; 2012, [Epub ahead of

print]

③Nomura I, Morita H, Hosokawa S, Hoshina H, Fukuie T, Watanabe M, Ohtsuka Y, Shoda T, Terada A, Takamasu T, Arai K, Ito Y, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K. Four distinct subtypes of non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies in neonates and infants, distinguished by their initial symptoms. *J Allergy Clin Immunol.*, 127; 2011, 685-688.e8

④Kudo T, Nagata S, Ohtani K, Fujii T, Wada M, Haruna H, Shoji H, Ohtsuka Y, Shimizu T, Yamashiro Y. Pulse steroids as induction therapy for children with ulcerative colitis. *Pediatr Int.*, May 27; 2011, [Epub ahead of print]

⑤Ohtsuka Y, Arai K, Aoyagi Y, Fujii T, Yamakawa Y, Ohtani K, Ikuse T, Baba Y, Inage E, Kudo T, Suzuki R, Nagata S, Shimizu T. Monitoring 6-thioguanine nucleotide concentrations in Japanese children and adolescents with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.*, 25; 2010, 1626-30

⑥Yamakawa Y, Ohtsuka Y, Ohtani K, Fujii T, Nagata S, Shimizu T. Clinical efficacy of leukotriene receptor antagonist in children with food allergy. *Drugs R D.*, 10; 2010, 147-54

⑦Fujii T, Ohtsuka Y, Yamakawa Y, Ohtani K, Kudo T, Ohtomo Y, Nagata S, Shimizu T. Effect of mizoribine in children with inflammatory bowel disease. *Pediatr Int.*, 52; 2010, e57-9

⑧Aoyagi Y, Nagata S, Kudo T, Fujii T, Wada M, Chiba Y, Ohtsuka Y, Yamashiro Y, Shimizu T, Ohkusa T, Peroxisome proliferator-activated receptor mutation may cause a subset of ulcerative colitis. *Pediatr Int.*, 52; 2010, 729-34

⑨Ohtani K, Ohtsuka Y, Ikuse T, Baba Y, Yamakawa Y, Aoyagi Y, Fujii T, Kudo T, Nagata S, Shimizu T. The increased expression of GATA-3 but T-bet observed in the mucosa from children with acute phase of inflammatory bowel disease, *Pediatr Int.*, Dec.17; 2009, 584-9, [Epub ahead of print]

⑩佐藤洋明, 大塚宜一, 森真理, 佐藤圭子, 東海林宏道, 清水俊明. プランルカストを投与した新生児一過性好酸球形大腸炎の1例. *小児科*, 50; 2009, 1521-1524

⑪大塚宜一, 馬場洋介, 幾瀬圭, 山川陽子, 藤井徹, 青柳陽, 東海林宏道, 工藤孝広, 鈴木竜洋, 佐藤洋明, 清水俊明. 新生児・乳児消化管アレルギーの病態 消化管局所における病態. *日本小児アレルギー学会雑誌*, 23; 2009, 18-24

[学会発表] (計 26件)

①Ohtsuka Y, Arai K, Aoyagi Y, Fujii T, Ikuse T, Kudo T, Shimizu T. Monitoring 6-thioguanine nucleotide concentrations in Japanese children and adolescents with

inflammatory bowel disease. 6th Korea- Japan IBD Symposium, 2012年1月2日, 京王プラザホテル (東京)

②Ohtsuka Y, Inage E, Baba Y, Kudos T, Shimizu T. Microarray analysis of food-protein induced enterocolitis syndrome by comparison with inflammatory bowel disease in children. PAS/ASPR, 2011年4月15日, Denver Convention Center (Denver)

③Ohtsuka Y, Ishida A, Inage E, Baba Y, Mori M, Yamakawa Y, Wada M, Suzuki R, Shimizu T. Microarray and histological analysis of food-protein induced enterocolitis syndrome. APAPARI mini-symposium, 2011年10月28日, 福岡国際会議場 (福岡)

