

グルテン – 沈殿要因 –2

瀬口 正晴 (SEGUCHI Masaharu)^{1,2} 吉野 精一 (YOSHINO Seiichi)³

Key Words: セリアック病, グルテン, グルテンフリー

本論文「グルテン – 沈殿要因 –2」は“Celiac Disease and Gluten” (by Herbert Wieser, Peter Koehler and Katharina Konitzer) 2014 の第 2 章 Gluten- The Precipitating Factor の一部を紹介するものである。

3. セリアック病毒性

3-1. 毒性のテスト

さまざまな穀物および非穀物原料, 穀物タンパク質およびペプチドの CD 毒性と免疫原性を特定し, 新しい治療法をテストするために, 多数の *in vivo* および *in vitro* の方法が開発された。テストは, (1) CD 患者の生体内チャレンジテスト (2) CD 患者の組織および細胞を用いた *in vitro* テスト (3) 動物モデルテスト^{31,32})に分類できる。テストの前に, 材料は化学分析によって十分に特性評価される必要がある。

(1) テストする材料

穀物由来のタンパク質およびペプチド製剤は, 信頼性の高い言明を保証するために, 毒性と免疫原性をテストする前に化学的に特性評価する必要がある。小麦グルテンなどの原材料は, たとえばケルダール法またはデュマ法などを使用して, 窒素の含有量を分析する必要がある。窒素の含有量から, 係数 5.7 によって粗タンパク質含有量に変換できる。グルテン組成は調製または加工の異なる起源と条件によりかなり変化する可能性があるため, プロラミンとグルテリンの割合や不純物の含有量などのタンパク質組成のさらなる研究が望ましい。たとえば, 抽出/液体クロマトグラフィーを組み合わせた手順は, さまざまなタンパク質画分の詳細な分析に使用できる

³³)。 *in vitro* 試験の場合, タンパク質はペプシン, トリプシン, キモトリプシン, パンクレアチンなどの酵素によって部分的に加水分解され, 消化管消化を模倣し, 不溶性タンパク質を可溶性ペプチドに変換する必要がある。塩が存在する場合 (例えば, 酵素消化中の中和ステップから生じる), 乾燥加水分解物のタンパク質/ペプチド含有量は窒素測定により分析する必要がある。少量の精製タンパク質およびペプチドは, RP-HPLC で定量できる³⁾。計算には, 定義済みのリフェレンスタンパク質 (PWG-gliadin³⁴) など) を使用する必要がある。分離または合成されたペプチドは, 純度と同一性を確認する必要がある。この目的には, RP-HPLC と質量分析が推奨される³⁵⁾。

(2) *In vivo* 試験

多くの研究者は, *in vivo* 試験が CD 毒性を評価するためのゴールドスタンダードであることに同意する。これは, 数年間 GFD (Gluten-free diet) を使用しているセリアックボランティアで実施されるため, 小腸の形態が正常であることが期待される。最初に, CD 患者は, 摂食試験に続いてキシロースと脂肪の吸収不良を測定するか, 脂肪便などの症状を監視することにより, 穀物製品と粗タンパク質画分に挑戦した³⁶⁾。ただし, これらのテストは, チャレンジの素材の最適量和チャレンジの最適の期間が不確実

¹ 神戸女子大学, ² 日本穀物科学研究会前会長, ³ 辻調理専門学校

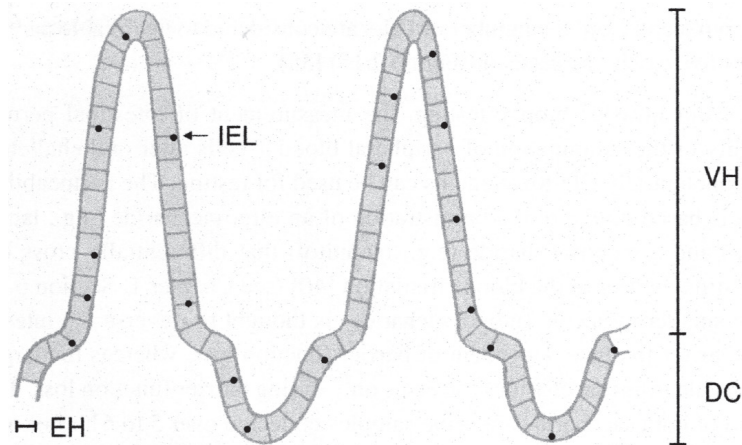


図 2.15 腸上皮の概略図および *in vivo* 毒性の測定に使用される要因の表示 (IEL, 上皮内リンパ球; EH, 腸細胞の高さ; VH, 絨毛の高さ; DC, 陰窩の深さ)

