

研究課題名	マカダミアナッツアレルゲンの交差反応についての解析
フリガナ	ヨシダ コウイチ
代表者名	吉田 幸一
所属機関 (機関名) (役職名)	東京都立小児総合医療センター アレルギー科 医員
本助成金による 発表論文, 学会発表	Koichi Yoshida, Shoichiro Shirane, Kazue Kinoshita, et al. Clinical features and allergen analysis in five children with macadamia nut allergy. American Academy of Allergy and Immunology/World Allergy Organization Joint Congress 2018. 2-5 March 2018. Orlando, FL, USA.

研究結果要約

マカダミアナッツは現在広く摂取される食品となったが、そのアレルギーについてこれまで十分な検討がなされていない¹⁻⁵⁾。そのため、交差反応についてもヘーゼルナッツとの可能性が症例報告レベルで示唆されるのみで、マカダミアナッツアレルギーがある場合どのナッツに注意すべきが明らかにできていなかったが、本研究により 5 名の即時型のマカダミアナッツアレルギーをもつ小児例（うちアナフィラキシーを経験した症例は 2 名）が集積できた。

我々はマカダミアナッツの粗タンパク質に対する特異的 IgE 抗体の検出系を確立し、Inhibition ELISA を 4 名の患者で実施した。その結果、4 名中 2 名の患者の特異的 IgE 抗体は、クルミとヘーゼルナッツの粗タンパク質を吸収抗原とした時、濃度依存的に吸光値が減少し、これらの抗原に対し交差反応を示すことが明らかになった。残り 2 名ではヘーゼルナッツ、クルミ、ピーナッツ、アーモンド、カシューナッツ、ピスタチオ、まつのみ、ごま、そばとも全ての症例の IgE 抗体は交差反応性を示さなかった。今後、この結果の臨床的意義も含め今後マカダミアナッツのアレルゲン性について、解析中のコンポーネントの同定など更なる研究が必要である。

研究目的

食物アレルギーをもつ患者は世界中で急増し、2012 年に学校給食による食物アレルギーに起因す

る死亡事故があり大きな社会問題になった。食物アレルギーの重要な原因食品のひとつとしてナッツ類があり、症状は重篤な場合が多くその対応が生死に関わることも少なくない。ピーナッツ、クルミ、カシューナッツ、ヘーゼルナッツなどは食物アレルギーの原因として広く認識され、コンポーネントの分析も行われその理解が進んでいるが、マカダミアナッツアレルギーの臨床像およびその主要抗原は明らかになっていない。

そこで我々は本研究にて、東京都立小児総合医療センター倫理委員会で承認を得た後、マカダミアナッツアレルギー患者を集積し、マカダミアナッツと他の食品の交差反応の解析を行い、マカダミアナッツアレルギーの方およびアレルギー診療に携わる方にとってより有益な情報を提供し、さらに特異的 IgE 抗体測定系の確立へとつなげることを目的とする。

研究計画及び研究手法

マカダミアナッツアレルギーと医師により診断された小児とその保護者に対して、本研究の目的、血清の提供につき説明の上、同意を得られた方について解析を行った。その臨床像をまとめ、血清を用いて他のナッツ類等との交差反応を調べた。

・ ELISA による Inhibition assay

マカダミアナッツと他の抗原（ピーナッツ、アーモンド、カシューナッツ、ヘーゼルナッツ、クルミ、そば、ピスタチオ、まつのみ、ごま）との交差反応を調べるために、ELISA による Inhibition assay を行った。Nunc Maxisorp plate (Thermo-Fisher Scientific, UK) にマカダミアナッツの粗タンパク質の抽出液をコーティングし(20 µg/ml)、ImmunoBlock(DS Pharma Biomedical Co. Ltd., Osaka, Japan) にてブロッキングを行った。プレートを洗浄後、事前に段階的に希釈した各抗原(0.01, 0.1, 1.0, 10 µg/ml) と incubate した患者血清を各 well に加えた。IgE の結合は、anti-human IgE antibody conjugated with horseradish peroxidase (Southern Biotechnologies Associates, Birmingham, AL, USA) にて検出し、3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine にて酵素反応させ A450nm の吸光度を測定した。

・ Western blotting によるアレルゲンコンポーネントの解析

交差反応をきたす抗原が、マカダミアナッツのどのタンパク質（コンポーネント）になるのかをより詳細に調べるために、IgE と結合するタンパク質の抽出を行った。Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, Bio-Rad, CA, USA) にてマカダミアタンパク質を分離し、ニトロセルロース膜(Amersham Protran, GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) に転写後、柵状に切断しマカダミアナッツアレルギーの患者の血清と反応させた。

抗原を分離するために、脱脂を目的にアセトンの使用、不純物を除去するための透析、タンパク質抽出キットの使用等をこころみ、各種処理を行った抗原を CBB 染色にて解析した。また、アレルゲ

