

岩手医科大学
審査学位論文
(博士)

早産児の便中 eosinophil-derived neurotoxin の 経時的測定とその影響因子解析

塩畑 健, 小田翔一, 浮津真弓,
佐々木美香, 千田勝一

岩手医科大学医学部, 小児科学講座

(Received on February 7, 2014 & Accepted on February 24, 2014)

要旨

便中 eosinophil-derived neurotoxin (EDN) は, 成人や乳幼児の消化管食物アレルギーの便中マーカーとして注目されている. 本研究ではミルクアレルギーの症候がない早産児の便中 EDN を経時的に測定し, この測定値に与える影響因子を解析した. 対象は 57 人 (在胎 28.5 週, 出生体重 1110g: 中央値) で, 便中 EDN は生後 0—1 日, 2—3 日, 4—5 日, 1 週, 2 週, 4 週, 6 週, 8 週に測定した. 影響因子解析は便中 EDN を従属変数とし, 採血を行った生後 0—1 日, 1 週, 2 週, 4 週, 8 週における変

数を独立変数とする重回帰分析で行った. この結果, 便中 EDN (中央値) は生後 0—1 日 (855.1ng/g) から 1 週 (477.8ng/g) まで有意差がなく, その後は生後 1 週から 8 週 (919.6ng/g) まで有意に上昇した. 生後 4 週から 8 週までは有意な変化がなかった. 便中 EDN 測定値と生後 1 週の母乳栄養との間で負の関連が認められた (標準偏回帰係数 - 0.58, $R^2=0.323$, $p<0.001$). この便中 EDN の経時的測定値は, 早産児の参照値として使用できると考えられた.

Key words : fecal biomarker, eosinophil-derived neurotoxin, preterm infant, gastrointestinal allergy

I. 緒言

好酸球の特異顆粒蛋白には major basic protein (MBP), eosinophil cationic protein (ECP), eosinophil-derived neurotoxin (EDN), eosinophil peroxidase (EPO) があり, これらは細胞傷害作用を有している¹⁻³⁾. このうち, EDN は小脳失調を引き起こす分子量約 18kDa の神経毒として同定されたもので⁴⁾, 最近, 成人や乳幼児の消化管食物アレルギーに対する腸管炎症の便中マーカーとして注目されている^{5,6)}. 一方, 新生児のミルクアレルギーに対しては, 簡便な便中の潜血反応検査や好酸球数測定が行われている. しかし, これらの検査の診断的価値は高くなく⁷⁾, 新たな便中マーカー

の出現が期待されている. ミルクアレルギーの発症率は, 腸管の未熟な早産児 (在胎 37 週未満) のほうが正常産児よりも高い^{7,8)}.

本研究では, 早産児のミルクアレルギーの便中マーカーとして EDN の有用性を評価するのに先立ち, 便凍結保存までの時間による EDN 測定値への影響を検討した. また, ミルクアレルギーの症候がない早産児の便中 EDN を経時的に測定し, この測定値への影響因子を解析した.

II. 研究対象及び方法

本研究は岩手医科大学の倫理委員会の承認を得て行なった.

1. 便凍結保存までの時間による EDN 測定値への影響

便は排出直後に採取できない可能性があり、また、便中 EDN 測定は便採取後に検査施設まで常温で届ける可能性も考えられる。このため、便採取までの時間と、便採取から凍結保存までの時間による EDN 測定値への影響を検討した。

1) 対象

便採取までの時間による EDN 測定値への影響は、2013 年 2 月に当院の新生児集中治療室 (NICU) に入院中で、全身状態が安定している早産児 6 人 (生後 34 日～133 日) と、当院の産科に入院中の正期産児 2 人 (生後 0 日, 13 日) の計 8 人とした。

便採取から凍結保存までの時間による EDN 測定値への影響は、2013 年 2 月に当院の NICU に入院中の前記とは別の対象で、全身状態が安定している早産児 7 人 (生後 13 日～142 日) と、正期産児 1 人 (生後 66 日) の計 8 人とした。

