

正常新生児・乳児の便粘液中に出現する好酸球の解析

—食物アレルギー患者における便粘液中好酸球の動態との比較—

千葉大学医学部小児科

平野清美 下条直樹 勝木利行
石川信泰 河野陽一 新美仁男

正常乳児を対象として、生直後よりの栄養（母乳，調整粉乳，アミノ酸乳）により便粘液細胞診中に出現してくる好酸球の出現状況を半年間観察し，消化管アレルギー（ミルクアレルギー）患者のそれと比較し，以下の結果を得た。

① 二親等以内にアトピー歴がない正常乳児においては，哺乳開始後の移行便中にハンセル染色陽性顆粒を有する細胞（好酸球）が，一過性に出現し1週間以内にほぼ消失した。

② 哺乳内容にかかわらず（母乳，調整粉乳，アミノ酸乳），便粘液中好酸球は出現した。

③ 母乳哺乳児は調整粉乳に，またアミノ酸乳哺乳児は母乳に変更すると再び一過性に多量の好酸球の出現が認められたがすぐに消失した。その後同量の調整粉乳を与えても好酸球の出現は認められなかった。

④ 両親が強いアトピー素因を有する乳児において，母乳から調整粉乳に変更した際に多量の好酸球が出現し，さらに好酸球数の低下が正常乳児に比較して遷延化した。

⑤ ミルクアレルギーを起こしている患児では便粘液中に多量の好酸球が常に認められた。調整粉乳又は母乳を除去すると臨床症状の改善と共に減少または消失した。また抗原と思われる調整粉乳，母乳を再び経口負荷すると好酸球は増加を示し，哺乳を中止しない限り持続的に便中に多量に出現した。

以上より，正常乳児とミルクアレルギー患児では便粘液中に出現する好酸球の動態が異なることが示された。この結果は，ミルクを原因とする消化管アレルギーの診断においてのみならず，正常乳児の食物抗原に対する免疫応答を考える上でもきわめて重要な結果と考えられた。

Key words: eosinophil — Hansel staining — infants — milk allergy — stool smear cytology

はじめに

ミルクアレルギーによる乳児の胃腸炎ではしばしば便粘液中に好酸球が認められ診断の補助に用いられている^{1)~3)}。しかしながら，従来の検討はすべてミルクアレルギーを疑った患者においてのみなされており，便粘液中の好酸球の正常乳児における出現の有無については現在まで解析がなされていない。

そこで我々は，正常乳児を対象として，生直後の胎便より生後初めて哺乳する栄養と便中に出現してくる細胞の関係を経時的に観察するとともにアレルギー患児についても同様の検討を行ったので，ここに報告する。

対象と方法

正常乳児の各月齢における便検体は，千葉大学医学部小児科関連病院の一般の乳児健診を受診した乳児143名から採取した。明らかなアトピー性皮膚炎や下痢症状を起こしている乳児は対象から除外した。さらに，正常乳児の生直後より経口摂取した栄養と便に出現する細胞の関係を調べるため，関連病院の産科で出産した乳児の胎便より半年間経時的に便を採取した。生直後からの栄養として，混合栄養（調整粉乳と母乳がほぼ同時に投与された）2例，母乳のみを哺乳させその後数カ月たって調整粉乳を与えた2例，また生直後よりアミノ酸乳（エレメンタルフォーミュラ，明治乳業，東京）を，その数日後母乳を哺乳させた2例を対象として選んだ。以上の症例は二親等以内にアレルギー疾患をもった家族がいないことを確認した。さらに，両

Received: February 20, 1997

Accepted: June 9, 1997

Table 1 Grading of eosinophil number on stool smear

0	No cells
1	Several on whole slide
2	1-5/500×field >5 fields
3	6-10/500×field >5 fields
4	11-20/500×field >5 fields
5	21-30/500×field >5 fields
6	>30/500×field >5 fields

親にアトピー素因を有する乳児についても同様の検討を行った。これらの対象児全てについてインフォームドコンセントを得た後に便検体を採取した。ミルクアレルギーによる下痢症を有する患児は千葉大学医学部小児科アレルギー外来を受診中の生後数日から6カ月までの20名を対象とした。

できる限り新鮮な便粘液部分をスライドグラスに塗抹し、乾燥固定後にエオジノステイン（鳥居薬品，東京）にてハンセル染色を行い，陽性顆粒を有する細胞を顕微鏡下で鏡検した。さらに，好酸球性ペルオキシダーゼに対するマウス単クローン性抗体（ニチレイ，東京）を用いた蛍光抗体法によって細胞内顆粒の染色特性についても検討した。その他の細胞は湿固定を行ってパパニコロ染色により細胞の形態や分画を観察した。便粘液中の好酸球数はハンセル染色陽性顆粒を有する好酸球の便粘液中の数を Table 1 に示すように1～6のグレードで表した。