④大塚宜一, 神保圭祐, 稲毛英介, 幾瀬圭, 山川陽子, 青柳陽, 藤井徹, 工藤孝広, 永田智, 清水俊明. 新生児・乳児消化管アレルギーの病態の解析. 第38回日本小児栄養消化器肝臓学会, 2011年10月9日, ホテル紫苑 (盛岡)

⑤大塚宜一, 石田明日香, 神保圭祐, 稲毛英介, 馬場洋介, 森真理, 山川陽子, 和田万里子, 工藤孝広, 鈴木竜洋, 清水俊明. 新生児・乳児消化管アレルギー患児の粘膜を用いた病態の解析. 第2報, 第61回日本アレルギー学会秋季大会 ミニシンポジウム, 2011年11月12日, グランドプリンスホテル新高輪 (東京)

⑥大塚宜一. 小児期慢性腸疾患の病態と免疫. 第325回順天堂医学会学術集会, 2011年5月21日, 東京 (有山記念講堂)

⑦大塚宜一. 小児期消化器疾患の臨床-便秘, 下痢, 血便を中心に. 山梨県小児科医会山梨県小児保健協会学術集会, 2011年6月16日, 山梨

⑧大塚宜一. 小児期消化器疾患の臨床-便秘, 下痢, 血便を中心に. 第23回海匝地区小児懇話会, 2011年7月14日, 千葉

⑨大塚宜一. 小児期炎症性腸疾患の炎症と免疫. 第114回日本小児科学会学術集会, 2011年8月13日, 東京

⑩大塚宜一. 消化管アレルギーから見た小児の粘膜免疫. 第74回日本小児アレルギー同好会, 2011年9月17日, 東京

⑪大塚宜一, 櫻井由美子, 藤武義人, 稲毛英介, 幾瀬圭, 馬場洋介, 鈴木光幸, 青柳陽, 藤井徹, 工藤孝広, 清水俊明. Microarrayを用いた小児期炎症性腸疾患の病態の検討. 第37回日本小児栄養消化器肝臓学会, 2010年10月9-10日, かがわ国際会議場 (高松)

⑫大塚宜一. 乳幼児期における食物アレルギーへの対応法. 足立区小児科医会学術講演会, 2010年1月22日, (東京)

⑬大塚宜一. 小児の食物アレルギー 消化管アレルギー. 第22回日本アレルギー学会春季臨床大会ミニシンポジウム, 2010年5

月 8 日, 国立京都国際館 (京都)

⑭大塚宜一. 新生児・乳児消化管アレルギー—新生児・乳児消化管アレルギー患児の粘膜を用いた病態の解析. 第 60 回日本アレルギー学会秋季大会—ミニシンポジウム, 2010 年 11 月 26 日, 東京国際フォーラム (東京)

⑮大塚宜一. 小児期の血便と IBD. 文京区医師会勉強会, 2010 年 11 月 9 日, (東京)

⑯大塚宜一. 新生児・乳児消化管アレルギー—新生児・乳児消化管アレルギー患児の粘膜病変について. 第 47 回日本小児アレルギー学会—シンポジウム, 講演・座長, 2010 年 12 月 4 日, パシフィコ横浜 (横浜)

⑰大塚宜一, 大谷清孝, 藤井徹, 幾瀬圭, 青柳陽, 鈴木竜洋, 清水俊明. 小児炎症性腸疾患における免疫調節薬の使用状況. 第 5 回日本消化管学会総会学術集会, 2009 年 2 月 12 日, 京王プラザホテル (東京)

⑱大塚宜一, 藤井徹, 鈴木竜洋, 永田智, 新井勝大, 稲毛英介, 山川陽子, 松原知代, 清水俊明. 小児炎症性腸疾患における免疫調節薬の使用状況について. 第 19 回日本小児リウマチ学会, 2009 年 10 月 4 日, 京都リサーチパーク (京都)

⑲大塚宜一, 和泉裕久, 名村真理子, 峯岸真梨緒, 馬場洋介, 幾瀬圭, 稲毛英介, 大谷清孝, 山川陽子, 青柳陽, 藤井徹, 工藤孝広, 東海林宏道, 鈴木竜洋, 永田智, 清水俊明.

