

Lactobacillus rhamnosus GG を含む広範加水分解カゼイン製剤は牛乳アレルギー  
一児のアレルギー症状の発生を減少させる：3年間の無作為化対照試験

## **Extensively hydrolyzed casein formula containing *Lactobacillus rhamnosus* GG reduces the occurrence of other allergic manifestations in children with cow's milk allergy: 3-year randomized controlled trial**

Roberto Berni Canani, MD, PhD, Margherita Di Costanzo, MD, Giorgio Bedogni, MD,  
Antonio Amoroso, BS, Linda Cosenza, MD, Carmen Di Scala, LDN, Viviana Granata,  
MD, Rita Nocerino, RN

Journal of Allergy and Clinical Immunology

Volume 139, Issue 6, Pages 1906-1913.e4 (June 2017)


DOI: 10.1016/j.jaci.2016.10.050

### 要旨

背景：牛乳アレルギー（CMA）児は他のアレルギー症状（AM）を有するリスクが高い。

目的：プロバイオティクス *Lactobacillus rhamnosus* GG（LGG）を含む広範囲に加水分解されたカゼイン製剤（EHCF）の投与が牛乳アレルギー児において他のアレルギー症状発生を減らすことができるかどうかを試験するために平行群（パラレルアーム）ランダム化比較試験を行った。

方法：

IgE 媒介 CMA の小児を EHCF（加水分解されたカゼイン製剤）または EHCF + LGG （加水分解されたカゼイン製剤 + *Lactobacillus rhamnosus* GG）群に無作為に割り当て、36 か月間追跡した。

一次的結果は、少なくとも一つのアレルギー症状（湿疹、じんましん、喘息、および鼻結膜炎）の発生であった。

二次的な結果は寛容性獲得であり、これは 12、24、および 36 ヶ月での二重盲検食物負荷試験結果が陰性として定義された。

アレルギー症状は標準化された基準に従って診断された。

耐性獲得は 12 ヶ月ごとに評価された。

結果：

平均年齢が 5.0 ヶ月（四分位範囲、3.0～8.0 ヶ月）の合計 220 人の子供（147 人の少年 [67%]）がランダム化された。110 人の子供が EHCF グループに、110 人の子供が EHCF

+LGG グループに入れられた。

完全なケース分析では、36 ヶ月間に少なくとも 1 回のアレルギー症状発生の絶対リスク差は 0.23 (95%CI, 0.36-0.10; P<0.001) であり、牛乳耐性の獲得に関する絶対リスク差は 12 ヶ月で 0.20 (95% CI, 0.05- 0.35; P < .01) 、 24 ヶ月で 0.24 (95% CI, 0.08-0.41; P < .01) 、 および 36 ヶ月で 0.27 (95% CI, 0.11-0.43; P < .001) であった。

感度分析では、アレルギー症状発生が 27 人の行方不明の子供全員に割り当てられても、主な結果への影響は実質的に変わらなかった。

結論：

EHCF+LGG は他のアレルギー症状発生率を低下させ、IgE による CMA 児における経口寛容を促進する。

食物アレルギー (FA) は、小児期によく見られる慢性疾患である<sup>1)</sup>。最近の 20 年間で、FA の自然史は、有病率の増加、臨床症状の重篤度、および後年の持続の危険性とともに変化したことが示唆されている<sup>2,3)</sup>。FA の子供たちにおける FA の罹患率の増加は重要な経済的効果を持ち、医療システムには多大な直接費用がかかり、家族にはさらに大きな費用がかかる<sup>4)</sup>。さらに、FA を持つ子供たちは他のアレルギー症状 (AM) を後に持つリスクが高くなる。最近の米国疾病管理予防センターの調査によると、FA の小児は喘息 (4.0 倍)、アトピー性湿疹 (2.4 倍)、呼吸器アレルギー (3.6 倍) など他の AM を有する可能性が FA なしの子供たちと比較して 2~4 倍高い。<sup>5,6)</sup> 牛乳アレルギー (CMA) は、幼児期の最も一般的な FA の 1 つであり、推定有病率は 2~3% である<sup>7)</sup>。我々は以前に、CMA の小児において、プロバイオティクス *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) を付加した広範囲加水分解カゼイン製剤 (EHCF) が、LGG を含まない EHCF と比較してより高い耐性率を誘導したことを示した<sup>8,9)</sup>。これらの所見は、CMA の第一選択食事管理に関して EHCF+LGG 対 EHCF またはアミノ酸ベースの処方により良い転帰を示した米国での 1 年間の追跡調査の結果と一致していた<sup>10)</sup>。EHCF+LGG 製剤の観察された臨床効果に責任がある。予備的データは、EHCF+LGG による食事介入が、腸内細菌叢症、短鎖脂肪酸産生、<sup>11)</sup> および TH1 および TH2 サイトカイン遺伝子発現のエピジェネティックな調節に好ましい影響を与えることを示唆していた<sup>12)</sup>。そのような機序は、EHCF+LGG で治療された CMA の小児の免疫系に対する長期的な影響の可能性を示唆している。そのような機序は、EHCF+LGG で治療された CMA の小児の免疫系に対する長期的な影響の可能性を示唆している。本無作為化比較試験 (RCT) は、LGG を補給した EHCF による食事介入が、IgE 媒介 CMA の小児における他の AM の発生に影響を及ぼし得るかどうかを試験するために計画された。

## 方法

### 研究デザイン

現在のパラレルアーム RCT は、EHCF + LGG が、IgE を介した CMA の小児において、EHCF と比較して他の AM の発生率を低下させることができるかどうかを試験するために設計された。

RCT は、2008 年 10 月から 2014 年 12 月まで、イタリア国民健康制度で 14 歳までの小児を診るファミリー小児科医 (FP) と共同で実施された。研究の開始前に、関与しているすべての FP が研究プロトコルが図示および議論された研究者会議に出席し、すべての手順および定義が共有された。

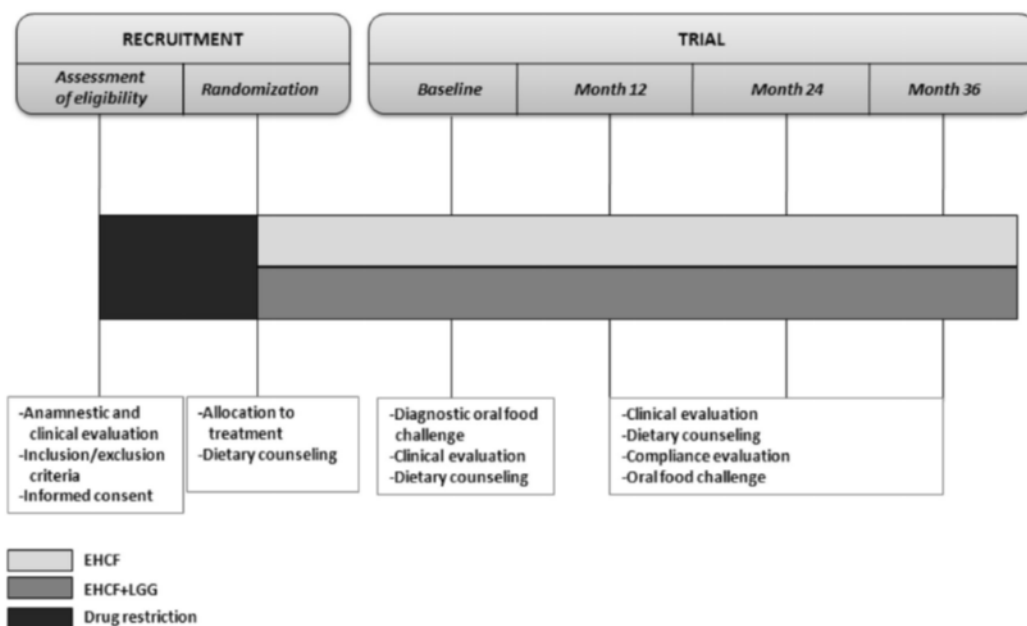
### 倫理

この研究はナポリ大学の「倫理委員会」「Federico II」によって承認され、[www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) (登録番号 NCT01891916) で登録された。

