

LC-MS/MSによる食物アレルギー検査方法

—標準物質「食物由来アレルギー抽出物™」のご紹介—

稲垣 江梨, 富上 香澄, 山下 賀容子

1 はじめに

食物を摂取等した際、食物に含まれる原因物質（アレルギー：主としてタンパク質）を異物として認識し、自分の身体を防御するために過敏な反応を起こすことがある。これを食物アレルギーという。アレルギー患者の健康危害防止の観点から、食品表示法により、食物アレルギーを含む食品にはアレルギーを含む旨の表示が定められている。食物アレルギーを発症する食品のうち、症例が多いものや重篤なものについては「特定原材料」とされ、アレルギー表示が義務付けられている。また、一定の頻度で健康被害がみられたものについては「特定原材料に準ずるもの」とされ、アレルギー表示が推奨されている。

食物アレルギー検査方法は、消費者庁通知法（以下通知法という）¹⁾により定量検査法としてELISA法が、定性検査法としてPCR法やウエスタンブロット法が指定されている。これらの検査方法は、アレルギーごとにそれぞれ個別に検査を行う必要がある。例えば、ELISA法による検査においては、卵であれば卵用のELISAキット、小麦であれば小麦用のELISAキットにて検査を実施する。また、検査の妨害物質を含む食品や偽陽性を示す食品は、正しい結果を得られない場合がある。

そこで近年、選択性が高く、複数アレルギーを検査できるLC-MS/MSを用いた手法が注目されている。雑賀技術研究所は、長年、LC-MS/MS等を用い残留農薬検査サービスに携わり、食の安全に貢献してきた。現在は、残留農薬で培った技術を活かし、LC-MS/MSを用いた食物アレルギー検査方法（以下「LC-MS/MS法」という）の開発に取り組んでいる。定量検査には標準物質が必要であり、一般に市販されている標準物質は、カゼインやアルブミン等の特定のタンパク質のみが含有されている。一方、通知法別添「アレルギーを含む食品に関する表示」には、「標準タンパク質は特定のタンパク質や抗原性を持つタンパク質ではなく、なるべくすべてのタンパク質を含んでいることが望ましい」と記載されている。また、通知法に記載されているELISA法用の標準物質では、界面活性剤が含有されているため、LC-

MS/MSの質量分析部に悪影響を及ぼす恐れがある。食物アレルギー検査にLC-MS/MS法を適用するにあたって、適した標準物質が見当たらないことが課題であった。

そこで、雑賀技術研究所では「総タンパク質を含有しながら質量分析計で使用可能な標準物質」を開発し、製品化した。本稿では、標準物質の特長及びこの標準物質を用いた食物アレルギー検査方法について紹介する。

2 標準物質「食物由来アレルギー抽出物™」

分析条件の検討や食品への添加試験を経て、総タンパク質の定量検査を実施できるようにするには、特定のタンパク質ではなく総タンパク質を含み、LC-MS/MSで使用可能な標準物質が必要である。これを可能にするため、標準物質を開発するにあたり、標準粉末から相間移動溶剤（PTS）²⁾を用いてタンパク質抽出するアプローチを検討した。その詳細を解説する。

図1に標準物質の調製方法を示す。材料となる標準粉末は、通知法別添3標準品規格を参考に調製した。例えば卵の場合、白色レグホン種の卵殻を外して均一にホモジナイズ後、凍結乾燥し、乾燥物を微粉碎した。

タンパク質抽出には、PTSを用いた。PTSはタンパク質可溶性に優れており、疎水性の高いタンパク質であっても親水性タンパク質と同等に抽出できる。また、PTSは界面活性剤であるが、酸性条件下で有機溶媒を用いた液々分配により除去できるために、LC-MS/MSの質量分析部に悪影響を与えない。