性的ために満足を与えるものではないと見なされている。さらに、キシロース吸収不良および脂肪バランスへの影響は二次的であり、上皮表面での反応に関する情報を与えない。ほとんどの研究では、わずかな CD 患者のみが検査され、対照は含まれていなかった。1970 年代に、腸の生検の技術が導入され、患者とコントロールのより大きなグループで挑戦され、毒性に関するより正確な結論に至った。オートムギ毒性に関する Janatuinen と研究者の *in vivo* 研究は、試験成績の例かもしれない³⁷⁾。彼らは、一定量のオートムギを含む選択された食事で挑戦された CD 患者について無作為に研究を行った。評価の主な方法は、特別な食事の適用の前の十二指腸生検と、およびそれらのテスト後の血清学的検査であった。患者 ($n=92$) は、オートミールを食べるグループとコントロールグループに分けられた。オートムギグループの患者は、6ヶ月または12ヶ月間、1日あたり約50gのオートムギを摂取した。完了すると、その後の組織学的および形態計測的測定と血清学的検査を伴う十二指腸生検が行われた。このような広範なテストは、大量に入手可能な材料(穀物、小麦粉、小麦グルテンなど)でのみ実行できるが、調製が困難な精製タンパク質やペプチドでは実行できない。寛解期(治療中)のCD患者の小腸への直接注入による経口チャレンジの導入、それに続く試験の開始時および数時間後の生検により、タンパク質およびペプチドの量を約1gに³⁸⁾さらに少なく減らすことができた^{35,39)}。

例として、グリアジンペプチド $\alpha 56-75$ を使用した生体内試験は、次のプロセスで説明されている^{35,39)}：

Quinton[®] 油圧式、複数生検カプセルにカニューレを取り付けた。カプセルは、蛍光透視下で鎮静された CD 患者の十二指腸遠位に配置された。消化性トリプシンタンパク質消化物またはグルテンペプチドの溶液は、シリンジドライバーによって2時間十二指腸に注入される。注入前および注入開始の2,4,6時間後に生検を行う。その後、組織をカプセルから取り出し、形態計測分析のためにホルマリンで固定する。組織の一部は部分的に染色され、一部は瞬間凍結される。染色切片の絨毛の高さ、陰窩の深さ、および腸細胞の高さを測定する。凍結切片を使用して、特殊な抗体検査により腸細胞100個あたりの上皮内リンパ球 (IEL) の数を測定する。絨毛の高さ、絨毛の高さと陰窩の深さの比率、および IEL の数の変化は、毒性評価の信頼できるパラメーターであると考えられている (図 2.15)³⁵⁾。

侵襲的な生検検査を避けるために、CD 毒性の可能性のある薬剤による経口投与後の腸透過性の測定または末梢血 T 細胞の検査を使用して検査することができる。透過性試験は、血液循環に対する腸の障壁を特異的に通過するオリゴ糖(例えばラクツロース)と単糖(例えばマンニトール)の経口投与に基づいている⁴⁰⁾。小さい分子(単糖)はバリア機能の喪失とは無関係に、腸のバリアを自由に通過することを考えたのに対し、より大きな分子(オリゴ糖)はバリア機能の喪失中のみ通過する。経口摂取後5~6時間に収集された尿サンプル中の両方の糖類の比率は、バリア機能の損失、したがって、テストされた薬剤のCD毒性を反映すると考えられる。ただし、14日間、3.0または7.5gグルテン/日

にチャレンジした GFD で 20 人の CD 患者を用いた *in vivo* 試験では、ラクツロースとマンニトールの比率に有意な変化は見られなかったが、生検形態、抗体価、および胃腸症状大多数の患者で変化した⁴¹⁾。したがって、糖とタンパク質/ペプチドに対する異常な腸管透過性の間の相関の程度は確立されていない。