2) 便の採取と保存

便は浣腸排便直後のおむつから採取した。この際、おむつ上で便の固形部分と粘液部分が一樣になるように“つまようじ”で混ぜ合わせ、便重量が 0.010～0.020g の範囲になるように 2ml 自立型凍結保存チューブ (品番 72.694, Sarstedt, 東京) に入れて測定した。

便採取までの時間による検討では、前記の重量測定後すぐに -20℃ で凍結保存したものと、おむつ上の同一検体 0.1g を新しいおむつ上に移し、密閉した容器 (温度 26℃, 湿度約 75%) に 2 時間置いたあとに凍結保存したものについて、便採取から 14 日後に便中 EDN を測定した。

便採取から凍結保存までの時間による検討では、前記の方法で同一検体を 3 本の保存チューブに取り分け、重量測定後すぐに凍結保存したものと、室温 (約 23℃) に 2 日間、および 7 日間置いたあとに凍結保存したものについて、便採取から 15 日後に便中 EDN を測定した。

両者の検体には、おむつに尿が染みていないものを使用した。

3) 便中 EDN の測定

便中 EDN はサンドイッチ法による便、尿、血清、血漿用 EDN ELISA kit (Immuno-diagnostik, Bensheim, Germany) を用いて、マニュアルに従って測定した。すなわち、保存検体を室温で解凍したのち、専用の extraction buffer (内容非公開) を 50 倍希釈になるよう 0.5～1.0ml 加えた。これを試験管ミキサーで 30 秒間攪拌して 10～20 分間静置し、上清 100μl を専用の wash buffer (内容非公開) で 4 倍に希釈して測定検体とした (最終希釈倍率 200 倍)。次にモノクローナル抗ヒト EDN 抗体でコーティングしたウェルを wash buffer で洗浄後、測定検体、標準検体、陰性と陽性のコントロールのそれぞれ 100μl を注入して室温で 1 時間振盪した。ウェル内を除去して wash buffer で洗浄後、ペルオキシダーゼ結合ウサギポリクローナル抗ヒト EDN 抗体を加えて室温で 1 時間振盪した。ウェル内を除去して wash buffer で洗浄後、テトラメチルベンジジンを加えて室温で暗所に 20 分間静置した。反応停止液を添加し、マイクロプレートリーダー (モデル 680, 日本バイオ・ラッドラボラトリーズ, 東京) で主波長 (450nm) と副波長 (620nm) で吸光度を測定し、標準検体の検量線から便中 EDN (ng/ml) を比色定量した。結果は便 1g 当たりの量に標準化して ng/g で表した。検出下限 (50ng/g) 未満の検体は 0ng/g として扱い、検出上限 (10000ng/g) 以上の検体はさらに希釈して測定することにした。

2. 早産児の便中 EDN の経時的測定と測定値への影響因子解析

1) 対象

2013 年 2 月から 10 月までに当院 NICU へ入院した新生児 88 人のうち、早産児は 67 人であった。このうち、家族の同意が得られた 57 人を対象とした (表 1)。早産児で除外されたのは、

表 1. 対象の特徴

産科因子	症例数 (n=57)	
母体年齢 (歳)	30	(21 ~ 42)
両親のアレルギー性疾患の既往	24	42%
母体への分娩前ステロイド筋注	39	68%
母体発熱	7	12%
妊娠高血圧症候群	9	16%
帝王切開	50	88%
多胎 (双胎 5 組)	10	18%
新生児因子		
在胎期間 (週)	28.5	(23.3 ~ 36.5)
出生体重 (g)	1110	(482 ~ 2980)
<1000g	20	35%
small-for-dates 児	7	12%
男児	28	49%
院外出生	0	0%
気管挿管	39	68%
Apgar スコア 5 分値 7 点未満	17	30%
血液ガス pH (臍帯動脈血)	7.32	(6.57 ~ 7.44)
呼吸窮迫症候群	37	65%
薬物学的動脈管閉鎖療法	29	51%
動脈管結紮術	12	21%
抗菌薬使用	57	100%
プロバイオティクス使用	38	67%
授乳開始日齢	2	(0 ~ 9)
総授乳量が 100ml/kg/日に達した生後日数	19	(3 ~ 43)
母乳栄養	13	23%

数値は人数と%, または中央値 (範囲) を表わす.