弊所では、上記のように調製した標準物質を既に「食物由来アレルギー抽出物™」として販売しており、その

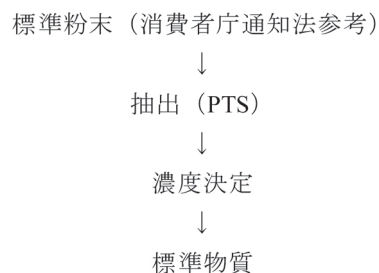


図1 標準物質の調製

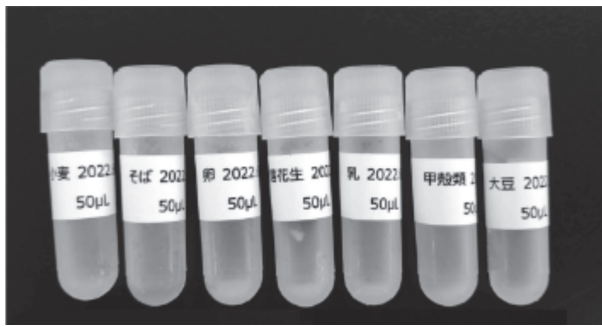


図2 標準物質
製品名：食物由来アレルギー抽出物™
関東化学株式会社にて販売

品目は、小麦、そば、卵、落花生、乳、甲殻類（以上、特定原材料）及び大豆（特定原材料に準ずるもの）となっている（図2）。くるみ（令和5年3月9日特定原材料に準ずるものから特定原材料へ移行）については現在開発を進めている。それぞれアレルギー1品目ずつを含んでいるが、複数含有する混合標準物質や、大豆以外の特定原材料に準ずるもの、マイナーアレルギー等への応用も考えている。

3 食物アレルギー検査方法（LC-MS/MS法）

3.1 前処理について

食品試料はそのままの状態では測定できないために、粉碎や抽出、酵素消化、精製等の前処理を行う。雑質技術研究所における分析フローシートについて紹介する（図3）。

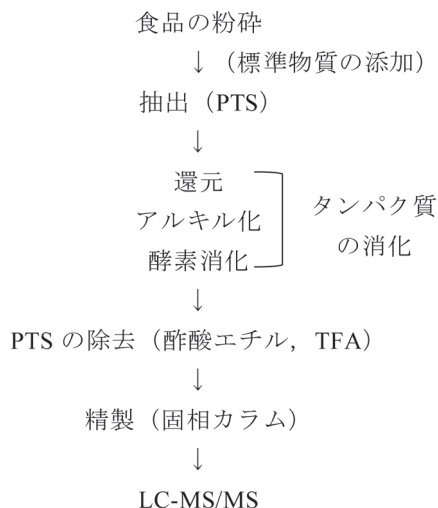


図3 食物アレルギー検査方法のフローシート

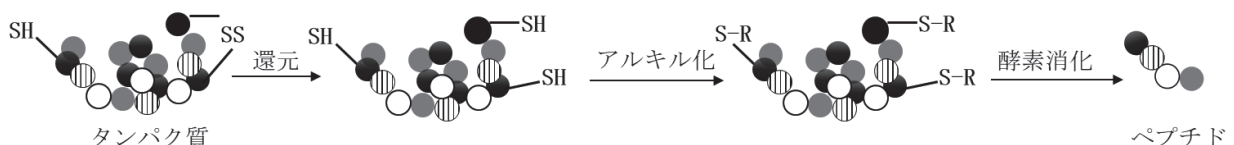


図4 タンパク質の消化

はじめに、フードプロセッサー等で食品を粉碎し、2で紹介した標準物質を添加する。食品抽出時に加えて前処理すると、標準添加法による定量や添加回収率の算出ができる。

次に、標準物質の調製で用いたPTSにより、タンパク質の抽出を行う。PTSは、食品から食物アレルギータンパク質を効率よく抽出できる。（抽出試薬について製品化を検討中である）。

その次に、タンパク質を消化する。還元、アルキル化、酵素消化によってペプチドまで切断する（図4）。アレルギータンパク質は高分子のために、このままでは分析が難しいが、ペプチドに断片化されると逆相LCカラムで保持され分析できる。

その後、PTSをトリフルオロ酢酸（TFA）により酸性にして脂溶化し、酢酸エチル中に分離させて除去する。高濃度のPTSをそのまま質量分析部に導入すると測定に悪影響を及ぼす恐れがあるため、この工程で除去する。

最後に、固相カラムを用いた精製を実施する。加工食品を対象にする場合、クロマトグラム上に夾雑物ピークが出現し、質量分析部でのイオン化阻害等のマトリックス効果が引き起こされる。そこで、固相カラムを用いた精製を実施すると、夾雑物を除去し質量分析部におけるマトリックス効果を軽減できる。固相カラムには様々な種類があるが、イオン交換カラムや無極性相互作用を利用したカラム等を推奨する。

以上が前処理の工程であり、その後LC-MS/MSで測定を行う。開発した方法は、学校法人慶応義塾の特許第4831708号、「タンパク質試料の調製方法」を食物アレルギー検査に応用した。