### 研究テーマ

研究のデザインは図 (Fig 1) 1 に描かれている。最近行われた IgE を介した CMA に関連した徴候や症状の発生が小児アレルギーのために私たちの三次センターに送られたために FP の診療所で連続して観察された子供たちは研究に含めることができた。選択基準は IgE 媒介 CMA が疑われた月齢 1~12 ヶ月の乳児である。除外基準は、牛乳タンパク質誘発アナフィラキシー、食物タンパク質誘発腸炎症候群、他の FA、他のアレルギー性疾患、胃腸管の好酸球性疾患、慢性全身性疾患、先天性心不全、活動性結核例えば、自己免疫疾患、免疫不全症、慢性炎症性腸疾患、セリアック病、嚢胞性線維症、代謝性疾患、悪性疾患、慢性肺疾患、胃腸管および/または気道の奇形、ならびに登録前 4 週間のプレバイオティクスまたはプロバイオティクスの投与であった。

### 図 1 研究デザイン



選択基準を満たした被験者のみが研究に参加するように呼びかけた。書面によるインフォームドコンセントが各被験者の両親/保護者から得られた。既往歴、人口統計学的、人体測定学的、および臨床データ、ならびに社会人口学的要因、家族および生活状況、アレルギー疾患の親の経歴、妊娠中の母親の喫煙、環境中のタバコの煙への曝露、兄弟の数、およびペットの飼い主に関する情報を各乳児の両親より得て、臨床データベースに記録された。その後、皮膚プリックテスト（SPT）が行われ、この研究の統計分析に関与していない生統計学者によって作成された1:1の無作為化リストに従って、乳児は2群の食事介入のうちのEHCF (Nutramigen; Mead Johnson Nutrition, Evansville, Ind)が1群に、またはLGH (Nutramigen LGG, Mead Johnson Nutrition)を含むEHCFが2群に無作為に割り付けられた。最初の評価から2~4週間後、CMA症状の完全かつ安定的な寛解が達成されてから、二重盲検のプラセボコントロール食物負荷試験（DBPCFC）を実施した。DBPCFCで証明されたIgE媒介CMAを有する1群あたり110人の被験者の事前に指定された数が達成されるまで募集を続け、これらの被験者だけが無作為化で処方された牛乳アレルギー用人工乳を用いて除外食を続けた。DBPCFCで証明されたIgEによるCMAを有する1つの群に対して110人の被験者人数が達成されるまで募集を続け、これらの被験者だけが無作為化時に処方された低アレルギー乳による除去食を続けた。

## 介入とデータ収集

両方の研究製品は、イタリアにおけるCMA食餌療法用の牛乳アレルギー用ミルク粉末と

して市販されていた。2つの牛乳アレルギー用ミルクの組成は、LGGの存在を除いて同一であった。価格は同じで、包装は非常に似ていた。2つの牛乳アレルギー用ミルクの物理的および感覚的性質は同一であった。患者の登録を担当する医師は、試験への参加時に次の利用可能な番号を割り当てた。栄養士たちは、除去食中に起こりうる問題について、そしてイタリアの子供たちの毎日の推奨摂取量に達するために牛乳を代替栄養源で置き換える方法について親に助言した。13 両親は、製造元の仕様書に従って、牛乳アレルギー用人工乳の名前、1日の量、および調製手順を記載した、CMAの除外食事療法の処方箋を受け取った。無作為化牛乳アレルギー用ミルクは子供の両親によって直接購入された。式の効果的な使用は、排除食中に起こりうる問題について両親に相談する栄養士によって研究中に評価されたが、これらの栄養士は研究結果の評価には関与していなかった。牛乳アレルギー用ミルクの効果的な使用は、除去食中に起こりうる問題について両親が相談する栄養士によって研究中に評価されたが、これらの栄養士は研究結果の評価には関与していなかった。両親や介護者は、毎日牛乳アレルギー用ミルクの使用記録を残すように求められた。調製した量（水のミリメートルおよび調合スプーンの数）および各消費後に残った量を日記に記録して、乳幼児によって消費された量を評価した。これにより、研究スタッフは割り当てられた牛乳アレルギー用ミルクへのコンプライアンスを評価し、患者が彼らの栄養要求を満たすために適切な量の牛乳アレルギー用ミルクを受けたことを確認することができた。その後、3年間の追跡調査中に、3回の来院（12、24、および36ヶ月）が計画された。12ヵ月ごとに牛乳への耐性の獲得を確認するために、SPTと経口食物負荷試験が行われた。FP（ファミリー小児科医）がアレルギー症状に気付いたとき、予定外の外来受診が行われた。外来受診のたびに、子供たちは身体検査を受け、体の成長が評価され、そして、アレルギー症状を含む健康上の問題について尋ねた。DBPCFCと臨床検査の両方が、グループの割り当てを知らされていない2人の研究者によって三次センターで行われた。AM（アレルギー症状）の診断について不一致の場合は、小児アレルギーを経験した3人目の小児科医によるさらなる評価が行われた。AMは標準化された基準を用いて診断された。

アトピー性湿疹は、以前に報告されたように（14）、21のリストのうちの3つのマイナーな基準に加えて、そう痒、典型的な形態および分布、慢性または慢性再発コース、および個人または家族のアトピー歴（4基準のうち3）に基づいて診断された。

鼻づまり、くしゃみ、かゆみ、鼻漏、これらの症状に対する現在の薬物使用、および/または感染症除外後の結膜炎、鼻炎などの症状に基づいてアレルギー性鼻結膜炎が診断された（15）。

痒み発疹または典型的な外観を伴う腫脹の少なくとも2つのエピソードが、両親または医師によって観察され、同じアレルゲンによって引き起こされた場合、アレルギー性蕁麻疹と診断された。単一のエピソードの場合、免疫学的証拠（3mmを超える膨疹反応または $>0.35$  KU/Lのアレルゲン特異的IgEレベルを引き起こす、疑いのない希釈されていない天然アレルゲンによるSPT（皮膚プリック試験））または疑わしいアレルゲンによる陽性誘発反応

試験を確定診断のために行われた (16)。

喘息の診断のために考慮された症状は以下の通りである：再発性喘鳴（月に1回以上）、呼吸困難、胸部圧迫感、またはその両方。せき（夜間に悪化）。短時間作用型気管支拡張薬および吸入ステロイドによる治療中の臨床的改善そして治療が中止されると悪化。

IgEによるFA（食物アレルギー）は、(1) IgEによるメカニズム（誘因食物摂取後の症状の急性発症）を示唆する病歴として定義された。(2) DBPCFC所見（最終用量の投与後2時間以内に典型的な症状の発生）。(3) IgEによるFAの典型的な症状（すなわち、皮膚病変のない掻痒、蕁麻疹、アトピー性湿疹増悪、血管浮腫、嘔吐、下痢、血便）。腹痛、鼻炎、鼻づまり、喘鳴、咳、喘鳴、およびチャレンジ中の呼吸困難) (3) SPT（膨疹サイズ> 3 mm）および/または血清IgE測定値 (> 0.1 kU/L) の結果。

服薬遵守（コンプライアンス）は、割り当てられた治療の少なくとも80%の消費として定義され、試験結果の評価に関与していなかった栄養士による追跡調査の訪問ごとに以前に記載されたように評価された。

## 研究成果

主な結果は、36カ月の研究期間中にAM（湿疹、じんましん、喘息、または鼻結膜炎）が発生したことである。二次的な結果は、12、24、および36ヶ月で耐性の獲得であった。他のいずれかのIgEによるFA単独またはAMとの組み合わせでの発生も記録された。

## サンプル数の計算

EHCF+LGG群とEHCF群のAM発生率の差が20%、検出率が90%で、0.05の水準で検出することを目的とした（ピアソンx2検定）。追跡調査時の脱落率を10%と仮定すると、グループあたり110人の乳幼児が参加することを意味します。しかし、子供たちはDBPCFCで確認された牛乳アレルギーの診断がなければならなかったため、我々は2つの治療に割り当てられた子供たちのプールを増やす必要がありました、1グループあたり少なくとも110人の子供がDBPCFC確認された牛乳アレルギーと診断されるまで、1グループあたり最大150人の子供を登録するように研究を設計した。

## 試験テスト

### SPT（皮膚プリック試験）

SPTは、生乳および牛乳タンパク質のアレルゲン、例えばα-ラクトアルブミン、β-ラクトグロブリン、およびカゼイン（Lofarma S.p.A、ミラノ、イタリア）を用いて行った。アレルゲンは、患者の前腕部に滴下した。陽性対照および陰性対照としてヒスタミン二塩酸塩