先天異常のため出生後に緊急手術が行われた 8 人 (心疾患 5 人, 消化器疾患 3 人) と, 白血病 1 人, 生後 7 日に入院した 1 人である. なお, 1. 1) の対象と重複する児はいない.

2) 便の採取と保存

便は生後 0—1 日, 2—3 日, 4—5 日, 1 週, 2 週, 4 週, 6 週, 8 週に 1. 2) の方法で採取し, 重量測定後すぐに -20°C で凍結保存した.

3) 便中 EDN の測定

便中 EDN は 1. 3) の手順で測定した. この測定にはマイクロプレートリーダー (iMarkTM, 日本バイオ・ラッドラボラトリーズ, 東京) を使用した.

4) 影響因子解析

生後 0—1 日, 1 週, 2 週, 4 週, 8 週の測定値に影響を及ぼすと考えられる因子を前方視的に記録した. この生後時期は日常管理に必要な最小限の採血時期から選択したもので, 通常, 採血検査を行わない生後 2—3 日, 4—5 日, 6 週は因子解析から除外した.

生後時期によらない共通項目として次の因子を選択した: 在胎期間, 出生体重, small-for-dates 児, 性別, 両親の小児期アレルギー歴の有無 (アトピー性皮膚炎/気管支喘息/食物アレルギー). さらに生後時期別に次の因子を選択した. 生後 0—1 日: 分娩前の母体へのステロイド筋注の有無, 分娩前の母体発熱の有無, 分娩直前の母体血清 CRP 値, 分娩様式, Apgar スコア 5 分値, 臍帯動脈血ガス分析 pH 値, 呼吸窮迫症候群の有無, 末梢血白血球数・好酸球数・血清 CRP 値 (採血時期の範囲: 生後 0 ~ 1 日). 生後 1 週: 呼吸窮迫症候群の有無, 薬物学的動脈管閉鎖療法の有無, 動脈管結紮術の有無, 抗菌薬使用の有無, プロバイオティクス服用の有無, 栄養チューブから引ける胃残量 (ml/kg/日), 授乳量 (ml/kg/日), 栄養の種類, 末梢血白血球数・好酸球数・血清 CRP 値 (同: 生後 5 ~ 9 日). 生後 2 週: 抗菌薬使用の有無, プロバイオティクス服用の有無, 胃残量, 授乳量, 栄養の種類, 末梢血白血球数・好酸球数・血清 CRP 値 (同: 生後 10 ~ 19 日). 生後 4 週: 酸素使用の有無, 抗菌薬使用の有無, プロバイオティクス服用の有無, エリスロポエチン使用の有無, 胃残量, 授乳量, 栄養の種類, 末梢血白血球数・好酸球数・血清 CRP 値 (同: 生後 25 ~ 34 日). 生後 8 週: 酸素使用の有無, 抗菌薬使用の有無, プロバイオティクス服用の有無, エリスロポエチン使用の有無, 胃残量, 授乳量, 栄養の種類, 末梢血白血球数・好酸球数・血清 CRP 値 (同: 生後 50 ~ 66 日).