3.2 機器分析について

機器分析は、アレルギータンパク質のペプチド断片を逆相クロマトグラフィーで分離し、LC-MS/MSにて測定する。機器分析条件の構築について紹介する。

まず、アレルギータンパク質のアミノ酸配列をNational Center for Biotechnology Information (NCBI)等のデータベースから入手する。次に、その配列を基にSkylineソフトウェア（ワシントン大学MacCoss Lab）を用いて、ペプチド断片を予測する。測定する質量数（イオン）を選択して、電圧等の質量分析条件を作製する。このとき、ペプチドが他の生物と一致しないよう

データベースで検索し、偽陽性が引き起こされないように特異性の高いものを選択する。

このように、アレルゲンタンパク質のアミノ酸配列がデータベースに記載されていれば、これを元に質量分析条件を設定できる。新たなアレルゲン品目について検討を開始する際は、ELISA キットが販売されていない品目であっても、質量分析条件の構築が可能である。

設定した質量分析条件を用いて、食品で検査を実施する前に、標準物質のみをペプチド断片化して測定する。ここで、使用する装置に合った最適電圧を定め、保持時間、ピーク形状や感度を確認し、分析条件を構築する。最終的には、実際に食品で検査した結果を考慮し、夾雑物の影響が少ない最適なイオンを定量イオンに選択する。食品によって最適なイオンが異なる場合があるため、測定時は複数イオンの設定を推奨する。

3.3 検査方法の特長

LC-MS/MS 法の特長は、複数のアレルゲンを一斉に検査でき、選択性が高いことである。実際の検査結果を用いて紹介する。

図 5 は、LC-MS/MS 法における蒲鉾かまぼこの検査例である。各アレルゲンにおいて、標準物質の添加ピークが確認できる。また、この蒲鉾は原材料に卵を含んでおり、原材料表示の記載通り、卵アレルゲンのみ検出されている。LC-MS/MS 法では、ELISA 法のように対象とするアレルゲンを限定せずに、図に示すような複数アレルゲを一斉に検査できる。

ELISA 法では偽陽性を示す食品が存在し、その情報はキットメーカーによる反応性データ³⁾⁴⁾に記載されて

いる。小麦アレルゲンは大麦に反応性があるために、大麦を使用した製品は偽陽性を示す可能性がある。図 6 は、LC-MS/MS 法における大麦入り包装米飯についてのクロマトグラムの一例である。左側は小麦と大麦の両方を検出するイオンを、右側は小麦のみを検出するイオンを設定した。試料において、小麦及び大麦検出用イオンでは検出され、小麦検出用イオンでは不検出であった。したがって、試料からは小麦は不検出であり、大麦のみ検出であると判別できた。このように、よく似たタンパク質であっても、特異性の高いイオンを設定すると、分析対象のアレルゲンを区別して検出できる。以上のように、LC-MS/MS 法は、複数イオンの設定により選択性が高くなり、ELISA 法では偽陽性を示す可能性

