

Application News

No. C160

LC/MS

高感度 LC/MS/MS による 食品中アレルゲンの一斉分析

食物アレルギーは食品中の特定のタンパク質に対する過剰な免疫応答によって引き起こされることが知られており、公衆衛生および食品産業における喫緊の課題になっています。アレルゲン（アレルギー物質）との予期せぬ接触を防ぐために、食品に含まれるアレルゲンについてはラベルに表示することが厳密に定められています。米国では食品医薬品局（FDA）が食品アレルゲン表示および消費者保護法（Food Allergen Labeling and Consumer Protection Act, FALCPA）に基づき、主要なアレルゲンとして牛乳、卵、魚類（例：スズキ、ヒラメ、タラ）、甲殻類（例：カニ、ロブスター、エビ）、ナッツ類（例：アーモンド、ピーカンナッツ、クルミ）、ピーナッツ、小麦、および大豆の8品目を特定し、これら主要なアレルゲンの存在を食品のラベルに表示する事を義務付けました。

現在、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) や PCR (Polymerase chain reaction) が検出方法として広く用いられており、これらは比較的簡便な操作によってアレルギー性食品原材料を検出することができます。その一方で、ELISA は交差反応により類似物質を擬陽性として誤検出するリスクが知られています。さらに、ELISA を用いた一斉分析は限定的であり、幅広い食品原材料を検査対象とする場合は異なる測定キットで複数回に分けて測定する必要があります。また、PCR はタンパク質ではなく DNA を検出する手法であるため、牛乳と牛肉を区別することは難しく、また DNA を含まない卵の白身を検出することも困難です。これらの理由により、より確度の高い方法を用いてアレルゲン分析を行うことの重要性が高まっています。

近年、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC/MS) を用いた方法が、その高い選択性と感度、複数のアレルゲンに対する一斉分析の可能性から食品アレルゲンの新たな測定法とし

て注目を集めています。本報では LC/MS/MS を用いた8つの主要アレルゲン由来のペプチドを検出する一斉分析方法の開発と市販の加工済み食品を用いた評価についてご紹介いたします。

T. Ogura

■ 前処理

アレルゲンを含む各食品を食料品店で購入し、分析手法の検討に用いる試料としました。それぞれの試料をグラインダー (GM-200, Retsch) にて粉碎したのち、0.5 - 1 g を 50 mL チューブに秤量しました。食品由来の油脂を取り除くためにヘキサンで洗浄した後、50 mM Tris-HCl (pH8.0)、2 M 尿素、プロテアーゼインヒビターを含む抽出溶液でタンパク質を抽出しました。タンパク質 100 - 250 μg を含む抽出溶液を還元アルキル化処理後に、トリプシンを用いて酵素消化を行いました。消化済みペプチド試料は SPE により脱塩し、凍結乾燥した後に保存しました。

■ LC/MS/MS によるアレルゲン性タンパク質の検出

分析条件の検討では、ピークの強度や形状および他のペプチドとの相溶性などを考慮し、Skyline を用いて MRM トランジションの選択を行いました (図 1)。その結果、表 1 に示した 8 つのアレルギー性食品に含まれる 13 のタンパク質を対象とし、最終的にこれらに由来する 29 ペプチドを測定するための 140 トランジションを選択しました。図 2 に示すように、全てのペプチドは 6.5 分以内に溶出し、良好なピーク形状および分離パターンを示しました。図 2 には併せて代表的なペプチドの直線性についても示しました。