(10 mg / mL) および等張食塩水 (NaCl 0.9%) をそれぞれ用いて、1 mm 単一ピークランセット (ALK - Abel 11、コペンハーゲン、デンマーク) を用いて SPT を実施した。反応は、15 分での膨疹およびフレアの最大直径 (ミリメートル) に基づいて記録した。SPT 反応は、陰性コントロールに反応することなく、膨疹が 3 mm 以上である場合、「陽性」であると見なされた。

#### 食物経口負荷試験

すべての食物投与は、試験に関与している三次センターの外来で、1 週間の間隔をおいて 2 日に分けて、二重盲検プラセボ対照方式で行われた。抗ヒスタミン薬を服用している幼児の両親は、チャレンジの前および最中に 72 時間これらの薬を差し控えるように勧められた。負荷試験の無作為化および準備は、この手順に直接関与していない経験豊富な FA 栄養士によって行われた。詳細には、20 分ごとに、3.5% の脂肪またはアミノ酸配合を含む新鮮な低温殺菌牛乳の用量を増やしながら (0.1、0.3、1、3、10、30、および 100mL) 投与した。完全な緊急用具および薬剤 (エピネフリン、抗ヒスタミン薬、およびステロイド) を準備した。結果は経験豊富な小児アレルギー専門医によって同時に評価された。研究対象は、0 から 3 点スケール (0、なし、1、軽い、2、中程度、および 3、重度) で 4 つの主なカテゴリーに分けられた 9 項目について採点された。 ; (2) 皮膚 (発疹およびじんましん / 血管浮腫)。 (3) 胃腸管 (吐き気または反復嘔吐、腹痛のような腹痛、および下痢)。 (4) 呼吸器系 (くしゃみまたはかゆみ、鼻詰まりまたは鼻漏、および上気道閉塞または喘鳴 (wheezing) に由来する喘鳴 (stridor))。3 人の医師のうちの少なくとも 2 人が独立してレベル 3 の項目またはレベル 2 の 2 項目 (またはそれ以上) の項目にスコアを付けた場合、試験結果は陽性とみなされた。最高用量を投与してから 2 時間以内に起こる臨床症状は、「即時反応」を有すると定義された。乳児は、最終用量後 2 時間まで観察され、その後退院した。いずれの試験用量でも陽性の DBPCFC 結果が得られた場合、症状が解消するまで患者は観察下に置かれた。患者が最初の 24 時間以内に症状を示さなかった場合、両親は毎回 100mL のテストされた人工乳 (verum (本物) またはプラセボ) のどちらか一つを提供するように勧められた。この期間中に何らかの症状が発生した場合、患者は同じ日に病院に戻った。7 日間の本物の投与またはプラセボ投与の後、患者を検査し、両親を中心に面接した。偽陰性のチャレンジ結果を除外するために、DBPCFC 処置後 7 日以内に何らかの症状が発生した場合は、親にセンターに連絡するように依頼した。患者が観察期間を含む全負荷試験で異常なければ、チャレンジ結果は陰性であると見なされた。臨床的耐性の獲得は、DBPCFC 結果が陰性によって定義された。その後の来診時に DBPCFC が陰性の結果を示した小児は、寛容性獲得の持続性をチェックするために 6 ヶ月後に再評価された。

## 統計分析

ほとんどの連続変数は非ガウス分布であり、すべて中央値および四分位範囲 (IQR) として報告されている。離散変数は、数と割合として、または中央値と IQR として報告されている。主な結果 (すなわち、36 ヶ月間の AM 発生に対する EHCF+LGG と EHCF の効果) は、二項回帰モデル (BRM) を用いて評価された (18)。BRM の応答変数は 36 ヶ月間の任意の AM の発生 (各: 0=いいえ、1=はい) であり、予測変数は治療 (各: 0= EHCF、1= EHCF+LGG) であった。ポイント推定値と絶対リスク差 (ARD) の 95%CI は BRM から得られ、治療に必要な数を計算するために反転された。また、以下の離散共変数を BRM に含めた後に ARD がどの程度変化したかを評価しました。性別 (0=女、1=男)、出生時 (各: 0=いいえ、1=はい)、帝王切開 (各: 0=いいえ、1=はい)、少なくとも 2 ヶ月間の授乳 (各: 0=いいえ、1=はい)、家族性アレルギーリスク (各: 0=いいえ、1=はい)、受動喫煙への曝露 (各: 0=いいえ、1=はい)、妊娠中の母親の喫煙 (各: 0=いいえ、1=はい)、およびペットへの曝露 (各: 0=いいえ、1=はい)。二次転帰 (すなわち、CMA 耐性の時間特異的発生率) は、反復測定に BRM を用いて評価した。(20) BRM の反応変数は、CMA 耐性の発達であった (各: 0=いいえ、1=はい)、予測子は治療 (各: 0 =EHCF、1 =EHCF+LGG)、時間 (各: 0 =12 か月、1 =24 か月、2 =36 か月)、および治療ごとの交互作用 (discrete-by-discrete)。被験者固有のクラスターCI を使用して、繰り返し測定が考慮された。CMA (牛乳アレルギー) 耐性における時間特異的 ARD を定量化するために、3 つの予め特定された群間 (EHCF、LGG 対 EHCF) の時間内 (12、24、および 36 ヶ月) のコントラストを用いた。これは、12、24、および 36 ヶ月目に EHCF+LGG と LGG の差を別々に評価することに相当する。3 つの比較 (対比) についてボンフェローニ補正を用いることにより相対ARDおよびP値を補正した。完全なケース分析 (CCA) を行うことに加えて、我々は以下のシナリオを用いて感度分析を行った。(1) EHCF+LGG と EHCF のすべての欠損値を最悪の結果に設定 (感度分析 - 最悪結果シナリオ等しい) [SA-EQS]); (2) EHCF+LGG グループの欠損値が最善の結果に設定され、EHCF グループの欠損値が最悪の結果に設定された (感度分析 - ベストケースシナリオ[SA-BCS])。 (3) EHCF+LGG グループの欠損値が最悪の結果に設定され、EHCF グループの欠損値が最善の結果に設定された (感度分析 - 最悪シナリオ[SA-WCS])。最悪の転帰は、主転帰に対する AM の発生、および二次転帰に対するすべての時点での耐性獲得の欠如として定義された。主な結果に対する SA-EQS は、試験プロトコールによって事前に規定されていた。他のすべての感度分析は事後に実施された。統計分析は、Stata 14.1 ソフトウェア (StataCorp、College Station、TX) を用いて行った。

## 結果



研究中の乳幼児の流れは図 2 に報告されています。1 グループあたり少なくとも 110 人の子供が DBPCFC によって確認された牛乳アレルギー診断となるまで、私たちは 1 グループあたり最大 150 人の子供を登録するように研究を設計した（「サンプルサイズの計算」を参照）。150 人の計画児童のうち合計 137 人が ECHF 群で 110 症例の DBPCFC 確認された牛乳アレルギーであり、150 人の計画乳幼児のうち 131 人が ECHF+LGG 群で 110 症例の DBPCFC 確認された牛乳アレルギーであった。DBPCFC を受けた合計 220 人の対象が I g E による牛乳アレルギー（147 人の男性対象、67%）と診断され、年齢中央値 5.0 ヶ月（IQR、3.0-8.0 ヶ月）であった。すべての子供たちは社会経済的地位が中程度の家族の出身で、都市部に住んでいた。ベースライン時には、研究グループの主な特徴は類似していた（表 I）