結 果

1) 便粘液中好酸球の染色

末梢血中および鼻粘膜スミアの好酸球は，ハンセル染色によって鮮やかな赤色に染色される⁴⁾が，便中の好酸球は Fig. 1a に示すように赤黒色から赤黄色の顆粒を有する細胞として染色される。本細胞は好酸球性ペルオキシダーゼに対する単クローン性抗体による蛍光抗体法で陽性に染色され (Fig. 1b)，また共焦点レーザー顕微鏡によって，分葉核を有することから (Fig. 1c)，好酸球であることが確認された。

2) ミルクアレルギー患者の便粘液中好酸球

臨床的に食物が原因で消化管アレルギーと診断された乳児の便粘液を調べてみるとグレード5～6と多量

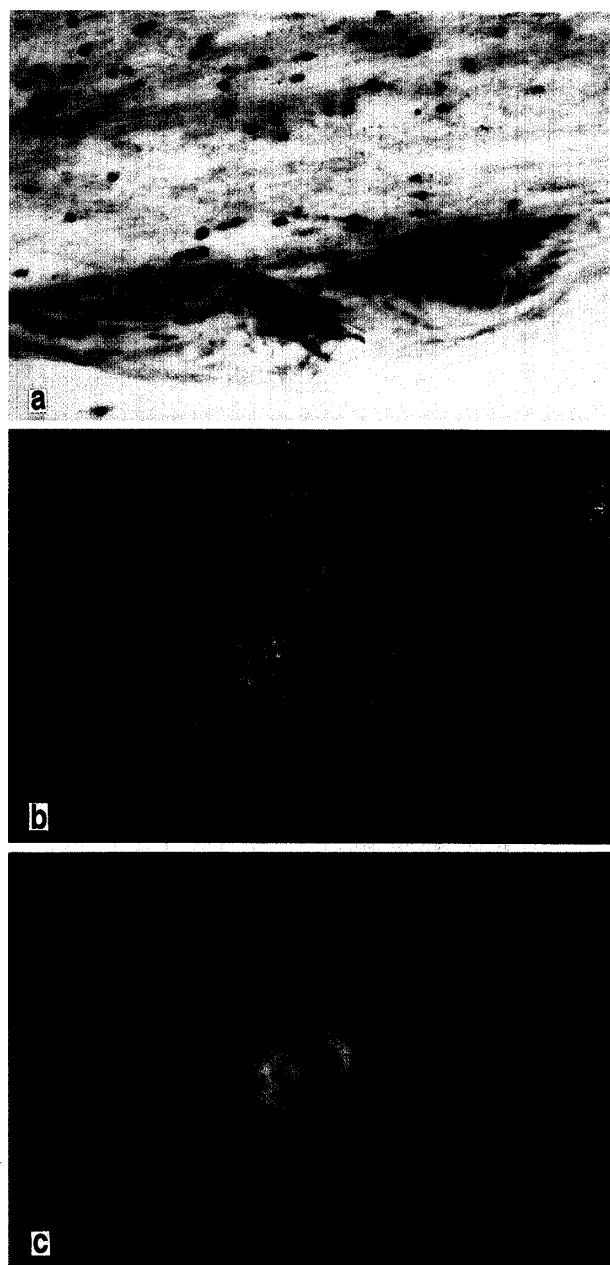


Fig. 1. Eosinophils in stool smear a) Hansel staining of eosinophils in stool smear (400×). b) Detection of eosinophil peroxidase by fluorescence microscopy (170×). c) Eosinophil stained with anti-eosinophil peroxidase (green) and propidium iodide (red) by confocal laser microscopy (2800×).

の好酸球が認められた。これらの患者で食物アレルギーを除去した後は月齢，年齢にかかわらず臨床症状の改善と共にすべての患者で便粘液中好酸球数はグレード0～3まで明らかに減少した (Fig. 2)。また負荷試験により再びグレード5～6まで上昇が認められた。すなわち，便粘液中好酸球数はミルクを原因アレ

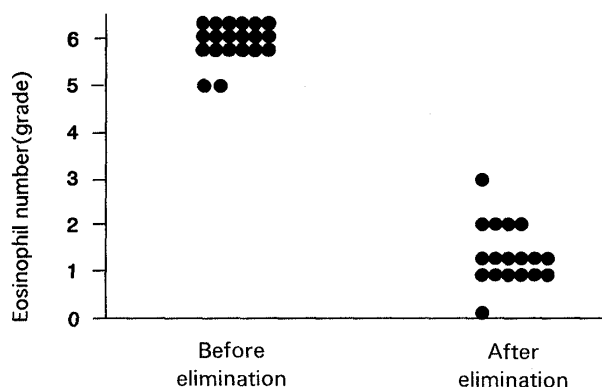


Fig. 2. Change of eosinophil number on stool smear after food elimination in food-allergic infants.