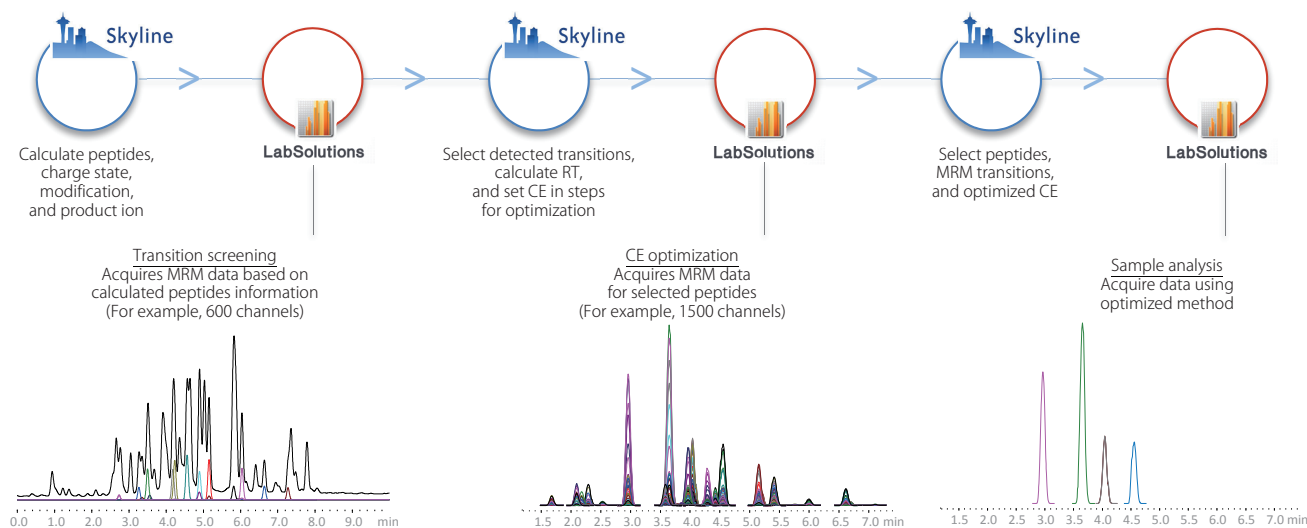


図 1 Skyline を用いた MRM トランジション最適化ワークフロー

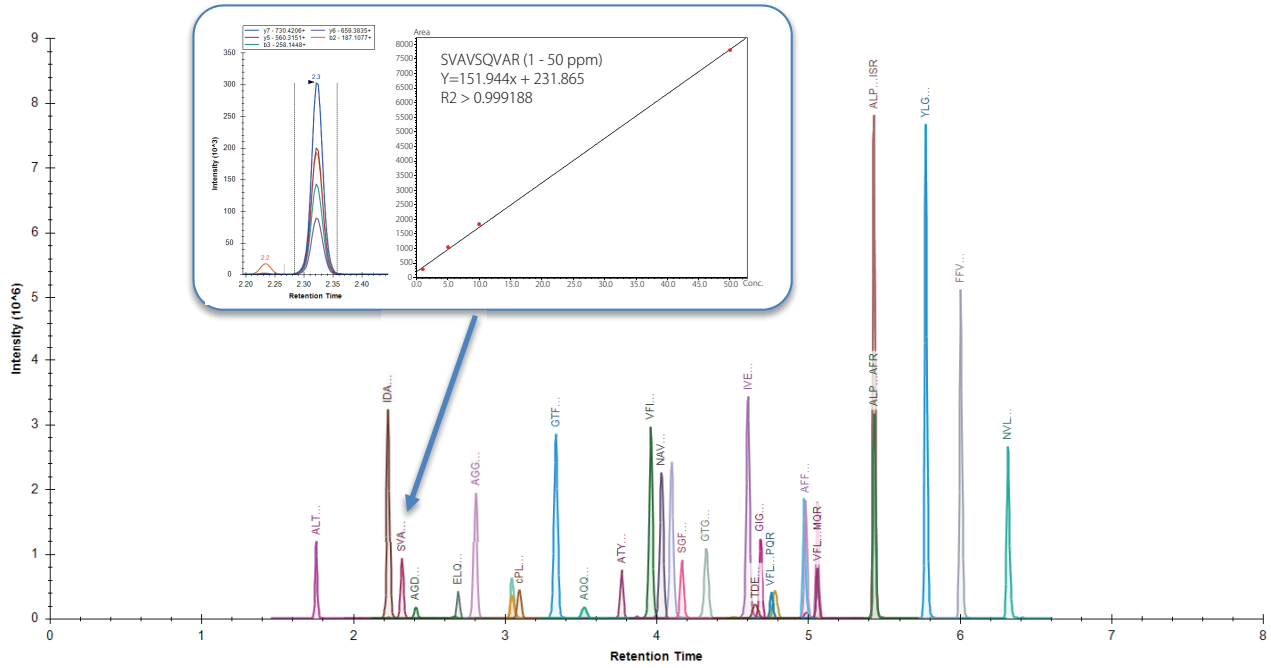


図2 8種類のアレルギー性食品に由来するペプチド混合物のクロマトグラム、小麦由来ペプチドの拡大クロマトグラムおよびその検量線

表1 測定対象とした食品原材料、タンパク質の名称、ペプチド配列、および UniProt ID

Food (Binomial name)	Protein name (UIS name)	Peptides	Uniprot ID
Milk (<i>Bos taurus</i>)	Caseins (Bos d 8)	FFVAPFPEVFGK	P02662, B5B3R8
		YLGYLEQLLR	P02662, B5B3R8
		NAVPIPTPLNR	P02662, B5B3R8
	Beta-lactoglobulin (Bos d 5)	FALPQYLK	P02663
	Beta-lactoglobulin (Bos d 5)	IDALNENK	P02754, G5E5H7, B5B0D4
Egg (<i>Gallus gallus</i>)	Ovalbumin (Gal d 2)	NVLQPSSVDSQTAMVLVNAIVFK	P01012
	Ovotransferrin (Gal d 3)	ATYLDCIK	P02789, Q4ADJ7, Q4ADJ6, E1BQC2, Q4ADG4, A0A1D5P4L7
	Ovotransferrin (Gal d 3)	TDERPASVFAVAVAR	P02789, Q4ADJ7, Q4ADJ6, E1BQC2, Q4ADG4, A0A1D5P4L7, A0A1L1RSU6
Fish (<i>Gadus morhua</i>)	Beta-parvalbumin (Gad m 1)	ALTDAAETK	P02622, A5I873, Q90YL0
		AFFVIDQDK	Q90YL0, A5I873
		SGFIEEDELK	Q90YL0, A5I873
Crustacean shellfish (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Tropomyosin (Lit v 1)	IQLLEEDLER	B4YAH6
	Tropomyosin (Lit v 1)	IVELEELR	B4YAH6
	Myosin, light chain 2 (Lit v 3)	EGFQLMDR	B7SN13
	Myosin, light chain 2 (Lit v 3)	GTFDEIGR	B7SN13
Crustacean shellfish (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Lit v 4)	VFIANQFK	C7A639
		AGGLTLER	C7A639