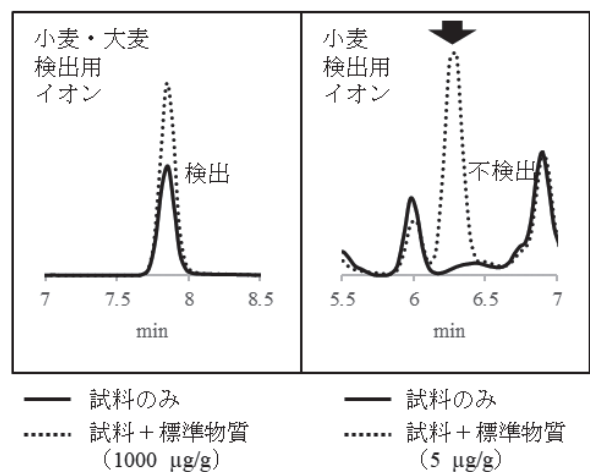


図 6 大麦入り包装米飯試料の小麦アレルゲンクロマトグラムの一例

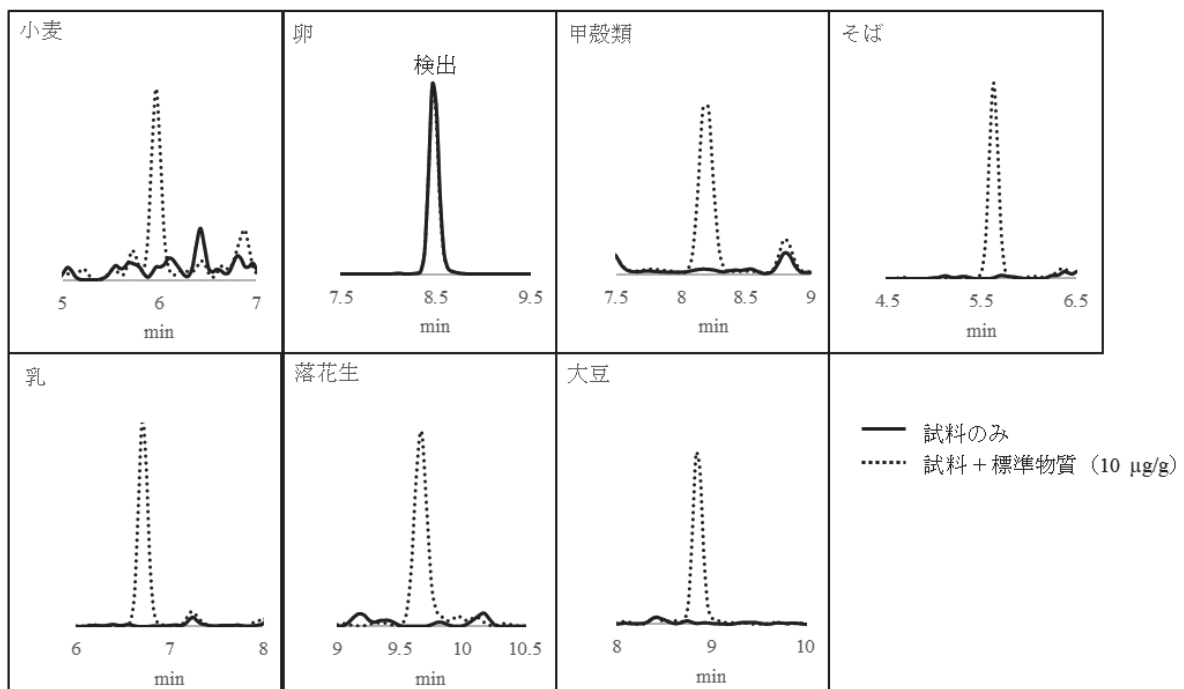


図 5 蒲鉾（原材料表示に卵の記載あり）試料のクロマトグラムの一例

のある食品でも判別できると考えられる。

3・4 加工食品での検査例

LC-MS/MS 法が多様な加工食品に適用できるか、4種類の試料を用いて精度等を評価した結果を紹介する。

試料には、海藻入り煎餅、鶏レバー入りベビーフード、レトルトパウチ食品（ミートソース）及び大麦入り包装米飯（3・3 図6における同一試料）を用いた。これらを試料に選択した理由について、表1に示す。ELISA法で測定が難しい場合がある試料を選択した。

分析者1名が1日5併行の試験を行い、併行精度、真度、検量線の相関係数、定量下限について評価した。結果について、表2に示す。併行精度（RSD）は11%以内、真度は93~110%、検量線の相関係数（r）は0.983以上となり、良好な結果となった。定量下限について、5 µg/g以下となり、通知法の表示基準レベルを満

たした。通知法では、試料がアレルゲンタンパク質を10 µg/g以上含むと微量を超える混入があると判断されるために、この数値がアレルギー表示の目安となる。

以上の結果から、LC-MS/MS法が多様な加工食品に

表1 試料の選択理由

試料名	試料の選択理由
海藻入り煎餅	海藻に含まれる粘性成分が、ELISAキットの抗体と吸着する場合があるため
鶏レバー入りベビーフード	鶏レバーを含み、ELISA法において「乳・落花生」に偽陽性を示す可能性があるため ³⁾⁴⁾
レトルトパウチ食品（ミートソース）	加工度が高く、野菜・豚肉・スパイス等様々なマトリックスを多く含むため
大麦入り包装米飯	大麦を含み、ELISA法において「小麦」に偽陽性を示す可能性があるため ³⁾⁴⁾

