

研究課題名	好酸球性消化管疾患、慢性炎症の原因特定のための食物負荷試験標準化に関する研究		
フリガナ	ノムラ イチロウ		
代表者名	野村 伊知郎		
所属機関（機関名） （役職名）	国立成育医療研究センター研究所 好酸球性消化管疾患研究室・室長		
共同研究者	氏 名（フリガナ）	所属機関・役職名	役割分担
	石原 俊治 （イシハラ シュンジ）	島根大学第二内科・教授	食事療法臨床研究
	山田 佳之 （ヤマダ ヨシユキ）	東海大学小児科・教授	食事療法臨床研究
本助成金による 発表論文、学会発表 ※次ページにつづく	学会発表（国際） 1. Ichiro Nomura : Clinical features and natural histories of eosinophilic gastrointestinal disorders in a nation-wide survey in Japan, EAACI & JSA joint symposium, EAACI (欧州・アレルギー学会) 招聘シンポジウム講演、2023 年 6 月 10 日、ハンブルグ、ドイツ。 2. Ichiro Nomura, Rina Kusuda, Sho Watanabe, Saori Nagashima, Hideaki Morita, Katsuhiro Arai, Yukihiro Ohya, Kenji Matsumoto. Transcriptomic analysis of gastric tissue in pediatric eosinophilic gastritis. American Academy of Asthma, Allergy and Immunology (アメリカ・アレルギー学会), 2024 年 2 月 25 日、Washington DC, USA.		

研究結果要約

好酸球性消化管疾患 (Eosinophilic Gastrointestinal Disease: EGID¹) は厚生労働省の定めた指定難病である。生涯にわたって消化器症状が続くが、炎症の原因として食物が重要と認識されはじめた。その機序は、即時型食物アレルギーとは大きく異なる。申請者らは、成功率が高い食事療法を世界に先駆けて開発した (RAINBOW 食事療法²)。これは、一旦限定した食事をとり、炎症を寛解させ、その後 1 食物ごと 1-2 カ月程度かけて長期負荷試験を行って、その食物が原因か否かを判定する方法である (別紙図 1)。

次の段階として、長期負荷試験 (図 1 の③の時期) の詳細を知り、実施方法を検討する必要がある。このため、本研究を行い、次のような結果を得ることができた。

1. 食事療法で症状が消失した持続型小児 EIGD 患者において、症状消失後の原因食物負荷試験の結果を後方視的に調査した。10 名の患者において、のべ 30 回の負荷試験陽性が得られ、負荷陽性となるまでの日数は中央値で 20 日を要し、最長は 100 日と、長期間を必要とすることが判明した。末梢血好酸球増加、血清 TARC の増加も認められた。
2. 長期負荷試験時に信頼できる血清マーカー探索のために、血清のサイトカイン分子 64 種同時測定を行った。これにより、サイトカイン X の感度特異度が高いことが判明、候補として特定できた。
3. RAINBOW 食事療法を確実に実施する裏付けとして分子メカニズムを明らかにする必要がある、このため消化管組織トランスクリプトームを実施、514 個の EGID 疾患特異的变化分子群が特定された。これらは食事療法後に、正常化することがわかった。

本助成金による 発表論文, 学会発表	学会発表（国内）
	1. 永嶋 早織, 鈴木 啓子, 楠田 理奈, 渡辺 翔, 山本 貴和子, 福家 辰樹, 松本 健治, 大矢 幸弘, 野村 伊知郎、好酸球性消化管疾患・好酸球性肺炎 好酸球性胃炎の血清サイトカイン・ケモカインの測定, 日本アレルギー学会、2023 年 10 月 22 日、東京フォーラム 2. 楠田 理奈, 永嶋 早織, 渡辺 翔, 野村 伊知郎、好酸球性消化管疾患・好酸球性肺炎 小児の好酸球性胃炎における消化管組織トランスクリプトーム解析, 日本アレルギー学会、2023 年 10 月 22 日、東京フォーラム