血液検査に関して、CD が確認された患者は、検査対象の薬剤で 3 日間の経口チャレンジを受ける。末梢血単核細胞 (PBMC) は数日後に分離され、薬剤 (ペプチドまたはタンパク質) とインキュベートされる⁴²⁾。インターフェロン- γ (IFN- γ) 応答は、サイトカイン特異的アッセイにより測定される。直腸は粘膜組織を取得するためのアクセスが容易な部位を提供するため、局所グルテン攻撃に対する反応が調査された⁴³⁾。2g のグルテン消化物で攻撃された CD 患者の直腸粘膜は、粘膜固有層の著しい腫脹、マスト細胞の急速な低下、IEL の顕著な上昇、および粘膜固有層のリンパ球の実質的な浸潤を示した。これらの観察は、直腸粘膜がグルテンに感作されていることを示しており、したがって、調査および診断の目的に便利なアプローチを提供した。

(3) *In vitro* 試験

毒性を試験するための *in vitro* システムの開発は、少量 ($\approx 1\text{mg}$ 以下) の試験ができるため、純粋なタンパク質およびペプチドの研究における重要なステップである。CD 患者の腸組織の器官培養は、最も信頼性の高い *in vitro* モデルであることが提案されており、*in vivo* 状況を反映している可能性がある。このテストは、1969 年に Browning and Trier によって最初に導入された⁴⁴⁾。CD 患者の組織は、診断手順の一部として採取され、テスト対象のタンパク質またはペプチドを含む培地でインキュベートされる⁴⁵⁾。長期培養後の粘膜形態の質の保証はないが、生検は培養システム内で 24 ~ 48 時間またはそれ以上継続することができる³¹⁾。元々、活動的な CD 患者の生検が行われ、組織は培養液のみで酵素活性、炎症の徴候、および形態の改善を示したが、CD 毒性物質の存在下では認められなかった。現在、寛解期の患者の組織は潜在的に有毒な物質とインキュベートされ、サイトカイン (例: IFN- γ , インターロイキン (IL) -4, IL-10) および一酸化窒素などの CD 特異的効果のマーカーが測定される。この方法の利点

の 1 つは、治療を受けた患者の生検で CD に特徴的なさまざまな特徴を再現できるため、研究者が CD の開発に関係するメカニズムを発見できることである³¹⁾。腸生検には腸細胞と粘膜固有層が含まれているため、このモデルは生得応答と適応応答の両方を判断するのに役立つ。欠点として、器官培養システムはハイスループット法ではなく、組織が循環、神経系、およびリンパ器官への接続のないことだ。器官培養システムは、毒性効果を検出するための最良の *in vitro* モデルだが、免疫原性効果のみを特定する T 細胞に関する研究に広く置き換えられている。1990 年代から、小腸粘膜または CD 患者の末梢血からの T 細胞株およびクローンが、タンパク質およびペプチドの免疫原性効果を測定し、潜在的な新規治療形態をテストするために使用されてきた⁴⁶⁾。グルテンに対して産生された T 細胞株とクローンは、多数の実験を行うのに役立ち、刺激に対する T 細胞の反応を容易に実証する。グルテン感受性 T 細胞は、*in vitro* で培養および刺激された腸の生検から分離できる⁴⁶⁾、または 3 日間の経口グルテンチャレンジ後 6 日目に治療を受けた CD 患者の血液に見られる⁴²⁾。頻繁に使用されるテストは、抗原提示細胞 (APCs) (例えば B 細胞) およびトリチウム化チミジンの存在下で TG2 で処理された推定抗原 (約 100 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と腸の CD 感受性 T 細胞のインキュベーションによって実行される T 細胞増殖アッセイである。シンチレーション測定によって決定された T 細胞の増殖は、免疫原性効果のパラメーターである。さらに、IFN- γ または IL の産生を測定できる。T 細胞検査は、免疫原性効果のレベルを比較するために広く使用されている。たとえば、異なるグリアジンペプチド⁴⁷⁾ およびオートムギ栽培品種⁴⁸⁾ (表 2.8) とのインキュベーション後、SI (刺激指数、抗原の 1 分あたりのカウントを抗原なしの 1 分あたりのカウントで割った値) および IFN- γ 濃度を測定するために増殖アッセイを適用した。T 細胞の感度は大きく変化し、刺激を受けた患者と刺激の手順に依存するため、参照グルテンタンパク質またはペプチドを比較のために摂取する場合、相対的な値のみを決定できる。

グルテン感受性クローンからではなく、複数の CD 患者からのグルテン感受性 T 細胞株の使用が推奨されている⁴⁹⁾。

表 2.8 異なる栽培品種からのグリアジン消化物, グリアジンペプチド, およびアベニン消化物に対するグルテン感受性 T 細胞の反応性 (47, 48)^a

Sample	SI	IFN- γ (pg/ml)
PT-gliadin	7	9
Peptide G9 (α 56-75/E65)	37	180
Peptide G5 (α 56-68/E65)	2	23
Peptide G4 (α 62-75/E65)	12	55
PTC-gliadin	1.8	9.4
PTC-avenin OF 720	0.7	3.4
PTC-avenin OH 727	1.0	4.8
PTC-avenin OM 719	1.3	7.9

^aSI, stimulation index; IFN- γ , interferon- γ ; PT, peptic-tryptic; PTC, peptic-tryptic-chymotryptic.