ルゲンとする消化管アレルギーの局所での炎症反応を示していると考えられた。

3) 各月例における正常乳児における便粘液中好酸球数の推移

健診に来院した乳児のなかで下痢症状やアトピー性皮膚炎のない生直後から6カ月までの乳児を対象として生直後の胎便から移行便またその後の便に出現してくる好酸球数を個々に検討した (Fig. 3)。生後1カ月以降、半年までの乳児においては便粘液中好酸球数はグレード0から3までであり、ミルクアレルギー患者に認められた多量の便粘液中好酸球を認める例は1例もなかった。しかしながら、1カ月未満の乳児においては、嘔吐・下痢などミルクアレルギー患者にみられる症状が全くないにも関わらず、グレード4から6ま

での多量の好酸球が存在することが明らかとなった。胎便中には好酸球はまったく認められなかったことから、生後1カ月までの間で、正常乳児の便中に好酸球が出現してくることが示唆された。そこで、生直後からの正常乳児の便をすべて経時的に採取して便粘液中の好酸球数を検討した。

4) 混合栄養を行った正常乳児の便粘液中好酸球数の推移

混合栄養の2例は調整粉乳を生直後より開始して母乳が出始めたら直ちに母乳も哺乳させた症例である。症例1は生後約11時間で調整粉乳を哺乳しその後6時間後に母乳も哺乳した (Fig. 4a)。調整粉乳を経口摂取して24時間目、母乳が入って18時間後には好酸球はグレード5とピークに達し、その後漸減し72時間後にはグレード0～1とほぼ消失した。症例2は、生後約10時間で調整粉乳を哺乳しその後36時間後に母乳も哺乳した (Fig. 4b)。調整粉乳を経口摂取21時間後に好酸球がグレード3となり、その後、母乳を経口摂取してから20時間後にさらに好酸球はグレード5と多量に出現した。本例では、日齢5日 (117時間) 後には便粘液中好酸球はグレード0と消失した。その後、2症例ともに半年間の追跡調査では低粘液中好酸球の出現を認めていない。

5) 母乳栄養を行った正常乳児の便粘液中好酸球数の推移

生直後より5%糖水のみを哺乳させて初乳がでてから母乳のみを哺乳させた乳児2例の便粘液中好

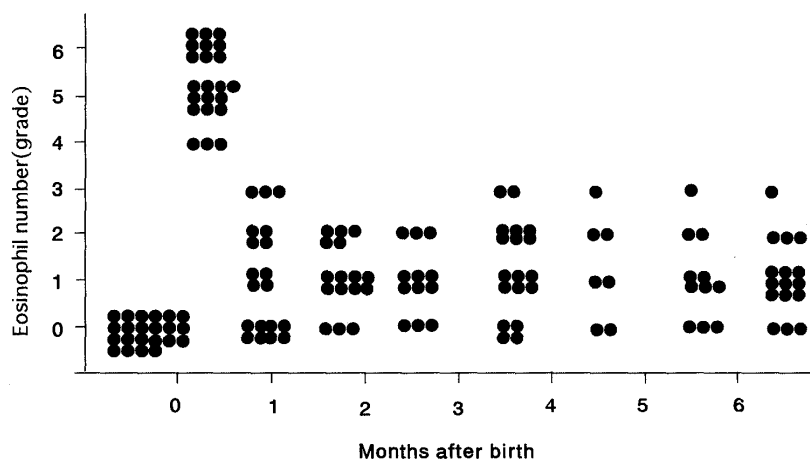
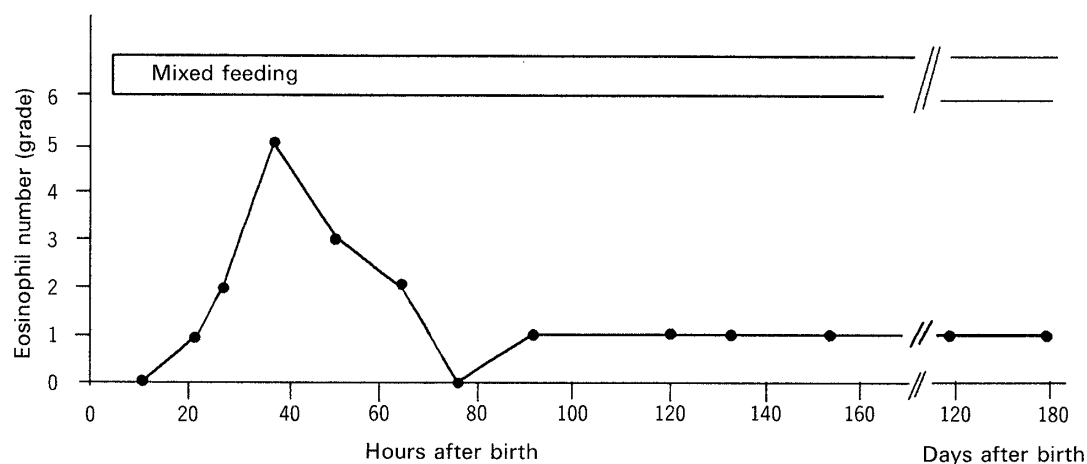