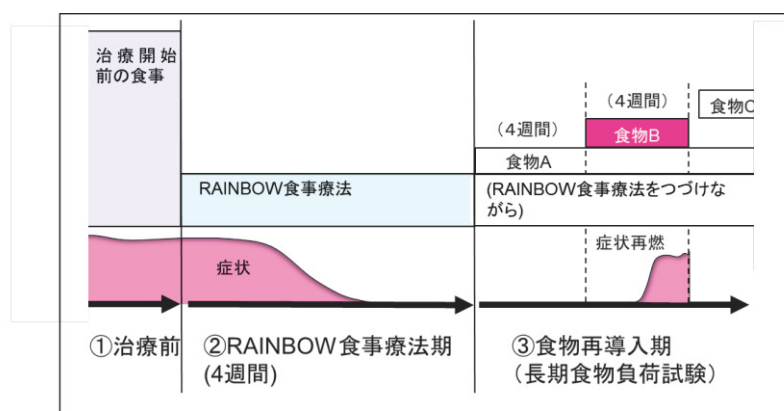


図1.RAINBOW食事療法の概説図

我々は、高い確率でいったん症状を寛解させることができる、RAINBOW食事療法を開発した。これは、アミノ酸栄養剤、野菜、果物、芋類、特定の調味料のみに一旦限定した食事を取り、消化管炎症を寛解させ、その後一つ一つの食物ごとに1〜2カ月程度かけて長期負荷試験を行って、その食物が原因か、そうでないかを判定していく方法である

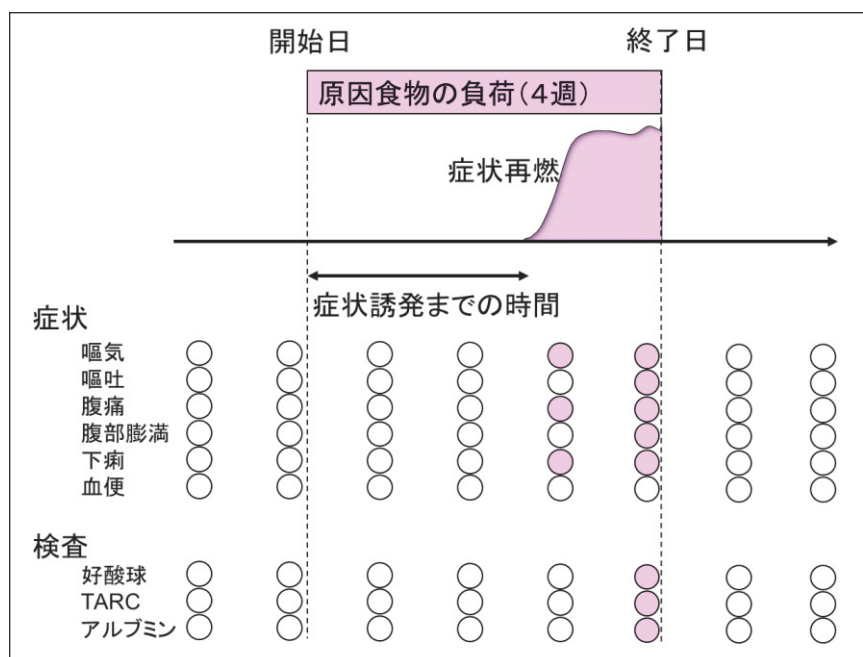


図2: 後方視的に医療情報を採取する。原因食物ごとに、図に示したごとく情報を取得する。これによって、①原因食物ごとの誘発症状、検査所見、症状誘発までに要する日数、②原因食物の頻度ランキング、が明らかとなる。原因食物の負荷前、負荷中、負荷後について、誘発された症状とその時間、血液検査について明らかにする。

研究目的

好酸球性消化管疾患 (Eosinophilic Gastrointestinal Disease: EGID) は厚生労働省の定めた指定難病である。嘔吐、食欲不振、下痢、血便、栄養障害などの症状が生涯にわたって続くため、生活の質は大きく障害される。

EGID の持続する炎症の原因として食物が重要であると認識されはじめている。しかしその病態、機序は、一般的に良く知られている即時型食物アレルギーとは大きく異なっている。原因食物の特定に血液検査は全く役に立たない。原因食物は患者ごとに大きく異なっており、またその種類も、ほとんどすべての食物に及ぶ。

我々は、高い確率でいったん症状を寛解させることができる、RAINBOW 食事療法を開発した。これは、アミノ酸栄養剤、野菜、果物、芋類、特定の調味料のみに一旦限定した食事を取り、消化管炎症を寛解させ、その後一つの食物ごとに1-2カ月程度かけて長期負荷試験を行って、その食物が原因か、そうでないかを判定していく方法である (図 1)。これにより、現在世界の先端と考えられている 6 種食物除去によっても改善しなかった EGID 患者の症状を寛解させることに成功した。²