3. 統計学的解析

正規性の検定には Shapiro-Wilk 検定を用い

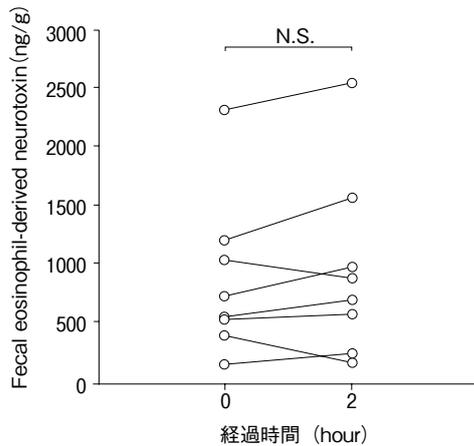


図1. 便採取までの時間による EDN 測定値への影響

排便後まもなく凍結保存した検体と、おむつ上に2時間置いたあとに凍結保存した検体の測定値 (n=8). N.S., not significant

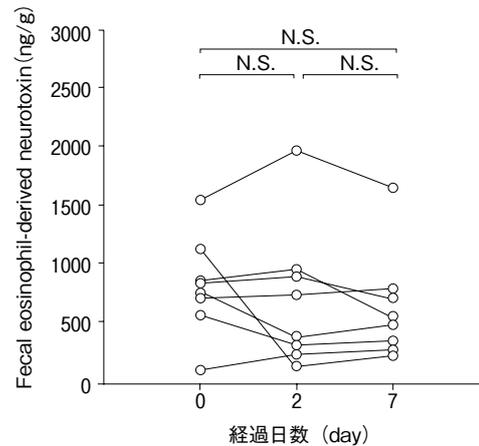


図2. 便採取から凍結保存までの時間による EDN 測定値への影響

排便後まもなく凍結保存した検体と、室温に2日間、および7日間置いたあとに凍結保存した検体の測定値 (n=8). N.S., not significant

た. 2群間の比較は Wilcoxon の符号付き順位検定で, 多群間の比較は Wilcoxon の符号付き順位検定を行い, Bonferroni 法で補正した. 影響因子解析は便中 EDN 測定値を従属変数に, 生後時期ごとの因子を独立変数としたステップワイズ重回帰分析で行なった. 統計解析には IBM SPSS Statistics (ver. 21.0, エス・ピー・エス・エス, 東京) を使用し, 有意水準を $p < 0.05$ とした. 数値は特に断りがなければ中央値 (範囲) で表した.

III. 結 果

1. 便凍結保存までの時間による EDN 測定値への影響

便採取までの時間による検討において, 便中 EDN は排便後まもなく凍結保存した検体の測定で 630.9ng/g ($111.8 \sim 2324.3$), おむつ上に2時間置いたあとに凍結保存した検体の測定で 757.8ng/g ($160.4 \sim 2511.8$) であり, 両群間で有意差を認めなかったが ($p=0.401$), 個々の検体で若干の増減がみられた (図1).

便採取から凍結保存までの時間による検討において, 便中 EDN は排便後まもなく凍

結保存した検体の測定値が 788.4ng/g ($102.1 \sim 1524.2$), 室温に2日間置いたあとに凍結保存した検体の測定値が 548.4ng/g ($145.8 \sim 1903.3$), 室温に7日間置いたあとに凍結保存した検体の測定値が 471.6ng/g ($205.7 \sim 1565.9$) であり, これら3群間で有意差がなかった ($p=0.325$) (図2). しかし, 個々の検体ではこれら3点間で増減がみられ, 0日よりも2日に大きく低下した検体があった.

2. 早産児の便中 EDN の経時的測定

対象の特徴を表1に示す. 在胎期間は28.5週 (23週~36週), 出生体重は 1110g ($482 \sim 2980$), 男児が28人 (49%) であった.

生後時期ごとの検体は1人1検体とし, 計361検体を測定した. 生後4週から8週までに17人が退院または転院し, これらの対象についてはその時点で測定を終了した. 検出下限未満の検体は6人で7検体あったが, 検出上限以上の検体はなかった.

便中 EDN の測定値は, 生後0-1日が 851.1ng/g ($112.7 \sim 9043.5$), 2-3日が 577.8ng/g ($0 \sim 4076.2$), 4-5日が 463.4ng/g ($55.9 \sim 2472.8$), 1週が 477.8ng/g ($0 \sim$