グルテンに敏感な T 細胞は腸組織ではまれなので、直接評価することはできない。十分に高い頻度で新鮮なポリクローナルグルテン感受性 T 細胞の唯一の既知のソースは、短期経口グルテンチャレンジの直後に採取された CD ドナーからの末梢血である⁴²⁾。グルテン攻撃の数日後に収集された CD 患者の末梢血単核細胞は、96 ウェルプレートを使用して潜在的な抗原とインキュベートされる。IFN- γ の放出は自動リーダーによってカウントされ、グルテンタンパク質の免疫原性 T 細胞エピトープの包括的なマッピングが可能になる⁵⁰⁾。一般に、T 細胞は腸内に存在する他の細胞タイプとの関連性がないため、*in vivo* で小腸に必ずしも影響しないことを言及する必要がある。さらに、T 細胞は抗原に対する反応が異なることが多いため、異なる患者の複数の T 細胞株を同時に適用する必要がある。さらに、免疫原性は、*in vivo* または器官培養試験で示される毒性に常に対応するとは限らない。例えば、オートムギのプロラミン画分であるアベニンは、T 細胞試験では免疫原性を示すが、器官培養試験では非毒性であることが示された^{51, 52)}。

皮膚試験、ヒト K562 (S) 細胞による凝集試験、白血球遊走阻害試験、またはマクロファージ凝血促進活性試験などの難易度の低いスクリーニングアッセイは、一般に受け入れられていない。1990 年代以来、2つの上皮細胞培養モデル、T84 細胞と Caco-2 細胞が、CD 特有の効果をテストするためのモデルとして使用されてきた³¹⁾。T84 細胞は結腸癌の肺転移に由来する。この細胞株は結腸起源だが、高分子およびイオンに対する腸上皮透過性の研究に広く使用されている。T84 細胞は、CD の病因の研

究、例えば、自然免疫反応⁵³⁾ および腸管透過性への影響⁵⁴⁾ の研究にも応用されている。Caco-2 細胞は、比較的高分化したヒト結腸腺癌に由来する。コンフルエンスに達すると、細胞は自発的に分化し、先端表面が微絨毛で覆われた分化した腸細胞の超微細構造形態を保持する。Caco-2 細胞は、タイトジャンクションと、腸の内側の細胞に特徴的な多くの酵素とトランスポーターを含んでいる⁵⁵⁾。これらの特性により、Caco-2 細胞は腸上皮バリアのモデルとして、および CD に関連する研究で広く使用されている。例えば、それらは個々のペプチドがどのように処理されるか⁵⁶⁾、CD 患者の抗体が疾患の病因にどのように関与するか⁵⁷⁾ を明らかにするために使用されてきた。

(4) 動物モデル

ヒトの腸内物質とは別に、グリアジン画分の細胞毒性活性を実証するために、ラットまたはヒヨコ胎児の未熟腸の培養物が使用されている^{58, 59)}。CD 活性化合物は、非常に未熟な小腸の発生と形態形成を阻害し、グリアジンペプチドがその形態形成の初期段階で小腸粘膜に対して直接的な損傷活性を有する可能性があることを示す。別のアプローチは、活性グリアジンペプチドによって引き起こされるラット肝臓リソソームの破壊研究である⁶⁰⁾。

CD の免疫学的経路とメカニズムをよりよく理解するために、さまざまな目的の動物モデルを作成するために多くの試みが行われた。現在、グルテン依存性下痢を自発的に生成する 3つのモデルがある：(1) 犬、(2) アカゲザル、および (3) 馬モデル^{32, 61)}。犬モデルでは、アイリッシュセッターはグルテ