Fig. 3. Eosinophil number on stool smear of normal infants. Dots at 0 months indicate eosinophil numbers in meconium.

a) Case 1



b) Case 2

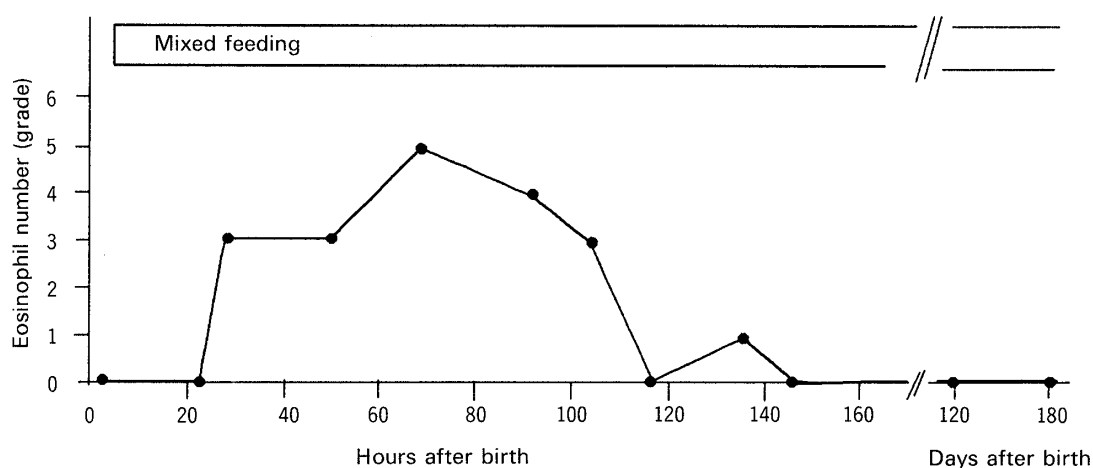


Fig. 4. Eosinophils appear in stool just after start of feeding in normal infants.

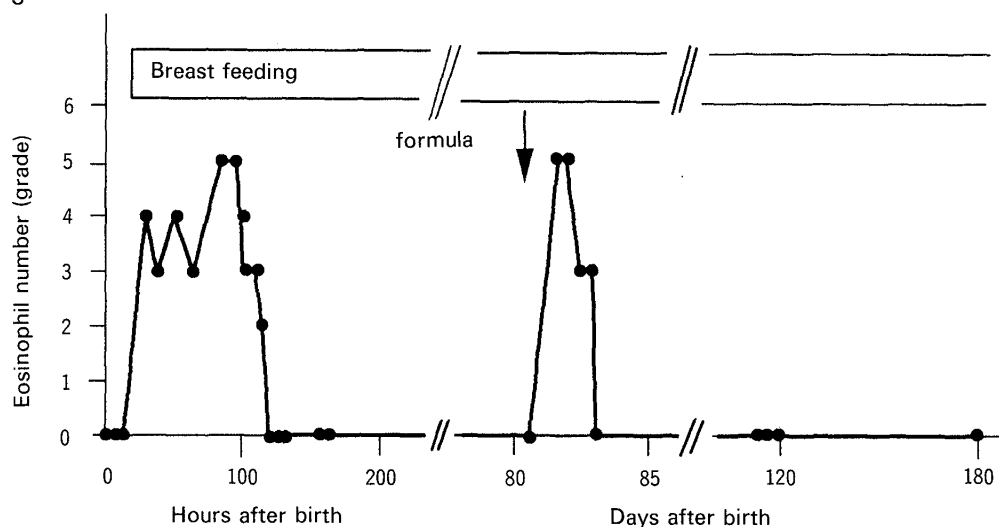
酸球数の推移を Fig. 5 に示した。症例 3 では生直後、12, 15, 19 時間目に、5 % 糖水 10ml を哺乳させ母乳がでるのを待った (Fig. 5a)。出生後 23 時間目より母乳を開始できた。母乳を開始して約 8 時間後に好酸球はグレード 4, 54 時間後にはグレード 5 とピークに達した。その後、およそ 100 時間後には消失した。その後、好酸球の出現は認めなかったが、生後 80 日目に調整粉乳を 200ml 哺乳すると再び好酸球は一過性に高値を示し (グレード 5) 数日以内に消失した。その後再び 25 日間の間隔において調整粉乳を 200ml 哺乳したが好酸球は出現しなかった。症例 4 も同様に、初期には 5 % 糖水 20ml を摂取させ出生後 20 時間目より母乳栄養を開始した (Fig. 5b)。母乳を開始して 30 時間後に好酸球が出現し、36 時間後にはグレード 5 と高値を示し 130 時間後には陰性となった。調整粉乳を与える時期を生後 6 カ月に見てみたがやはり症例 3 と同様に一過性の便粘液中好酸球が認められその後早期に陰性化した。その後