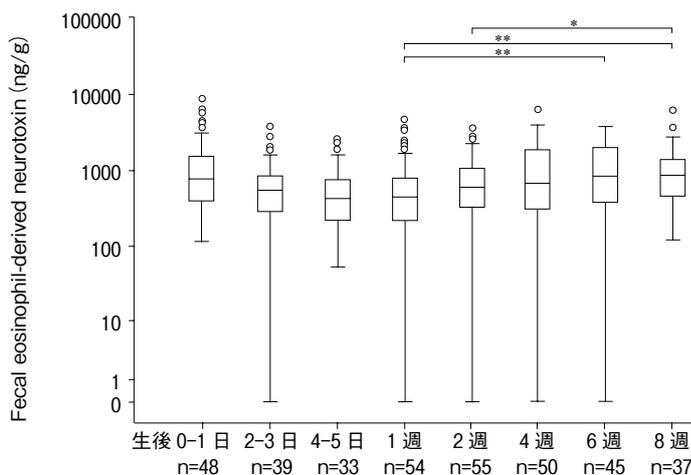


図 3. 便中 EDN の経時的測定
 箱ひげ図は中央値と四分位範囲，および箱の高さの 1.5 倍を超えない範囲での最大値と最小値を示す。○は外れ値。縦軸は対数表示。n は生後時期別検体数。*，p<0.05；**，p<0.01

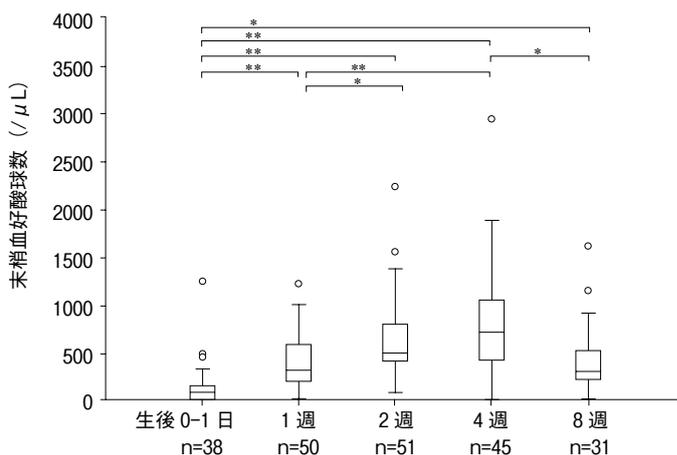


図 4. 末梢血好酸球数の経時的測定
 箱ひげ図は中央値と四分位範囲，および箱の高さの 1.5 倍を超えない範囲での最大値と最小値を示す。○は外れ値。n は生後時期別検体数。*，p<0.05；**，p<0.01

3733.5)，2 週が 631.0ng/g (0 ~ 3534.8)，4 週が 734.7ng/g (0 ~ 6566.3)，6 週が 874.6ng/g (0 ~ 3982.2)，8 週が 919.6ng/g (134.3 ~ 6060.4) であった (図 3)。この測定値は生後 0—1 日から 1 週まで有意差がなかった。その後は生後 1 週よりも 6 週 (p<0.001) と 8 週 (p<0.001) で有意に高くなり，また，生後 2 週よりも 8 週 (p=0.001) で有意に高かった。しかし，この測定値の分布範囲は，生後時期によってかなり大

きかった。

3. 便中 EDN 測定値の影響因子解析

重回帰分析の結果，便中 EDN 測定値と生後 1 週の母乳栄養との間で負の関連が認められた (標準偏回帰係数 - 0.58, R²=0.323, p<0.001)。そのほかの生後時期における有意な因子は選択されなかった。生後時期別の末梢血好酸球数は，生後 0—1 日が最も少なかった (図 4)。

IV. 考 察

早産児の便中 EDN を出生後から経時的に測定した報告はない。本研究では早産児の便中 EDN が生後 0—1 日から 1 週まで有意な変化がなく、その後は 1 週から 8 週までに有意に高くなった。生後 4 週から 8 週までは有意な変化がなかった。対象には観察期間中にミルクアレルギーの症候を表したものがなかったことから、この便中 EDN の経時的測定値は、ミルクアレルギーの顕性症候がない早産児の参照値として使用できると考えられた。しかし、この測定値の分布範囲は、生後時期によってかなり大きかった。