ンの消費に応じて部分的な絨毛萎縮と IEL（上内皮リンパ球）浸潤を発症する⁶²⁾。アカゲザルではグルテン依存性の小腸粘膜損傷が報告されており⁶³⁾、炎症性小腸疾患のウマではグルテン依存性の抗体レベルの上昇が観察されている⁶⁴⁾。これら3つの自発的モデルすべてに共通するのは、HLA-DQ 2/8 対立遺伝子との関連性の欠如である。他のモデル（マウス、ラット、ウサギなど）は自発的ではなく、グルテン感作、化学的および/または薬物治療、および CD の機能を発症するための遺伝子改変が必要である。マウスモデルは、特定の遺伝子の CD の発症への寄与を評価するために導入遺伝子を導入できるため、他のモデルよりも大きな利点がある。例えば、ヒト HLA-DQ2 または -DQ8 を発現するトランスジェニックマウスが生成されたが、使用された動物のいずれも本格的な絨毛萎縮を発症しなかった⁶⁵⁾。デ・パオロと共同研究者は、グリアジンを与えられたヒト化 HLA-DQ8 マウスが固有層で IL-15 を過剰発現していることを報告した。ただし、粘膜構造は正常のままである⁶⁷⁾。多くの研究でトランスジェニックマウスを使用して、CD 病因のさまざまな要素（CD4+T 細胞、TG2、IL-15、腸内微生物叢の役割など）を調査した^{32,61)}。特定のマウスモデルは、CD の新規治療法のテストにも使用された³²⁾。病原性ステップを標的とする例は、グルテンペプチドの修飾、自然反応の抑制、ゾヌリン -1、炎

症性 T 細胞応答の抑制、および IL-15 または IL-15 の受容体の遮断である。これらすべての試みに関係なく、この障害のすべての側面を再現する CD の動物モデルはまだ開発を待っている。

(5) 毒性レベル

穀物、タンパク質画分とタイプ、およびペプチドの CD 毒性レベルに関する推測を多くの論文が提供している。たとえば、六倍体の普通小麦は、最も毒性の強い穀物として頻繁に説明されている。二倍体および四倍体の小麦種は、六倍体の普通小麦よりも毒性が低いことが示唆された⁶⁸⁻⁷⁰⁾。グリアジンはグルテニンよりも毒性が強い傾向がある³⁶⁾。グリアジン内では、 α -グリアジンが最も毒性が強く、 γ -グリアジンと ω -グリアジンの毒性が低いことが提案された⁷¹⁻⁷³⁾。D ホルデインと C ホルデインはホルデインの中で最も免疫原性が高いことがわかった⁷⁴⁾。多数の報告が、 $\alpha 2$ -グリアジンからの 33 量体ペプチドがグルテンペプチド内の最も重要な免疫原性物質であることを強調している。これらの仮定はすべて正当化されているか、CD の毒性と免疫原性のレベルを決定することはまったく可能か？意欲的な患者の数が限られていること、毒性効果を生み出すのに必要な薬剤の量が比較的多いこと、実験の労力が大きいため、毒性レベルの統計的に有意な評価のために生体内チャレンジを考慮することはできな

表 2.9 ペプチド $\alpha 31-49$ および 5 つのアラニン (A) 置換ペプチド変異体、フレイザー画分 FIII (FFIII), およびオвалブミン (OVA) で培養された検体の腸細胞高さ (μm)⁷⁵⁾

Patient	Peptide							
	FFIII	$\alpha 31-49$	A31	A36	A38	A39	A42	OVA
1	-7.9	-6.7	-6.3	-11.5	4.4	-1.6	3.8	0.7
2	-9.5	-6.5	1.8	9.0	-6.2	6.0	10.6	4.2
3	-13.3	-9.6	-13.7	-8.4	-1.4	-0.8	-2.5	-0.2
4	-12.3	-18.6	-5.8	-9.4	1.5	-0.4	-1.3	-1.9
5	-7.5	2.0	-3.7	-1.6	13.1	10.5	6.0	2.7
6	-12.5	-15.5	-1.2	-1.6	0.7	-2.4	-7.3	-6.9
7	-11.8	-10.9	-3.0	-2.4	1.1	1.2	0.9	-1.6
8	-17.7	-9.7	-12.1	-18.8	-5.4	-1.8	-3.8	-3.2
9	-6.6	n.t.	-0.1	6.7	n.t.	9.0	7.3	-1.6
10	-4.1	n.t.	n.t.	n.t.	-1.7	n.t.	n.t.	2.8
Mean	-10.3	-9.4	-4.9	-3.9	0.7	2.2	1.5	-0.5

n.t. = not tested.