図 2 研究の乳幼児の流れ

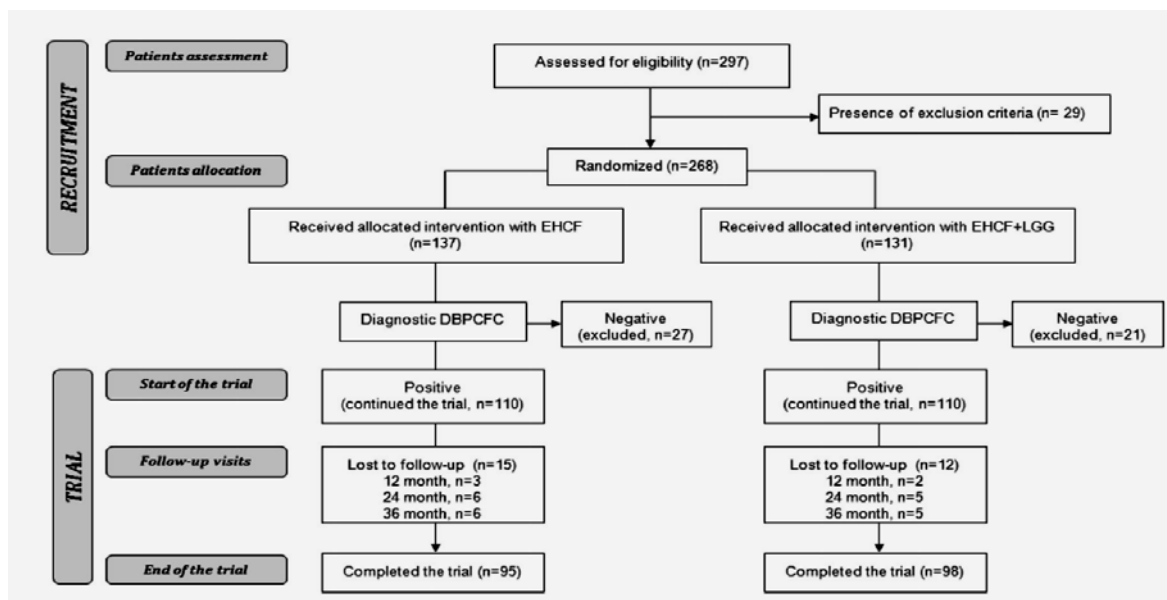


表 1 研究に参加した児の基本情報

Feature	EHCF	EHCF+LGG
Male sex, no. (%)	75/110 (68.2)	72/110 (65.5)
Cesarean delivery, no. (%)	69/110 (62.7)	66/110 (60.0)
Born at term, no. (%)	101/110 (91.8)	98/110 (89.1)
Weight at birth (kg), median (IQR)	3.4 (3.0 to 3.7)	3.2 (2.9 to 3.5)
Breast-fed for $\geq 2$ mo, no. (%)	84/110 (76.4)	77/110 (70.0)
Weaning (mo), median, (IQR)	5.0 (5.0 to 6.0)	5.0 (4.0 to 6.0)
Siblings (count), median (IQR)	1 (0.0 to 1.0)	1 (0.0 to 1.0)
Familial risk of allergy, no. (%)	79/110 (71.8)	75/110 (68.2)
Allergic first-degree relatives (count), median (IQR)*	1 (1 to 2)	1 (1 to 2)
Exposure to passive smoking, no. (%)	39/110 (35.5)	38/110 (34.5)
Mother smoked during pregnancy, no. (%)	41/110 (37.3)	35/110 (31.8)
Exposure to pets, no. (%)	13/110 (11.8)	18/110 (16.4)
Age at CMA diagnosis (mo), median (IQR)	5.0 (3.0 to 8.0)	5.0 (3.0 to 8.0)
Weight at CMA diagnosis (kg), median (IQR)	7.5 (6.1 to 8.6)	7.4 (6.1 to 8.7)
Weight at CMA diagnosis (SDS WHO), median (IQR)	0.16 (-0.41 to 0.09)	0.14 (-0.45 to 0.79)
Length at CMA diagnosis (m), median (IQR)	0.66 (0.61 to 0.70)	0.66 (0.61 to 0.70)
Length at CMA diagnosis (SDS WHO), median (IQR)	0.05 (-0.76 to 0.52)	-0.03 (-0.56 to 0.94)
BMI at CMA diagnosis (kg/m <sup>2</sup> ), median (IQR)	17.3 (16.2 to 18.1)	17.2 (16.2 to 18.1)
BMI at CMA diagnosis (SDS WHO), median (IQR)	0.29 (-0.45 to 0.73)	0.26 (-0.48 to 0.66)
Positive prick by prick test result for fresh milk, no. (%)	110/110 (100.0)	110/110 (100.0)
Positive SPT response for $\alpha$ -lactalbumin, no. (%)	96/110 (87.3)	94/110 (85.5)
Positive skin test response for $\beta$ -lactoglobulin, no. (%)	60/110 (54.5)	70/110 (63.6)
Positive SPT response for casein, no. (%)	49/110 (44.5)	51/110 (46.4)
Gastrointestinal symptoms at CMA onset, no. (%)	61/110 (55.5)	65/110 (59.1)
Cutaneous symptoms at CMA onset, no. (%)	75/110 (68.2)	73/110 (66.4)
Respiratory symptoms at CMA onset, no. (%)	17/110 (15.5)	14/110 (12.7)

SDS, SD score; WHO, World Health Organization.  
\*Calculated only for the subjects with familial risk of allergy.

研究に参加したすべての乳幼児は治療の指導を守った（すなわち、割り当てられた処方80%超を消費した）。治療乳の使用に関する誤解の事例は報告されなかった。追跡調査中に合計 27 人（12%）の子供が脱落した：EHCF グループで 15 人、EHCF+LGG グループで 12 人。家族が転居したために 14 人の乳幼児が研究から辞退し、13 人が未知の理由で辞退した（スタディセンターからも FP（家庭小児科医）からの連絡できなかった）。EHCF グループで追跡できなかった 15 人の子供のうち、3 人は 12 ヶ月で、6 人は 24 ヶ月で、6 人は 36 ヶ月で脱落した。EHCF+LGG グループで追跡不能になった 12 人の乳幼児のうち、2 人は 12 ヶ月で、5 人は 24 ヶ月で、5 人は 36 ヶ月で脱落した。この記事のオンラインリポジトリ（[www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)）の表 E1 は、研究を終えた被験者のベースラインの特徴とフォローアップに失敗した被験者のベースラインの特徴の比較である。

表 E I 追跡調査不能被験者の特徴と研究を完了した被験者の特徴の比較

	Study completers	Lost to follow-up
Male sex, no. (%)	130/193 (67.4)	17/27 (63.0)
Cesarean delivery, no. (%)	118/193 (61.1)	17/27 (63.0)
Born at term, no. (%)	172/193 (89.1)	27/27 (100.0)
Weight at birth (kg), median (IQR)	3.3 (3.0 to 3.5)	3.2 (2.8 to 3.5)
Breast-fed for ≥2 mo	146/193 (75.6)	15/27 (55.6)
Weaning (mo), median (IQR)	5.0 (4.0 to 6.0)	5.0 (5.0 to 6.0)
Siblings (count), median (IQR)	1 (0 to 1)	0 (0 to 1)
Familial risk of allergy	140/193 (72.5)	14/27 (51.9)
Allergic first-degree relatives (count), median (IQR)*	1 (1 to 2)	1 (1 to 1)
Exposure to passive smoking, no. (%)	69/193 (35.8)	8/27 (29.6)
Mother smoked during pregnancy, no. (%)	61/193 (31.6)	15/27 (55.6)
Exposure to pets, no. (%)	26/193 (13.5)	5/27 (18.5)
Age at CMA diagnosis (mo), median (IQR)	5.0 (3.0 to 7.0)	7.0 (6.0 to 8.0)
Weight at CMA diagnosis (kg), median (IQR)	7.2 (5.9 to 8.6)	8.1 (7.7 to 9.4)
Weight at CMA diagnosis (SDS WHO), median (IQR)	1.92 (1.28 to 2.47)	2.24 (1.72 to 2.64)
Length at CMA diagnosis (m), median (IQR)	0.65 (0.60 to 0.69)	0.69 (0.67 to 0.71)
Length at CMA diagnosis (SDS WHO), median (IQR)	2.69 (1.68 to 3.77)	3.05 (2.73 to 3.42)
BMI at CMA diagnosis (kg/m <sup>2</sup> ), median (IQR)	17.2 (16.1 to 18.0)	18.0 (16.9 to 18.9)
BMI at CMA diagnosis (SDS WHO), median (IQR)	0.58 (0.07 to 1.07)	0.74 (-0.03 to 1.25)
Positive prick by prick test result for fresh milk	193/193 (100.0)	27/27 (100.0)
Positive SPT response for α-lactalbumin	163/193 (84.5)	27/27 (100.0)
Positive skin test response for β-lactoglobulin	103/193 (53.4)	27/27 (100.0)
Positive SPT response for casein	73/193 (37.8)	27/27 (100.0)
Gastrointestinal symptoms at CMA onset	109/193 (56.5)	17/27 (63)
Cutaneous symptoms at CMA onset	135/193 (69.9)	13/27 (48.1)
Respiratory symptoms at CMA onset	22/193 (11.4)	9/27 (33.3)

SDS, SD score; WHO, World Health Organization.  
\*Calculated only for the subjects with familial risk of allergy.