便中 EDN 測定値の影響因子解析の結果、生後 1 週に母乳栄養と負の関連が認められた。これは人工栄養または混合栄養の場合に便中 EDN が高いことを表している。腸管の炎症マーカーとされる便中 calprotectin を早産児で測定した当施設の報告によると、生後 1 週の便中 calprotectin でも母乳栄養と負の関連が認められた⁹⁾。このことから、未熟な早産児では嘔吐や血便といったミルクアレルギーの症候が現れなくても、牛乳蛋白に由来する軽微なアレルギー反応によって腸管炎症が惹起されている可能性が考えられた。そのほかの生後時期では、選択した因子による有意な関連が認められなかったため、便中 EDN が生後 1 週から 8 週に上昇した理由や、生後時期によって分布範囲が大きい理由は不明である。なお、本対象における出生後の末梢血好酸球数の推移は、出生後から徐々に増加して 3～4 週目にピークとなり、その後は徐々に減少するという早産児の測定結果¹⁰⁾と同様であったが、末梢血好酸球数は便中 EDN 値への影響因子として選択されなかった。また、ミルクアレルギーの 1～18 か月児、11 人の便中 EDN を測定した報告⁶⁾でも、その分布範囲は <50 (検出下限未満)～3650ng/g と大きい結果になっている。

経口負荷試験によってミルクアレルギーと診断した生後 1～18 か月児 (n=11) において、

便中 EDN 測定 (カットオフ値 2818ng/g) が有用であったとする報告がある⁶⁾。本対象ではこのカットオフ値を持続して上回る児はなかった。また、このカットオフ値を一時的に上回った児でも、観察期間中にミルクアレルギーの症候を示した児はなかった。経口負荷試験で診断された新生児、乳児の IgE 非依存性消化管食物アレルギーは、わが国では嘔吐と血便の有無によって 4 群に分類されている¹¹⁾。この分類によると、便中 EDN は血便をきたした群で高値を示したという報告がある¹²⁾。新生児・乳児消化管アレルギーには症候によって便中 EDN 測定値が異なる可能性があり、この検査の診断への応用に当たっては、群別に検討する必要があると考えられた。なお、嘔吐も血便もない群では体重増加不良や下痢などで発症しており、本対象ではこのような症候を示したものもなかった。

本研究では、便採取までの時間が 2 時間、便採取後から凍結保存までの時間が 7 日まで、常温でも EDN 測定値への有意な影響は認められなかった。これは Peterson らの報告で、便中 EDN 測定値が 6℃、22℃、34℃でも 7 日間安定していたとする結果と同様であった¹³⁾。しかし、個々の検体では便採取までと、凍結保存までの時間によって、便中 EDN 測定値に増減がみられた。この理由として、一つは便採取までの時間による影響では便中の水分がおむつに吸収されるか、蒸散して水分量が異なる可能性によること、もう一つは便を“つまようじ”で混ぜ合わせても便中 EDN が均一にならない可能性があることが考えられた。今後、水分量の測定や、便の複数箇所を採取した EDN の測定によって上記の可能性を検討する必要がある。また、本研究では、特に早産児の便 1 回量が少なくなる生後 2～5 日頃と、転院・退院児が増えた生後 8 週に、便採取数が減少したことが問題点である。さらに、便に尿が混じった場合の尿中 EDN の影響についても検討が必要である。

V. 結 語

早産児の便中 EDN 測定値は、便採取から凍結保存までの期間が7日まで、常温に置いても有意な変化を認めなかったが、個々の検体では一定でなかった。生後時期別の便中 EDN 測定値は分布範囲が大きかったが、早産児の消化管アレルギー検査の参照値として使用できると考えられた。