い。対照的に、CD患者に由来する小腸生検の臓器培養は、毒性効果の違いを測定する可能性を提供する。寛解期の患者の組織は潜在的に有毒な物質とインキュベートされ、酵素活性、形態的特徴、サイトカイン濃度などのCD特異的効果のマーカーを測定できる。陽性および陰性の対照物質を実験に含める必要がある。例として、ペプチド α 31-49 と 10 人の CD 患者の検体で試験した 5 つのアラニン置換変異体の検査を表 2.9 に示した⁷⁵⁾。フレイザーの画分 FIII (小麦グルテンの消化性トリプシン消化物の水溶性部分) およびオボアルブミンをそれぞれ陽性および陰性コントロールとして使用し、培地のみと比較した腸細胞の高さの変化 (図 2.15) を毒性のマーカーとして使用した。結果は、非修飾ペプチド α 31-49 は、陽性対照と同程度の毒性があった。ペプチド α 31-49/A31 および α 31-49/A36 は毒性が低かった。また、ペプチド α 31-49/A38, α 31-49/A39, および α 31-49/A42 は非毒性だった。

器官培養システムが多種多様な細胞タイプを含み、生体内の状況を反映していることを考えると、この方法が少数の研究でしか使用されていないことは驚くべきことである。

対照的に、CD患者の小腸粘膜および末梢血から得られたグルテン感受性 T 細胞による検査は、CD 特異的免疫原性効果の評価に広く使用されている。表 2.8 に例を示した。ただし、T 細胞株とクローンの感度と特異性は、いくつかのパラメーター (例えば、それらが採取された患者や刺激に使用される薬剤) に強く依存している。一部の T 細胞は特定のグルテンペプチドに高度に特異的だが、他の T 細胞は相同ペプチドと交差反応し、これらの T 細胞間の比率は患者ごとに異なる⁷⁶⁾。これらの制限を克服するために、T 細胞クローンではなく、異なる患者からの複数の同時 T 細胞株の適用が推奨されている⁴⁹⁾。

References

31. Lindfors K., Rauhavirta T., Stenman S., Maeki M., Kaukinen K. *In vitro* models for gluten toxicity: relevance for celiac disease pathogenesis and development of novel treatment options. *Exp Biol Med*. 2012; **237**:119-125. 32. Stoven S., Murray J.A., Marietta E.V. Latest *in vitro* and *in vivo* models of celiac disease. *Expert Opin Drug Discov*. 2013; **8**: 445-457.
33. Wieser H., Antes S., Seilmeier W. Quantitative determination of gluten protein types in wheat flour by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem*. 1998; **75**: 644-650.
34. vanEckert R., Berghofer E., Ciclitira P.J., Chirido F., Denery-Papini S., Ellis H.J. *et al.*: Towards a new gliadin reference material - isolation and characterisation. *J Cereal Sci*. 2006; **43**: 331-341.
35. Fraser J.S., Engel W., Ellis H.J., Moodie S.J., Pollock E.L., Wieser H. *et al.*: Coeliac disease: *in vivo* toxicity of the putative immunodominant epitope. *Gut*. 2003; **52**: 1698-1702.
36. Shewry P.R., Tatham A.S., Kasarda D.D. Cereal proteins and coeliac disease. In: Marsh M.N., ed. *Coeliac disease*. Oxford (UK): Blackwell Scientific Publications; 1992: 305-348.
37. Janatuinen E.K., Pikkarainen P.H., Kempainen T.A., Kosma V.M., Jarvinen R.M., Uusitupa M.J. *et al.*: A comparison of diets with and without oats in adults with celiac disease. *N Engl J Med*. 1995; **333**: 1033-1037.
38. Hekkens W.T.J.M., Haex A.J.C., Willighagen R.G.J. Some gliadin fractionation and testing by a method. In: Booth C.C., ed. *Coeliac disease* (UK): Churchill Livingstone; 1970: 11-19.
39. Sturgess R., Day P., Ellis H.J., Lundin K.E.A., Gjertsen H.A., Kontakou M. *et al.*: Wheat peptide challenge in coeliac disease. *Lancet*. 1994; **343**:758-761.
40. Grootjans J., Thuijls G., Verdam F., Derikx J.P., Lenaerts K., Buurman W.A. Non-invasive assessment of barrier integrity and function of the human gut. *World J Gastrointest Surg*. 2010; **2**: 61-69.
41. Leffler D., Schuppan D., Pallav K., Najarian R., Goldsmith J.D., Hansén J. *et al.*: Kinetics of the histological, serological and symptomatic responses to gluten challenge in adults with coeliac disease. *Gut*. 2013; **62**: 996-1004.
42. Anderson R.P., vanHeel D.A., Tye-Din J.A., Barnardo M., Salio M., Jewell D.P. *et al.*: T cells in peripheral blood after gluten challenge in coeliac disease. *Gut*. 2005; **54**: 1217-1223.
43. Loft D.E., Marsh M.N., Sandle G.I., Crowe P.T., Garner V., Gordon D. *et al.*: Studies of intestinal lymphoid tissue. XII. Epithelial lymphocyte and disease. Edinburgh, aspects of histochemical London mucosal responses to rectal gluten challenge in celiac sprue. *Gastroenterology*. 1989; **97**: 29-37.
44. Browning T.H., Trier J.S. Organ culture of mucosal biopsies of human small intestine. *J Clin Invest*. 1969; **48**: 1423-1432.
45. Shidrawi R.G., Day P., Przemioslo R., Ellis H.J., Nelufer J.M., Ciclitira P.J. *In vitro* toxicity of gluten peptides in celiac disease assessed by organ culture. *Scand J Gastroenterol*. 1995; **30**:758-763.
46. van de Wal Y., Kooy Y.M.C., van Veelen P.A., Pena S.A., Mearin L.M., Molberg O. *et al.*: Small intestinal T cells of celiac disease patients recognize a natural pepsin fragment of gliadin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; **95**: 10050-10054.