に再び調整粉乳を 100ml 哺乳させたが好酸球の増加は認められなかった。

6) アミノ酸乳によって栄養した正常乳児の便粘液中好酸球数の推移

生直後よりアミノ酸乳を開始して母乳が出始めた後に母乳による哺乳を行った 2 例を Fig. 6 に示した。症例 5 は生直後 7 時間目よりエレメンタルフォーミュラミルクを哺乳開始した (Fig. 6a)。哺乳開始 51 時間後、哺乳回数 16 回、計 390ml 哺乳した時点で便粘液中好酸球は 4 ポイントの便でグレード 5 と高値を示したが、その後消失した。その後母乳を開始したところ、哺乳約 7 時間後には好酸球は再びグレード 5 と高値を示したが、再びすぐにグレード 0 となった。その後母乳を飲み続けたが好酸球の出現は認められなかった。症例 6 は、生直後 9 時間目よりエレメンタルフォーミュラミルクを開始した (Fig. 6b)。哺乳開始 24 時間後、哺乳

a) Case 3



b) Case 4

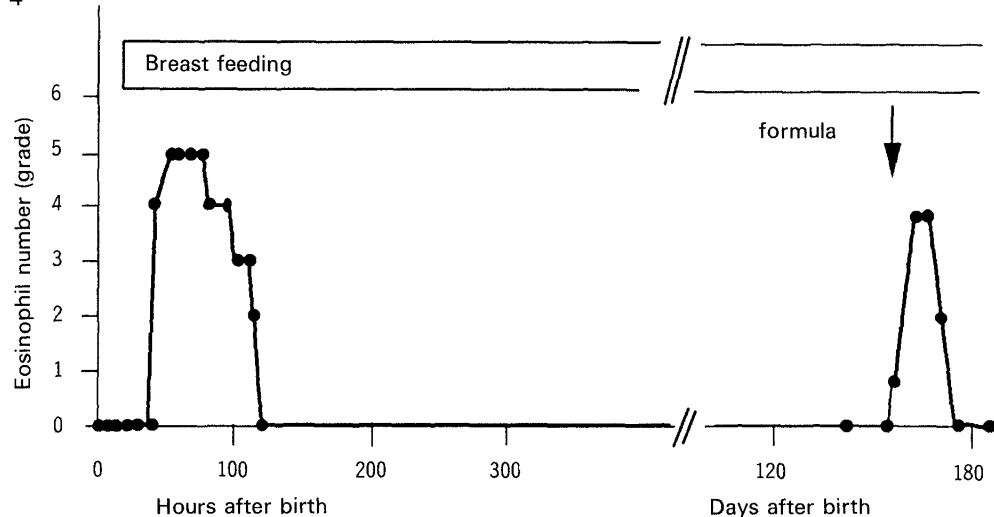


Fig. 5. Eosinophils appear in stool just after start of breast feeding and that of formula in normal infants.

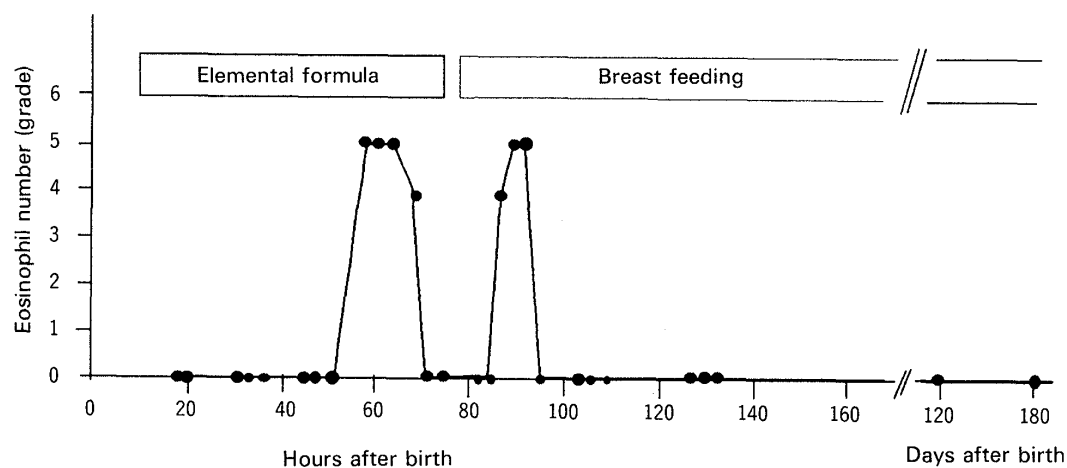
回数8回、計210ml 哺乳した時点で好酸球は3ポイントの便においてグレード4と高値を示したが、その後早期に陰性化した。また、日齢5日目に母乳開始したところ、その9時間後の便中に再びグレード4と好酸球が出現した。しかし、この上昇も一過性であり、好酸球数は直ちに低値に戻った。その後母乳を飲み続けても細胞数の変化はなかった。