Tree nuts (<i>Prunus dulcis</i>)	Amandin, 11S globulin legumin-like protein (Pru du 6)	ALPDEVLANAYQISR	E3SH28, Q43607
		ALPDEVLQNAFR	E3SH29
Peanuts (<i>Arachis hypogaea</i>)	Cupin Vicillin-type, 7S globulin (Ara h 1)	NNPFYFPSR	P43237, P43238, E5G076, B3IXL2, N1NG13, Q6PSU3
		GTGNLELVAVR	P43237, P43238, B3IXL2, Q6PSU6, Q6PSU3, N1NG13, Q6PSU5, E5G076, Q6PSU4
Wheat (<i>Triticum aestivum</i>)	High molecular weight glutenin (Tri a 26)	ELQELQER	P10388, P08489 and 22 others in wheat
		SVAVSQVAR	P10387, P08488, and 21 others in wheat
		AQQPATQLPTVCR	P10387, P08488, and 21 others in wheat
	Low molecular weight glutenin GluB3-23 (Tri a 36)	VFLQQQCIPVAMQR	P10385 and 71 others in wheat
VFLQQQCSPVAMPQR		P10386, P04729, P04730 and 114 others in wheat	
Soybeans (<i>Glycine max</i>)	Trypsin inhibitor (Gly m TI)	CPLTVQSR	P01070, P01071, P25272 and 13 others
		NKPLVWFQK	P01070, P01071, P25272 and 8 others
		NKPLVVEFQK	P25273

■加工済み食品に含まれるアレルゲン

市販の食品試料から得られたクロマトグラムを図3に示しました。食品試料にはアレルギー性食品原材料8種の混合試料(図3(a))と、7種の加工済み食品(図3(b)-(h))を用いました。表2に7種の加工済み食品についてラベル表示と測定結果の比較を示しました。大豆のラベル表示があったいくつかの加工済み食品についてアレルゲンが不検出となった点を除き、市販の加工済み食品においてもアレルゲンを正しく検出できることが示されました。

■グルテンフリー食品

この測定手法の妥当性を確認するため、グルテンフリー食品を用いた添加試験を実施しました。米国FDAは「グルテンフリー」と表示するための基準としてグルテン含有率が20 ppm未満であることと定めています。そこで、グルテンフリー表示のパンに10 ppm相当となるように小麦抽出液を添加し、非添加の試料と測定結果を比較しました(図4)。非添加のグルテンフリー表示のパンからはアレルゲンに該当するペプチドが検出されない一方、小麦抽出液を添加した試料では明確に検出されており、本測定手法は低濃度のアレルゲン検出にも適用できることが確認されました。