一次的結果

表 II は、主要転帰の頻度（36 ヶ月間の任意のアレルギー症状）、その内容の全体的および時間特異的頻度（湿疹、じんましん、喘息、および鼻結膜炎）、ならびに他の食物アレルギー単独またはアレルギー症状と組み合わせた全体的頻度である。EHCF に対する EHCF + LGG の任意の AM (アレルギー症状) の ARD (絶対リスク差) は、CCA (Complete case analysis) で  $-0.23$  (95%CI、 $-0.36 \sim -0.10$ ;  $P < 0.001$ ) であった。(2) SA - EQS (Sensitivity analysis–equal worst outcome scenario) で  $-0.22$  (95%CI、 $-0.35 \sim -0.09$ ;  $P < 0.001$ )。 (3) SA - BCS (Sensitivity analysis–best-case scenario) で  $-0.33$  (95%CI、 $20.45 \sim -0.21$ ;  $P < 0.001$ )。 (4) SA - WCS (Sensitivity analysis–worst-case scenario) で  $-0.08$  (95%CI、 $-0.21 \sim 0.04$ ;  $P = .5$ )。SA-EQS の推定値は CCA の推定値とよく似ていた。絶対的な理由から、SA-BCS は CCA の推定値より 10% 高く、SA-WCS は 15% 低かった。最悪のシナリオの下でさえも、EHCF+LGG に有利な違いがまだ残っていた (8%)。ARD の CCA (Complete case analysis) 推定値を使用することにより、治療に必要な人数は 4 名であった (95%CI、 $3 - 10$ )。これは、EHCF と比較して、少なくとも 1 つのアレルギー症状を防ぐために、4 人の被験者が 36 ヶ月間 EHCF+LGG で治療される必要があったことを意味します。図 3 は、CCA の下での主な結果の発生率をプロットしたものである。この記事のオンラインレポジトリ

(www.jacionline.org) の表 E II は、主要転帰の発生率に対する選択されたベースライン共変数の影響を示している。影響はすべての場合で無視でき、絶対値で 2%未満、相対値で 10%未満であった。この記事のオンラインリポジトリ (www.jacionline.org) の図 E1 は、CCA (Complete case analysis) によって決定された、研究中の主な結果の構成要素の発生率をプロットした。主な結果は複合的結果であり、したがって仮説生成目的にのみ使用されるべきであるため、これは探索的分析である。

図 3 CCA (Complete case analysis) での主な試験結果の発生率。

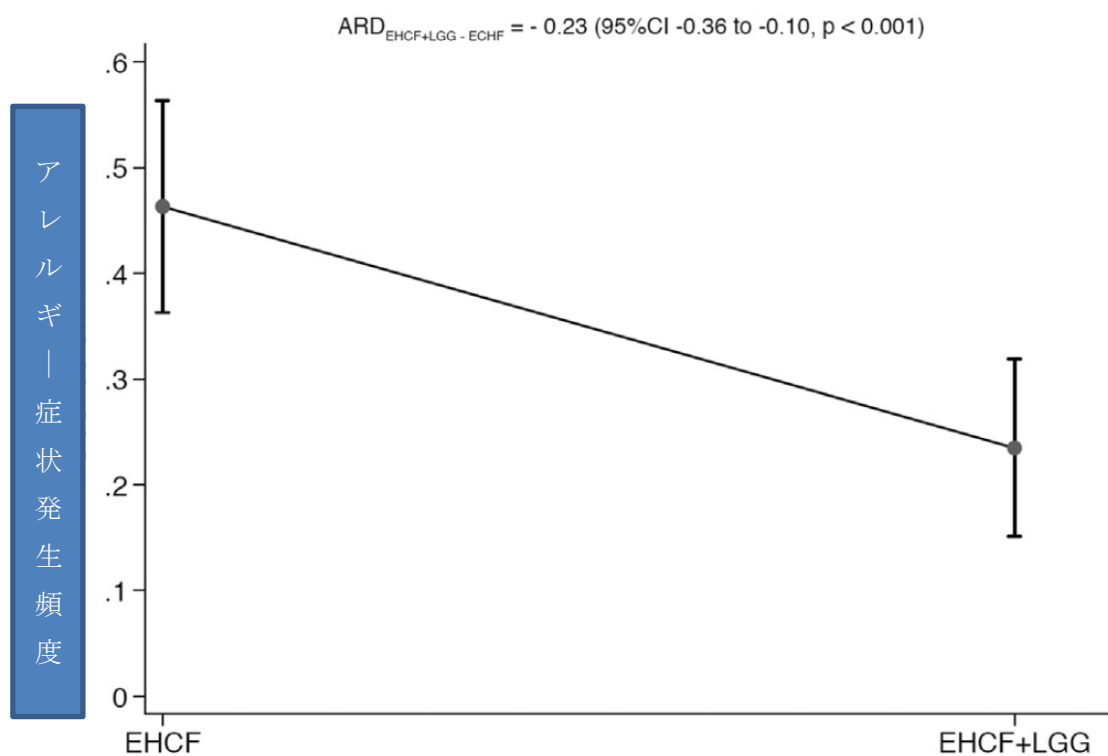
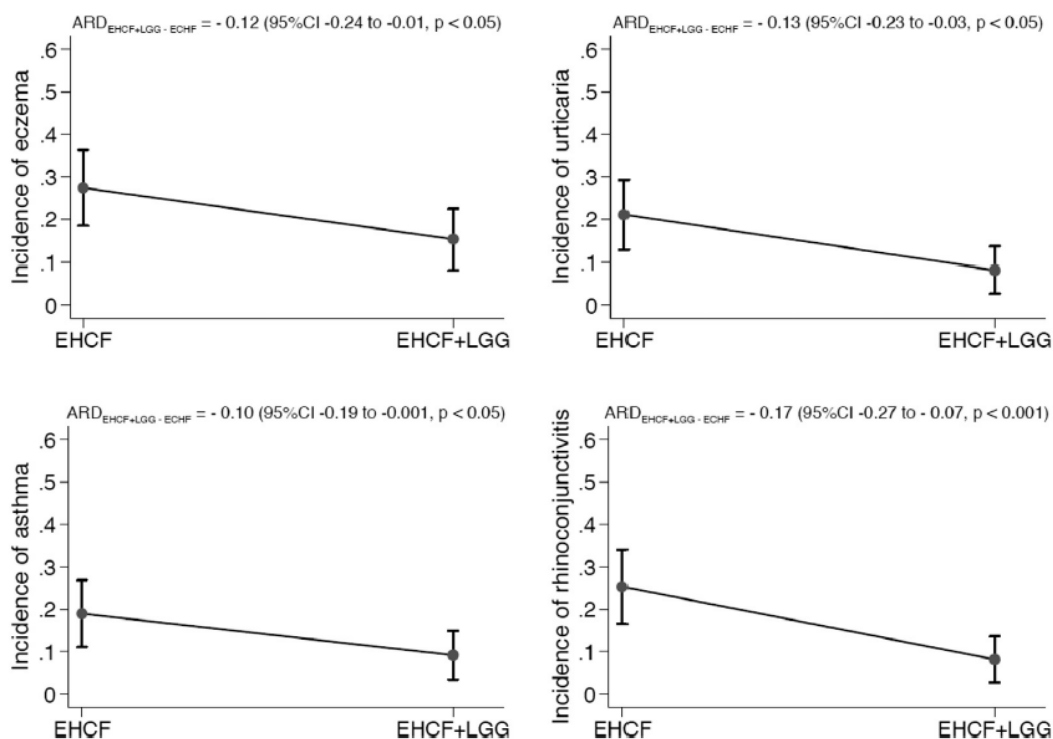