47. Ellis H.J., Pollock E.L., Engel W., Fraser J.S., Rosen-Bronson S., Wieser H. *et al.*: Investigation of the putative immunodominant T cell epitopes in coeliac disease. *Gut*. 2003; **52**: 212-217.
48. Comino I., Real A., deLorenzo L., Cornell H., Lopez-Casado M.A., Barro F. *et al.*: Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease. *Gut*. 2011; **60**: 915-922.
49. Suligoj T., Gregorini A., Colomba M., Ellis H.J., Ciclitira P.J. Evaluation of the safety of ancient strains of wheat in coeliac disease reveals heterogeneous small intestinal T cell responses suggestive of coeliac toxicity. *Clin Nutr*. 2013; **32**: 1043-1049.
50. Tye-Din J.A., Stewart J.A., Dromey J.A., Beissbarth T., van Heel D.A., Tatham A. *et al.*: Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Sci Transl Med*. 2010; **2**: 41-51.
51. Kilmartin C., Lynch S., Abuzakouk M., Wieser H., Feighery C. Avenin fails to induce a Th1 response in coeliac tissue following *in vitro* culture. *Gut*. 2003; **52**: 47-52.
52. Kilmartin C., Wieser H., Abuzakouk M., Kelly J., Jackson J., Feighery C. Intestinal T cell responses to cereal proteins in celiac disease. *Dig Dis Sci*. 2006; **51**: 202-209.
53. Maiuri L., Luciani A., Vilella V.R., Vasaturo A., Giardino I., Pettoello-Mantovani M. *et al.*: Lysosomal accumulation of gliadin p31-43 peptide induces oxidative stress and tissue transglutaminase-mediated PPAR γ downregulation in intestinal epithelial cells and coeliac mucosa. *Gut*. 2010; **59**: 311-319.
54. Bethune M.T., Siegel M., Howles-Banerji S., Khosla C. Interferon- γ released by gluten-stimulated celiac disease-specific intestinal T cells enhances the transepithelial flux of gluten peptides. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009; **329**: 657-668.
55. Lammers K.M., Lu R., Brownley J., Lu B., Gerard C., Thomas K. *et al.*: Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology*. 2008; **135**: 194-204.
56. Barone M.V., Nanayakkara M., Paoletta G., Maglio M., Vitale V., Troiano R. *et al.*: Gliadin peptide P31-43 localises to endocytic vesicles and interferes with their maturation. *PLoS One*. 2010; **5**: e12246.
57. Luebbing N., Barone M.V., Rudloff S., Troncone R., Auricchio S., Zimmer K.P. Correction of gliadin transport within enterocytes through celiac disease serum. *Pediatr Res*. 2011; **70**: 357-362.
58. Wood G.M., Howdle P.D., Losowsky M.S. Organ culture of fetal rat small intestine for testing gluten toxicity: a reappraisal. *Br J Exp Pathol*. 1987; **68**: 25-34.
59. Mothes T., Osman A.A., Seilmeier W., Wieser H. The activity of single gliadin components in a fetal chick intestine assay for coeliac disease. *Eur Food Res Technol*. 1999; **210**: 93-96.
60. Cornell H.J., Townley R.R.W. Effect of gliadin peptides on rat-liver lysosomes in relation to the pathogenesis of coeliac disease. *Clin Chim Acta*. 1973; **49**: 181-188.
61. Marietta E.V., Murray J.A. Animal models to study gluten sensitivity. *Semin Immunopathol*. 2012; **34**: 497-511.
62. Hall E.J., Batt R.M. Dietary modulation of gluten sensitivity in a naturally occurring enteropathy of Irish setter dogs. *Gut*. 1992; **33**: 198-205.