ンコンポーネントを解析するにあたり二次元電気泳動を実施した。

結果と考察

・ 研究対象患者

マカダミアナッツアレルギーを医師が疑った 6 名のうち確定診断に至った患者が 5 名であった。5 名のマカダミア特異的 IgE 抗体値 (ImmunoCAP: Thermo-Fisher Scientific, UK) は 0.58 ~ 28.4 UA/ml で、Skin prick test は全例で陽性であった。また 5 名中 2 名でマカダミアによるアナフィラキシーの経験を有した。他の食物アレルギーとの合併は、カシューナッツ、キウイ、いくらにアレルギーがあるものが 1 名 (ヘーゼルナッツ、クルミは未摂取)、クルミが 1 名 (ヘーゼルナッツは未摂取)、鶏卵が 1 名であった。

・ ELISA による Inhibition assay

確定診断 5 例のうち 1 名はマカダミアナッツと IgE の結合能が弱く解析ができなかったため、可能であった 4 名につき検討した。4 名中 2 名が、ヘーゼルナッツとくるみの 2 つの抗原に対してともに濃度依存的に吸光値が減少し、これらの抗原に対し交差反応を示すことが明らかになった。残りの 2 名は今回検討したすべての抗原 (ピーナッツ、アーモンド、カシューナッツ、ヘーゼルナッツ、クルミ、そば、ピスタチオ、まつのみ、ごま) では、吸光度は減少せず交差反応を示さないことが明らかになった。

・ Western blotting

10~20kDa の間の 3 つのバンド、37~50 kDa の間の 2 つのバンドが IgE の結合するタンパク質の分子量として想定された。これらのバンドに含まれるタンパクの解析を行うため、マカダミアナッツ抽出液に対して脱塩、脱脂等の処理をおこなったが SDS-PAGE では十分にタンパク質が分離できないことがわかり、二次元電気泳動を行った。二次元電気泳動では、2 つのスポット (およそ 40kDa と 14kDa 付近) がマカダミアナッツアレルギーの患者血清と反応するスポットと推定することができた。

マカダミアナッツとヘーゼルナッツの交差反応については、成人の症例報告であるがすでにその可能性が示されている。本研究により、マカダミアナッツは小児例でもヘーゼルナッツが同様に交差反応を示す可能性があること、また新たにクルミに対しても交差反応がある可能性があることがわかった。しかし臨床像 (摂取時の症状の有無) と一致していない場合もあり、その臨床的意義についてはさらなる研究が必要と思われる。今後質量解析等を用いて、マカダミアナッツのなかの主要なアレルギーコンポーネントを同定し、他のナッツアレルギーのようにアレルギーコンポーネントを

用いた診断へと進むことが、より正確なアレルギー診断へとつながると考えられる。

そして、ヘーゼルナッツ、クルミ以外のアレルゲン（ピーナッツ、アーモンド、カシューナッツ、ピスタチオ、ごま、そばなど）は交差反応を示さないことが明らかにでき、マカダミアナッツアレルギーを理由に除去する必要がないことがわかった。

2017年 International Symposium on Molecular Allergology にてドイツの発表者からマカダミアナッツアレルギーの報告があり、ビシリン様タンパクがマカダミアナッツの主なアレルゲンと推測されるという報告があった。食物アレルギーは頻度や主要アレルゲンについて地域差があることは知られているが、本研究とこの報告ともいくつか相違点があり、今後も研究を継続することによりマカダミアナッツアレルギーの詳細が明らかにしたい。そして、AAAAI/WAO joint congress 2018 にて本研究の一部を報告したが、その後行った本研究を学会発表するとともに、論文という形でも報告していきたいと考え、現在作成中である。

今後の研究活動について

マカダミアナッツアレルギーはピーナッツなど他のナッツアレルギーと比較すると患者数は少ないが、日本の小児でもその症状は他のナッツ同様、重篤な症状をきたすことが明らかになった。そして、ヘーゼルナッツ、クルミと交差反応を示す可能性が本研究により示されたが、その臨床的意義やコンポーネントの解析は、より正確な診断には必要である。

本研究結果をもとに現在食物アレルギーの診断において重要な検査となっているコンポーネントに対する特異的 IgE 抗体検査が実施できるよう、マカダミアナッツの主要アレルゲンコンポーネントを明らかにし、より臨床の現場で役に立つよう研究を続けていきたい。

参考文献

- 1) Pallares DE. Allergy to macadamia nut. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000;85(5):385-6.
- 2) Knott E, Gurer CK, Ellwanger J, Ring J, Darsow U. Macadamia nut allergy. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2008;22(11):1394-5.
- 3) De Knop KJ, Hagendorens MM, Bridts CH, Stevens WJ, Ebo DG. Macadamia nut allergy: 2 case reports and a review of the literature. *Acta Clin Belg.* 2010;65(2):129-32.
- 4) Ekbote A, Hayman G, Bansal A. Macadamia nut allergy: potentially misleading specific IgE results. *Allergy.* 2010;65(10):1345.
- 5) Sutherland MF, O'Hehir RE, Czarny D, Suphioglu C. Macadamia nut anaphylaxis: demonstration of specific IgE reactivity and partial cross-reactivity with hazelnut. *J Allergy Clin Immunol.* 1999;104(4 Pt 1):889-90.

以上