7) 両親にアトピー歴のある新生児の便粘液中好酸球数の推移

母親、父親共にアトピー歴を有する児（症例7）についての経過をFig. 7に示した。本例では出生前に特に除去食等をしていない。本例では生直後より調整粉

乳を開始して53時間後（調整粉乳合計420mlと母乳22mlを哺乳）、好酸球数の増加は著明でないものの、血便が短時間の間に7ポイントの便に出現した。この時の血便中には肥満細胞も認められた。そこで直ちに哺乳を母乳のみに切り替えたところ便粘液中好酸球はグレード1まで低下した。日齢5日目に、誤って調整粉乳を30ml 哺乳させたところ再び好酸球はグレード3～4まで増加したが、再び母乳に戻した後にグレード1まで低下した。しかし日齢24日に調整粉乳を140ml 哺乳すると3時間後にはグレード3、さらに11時間後にはグレード6と多量の好酸球が出現した。さらに好酸球が減少するまでの便回数も増加した。その後外出時（日齢35日）に調整粉乳を100ml 哺乳したところ8時

a) Case 5



b) Case 6

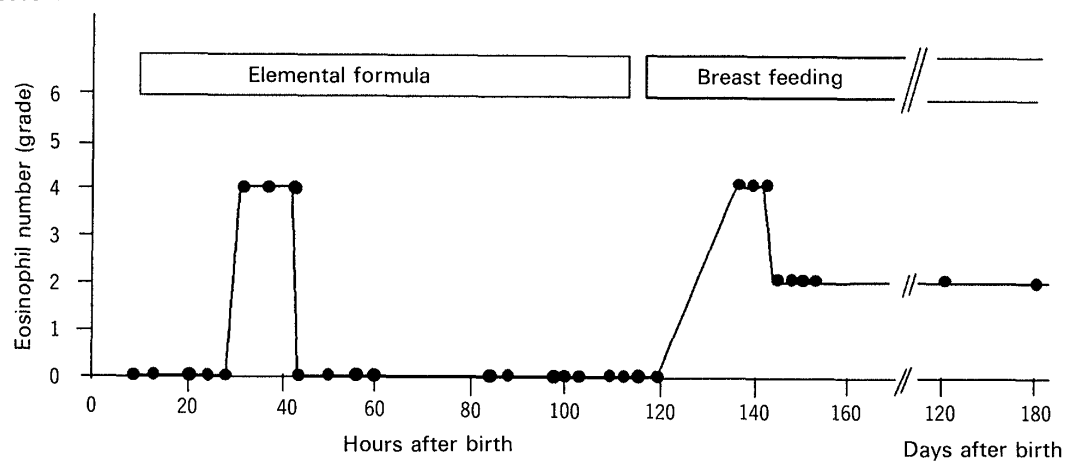


Fig. 6. Eosinophils appear in stool after start of amino-acid formula in normal infants.