次の段階として、長期負荷試験の詳細を検討する必要がある。原因食物種類ごとの負荷試験結果を明らかにして、全国での RAINBOW 食事療法を成功に導くことが必要である。同時に、長期負荷試験時に信頼できるバイオマーカーを探索し、特定すべきである。また、EGID の炎症が治療によってどのように変化するかを分子生物学的

手法 (トランスクリプトーム) を用いて、明らかにする必要がある。

これによって、RAINBOW 食事療法を確実に実行し、患者を生涯にわたる EGID の苦しみから救う手段を構築することができる。

研究計画及び研究手法

1. 食物負荷試験の後ろ向きコホート研究により、原因食物、負荷試験時の詳細を明らかにする

後方視的に医療情報を採取する。症例集積研究。原因食物ごとに、(別紙図 2)に示したごとく情報を取得する。これによって、①原因食物ごとの誘発症状、検査所見、症状誘発までに要する日数、②原因食物の頻度ランキング、が明らかとなる。原因食物の負荷前、負荷中、負荷後について、誘発された症状とその時間、血液検査について明らかにする。

対象患者 inclusion criteria: 2 歳以上の持続型好酸球性胃腸炎患者。食物除去治療によって、症状および検査所見が寛解し、その後負荷試験によって原因食物が特定できた児。

食物負荷試験の条件: ①食物除去治療によって、症状および検査所見が寛解し、少なくとも 7 日間以上を経過していること。②負荷食物は 1 サービングサイズ (一回に摂取できる通常の量) の 1/4 を下回らない量を連日、もしくは隔日に摂取する。③1 サービングサイズの 1/4 を下回る量で開始した場合には経口免疫療法群として、別に解析を行う。

アウトカムの測定: ①嘔気、嘔吐、腹痛、腹部膨満、下痢、血便についてデータを採取する。②原

因食物負荷開始から何日目で、症状が誘発されたかをデータ採取する。③原因食物による症状悪化に気づかれ、原因食物摂取の中断から何日間で、症状寛解が得られたかをデータ採取する。

バイオマーカーの解析：临床上必要があり測定された、末梢血好酸球数、血清 TARC、血清アルブミンのデータを解析する。

2. 血清バイオマーカーの特定により、正確な負荷試験を可能にする

64 種類のサイトカイン、ケモカインを血清において同時に測定し、検査指標を特定する。

好酸球性胃炎（EoG）は、嘔吐、食欲不振、腹痛、成長障害などの症状を引き起こす胃の慢性炎症性疾患である。小児患者の半数以上が持続型を呈し³、長期にわたる症状に悩まされる。胃の好酸球集積の証明は、診断および治療効果評価のゴールドスタンダードである。しかし、内視鏡検査は侵襲的であるため、小児に実施する同意を得るのは困難である。治療反応性の血液バイオマーカーがあれば、少ない内視鏡検査で良好なフォローアップが可能になる。しかし、治療効果を評価するためのバイオマーカーは同定されていない。候補分子を同定するために、われわれは小児 EoG 患者の血清中の 61 種類のサイトカイン/ケモカインを同時に測定した。本研究は当院の倫理委員会（725）の承認を得ており、患者およびその家族から検体およびデータの使用について同意を得た。組織学的に診断された（好酸球数 > 30 /hpf）（Pesek）持続性 EoG（罹病期間 > 6 ヶ月）で、2008 年から 2018 年の間に当施設で多食除去食

（6FED または RAINBOW 食）を受けた小児患者を本研究の対象とした。疾患特異的サイトカイン/ケモカインを同定するために、年齢をマッチさせた活動性潰瘍性大腸炎（UC）と無症候性即時型食物アレルギー（FA）の対照を選択した。治療反応性のサイトカイン/ケモカインを同定するために、治療後も評価した。

3. 消化管組織の発現マイクロアレイ解析

患者消化管粘膜の mRNA によって、発現マイクロアレイ解析を行い、特徴的な変化のパターンをとらえる。2023 年、ストックしている mRNA を使用して測定、解析を行う。

研究デザイン：好酸球性胃炎（EoG）のトランスクリプトームを、機能的胃腸障害を炎症のない対照群とし、クローン病を炎症のある疾患対照群として、3 者比較を行った。本研究は当院の倫理委員会（725）の承認を得ており、患者およびその家族から検体およびデータの使用について同意を得た。

患者選択：2012 年 3 月から 2019 年 10 月までの間に国立成育医療研究センターで EGID を示唆する臨床症状により上部および下部の消化管内視鏡検査を受けた小児患者 6 歳から 20 歳まで好酸球性胃炎（EoG）の診断を受けた患者 23 名のうち、自然経過として持続型、間歇型、単発型のうち、持続型で本研究の同意を得られたの患者 13 名でトランスクリプトーム研究を行った。