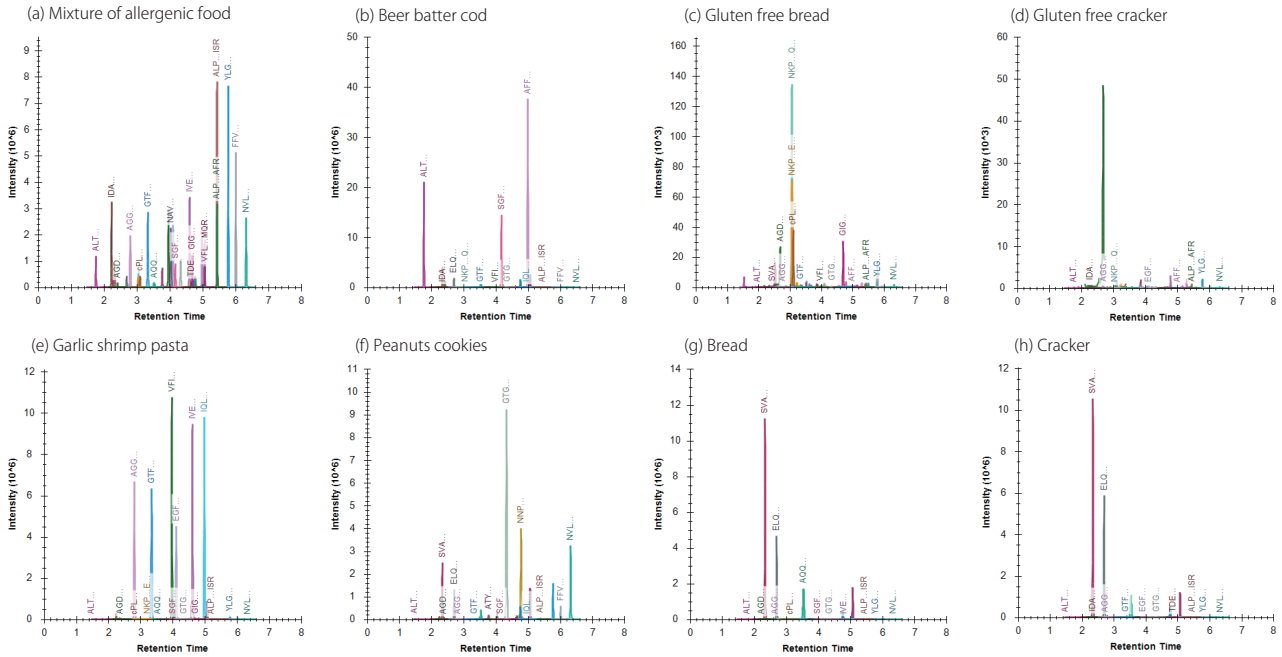


図3 アレルギー性食品原材料の混合試料 (a) および7種類の加工済み食品 (b) - (h) の測定結果

表2 7種の加工済み食品のアレルゲン表示および測定結果

Food	Allergens	Gluten free bread		Gluten free cracker		Bread		Cracker		Peanuts cookies		Frozen fish "fried cod"		Frozen pasta "garlic shrimp"	
		Label	Detect	Label	Detect	Label	Detect	Label	Detect	Label	Detect	Label	Detect	Label	Detect
Milk	Caseins (Bos d 8) Beta-lactoglobulin (Bos d 5)			x	x					-	x	x	x	x	x
Egg	Ovalbumin (Gal d 2) Ovotransferrin (Gal d 3)			x	x	x	x			-	x				
Atlantic cod	Beta-parvalbumin (Gad m 1)									-		x	x		
Whiteleg shrimp	Tropomyosin (Lit v 1) Myosin, light chain 2 (Lit v 3) Sarcoplasmic CBP (Lit v 4)									-				x ¹	x
Almonds	Amandin (Pru du 6)									-					x
Peanuts	Cupin, vicillin-type, 7S globulin (Ara h 1)			x						-	x				
Wheat	High molecular weight glutenin (Tri a 26) Low molecular weight glutenin (Tri a 36)					x	x	x	x	-	x	x	x	x	x
Soybeans	Trypsin inhibitor (Gly m TI)	x	x	x				x		-					x

¹Labeled as "Crustacean shellfish (Shrimp)"