図 E1 試験期間中の主な結果（湿疹、じんましん、喘息、および鼻結膜炎）の構成要素の発生率の探索的分析



## 二次結果

LGH に対する ECHF+LGG の牛乳耐性の ARD (Absolute risk difference) は CCA (Complete case analysis) を使用して (1) 12 か月で 0.20 (95%CI, 0.05-0.35;  $P < 0.01$ )、24 ヶ月で 0.24 (95%CI, 0.08-0.41;  $P < 0.01$ )、36 ヶ月で 0.27 (95%CI, 0.11-0.43;  $P < 0.001$ ) であった。(2) SA-EQS を使用して 12 ヶ月で 0.15 (95%CI, 0.00~0.31;  $P = 0.06$ )、24 ヶ月で 0.20 (95%CI, 0.05~0.35;  $P < 0.01$ )、36 ヶ月で 0.23 (95%CI, 0.09~0.37;  $P < 0.001$ )。 (3) SA-BCS を用いて 12 ヶ月時点で 0.29 (95%CI 0.15~0.43、 $P < 0.001$ )、24 ヶ月時点で 0.34 (95%CI, 0.18~0.49;  $P < 0.001$ )、36 ヶ月時点で 0.36 (95%CI, 0.22~0.51、 $P < 0.001$ )。 (4) SA-WCS を使用して 12 ヶ月で 0.05 (95%CI, 20.11~0.20;  $P = 0.51$ )、24 ヶ月で 0.09 (95%CI, 20.07~0.25;  $P = 0.55$ )、36 か月で 0.12 (95%CI, 20.03~0.27、 $P = 0.2$ )。最悪のシナリオ (SAWCS) の下でも、ECHF+LGG グループに有意差があった。この差は 24 ヶ月で 12% であった。図 4 は、試験中の 2 つの試験群における CMA (牛乳アレルギー) 寛解率をプロットした。www.jacionline の

この記事のオンラインリポジトリの Fig E2 にプロットされているように。SPT（皮膚プリックテスト）陰性化率は、寛解率とよく似ている。表 II は、他の FA（食物アレルギー）単独でまたは AM（アレルギー症状）と組み合わせた全体的な頻度を示している。

表 E II EHCF+LGG グループと EHCF グループ間の ARD (Absolute risk difference) に対するベースライン共変数の影響

EHCF+LGG vs EHCF	-0.21† (-0.34 to -0.08)	-0.22‡ (-0.35 to -0.09)	-0.24‡ (-0.37 to -0.11)	-0.23‡ (-0.36 to -0.10)	-0.23‡ (-0.35 to -0.10)	-0.23‡ (-0.36 to -0.10)	-0.22† (-0.35 to -0.09)	-0.24‡ (-0.37 to -0.11)
Male sex	0.09 (-0.04 to 0.23)							
Born at term	0.06 (-0.14 to 0.25)							
Cesarean delivery	0.15* (0.03 to 0.28)							
Breast-fed for at least 2 mo	-0.02 (-0.17 to 0.13)							
Familial risk of allergy	0.22‡ (0.10 to 0.34)							
Exposure to passive smoking	0.01 (-0.13 to 0.14)							
Mother smoked during pregnancy	0.05 (-0.09 to 0.20)							
Exposed to pets	0.15 (-0.05 to 0.35)							
Observations	193	193	193	193	193	193	193	193

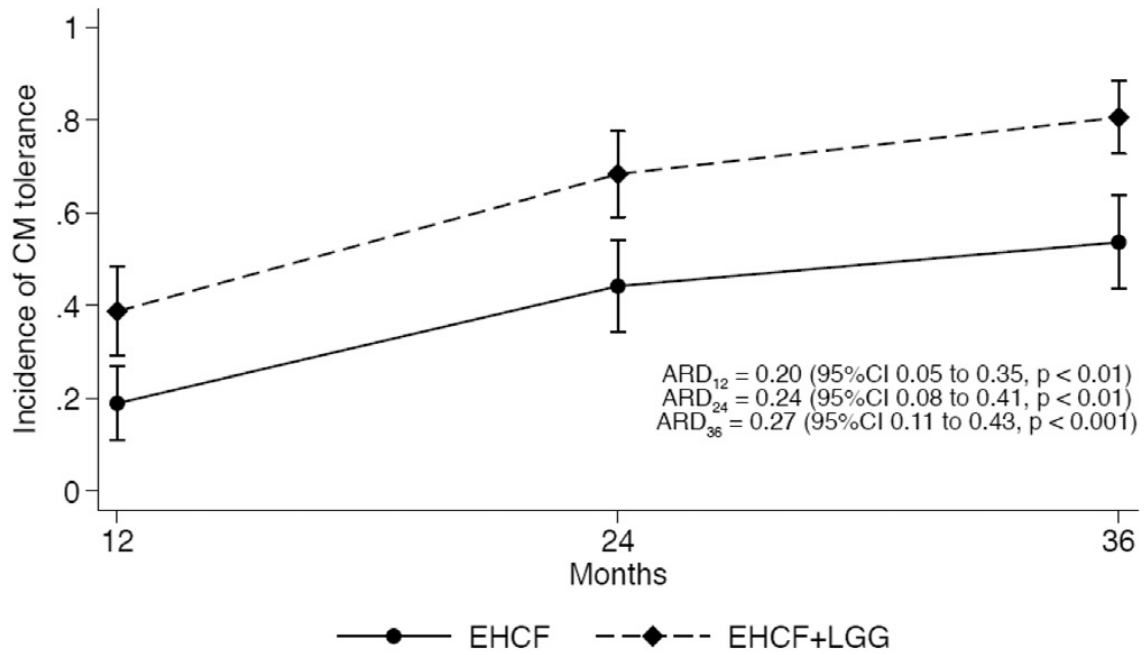
Values are ARDs, with 95% CIs in brackets.

\* $P < .05$ .

† $P < .01$ .

‡ $P < .001$ .

図 4 CCA (Complete case analysis) における CMA 耐性の発生率



ARD = absolute risk difference  
95%CI and p-values are corrected for 3 comparisons

表Ⅱ 主な結果の頻度、その構成要素、その他の FA

	EHCF		EHCF+LGG	
	No.	Percent	No.	Percent
<b>Eczema at 12 mo</b>				
No	78	82.1	84	85.7
Yes	17	17.9	14	14.3
Total	95	100.0	98	100.0
<b>Eczema at 24 mo</b>				
No	92	96.8	98	100.0
Yes	3	3.2	0	0.0
Total	95	100.0	98	100.0
<b>Eczema at 36 mo</b>				
No	89	93.7	97	99.0
Yes	6	6.3	1	1.0
Total	95	100.0	98	100.0
<b>Eczema total episodes</b>				
No	69	72.6	83	84.7
Yes	26	27.4	15	15.3
Total	95	100.0	98	100.0
<b>Urticaria at 12 mo</b>				
No	77	81.1	94	95.9
Yes	18	18.9	4	4.1
Total	95	100.0	98	100.0
<b>Urticaria at 24 mo</b>				
No	95	100.0	96	98.0
Yes	0	0.0	2	2.0
Total	95	100.0	98	100.0
<b>Urticaria at 36 mo</b>				
No	93	97.9	96	98.0
Yes	2	2.1	2	2.0
Total	95	100.0	98	100.0
<b>Urticaria total episodes*</b>				
No	75	78.9	90	91.8
Yes	20	21.1	8	8.2
Total	95	100.0	98	100.0
<b>Asthma at 12 mo</b>				
No	93	97.9	92	93.9
Yes	2	2.1	6	6.1
Total	95	100.0	98	100.0
<b>Asthma at 24 mo</b>				
No	87	91.6	96	98.0
Yes	8	8.4	2	2.0
Total	95	100.0	98	100.0
<b>Asthma at 36 mo</b>				
No	87	91.6	97	99.0
Yes	8	8.4	1	1.0
Total	95	100.0	98	100.0
<b>Asthma total episodes</b>				
No	77	81.1	89	90.8
Yes	18	18.9	9	9.2
Total	95	100.0	98	100.0
<b>Rhinoconjunctivitis at 12 mo</b>				
No	90	94.7	93	94.9
Yes	5	5.3	5	5.1
Total	95	100.0	98	100.0
<b>Rhinoconjunctivitis at 24 mo</b>				
No	92	96.8	97	99.0
Yes	3	3.2	1	1.0
Total	95	100.0	98	100.0
<b>Rhinoconjunctivitis at 36 mo</b>				
No	79	83.2	96	98.0
Yes	16	16.8	2	2.0
Total	95	100.0	98	100.0

(Continued)



TABLE II (Continued)

	EHCF		EHCF+LGG	
	No.	Percent	No.	Percent
Rhinoconjunctivitis total episodes				
No	71	74.7	90	91.8
Yes	24	25.3	8	8.2
Total	95	100.0	98	100.0
At least 1 allergic episode during the study				
No	51	53.7	75	76.5
Yes	44	46.3	23	23.5
Total	95	100.0	98	100.0
Other FAs, total episodes				
No	58	61.1	66	67.3
Yes	37	38.9	32	32.7
Total	95	100.0	98	100.0
Other FA plus AMs during the study				
No	34	35.8	50	51.0
Yes	61	64.2	48	49.0
Total	95	100.0	98	100.0

\*All cases were related to FA.