EoG の診断は症状および組織学的検査の両面から行った。症状としては心窩部の腹痛、食欲不振、嘔気、嘔吐、などの EoG に見られる症状が

あることと胃の組織に好酸球浸潤が存在することを同時に満たした場合に EoG と診断した。胃生検検体において 2 個以上の HPF に 30 個以上の好酸球を認めたものを活動性 EoG、すべての HPF の好酸球が 30 個に満たなかったものを非活動性 EoG と定義した。

4. RAINBOW 食事療法を家庭で実施するための、調味料のセットを選択し、保険収載を目指す

現在、RAINBOW 食事療法に安全に使用されている、さしすせそ（醤油代替品、辻安全食品）、スープのもと（野菜スープミックス、辻安全食品）、昆布液体だし S（マルハチ村松）、トマトケチャップ（ハインツ）、ノンオイルクリーミードレッシング（キューピー）、アマニオイル、エゴマオイルについて、厚生労働省、PMDA、食品製造企業と話し合い、検査試薬としてなどの保険収載の道を探る。2023 年、なるべく早い時期に、厚生労働省、PMDA、食品メーカー企業との会議を行う。保険収載にむけて、手続きを行う。

5. 負荷試験を家庭で行うための負荷食材試薬（牛肉、豚肉、鶏肉など）の開発を計画する

厚生労働省、PMDA、食品メーカー企業と話し合い、検査試薬としてなどの開発の道を探る。2023 年、なるべく早い時期に、厚生労働省、PMDA、食品メーカー企業との会議を行う。保険収載にむけて、手続きを行う。

結果と考察

1. 食物負荷試験の後ろ向きコホート研究により、原因食物、負荷試験時の詳細を明らかにする

【結果】（論文投稿準備中のため、一部の結果を伏せさせていただいた）好酸球性胃炎、好酸球性小腸炎、好酸球性大腸炎 10 名の患者について、合計 30 回の長期負荷試験が適格とされ、解析を行った。年齢は 6~20 才であった。いずれも数年以上持続している重症例であった。成育医療研究センターに入院の上、6 種食物除去、もしくは Rainbow 食事療法によって症状寛解を得ることができ、長期負荷試験に移行した。長期負荷試験を開始後、非即時型反応の症状誘発までの期間は、5 日~100 日と食物種類によって大きな差があった。中央値は 22 日であった。これ以外に、2 名において摂取開始当日に、蕁麻疹、呼吸器症状を含む即時型反応が見られた。原因食物の違いによる、症状誘発までの期間は大きく 2 群に分かれることが判明した。症状誘発までの期間が短い食物群を A グループ、期間が長い食物群を B グループとする。A グループの食物種類は蛋白含有量の多いものであり、腹痛、嘔吐などの症状によって開始していた。一方、B グループは蛋白含有量の少ないものが多い傾向があった。症状は軽度であるが、末梢血好酸球数、TARC などの倍マーカーの上昇が顕著であった。いずれのグループにおいても、原因食物を中止すると速やかに改善することが多かった。

【考察】好酸球性胃腸炎の食物負荷試験について、長期負荷誘発試験の結果を得ることができた。こ

れまでにこの種の報告はなく、世界初のデータと思われる。誘発までの期間が中央値で 22 日、最長で 100 日を要したことは驚きである。多くの医師が負荷期間として 7 日程度を予定していると思われる。好酸球性胃腸炎の非即時型反応の診断が非常に困難である理由のひとつが証明された。現在論文化を行っている。

【残された課題】この結果をもとに、より大きなスケールで研究を実施する必要がある。

【今後の予定】2024 年 8 月論文化。2025 年 Minds ガイドラインへの記載を行う。

2. 血清バイオマーカーの特定により、正確な負荷試験を可能にする

【結果】（論文投稿準備中のため、一部の結果を伏せさせていただいた）解析には 8 例の小児好酸球性胃炎（EoG）が含まれた。EoG の年齢中央値は 10.5 歳（四分位範囲[IQR]8.5-12.5）、75%が男性、50%が食道病変を合併していた。EoG 群は UC 群と FA 群と比較して 35 サイトカイン/ケモカインが上昇していた。UC 群の分布は FA 群と有意差はなかった。サイトカイン X が EoG 特異的上昇分子として最も顕著な変化を示した。しかも、治療後、検出感度以下まで低下していた。