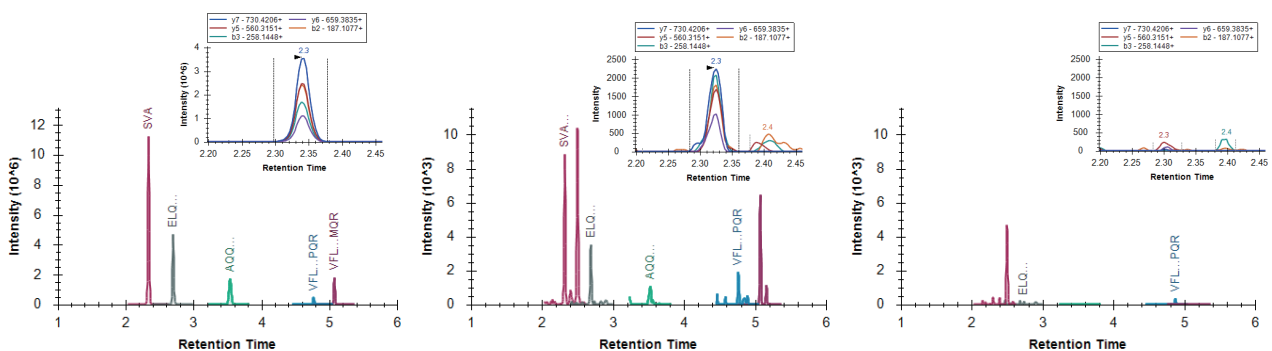


図4 通常のパン (左)、小麦抽出液 10 ppm を添加したグルテンフリー表示のパン (中央) およびグルテンフリー表示のパン (右) のクロマトグラム

■ そのほかの原材料との同索性

本測定手法の開発では、他の原材料との同索性について留意して検出するペプチドを選択しました。測定対象となる各タンパク質のトリプシン断片後のアミノ酸配列をUniProtデータベースを用いて検索した結果、グルテン関連タンパク質は穀物において一般的であることから、一部のペプチド配列は小麦以外の穀物にも広く保存されていることが判明しました（表3）。小麦と他の穀物の誤同定を防ぐため、小麦由来アレルゲンの検出には大麦やライ麦などに含まれないペプチドを用いることとしました。一方で、これらのペプチドはゴートグラス（goat grass）などにも含まれることが判明しています。

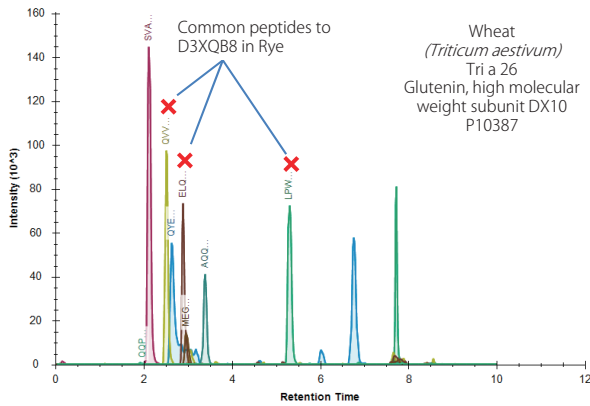


図5 小麦粉に由来するペプチドのクロマトグラム

■ 結論

- ◆ LC/MS/MS を用いて主要な食品アレルゲンを検出する分析手法を開発しました。
- ◆ 8種類の食品に含まれる13種のアレルギー性タンパク質について、計29ペプチド（140MRM トランジション）を対象とした一斉分析を行いました。
- ◆ 本分析手法では市販の加工済み食品に含まれるアレルゲンについても正しく検出することができました。

表3 予想されたペプチド配列の検索結果

Analyzed wheat peptides (P10387)	Positions	Barley	Rye
AQQPATQLPTVCR	624-636		
ELQESSLEACR	33-43	×	×
LPWSTGLQMR	54-63	×	×
MEGGDALSASQ	637-647		×
QGSYYPGQASPPQPGQGQPGK	135-156		×
QQPGQGQHPEQGGK	469-481		×
QVDQQLAGR	44-53		×
QYEQTWPPK	86-95		
SVAVSQVAR	75-85		

×: found, blank: not found

表4 LC/MS 分析条件

System	: Nexera X2 + LCMS-8050		
Column	: Shimadzu Shim-pack XR-ODS III (75 mmL × 2.0 mmI.D., 1.6 μm)		
Mobile Phase	: A 0.1% Formic acid - Water, B Acetonitrile		
Flow Rate	: 0.5 mL/min		
Time program	: B Conc. 2% (0 min) - 15% (4 min) - 40% (7 min) - 95% (7.1 - 8 min) - 2% (9.1 - 10 min)		
Ionization	: ESI-positive mode		
DL Temp.	: 150 °C	Block Heater Temp.	: 200 °C
Interface Temp.	: 250 °C	Heating Gas Flow	: 20 L/min
Neb. Gas Flow	: 3 L/min	Drying Gas Flow	: 5 L/min