

# トリプル四重極型質量分析計を用いた食品中アレルゲン分析

前島 希<sup>1)</sup>、冨上 香澄<sup>2)</sup>、稲垣 江梨<sup>2)</sup>、小林まなみ<sup>1)</sup> 1) (株) 島津製作所: 2) (一財) 雑賀技術研究所

## 1. はじめに

食物アレルギーは食品中の特定のタンパク質 (アレルゲン) に対する過剰な免疫反応によって引き起こされ、時には重篤な症状を呈する場合がある。食物アレルギーによる健康被害を防ぐため、食品表示について各国において厳格に定められている。日本では過去の健康被害の程度・頻度を考慮し、容器包装された加工食品について、特定原材料8品目では表示義務が、特定原材料に準ずるもの20品目については表示が推奨されている1)。

近年、様々なメリットからアレルゲンをLC-MS/MSで分析する手法が注目を集めている。本発表では、LC-MS/MSを用いて加工食品中の特定原材料8品目と準ずるもの9品目を一斉分析した。Skylineを用いて新たにナッツ類4種、フルーツ5種に特異的なペプチドの選定およびMRMトランジションの作成を行った。また、食品中アレルゲン分析に最適化された抽出試薬および標準物質を用いて検量線を作成した。

## 2. 方法と結果

2-1. 準ずるもののMRMトランジション開発

標準物質としてくるみ、アーモンド、カシューナッツ、マカダミアナッツ、バナナ、キウイフルーツ、オレンジ、モモ、リンゴの食物由来アレルゲン抽出物(雑賀技術研究所、図1)を使用した。標準物質はS-Trap (ProtiFi社製) とトリプシンを用いてペプチド断片に消化した。

定性のためのLC-MS/MS分析には、超高速液体クロマトグラフNexera™ X3 UHPLCと四重極飛行時間型量分析計LCMS™-9030を組み合わせたシステムを使用し、DDAモードでデータ採取を行った。解析にはSkylineを用い、アルゴリズムには高精度なペプチド同定が可能なMS Amandaを使用した。

原材料由来タンパク質のアミノ酸配列情報はthe Allergen Nomenclature database (www.allergen.org) およびUniProt (reviewed) から入手した。得られたMRMトランジション候補は、トリプル四重極質量分析計を用いてMRM最適化を行い、感度の良さ、特異性の高さ、イオン化の安定性から選別を行った。ワークフローを図2に示す。

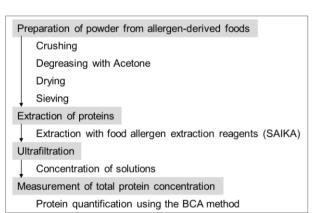


図1 アレルゲン分析用標準物質の調製方法の例

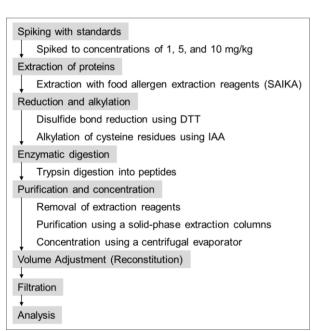


図3 加工食品中食物アレルゲン 分析の前処理

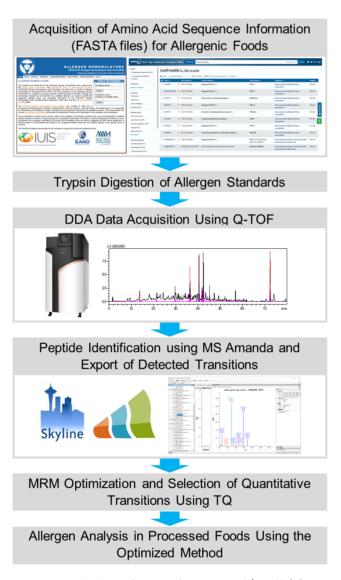


図2 Skylineを用いたアレルゲン分析 用MRMトランジションの作成方法

### 2-2. MRMトランジションの特異性の検証

食物アレルゲン分析を行ううえで偽陽性の検出を避けるために、使用するメソッドが各品目について特異性が高いことが重要である。そこで、目的原材料の検出に使用するトランジションで他の原材料を分析した際に検出される偽陽性の有無を調べた。

食品中アレルゲンを分析する際と同様の手法 (図3) で標準物質のみを個別に前処理した。食品中に原材料由来タンパク質が500 mg/kg含まれる場合と同等の終濃度になるサンプルを1品目ずつ調製し、LC-MS/MS分析を行った。

4種類のナッツと5種類の果物について新たに開発したトランジションの結果を表1に示す。観測された偽陽性ピーク強度は、対象食品のピーク面積に対して+  $(0.1\sim1\%)$ 、+++  $(1\sim5\%)$ 、+++  $(5\sim10\%)$ 、++++ (10%)以上)の4段階評価とした。偽陽性ピークがなく、検量線の直線性が良好なペプチドは "Good"、偽陽性ピークがわずかに認められるペプチドは "Acceptable"、偽陽性ピークが顕著であるか、検量線の直線性が悪いペプチドは "Unacceptable" と評価した。オレンジを除くすべての食品について、良好な直線性と特異性を備えたトランジションを開発することに成功した。