B.breve の仔ラット消化管粘膜に与える効果について. 第 36 回日本小児栄養消化器肝臓学会, 2009 年 10 月 10 日, 北海道大学学術交流会館 (札幌)

⑳大塚宜一, 櫻井由美子, 和泉裕久, 名村真理子, 峯岸真梨緒, 馬場洋介, 幾瀬圭, 藤井徹, 鈴木竜洋, 永田智, 稲毛英介, 山川陽子, 松原知代, 清水俊明. Microarray を用いた仔ラット消化管粘膜に与える probiotics の効果の検討. 第 59 回日本アレルギー学会秋季学術大会—ミニシンポジウム, 2009 年 10 月 31 日, 秋田ビューホテル (秋田)

㉑大塚宜一, 藤井徹, 鈴木竜洋, 永田智, 和泉裕久, 名村真理子, 峯岸真梨緒, 稲毛英介, 山川陽子, 松原知代, 清水俊明. 仔ラット消化管粘膜における probiotics の抗炎症効果について. 第 46 回日本小児アレルギー学会, 2009 年 12 月 6 日, 福岡国際会議場 (福岡)

㉒大塚宜一. 「アレルギー関連領域の診断と治療」新生児・乳児消化管アレルギーの診断と治療. 第 17 回小児臨床薬理・アレルギー・免疫研究会—シンポジウム 4, 2009 年 2 月 1 日, (宇都宮)

㉓大塚宜一. 江東ブロック病勤薬剤師会—平成 21 年度 4 月例会, 炎症性腸疾患について本邦と欧米の治療法の違い. 2009 年 4 月 28 日, (東京)

㉔大塚宜一. 新生児・乳児消化管アレルギー

(FPIES) と新生児一過性好酸球性腸炎 (NTEC). 第 563 回日本小児科学会東京都地方会講話会指定発言, 2009 年 1 月 10 日, (東京)

㉕大塚宜一. 小児の炎症性腸疾患について. 第 568 回日本小児科学会東京都地方会講話会指定発言, 2009 年 9 月 12 日, (東京)

㉖大塚宜一, 久田研, 東海林宏道, 佐藤洋明, 清水俊明. 好酸球性腸炎としての新生児・乳児消化管アレルギー. 第 54 回未熟児新生児学会—パネルディスカッション, 2009 年 11 月 30 日, パシフィコ横浜 (横浜)

〔図書〕 (計 4 件)

①大塚宜一, 清水俊明. 周産期のアレルギー, 出生後の抗菌薬使用はアレルギー疾患と関係するか. 周産期医学, 41; 2011, 629-632

②大塚宜一. ライフスパンから見た小児科診療, 炎症性腸疾患. 小児内科, 43; 2011, 1540-1542

③大塚宜一, 他. 児玉浩子, 玉井浩, 清水俊明編. 診断と治療社, 好酸球性胃腸炎. 小児臨床栄養学, 2011, 194-196

④大塚宜一, 他. 五十嵐隆, 清水俊明編. 中山書店, 小児科臨床ピクシス 18—下痢・便秘—食物アレルギーと下痢. 2010, 63-67

〔その他〕 ホームページ

<http://www.juntendo.ac.jp/graduate/kenkyudb/search/researcher.php?MID=1777>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 宜一 (OHTSUKA YOSHIKAZU)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号 : 90338335

(2) 研究分担者

清水 俊明 (SHIMIZU TOSHIAKI)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号 : 30260889

永田 智 (NAGATA SATORU)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号 : 70266055