## 安全性

参加した乳幼児で研究用人工乳に不耐性の児はいなかった。DBPCFC 中にプラセボ拒絶の症例はなかった。人工乳摂取に起因する有害事象はなく、毎日の人工乳摂取量に差はなかった。さらに、体重、長さ、および身長の変化的変化は、EHCF、LGG 群+EHCF 群の間で同程度であった（データは示していない）。

## 考察

最近の系統的レビューにより、若年期の食物過敏症は他の AM（アレルギー症状）、特に喘息、アトピー性湿疹、および鼻結膜炎を引き起こすことが確認された。著者は、若年期の食品感作が予防的な戦略から有益である可能性があり、その後のアレルギー性疾患を発症するマーカーとして使用すべきであると結論付けた。現在の知見は、アレルギー性疾患は、腸内細菌叢およびエピジェネティクス（訳注：DNA の配列が同一であっても、DNA やクロマチンへの化学修飾を通して細胞や個人の形質を変化させる機構があることが分かってきた。つまり、DNA の配列に依存せず、かつ細胞分裂を経て引き継がれる遺伝子機能の変化や仕組みについての研究-エピジェネティクス）が果たす主要な役割とともに、幼少期の遺伝的要因と環境要因との間の相互作用によって部分的に決定されることを示唆している。アレルギー性疾患の発症に潜在的に関与するエピジェネティックなメカニズムの中で、DNA メチル化は最も顕著で広く研究されている (22)。本研究は、EHCF+LGG が EHCF 単独よりも、IgE による CMA（牛乳アレルギー）児における他の AM（アレルギー症状）の発生を減少させるのに有効であるかどうかを評価することを目的とした。本 RCT の結

果は、他のAMの発生を防止することにおいて、EHCF+LGGがEHCFよりも効果的であることを示している。主な結果に関しては、36ヶ月間に少なくとも一つのアレルギー症状発生を防ぐためにEHCF+LGGで治療する必要がある乳幼児数は、この研究によって4人(95%CI、3-10)と推定された。EHCF+LGGが主な試験結果のすべての要素に影響を及ぼしたことを観察することは興味深いが、これらの知見は探索的なものとしてのみとらえることができ、単一のアレルギー性疾患に対するこの戦略の可能性を調べるためにさらなる研究が必要である。

アレルギーを予防するEHCFの能力は、アレルギー性疾患のリスクが高い乳児がEHCFを受けたときにAM(アレルギー症状)を予防できるというドイツの乳児栄養介入研究(16,23-26)の結果によって裏付けられた。さらに、EHCFは15歳での喘息発生率を減少させた唯一の人工乳であった(26)。我々の結果は、他のアレルギーのリスクがより高い集団において、根底にあるIgEによるCMA(牛乳アレルギー)のために、EHCFへのLGGの添加がEHCFの予防効果をさらに増強することを示している。いくつかの関連する洞察は、我々の二次的な結果から導き出された。以前の観察と一致して、我々は、IgEによるCMAの小児における経口寛容性獲得に対するEHCF+LGGによる効果についてさらなるエビデンスを示した。いくつかの関連する洞察は、私たちの二次的な結果から導き出されたものである。以前の研究と一致して、我々は、IgE媒介CMAの小児における経口寛容性獲得に対するEHCF+LGGによる効果についてのさらなるエビデンスを示した。本研究において、この効果が36ヶ月間介入することにより持続することを示した。これらのデータは、CMAの自然経過が経時的に変化していることを示唆する最新のエビデンスを考慮すると、5歳以降の年齢で疾患が持続する小児の割合がより高いことを示唆している(2,27)。

臨床に関連するもう1つの側面は、試験人工乳に対する有害反応が観察されなかったことである。これらの所見は、CMA小児の最大10%がEHCFに副反応の可能性を示した少ない症例から得られた報告とは一致しない(28,29)。この矛盾について考えられる理由は、現在のRCTでは、CMA関連アナフィラキシー、好酸球性胃腸障害、および複数のFA(食物アレルギー)を含む厳密な除外基準を採用したことである。我々の所見は、CMA関連アナフィラキシー患者を除いて、CMAの第一選択治療としてEHCFの使用を示唆する最近のガイドラインを支持している(6,30-32)。この研究にはいくつかの長所(強み)がある。1つ目は、DBPCFCで証明されたCMAの小児の大多数のサンプルに続いて、高い追跡率で3次小児アレルギーセンターで行われたRCT(ランダムコントロール試験)である。第二に、一次転帰と二次転帰の両方に関連する効果の大きさは臨床的に関連していた。第三に、そのような効果の大きさは最悪のシナリオの感度分析の下で優位性の明確な傾向があった。それにもかかわらず、この研究にはいくつかの制限事項がある。第一に、我々のデータは、研究から除外された理由である条件を持つ乳幼児に一般化することはできない。これらの乳幼児におけるEHCF+LGGとEHCFの効果は、さらなる研究によって対処されなければならないであろう。第二に、我々の結果は、EHCF+LGGが他のAM(ア

アレルギー症状) 発生率を減少させ (12、24)、36 ヶ月の IgE による CMA を有する小児における経口寛容獲得を支持することを示したが、この効果が持続するかどうかを試験するためにより長い追跡期間が必要である。第三に、この研究結果の欠点は、EHCF+LGG がその効果をもたらすメカニズムを調査するのに有用であろう腸内細菌叢および TH1 / TH2 サイトカインに関するデータの欠如である。

生後 1 年目の移行性腸内細菌叢は、アレルギーの発症に関連している (33)。我々のグループによって得られた証拠は、EHCF だけではなく EHCF+LGG が、CMA の乳児に酪酸塩を生成する可能性のある選択された属 (菌種) の量を増やすことができることを示唆している (11)。牛乳に対する耐性を獲得した乳児で同定された酪酸産生属 (Roseburia、Coprococcus、および Blautia を含む) の株レベルの境界は、LGG 治療が分類群の株レベルの群集構造を変化させることによって耐性の獲得に寄与することを示唆する酪酸を生産する (11)。アレルギーに対する酪酸塩の作用機序は複数あるが、その多くはヒストンデアセチラーゼ (HDAC) の阻害を介した遺伝子発現のエピジェネティックな調節である。HDAC9 および HDAC6 を阻害すると、制御性 T 細胞の産生および抑制機能と同様にフォークヘッドボックス P3 遺伝子の発現が増加する (34、35)。我々は、経口耐性を獲得した EHCF+LGG で治療された CMA の子供が、他の人工乳 (加水分解乳) で治療された CMA の患者と比較して異なる TH1 / TH2 サイトカインおよびフォークヘッドボックス P3 遺伝子 DNA メチル化パターンを示すことを観察した。このパターンは、健康なコントロール対象において観察されたものより密接に関連していた。CMA が自然治癒した患者のサイトカイン DNA メチル化率に影響を与える可能性がある要因を分析したところ、唯一の変数は EHCF+LGG の使用であることがわかった (12,36)。これらの所見は、現在の RCT (ランダムコントロール試験) で観察された EHCF+LGG の作用が少なくとも部分的には腸内細菌叢の良好な調節およびエピジェネティックなメカニズムによるものであり得ることを示唆している。