#### 2-3. 加工食品中の食物アレルゲン分析

アレルゲンフリーの加工食品としてチキンライスをサンプルとし、それぞれ1、5、10 mg/kgとなるようアレルゲンの標準物質を添加し、図3に示す前処理をn=2で行った。抽出にはLC-MS/MS法に適した食物アレルゲン抽出試薬(雑賀技術研究所製)を用いた。LC-MS/MS分析を行い、バックグラウンドと検量線の直線性を確認した。アレルゲンの標準物質としては、特定原材料8品目(牛乳、卵、小麦、ソバ、えび、かに、くるみ、ピーナッツ)と準ずるもの9品目(大豆、アーモンド、カシューナッツ、マカダミアナッツ、バナナ、キウイ、オレンジ、モモ、リンゴ)の計17品目の食物由来アレルゲン抽出物を添加した。えびとかには合わせて甲殻類とした標準物質を使用した。定量分析はトリプル四重極質量分析計LCMS-8060RXと超高速液体クロマトグラフNexera X3 UHPLCシステムを組み合わせて行った。

すべての食物アレルゲンで1 mg/kgから良好な検量線を作成できることを確認した。 図4は、ナッツと果物を添加した加工食品の前処理済みサンプルのMSクロマトグラム と検量線を示す。

## 3. 結果とまとめ

- ・4種類のナッツと5種類の果物について新たにMRMトランジションを開発し、オレンジを除く8品目で特異性の高い条件を構築できた。
- ・加工食品に標準物質を添加し、検量線を作成したところ、17品目で1 mg/kgから良好な直線性のある検量線を作成できた。

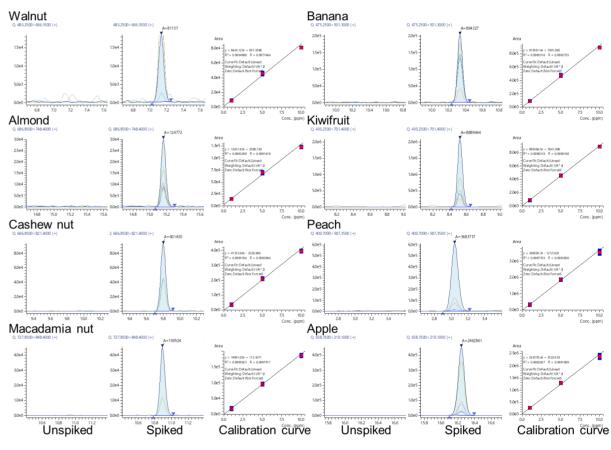


図4 未添加試料と10 mg/kg添加試料のMSクロマトグラムおよび検量線

表1 作成したMRMトランジションの特異性の検証 (\*は直線性が良好ではないペプチドを示す)

Food	Peptide sequence	Rating	Milk	Buckwheat	Wheat	Peanut	Crustaceans	Soybeans	Egg	Walnut	Pecan	Almond	Cashew	Macadamia	Banana	Green Kiwi	Gold Kiwi	Orange	Peach	Apple
Walnut	SPDQSYLR	Good																		
	DLPNECGISSQR	Unacceptable	++				+				+		+				+			
	LVALEPSNR	Unacceptable					++													
	ATLTLVSQETR	Acceptable																+		
Almond	ADFYNPQGGR	Acceptable	+						+								+			
	ALPDEVLQNAFR	Good																		
	TEENAFINTLAGR	Acceptable																		+
	VTGINALR	Unacceptable		++	+								+	++	+++		++	++	+++	++
Cashew nut	ADIYTPEVGR	Unacceptable	+							+				++						
	ELYETASELPR	Good																		
	GQVQVVDNFGNR	Good																		
	IDYPPLEK	Acceptable			+	+		+										+		
	WLQLSVEK	Acceptable									+									
Macadamia nut	EGVIIR	Unacceptable								++++	++++									
	EILEAALNTQTER	Good																		
	ESYNLECGDVIR	Good																		
	FLQTISTPGQYK	Acceptable									+									
	GPYNLFNK	Good																		
	QSDNPYYFDER	Good																		
Banana	ATFEIVNR	Good																		
	NSNIQVLLDVPR	Unacceptable	+				+	+	+					+					++	
	CSYTVWAAAVPGGGR	Unacceptable*																		
	TGCSFDGSGR	Good																		
Kiwifruit	WDECDSR	Good																		
	IVALSTGWYNGGSR	Acceptable											+							
	SAGAVVDIK	Good																		
Orange	DECPCYR	Unacceptable		++			++							++	++				++++	++++
	AATEAIK	Unacceptable	+		++	++++	+	+++	+			++	+++	++++			+		++	++
	NVVDGSTTFK	Unacceptable			++++		+++		++								++			
Peach	NVNNLAR	Good																		
	IAPQAIK	Unacceptable			+	+						+								++++
	AFVLDADNLVPK	Acceptable										+								
Apple	IAPQAVK	Unacceptable																	++	
	TINGLAR	Good																		
	LVASGSGSIIK	Good																		
	VCPAPLQVK	Unacceptable	+		++	+	+	+		+	+		+	+			+		++	
	ILTDYIK or LIESYLK	Good																		
	AFVLDADNLIPK	Good																		