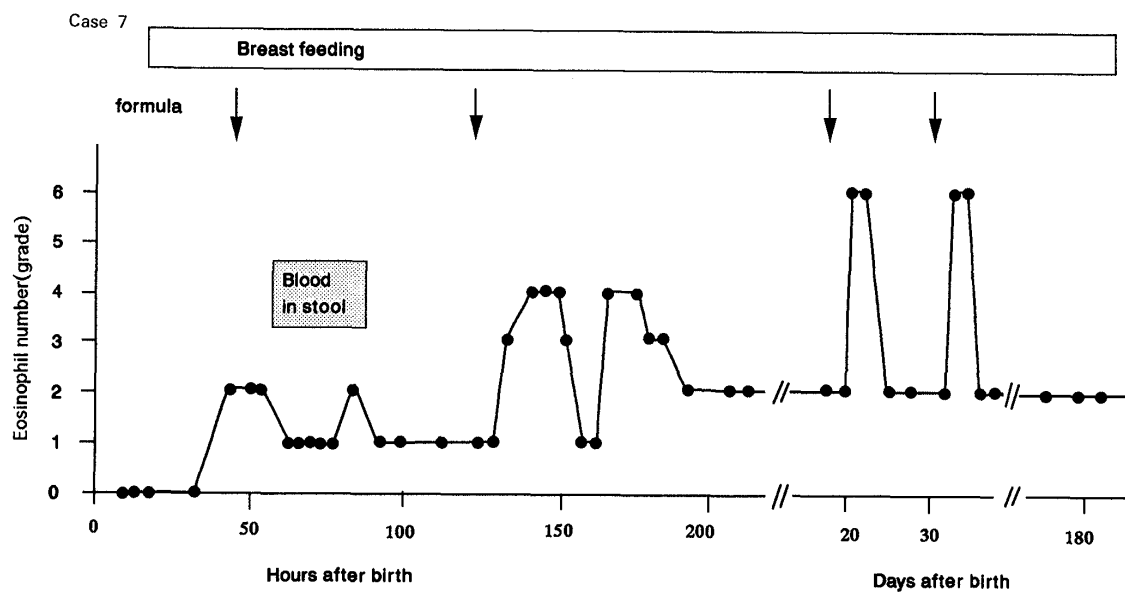


Fig. 7. Eosinophils repeatedly appear in stool after ingestion of milk in a infant born to atopic parents.

間後にグレード6と多量の好酸球が出現した。その後同様のエピソードがもう1回あったが、以後調整粉乳は与えず、1歳過ぎまでは牛乳・乳製品が含まれた二次食品も除去した。3歳6カ月現在の時点までアトピー疾患の発症を認めていない。

考 察

乳幼児期において難治性の下痢や血便の原因としてミルクアレルギーは重要な疾患である。しかし、乳児においては食物に対するIgE抗体がしばしば陰性であることが多く、臨床検査上ミルクに対する特異的な免疫応答を明らかにすることは必ずしも容易ではない。一方、ミルクアレルギーによる乳児の胃腸炎ではしばしば便粘液中に好酸球が認められることが知られており、診断の補助に用いられてきた¹⁾。また、最終的な診断は負荷試験によって行われるが、このときのアレルギー性炎症反応の指標としても消化管に出現する好酸球が客観的なマーカーとして報告されている²⁾³⁾。しかしながら、便粘液中の好酸球の正常乳児における出現の有無については現在まで解析がなされておらず、便粘液中好酸球の出現の評価に関しては特に新生児において注意が必要であった。

今回我々は生後6カ月までの正常乳児を対象として便粘液中好酸球を調べた結果、生後1カ月以内の乳児群のみに多数の便粘液中好酸球が出現することが判明した。そこで新生児期の便粘液中好酸球の出現機序を明らかにするために、生直後の胎便よりほぼすべての便を経時的に観察した。その結果、正常乳児においても特に新生児期には哺乳開始後の移行便粘液中に好酸球が一過性に出現してくることを初めて明らかにした。さらに、便中に好酸球を誘導する食物の性質を解析するために糖水、母乳、調整粉乳、アミノ酸乳投与後の便粘液中好酸球の出現時期と細胞数を詳細に解析した。便粘液中好酸球は、母乳、調整粉乳の摂取後に出現したのみでなく、アミノ酸乳の摂取後にも出現した。以上の結果は、好酸球の出現には必ずしも未分解の蛋白質の摂取が必須ではないことを示唆している。しかしながら、①アミノ酸乳で栄養を開始した例では、母乳・調整粉乳の摂取から開始した群に比較して、便中の好酸球の出現が遅く、また好酸球出現までにより多量のミルクの摂取を要したこと、②アミノ酸乳で開始した児では母乳投与後に、また母乳で栄養を開始し

た児では調整粉乳投与後に一過性の便粘液中好酸球の出現がみられたこと、などからアミノ酸乳、母乳、調整粉乳の間には何らかの差異があることは明らかと考えられる。現在のところ、その差異が蛋白や脂肪の量に関連するのかは不明である。また、糖水のみで便粘液中好酸球が出現するかに関しては、倫理的な点から長期の糖水のみの栄養はできず明らかではない。

正常乳児の便粘液中に好酸球が出現することが明らかとなったが、この好酸球の出現機序は不明である。ミルクアレルギー患者においてはミルク摂取時（特に哺乳後早期）に便粘液中には好酸球のみでなく好中球、リンパ球、マクロファージなどの炎症細胞が出現し、またときに肥満細胞の出現や出血に伴う赤血球が認められる。これに対し、正常乳児の便では好酸球の出現以外にこのような炎症反応を示唆する所見は認められないことから、組織傷害にいたる好酸球性炎症反応が惹起されているとは考えづらい。今回の検討では、正常乳児便中に出現する好酸球は好酸球性ペルオキシダーゼ抗体によって陽性に染色されたが、EG1、EG2抗体に対しては陰性であった（結果は示さず）。便中の細胞の免疫染色はpHや消化酵素の存在などによって簡単ではないが、この結果から正常乳児便中に認められた好酸球が未分化であり活性化されていない可能性も考えられる。すなわち、正常乳児の生直後哺乳した栄養によって起こる好酸球の集積やその後栄養を変更したときに起こる一過性の好酸球の集積は、炎症局所に集積する好酸球とは異なりなにか別の機序や役割もあると推定される。