表2 加工食品における試験結果

試料	アレルゲン	併行精度 ^{*1} (RSD%)	真度 ^{*1} (%)	相関係数 ^{*2} (r)	定量下限 ^{*3} (µg/g)
海藻入り煎餅	小麦	8	97	0.990	1
	卵	6	103	0.983	1
	乳	7	99	0.987	1
	落花生	3	104	0.987	0.5
	そば	3	110	0.983	1
	甲殻類	6	99	0.983	1
	大豆	6	101	0.985	0.5
鶏レバー入りベビーフード	小麦	2	100	0.996	1
	卵	3	93	0.997	1
	乳	4	96	0.997	1
	落花生	10	103	0.997	1
	そば	3	97	0.997	1
	甲殻類	3	101	0.998	1
	大豆	6	101	0.993	1
レトルトパウチ食品（ミートソース）	小麦	3	105	0.988	5
	卵	7	99	0.995	0.5
	乳	2	102	0.996	0.5
	落花生	7	105	0.996	0.5
	そば	3	102	0.994	0.5
	甲殻類	4	100	0.996	1
	大豆	6	100	0.994	1
大麦入り包装米飯	小麦	3	106	0.997	1
	卵	4	110	0.992	5
	乳	4	107	0.997	1
	落花生	11	103	0.992	1
	そば	7	110	0.993	1
	甲殻類	3	106	0.997	1
	大豆	1	106	0.996	1

加工食品に標準物質を添加（n=5）。※1：10 µg/gの結果；※2：0.5, 1, 5, 10, 20 µg/gの結果；※3：目標値（併行精度20%以下、真度70%以上120%以下）を満たす0.5, 1, 5, 10, 20 µg/gの最小濃度。

適用でき、食物アレルギー検査方法として活用できると示唆された。

4 まとめ

我々は、LC-MS/MS法で用いる標準物質「食物由来アレルギー抽出物TM」を製品化した。本稿では、この標準物質の特長及びこの標準物質を用いた食物アレルギー検査方法を紹介した。今後は、この検査方法の実用化に向けて、研究機関や食品会社等の検査現場への導入をすすめていきたいと考えている。一部の加工食品メーカーでは、将来的に自社製品の品質管理に取り入れることを目標にLC-MS/MS法について取り組みを始めている。通知法において採用されている方法ではないものの、品質管理で有効に活用できると期待される。また、LC-MS/MSを食物アレルギー検査にも利用することで、装置の活用幅が広がると考える。

今後、LC-MS/MS法に興味を持つ会社が増え検査方法が普及し、食の安心安全につながっていくことを望んでいる。雑賀技術研究所は、検査方法の開発をはじめとする様々な活動を通じ、社会に貢献していく所存である。

文 献

- 1) 消費者庁：平成27年消費者庁次長通知消食表第139号，“食品表示基準について（別添）アレルギーを含む食品に関する表示”（2015）。
- 2) T. Masuda, M. Tomita, Y. Ishihama : *J. Proteome Res.*, **7**, 731 (2008)。

- 3) 日本ハム株式会社中央研究所：“FASTKIT エライザ Ver. III シリーズ，食品反応性データ（2018年8月改訂）”，〈https://www.rdc.nipponham.co.jp/fastkit/fastkit_elisa3.html〉，(accessed 2023. 8. 7)。
- 4) 株式会社森永生科学研究所：“モリナガ FASPEK エライザ II，食品反応性データ”，〈<https://miobs.com/product/tokutei/faspek2/reactive.html>〉，(accessed 2023. 8. 7)。



稲垣 江梨 (Eri INAGAKI)

一般財団法人雑賀技術研究所研究開発室。
(〒640-8341 和歌山市黒田二丁目1番20号)。《現在の研究テーマ》GC/MS, LC/MSを用いた食品分析。
E-mail : inagaki@saika.or.jp



富上 香澄 (Kasumi TOKAMI)

一般財団法人雑賀技術研究所研究開発室。
(〒640-8341 和歌山市黒田二丁目1番20号)。《現在の研究テーマ》GC/MS, LC/MSを用いた食品分析。
E-mail : tokami@saika.or.jp



山下 賀容子 (Kayoko YAMASHITA)

一般財団法人雑賀技術研究所研究開発室。
(〒640-8341 和歌山市黒田二丁目1番20号)。《現在の研究テーマ》GC/MS, LC/MSを用いた食品分析。
E-mail : kyamashita@saika.or.jp

会社ホームページ URL :

<https://www.saika.or.jp/allergen/index.html>

関連製品ページ URL :

https://www.kanto.co.jp/dcms_media/other/REA-18.pdf