【考察】サイトカイン X が EoG 特異的上昇分子として最も顕著な変化を示した。治療後、検出感度以下まで低下し、バイオマーカーとして優れていると考えられた。

【残された課題】この結果をもとに、サイトカイン X について、より大きなスケールで研究を実施する必要がある。診療ガイドラインに反映させ

る。

【今後の予定】2024 年 8 月論文化。

3. 消化管組織のトランスクリプトーム（発現マイクロアレイ）解析

【結果】（論文投稿準備中のため、一部の結果を伏せさせていただいた）疾患別の比較：機能性胃腸障害（FGID）を非炎症対照群として設定した。クローン病（CD）を炎症のある対照群とした。好酸球性胃炎（EoG）活動期の患者から採取した胃粘膜組織をオミックスデータ解析によって比較した。全 50739 個の遺伝子を使用した主成分分析では、EoG は完全に他疾患と分離しているとともに、近接した集団を形成していた。50739 個の遺伝子は 4 つのノーマライズプロセスによってノイズと判断されたデータが削除され結果として 15828 個抽出された。発現量を可視化した階層クラスタリング解析では EoG 活動期と他疾患は大きく 2 つに分かれていた。15828 個の遺伝子を FGID と EoG で比較したところ発現値に有意差のみられた 594 の遺伝子が確認された ($P<.05, >2$ 倍)。

EoG 活動期における疾患特異的遺伝子発現パターンの同定：EoG 活動期、CD を FGID と比較し発現が上昇、低下した遺伝子をそれぞれ抽出した ($P<.05, >2$ 倍)。FGID と比較して EoG 活動期で特異的に上昇した遺伝子は 260 個、CD で上昇した遺伝子は 133 個、共通する遺伝子は 55 個であった。同様に FGID と比較して低下した遺伝子は EoG で 254 個、CD で 14 個、共通して低下したものが 25 個であった。遺伝子の発現を疾患別

に比較することでより特異的な遺伝子を発見できた。EoG 活動期でみられたこれらの 260+254=514 個の遺伝子を EoG 特異的遺伝子と同定した。

発現増強する遺伝子群：EoG 活動期で特異的に上昇した上位 50 の遺伝子のうち 2014 年 Caldwell らの報告⁴のものと 13 個共通していた。EoG で最も発現の高かった CCL26 はこれまでも多くの論文で報告されており好酸球の選択的遊走や活性化にかかわるケモカインである。⁵

知られているすべてのサイトカインおよびサイトカインレセプターの発現量をみたところ、サイトカイン Y のみが有意に上昇していた。

食事療法後の EoG 特異的遺伝子正常化：PCA 解析より EoG で治療を行った 6 名の治療後の発現量をみると大きく変動していることが分かった。特に全身性グルココルチコイド治療、食事療法(6FED)を行った 5 名は FGID、CD へと近づいた。一方で EoG Patient 5 は活動期と治療後の間に位置していた。これは抗 IL13 抗体投与を行い 3 か月ほど経過した時の状態で、患者の症状は改善したものの組織の完全な正常化には至っていないことが考えられた。

治療によって変化しなかった遺伝子群：EoG 特異的遺伝子の多くが治療後に正常化する一方で、発現変動しない遺伝子もみられた。治療を行った 6 名において EoG 特異的上昇遺伝子 260 個の階層クラスター解析を行った。260 個を 17 個のクラスターに分かれたもののうちクラスター 6 の遺伝子がどの治療においても変動が見られなかった。この遺伝子の働きをみると機能 A や機能 B

に関するものが約半数を占めていた。また低下遺伝子 254 個の遺伝子で同様の解析を行ったところ 28 個に分けたうちのクラスター 27 で変動が見られなかった。この機能 A、機能 B 分子群に注目して、治療前後の HE 染色標本を見直したところ、新たな病理学的特徴の変化を発見することができた。

【考察】好酸球性胃炎のトランスクリプトームが対照群と比較して明瞭に分離できたとともに、EoG 患者同士は非常に近接していた。疾患特異的遺伝子群が同定された。治療後 2 年程度で遺伝子が正常化するものの、一部の遺伝子は正常化しておらず、それらはある役割をもつ分子群であった。治療目標についてそれらの分子群にまで及ぼすべきと考えられた。