63. Bethune M.T., Borda J.T., Ribka E., Liu M.X., Phillippi-Falkenstein K., Jandacek R.J. *et al.*: A non-human primate model for gluten sensitivity. *PLoS One*. 2008; **3**: e1614.
64. vanderKolk J.H., vanPutten L.A., Mulder C.J., Grinwis G.C.M., Reijm M., Butler C.M. *et al.*: Gluten-dependent antibodies in horses with inflammatory small bowel disease (ISBD). *Vet Q*. 2012; **32**: 3-11.
65. deKauwe A.L., Chen Z., Anderson R.P., Keech C.L., Price J.D., Wijburg O. *et al.*: Resistance to celiac disease in humanized HLA-DR3-DQ2-transgenic mice expressing specific anti-gliadin CD4+ T cells. *J Immunol*. 2009; **182**: 7440-7450.
66. D'Arienzo R., Stefanile R., Maurano F., Luongo D., Bergamo P., Mazzarella G. *et al.*: A deregulated immune response to gliadin causes a decreased villous height in DQ8 transgenic mice. *Eur J Immunol*. 2009; **39**: 3552-3561.
67. dePaolo R.W., Abadie V., Tang F., Fehlner-Peach H., Hall J.A., Wang W. *et al.*: Co-adjuvant effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens. *Nature*. 2011; **471**: 220-224.
68. Auricchio S., de Ritis G., de Vincenzi M., Occorsio P., Silano V. Effects of gliadin-derived peptides from bread and durum wheats on small intestine cultures from rat fetus and coeliac children. *Pediatr Res*. 1982; **16**: 1004-1010.
69. Vincentini O., Maiale F., Gazza L., Silano M., Dessi M., de Vincenzi M. *et al.*: Environmental factors of celiac disease: cytotoxicity of hulled wheat species *Triticum monococcum*, *T. turgidum* ssp. *dicocum* and *T. aestivum* ssp. *spelta*. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007; **22**: 1816-1822.
70. vandenBroeck H., Hongbing C., Lacaze X., Dusautoir J.C., Gilissen L., Smulders M. *et al.*: In search of tetraploid wheat accessions reduced in celiac disease-related gluten epitopes. *Mol Biosyst*. 2010; **6**: 2206-2213.
71. Frisoni M., Corazza G.R., Lafiandra D., deAmbrogio E., Filipponi C., Bonvicini F. *et al.*: Wheat deficient in gliadins: promising tool for treatment of coeliac disease. *Gut*. 1995; **36**: 375-378.
72. Spaenij-Dekking L., Kooy-Winkelaar Y., van Veelen P., Drijfhout J.W., Jonker H., van Soest L. *et al.*: Natural variation in toxicity of wheat: potential for selection of nontoxic varieties for celiac disease patients. *Gastroenterology*. 2005; **129**: 797-806.
73. Carroccio A., diPrima L., Noto D., Fayer F., Ambrosiano G., Villanacci V. *et al.*: Searching for wheat plants with low toxicity in celiac disease: between direct toxicity and immunologic activation. *Dig Liver Dis*. 2011; **43**: 34-39.
74. Tanner G.J., Howitt C.A., Forrester R.I., Campbell P.M., Tye-Din J.A., Anderson R.P. Dissecting the T-cell response to hordeins in coeliac disease can develop barley with reduced immunotoxicity. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010; **32**: 1184-1191.
75. Biagi F., Ellis H.J., Parnell N.D., Shidrawi R.G., Thomas P.D., O'Reilly N. *et al.*: A non-toxic analogue of a coeliac-activating gliadin peptide: a basis for immunomodulation? *Aliment Pharmacol Ther*. 1999; **13**: 945-950.
76. Koning F. Celiac disease: quantity matters. *Semin Immunopathol*. 2012; **34**: 541-549.