利益相反：著者には開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) **Yang D, Rosenberg HF, Chen Q, et al.**: Eosinophil-derived neurotoxin (EDN), an antimicrobial protein with chemotactic activities for dendritic cells. *Blood* **102**, 3396-3403, 2003.
- 2) **Yang D, Chen Q, Rosenberg HF, et al.**: Human ribonuclease A superfamily members, eosinophil-derived neurotoxin and pancreatic ribonuclease, induce dendritic cell maturation and activation. *J Immunol* **173**, 6134-6142, 2004.
- 3) **藤澤隆夫**: 好酸球とアレルギー。皮膚アレルギーフロンティア **4**, 7-12, 2006.
- 4) **Fredens K, Dahl R and Venge P**: The Gordon phenomenon induced by the eosinophil cationic protein and eosinophil protein X. *J Allergy Clin Immunol* **70**, 361-366, 1982.
- 5) **Magnusson J, Gellerstedt M, Ahlstedt S, et al.**: A kinetic study in adults with food hypersensitivity assessed as eosinophil activation in fecal samples. *Clin Exp Allergy* **33**, 1052-1059, 2003.
- 6) **Kalach N, Kapel N, Waligora-Dupriet AJ, et al.**: Intestinal permeability and fecal eosinophil-derived neurotoxin are the best diagnosis tools for digestive non-IgE-mediated cow's milk allergy in toddlers. *Clin Chem Lab Med* **51**, 351-361, 2013.
- 7) **Miyazawa T, Itahashi K and Imai T**: Management of neonatal cow's milk allergy in high-risk neonates. *Pediatr Int* **51**, 544-547, 2009.
- 8) **野村伊知郎**: 新生児-乳児消化管アレルギーの概要。アレルギーの臨床 **31**, 1098-1104, 2011.
- 9) **浮津真弓, 塩畑 健, 佐々木美香, 他**: 早産児の便中 calprotectin の経時的測定とその影響因子解析。岩手医誌 **64**, 247-253, 2012.
- 10) **大場邦弘, 河野寿夫**: 早産児の好酸球数の検討。日未熟児新生児会誌 **20**, 49-55, 2008.
- 11) **Nomura I, Morita H, Ohya Y, et al.**: Non-IgE-mediated gastrointestinal food allergies: distinct differences in clinical phenotype between western countries and Japan. *Curr Allergy Asthma Rep* **12**, 297-303, 2012.
- 12) **森田英明, 野村伊知郎, 松本健治**: 新生児-乳児消化管アレルギー患者における便中 Eosinophil-Derived Neurotoxin (EDN) 測定の意義。日小児栄消肝会誌 **25** (増刊), 63, 2011.
- 13) **Peterson CGB, Eklund E, Taha Y, et al.**: A new method for the quantification of neutrophil and eosinophil cationic proteins in feces: establishment of normal levels and clinical application in patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **97**, 1755-1762, 2002.

Serial measurements of fecal eosinophil-derived neurotoxin in preterm infants and analysis of influencing factors

Takeshi SHIOHATA, Shoichi ODA, Mayumi UKITSU,
Mika SASAKI and Shoichi CHIDA

Department of Pediatrics, School of Medicine,
Iwate Medical University, Morioka, Japan

(Received on February 7, 2014 & Accepted on February 24, 2014)

Abstract

Fecal eosinophil-derived neurotoxin (EDN) has attracted attention as a non-invasive marker of gastrointestinal food allergies in both adults and infants. In the present study we conducted serial measurements of fecal EDN in preterm infants without milk allergy signs and analyzed factors affecting the measured values. EDN levels in the feces of 57 preterm infants (median gestational age, 28.5 weeks; median birth weight, 1110 g) were measured on postnatal days 0-1, 2-3, 4-5, and weeks 1, 2, 4, 6, and 8. Multiple linear regression analysis was conducted with fecal EDN as the dependent variable and various parameters as independent

variables on postnatal day 0-1 and weeks 1, 2, 4 and 8 when blood samples were taken. Significant changes in median fecal EDN values were not observed between postnatal 0-1 day (855.1 ng/g) and 1 week (477.8 ng/g), then significantly increased until postnatal 8 weeks (919.6 ng/g). A negative correlation was observed between fecal EDN values and breast milk feeding at postnatal 1 week (standard partial regression coefficient, -0.58 ; $R^2=0.323$; $p<0.001$). These serial measurements of fecal EDN could provide reference values for fecal EDN in preterm infants to detect milk allergy.