結論として、我々の RCT は、IgE による CMA を有する子供のよく特徴付けられた集団において行われ、EHCF+LGG が 36 ヶ月間の AM の予防に関して EHCF より優れていることを示した。EHCF+LGG が単一の AM (現在の RCT ではいくらかは示唆しているが証明できていない) を防ぐことができるかどうかをテストし、この有益な効果のメカニズムをより明確にするためにさらなる研究が必要である。我々の RCT はまた、EHCF に LGG を追加することで、IgE による CMA の小児における寛容の発現までの時間が短縮されることを確認した。

**臨床的意義 : EHCF+LGG は、IgE による CMA 乳幼児における AM の予防において EHCF より優れている。EHCF**

## に LGG を追加すると、経口耐性獲得が加速される。

### REFERENCES

1. Sicherer SH, Sampson HA. Food allergy: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:291-307.
2. Skripak JM, Matsui EC, Mudd K, Wood RA. The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:1172-7.
3. McBride D, Keil T, Grabenhenrich L, Dubakiene R, Drasutiene G, Fiocchi A, et al. The EuroPrevall birth cohort study on food allergy: baseline characteristics of 12,000 newborns and their families from nine European countries. *Pediatr Allergy Immunol* 2012;23:230-9.
4. Gupta R, Holdford D, Bilaver L, Dyer A, Holl JL, Meltzer D. The economic impact of childhood food allergy in the United States. *JAMA Pediatr* 2013;167:1026-31.
5. Branum AM, Lukacs SL. Food allergy among children in the United States. *Pediatrics* 2009;124:1549-55.
6. NIAID-Sponsored Expert Panel, Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126(suppl):S1-58.
7. Sicherer SH. Epidemiology of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:594-602.
8. Berni Canani R, Nocerino R, Terrin G, Coruzzo A, Cosenza L, Leone L, et al. Effect of *Lactobacillus GG* on tolerance acquisition in infants with cow's milk allergy: a randomized trial. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:580-2.
9. Berni Canani R, Nocerino R, Terrin G, Frediani T, Lucarelli S, Cosenza L, et al. Formula selection for management of children with cow milk allergy influences the rate of acquisition of tolerance: a prospective multicenter study. *J Pediatr* 2013;163:771-7.
10. Ovcinnikova O, Panca M, Guest JF. Cost-effectiveness of using an extensively hydrolyzed casein formula plus the probiotic *Lactobacillus rhamnosus GG* compared to an extensively hydrolyzed formula alone or an amino acid formula as first-line dietary management for cow's milk allergy in the US. *Clinicoecon Outcomes Res* 2015;7:145-52.
11. Berni Canani R, Sangwan N, Stefka AT, Nocerino R, Paparo L, Aitoro R, et al. *Lactobacillus rhamnosus GG* supplemented formula expands butyrate producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J* 2016;10:742-50.
12. Berni Canani R, Paparo L, Nocerino R, Cosenza L, Pezzella V, Di Costanzo M, et al. Differences in DNA methylation profile of Th1 and Th2 cytokine genes are associated with tolerance acquisition in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Clin Epigenet* 2015;7:38.
13. Berni Canani R, Leone L, D'Auria E, Riva E, Nocerino R, Ruotolo

- S, et al. The effects of dietary counseling on children with food allergy: a prospective, multicenter intervention study. *J Acad Nutr Diet* 2014;114:1432-9.
14. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol* 1980;60(suppl 92):44-7.
15. de Groot H, Brand PLP, Fokkens WF, Berger MY. Allergic rhinoconjunctivitis in children. *BMJ* 2007;335:985-8.
16. von Berg A, Koletzko S, Gr€ubel A, Filipiak-Pittroff B, Wichmann HE, Bauer CP, et al. The effect of hydrolyzed cow's milk formula for allergy prevention in the first year of life: the German Infant Nutritional Intervention Study, a randomized double-blind trial. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:533-40.
17. National Asthma Education and Prevention Program. Expert Panel Report 3 (EPR-3): guidelines for the diagnosis and management of asthma—summary report 2007. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(suppl):S94-138.
18. Hardin JW, Hilbe JM. Generalized linear models and extensions. College Station (TX): Stata Press; 2012.
19. Altman DG. Confidence intervals for the number needed to treat. *BMJ* 1998;317:1309-12.
20. Rabe-Hesketh S, Skrondal A. Multilevel and longitudinal modeling using Stata. 3rd ed. College Station (TX): Stata Press; 2012.
21. Alduraywish SA, Lodge CJ, Campbell B, Allen KJ, Erbas B, Lowe AJ, et al. The march from early life food sensitization to allergic disease: a systematic review and meta-analyses of birth cohort studies. *Allergy* 2016;71:77-89.
22. Weinmann T, Gerlich J, Heinrich S, Nowak D, Gerdes J, Schlichtiger J, et al. Establishing a birth cohort to investigate the course and aetiology of asthma and allergies across three generations—rationale, design, and methods of the ACROSSOLAR study. *BMC Public Health* 2015;15:1210.
23. von Berg A, Koletzko S, Filipiak-Pittroff B, Laubereau B, Gr€ubel A, Wichmann HE, et al. German Infant Nutritional Intervention Study Group. Certain hydrolyzed formulas reduce the incidence of atopic dermatitis but not that of asthma: three-year results of the German Infant Nutritional Intervention Study. *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:718-25.
24. von Berg A, Filipiak-Pittroff B, Kr€amer U, Link E, Bollrath C, Brockow I, et al. GINI plus study group. Preventive effect of hydrolyzed infant formulas persists until age 6 years: long-term results from the German Infant Nutritional Intervention Study (GINI). *J Allergy Clin Immunol* 2008;121:1442-7.
25. von Berg A, Filipiak-Pittroff B, Kr€amer U, Hoffmann B, Link E, Beckmann C, et al. GINI plus study group. Allergies in high-risk schoolchildren after early intervention with cow's milk protein hydrolysates: 10-year results from the German Infant Nutritional Intervention (GINI) study. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:1565-73.
26. von Berg A, Filipiak-Pittroff B, Schulz H, Hoffmann U, Link E, Sußmann M, et al. GINI plus study group. Allergic manifestation 15 years after early intervention with hydrolyzed formulas—the GINI study. *Allergy* 2016;71:210-9.

27. Wood RA, Sicherer SH, Vickery BP, Jones SM, Liu AH, Fleischer DM, et al. The natural history of milk allergy in an observational cohort. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:805-12.
28. Caffarelli C, Plebani A, Poiesi C, Petroccione T, Spattini A, Cavagni G. Determination of allergenicity to three cow's milk hydrolysates and an amino acid-derived formula in children with cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy* 2002;32:74-9.
29. Rago V, Giampietro PG, Bruno G, Businco L. Allergenicity of milk protein hydrolysate formulae in children with cow's milk allergy. *Eur J Pediatr* 1993;152:760-2.
30. Koletzko S, Niggemann B, Arato A, Dias JA, Heuschkel R, Husby S, et al. European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Diagnostic approach and management of cow's-milk protein allergy in infants and children: ESPGHAN GI Committee practical guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;55:221-9.
31. Luyt D, Ball H, Makwana N, Green MR, Bravin K, Nasser SM, et al. Standards of Care Committee (SOCC) of the British Society for Allergy and Clinical Immunology (BSACI). BSACI guideline for the diagnosis and management of cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy* 2014;44:642-72.
32. Fiocchi A, Brozek J, Schünemann H, Bahna SL, von Berg A, Beyer K, et al. World Allergy Organization (WAO) Special Committee on Food Allergy. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatr Allergy Immunol* 2010;21(suppl 21):1-125.
33. Liu AH. Revisiting the hygiene hypothesis for allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:860-5.
34. Shi Y, Xu LZ, Peng K, Wu W, Wu R, Liu ZQ, et al. Specific immunotherapy in combination with *Clostridium butyricum* inhibits allergic inflammation in the mouse intestine. *Sci Rep* 2015;5:17651.
35. Licciardi PV, Ververis K, Karagiannis TC. Histone deacetylase inhibition and dietary short-chain fatty acids. *ISRN Allergy* 2011;2011:869647.
36. Paparo L, Nocerino R, Cosenza L, Aitoro R, D'Argenio V, Del Monaco V, et al. Epigenetic features of FoxP3 in children with cow's milk allergy. *Clin Epigenetics* 2016;8:86.