【残された課題】好酸球性小腸炎、好酸球性大腸炎においてもトランスクリプトーム研究を実施し、その分子病態を明らかにする必要がある。

【今後の予定】2024 年 6 月論文化。

4. RAINBOW 食事療法を家庭で実施するための、調味料のセットを選択し、保険収載を目指す

【結果】研究グループで議論を重ね、Rainbow 食事療法について、負荷試験の結果を明らかにし、全国で安心して実施できる体制を整えてから、本項目に移行すべきとの結論を得た。

【考察、残された課題】時期をみて、再度実施を試みることになった。

5. 負荷試験を家庭で行うための負荷食材試薬（牛肉、豚肉、鶏肉など）の開発を計画する

【結果】研究グループで議論を重ね、Rainbow 食事療法について、負荷試験の結果を明らかにし、全国で安心して実施できる体制を整えてから、本項目に移行すべきとの結論を得た。

【考察、残された課題】時期をみて、再度実施を試みるようになった。

今後の研究活動について

2023 年度も RAINBOW 食事療法を求めて多くの患者が国立成育医療研究センターを訪れ、治療を行った。中でも、10 年以上症状に苦しんだニュージーランドからの好酸球性胃炎の女兒、出生直後に壊死性腸炎となり、小腸広範囲切除後も 2 年程度炎症が持続、栄養障害の危険が高かった、中華人民共和国からの好酸球性消化管疾患の男児は、日本において治療を行うことによって、症状寛解をはじめて得ることができ、印象に残っている。重症の好酸球性消化管疾患において、RAINBOW 食事療法は高い寛解率をもつ重要な治療法である。今回の研究によって寛解後の長期負荷試験の結果が明らかとなったが、多くの医師にとって意外な結果であったと思われる。中央値で 20 日もの負荷期間が必要であると、だれが予想しているだろうか。この結果を拡大し、厚労省研究班で作成する Minds 準拠診療ガイドラインに詳細を載せる必要がある。これにより、日本全国で RAINBOW 食事療法を間違いなく実施できるようにする。これにより、海外の患者も、訪日して入院治療を受けることで、すみやかな寛解を得て、栄養障害、神経発達症、成長障害の危険から脱することができるようにしたい。すなわち、

日本列島をして、重症の好酸球性消化管疾患が安心して治療を受けられる医療圏へと成長させるべきと考える。そのような状態となれば、本研究計画の 4 と 5 に示した、「RAINBOW 食事療法を家庭で実施するための、調味料のセットを選択し、保険収載を目指す」「負荷試験を家庭で行うための負荷食材試薬（牛肉、豚肉、鶏肉など）の開発を計画する」の実行が時期を得たものになるであろう。

参考文献

- 1) Shoda T, Taylor RJ, Sakai N, Rothenberg ME. Common and disparate clinical presentations and mechanisms in different eosinophilic gastrointestinal diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2024 Mar 28: S0091-6749(24)00298-7.
- 2) Nagashima S, Yamamoto M, Inuzuka Y, Irahara M, Miyaji Y, Tadaki H, Ito S, Masuda S, Ito Y, Saito Y, Kobayashi S, Morita H, Yoshioka T, Shimizu H, Arai K, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K, Nomura I. Tolerability and safety of a new elimination diet for pediatric eosinophilic gastritis and duodenitis. *Allergol Int*. 2023 Apr;72(2):306-315.
- 3) Yamamoto M, Nagashima S, Yamada Y, Murakoshi T, Shimoyama Y, Takahashi S, Seki H, Kobayashi T, Hara Y, Tadaki H, Ishimura N, Ishihara S, Kinoshita Y, Morita H, Ohya Y, Saito H, Matsumoto K, Nomura I. Comparison of Non-eosinophilic Eosinophilic Gastrointestinal Disorder

- s with Eosinophilic Esophagitis: A Nationwide Survey. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2021 Sep;9(9):3339-3349.e8.
- 4) Caldwell JM, Collins MH, Stucke EM, Putnam PE, Franciosi JP, Kushner JP, Abonia JP, Rothenberg ME. Histologic eosinophilic gastritis is a systemic disorder associated with blood and extragastric eosinophilia, TH2 immunity, and a unique gastric transcriptome. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Nov;134(5):1114-24.
- 5) Ben-Baruch Morgenstern N, Shoda T, Rochman Y, Caldwell JM, Collins MH, Mukkada V, Putnam PE, Bolton SM, Felton JM, Rochman M, Murray-Petzold C, Kliever KL, Rothenberg ME. Local type 2 immunity in eosinophilic gastritis. *J Allergy Clin Immunol.* 2023 Jul;152(1):136-144.