Hattevigらは、乳児期においては食物摂取後に一過性に食物抗原特異的IgE抗体が産生されるが、その後急速に消失することから食物抗原に対する抑制的な免疫機序が働いている可能性を示している⁹⁾。我々は、本研究で正常乳児のミルクに対する抗体を測定していないが、便粘液中好酸球の出現が一過性の食物特異的IgE産生と関連する可能性もある。正常乳児で、調整粉乳の摂取後に一過性に出現した好酸球が再び調整粉乳を飲んでも増加することはなかった。この結果は、一回消化管を介して免疫系に認識された食物抗原に対して何らかの免疫学的な調節機序が稼働している可能性を強く示唆している。今回、アトピー素因を有する両親の間に出生した児の症例を1例示したが、我々は多数の症例で同様の便粘液中好酸球の動態を観察している（結果は示さず）。すなわち、著明なアトピー素因を有する両親から生まれた児においては、同一のミルク

摂取に対して繰り返し好酸球が出現し、さらに好酸球数の増加を認めたことは、摂取される食物に対する経口免疫寛容がこれらの患者においては正常に稼働していないことを示すと考えられる。

以上の結果をまとめると、本研究から正常乳児においても形態的、染色性共にアレルギー患児と同じ細胞が出現してくることが判明した。しかしながら、正常乳児においては便粘液中好酸球の出現がミルク摂取に引き続いて一過性に起こるのみであり、きわめて早期に消失すること、また腸粘膜上皮の脱落などの組織の炎症所見を欠くことなどから、ミルクアレルギー患者におけるアレルゲン負荷後便粘液中好酸球の出現とは異なる反応であることが示唆された。このように正常乳児の便粘液中に出現してくる細胞の動態の理解は、消化管アレルギーの診断における鑑別にとってきわめて重要な情報を提供するとともに、ミルクアレルギー患児の食物抗原除去時、負荷時の細胞の動きを客観的に判定する際にも有用であると考えられた。また、乳児（特に新生児）のミルクアレルギーの診断に際しては、食物摂取歴を確認すること、および一時点の便粘液中好酸球の検査のみではなく継続して検査を行い、さらに他の炎症細胞の出現の有無を確認することが重要と考えられた。今後、新生児・乳児期の一過性の便粘液中好酸球の出現に関しては、機能的側面からの解析が必要と思われる。

本論文の結果の一部は、第31回小児アレルギー学会（平成6年、宇都宮）において報告した。正常新生児・乳児の便検体採取に協力を頂きました千葉川鉄病院産婦人科河田 誠先生はじめ病棟のスタッフの皆様にご心から感謝いたします。また、蛍光抗体法のご指導を頂きました千葉大学医学部解剖学教室永野俊雄教授ならびに前川眞見子助手に感謝いたします。

文 献

- 1) 黒梅恭芳：食物アレルギーの診断。小児科診療 39, 274-277, 1976.
- 2) 本間季里, 河野陽一, 平野清美, 下条直樹, 鈴木宏, 他：食物アレルギーの診断における抗原誘発直腸粘膜細胞診の有用性。アレルギー 41, 749-756, 1992.
- 3) 下条直樹, 清水直樹, 平野清美, 河野陽一, 新美仁男：カゼイン加水分解乳の抗原性。カゼイン加水分解乳に感作されて消化管アレルギーを呈した症例における感作アレルゲンの検討。アレルギー 41, 1413-1418, 1992.
- 4) 久保政次：小児気道疾患の新しい診断法。“新しい考え方による小児気道疾患の日常診療”（久保政次編），南山堂，東京，pp.16, 1981.
- 5) Hattevig, G., Kjellman, B. and Bjorksten, B.: Appearance of IgE antibodies to ingested and inhaled allergens during the first 12 years of life in atopic and non-atopic children. *Ped. Allergy Immunol.* 4, 182-186, 1993.

EOSINOPHILS IN STOOL SMEAR IN NORMAL AND MILK-ALLERGIC INFANTS

Kiyomi Hirano, Naoki Shimojo, Toshiyuki Katsuki, Nobuyasu Ishikawa,
Yoichi Kohno and Hiroo Niimi

Department of Pediatrics, Chiba University School of Medicine

Stool smears of newborn infants were investigated sequentially from birth through 6 months of life in order to study relation between appearance of eosinophils in stool and feeding of babies. In babies born to non-atopic parents, eosinophils appeared in stool smear soon after start of feeding, but disappeared in a short time. Eosinophils were found irrespective of types of feeding, i.e., breast feeding, powdered milk or amino acid formula. There was tendency of sustained presence of eosinophils in stool smears in babies born to severe atopic parents. These results suggest that appearance in stool of eosinophils does not necessarily mean allergic reaction to ingested foods and need attention in diagnosing milk allergy. Mechanisms of appearance and function of eosinophils in stool in normal babies may differ from those in pathological situations and need further detailed investigation.