

ニッポンハム食の未来財団 2022 年度個人研究助成 研究完了報告書

研究課題名	加工食品の輸出拡大を目指したコーデックス指定アレルゲンならびにアレルゲン様化学物質の網羅的検出法の基盤的検討
フリガナ	ナカムラ コウスケ
代表者名	中村 公亮
所属機関 (機関名) (役職名)	国立医薬品食品衛生研究所 食品部第五室 室長
本助成金による 発表論文, 学会発表	【発表論文】 なし 【学会発表】 鳥井昭良、関友輔、三浦雄也、有本千里、石田悦基、伊藤里恵、飯島賢、 樺山浩、菅野洋平、中村公亮：LC-MS/MS を用いた特定原材料 8 品目および 亜硫酸塩類同時分析法の開発、日本食品衛生学会第 119 回学術講演会

研究結果要約

近年、食物アレルギーの発症の報告は世界的に増加傾向にある。発症の抑制には、食品への「アレルギー表示」が有効な方法の一つである。しかしながら、アレルギー表示対象の食品は国や地域で異なっており、食品の国際貿易という観点から、食物アレルギー対応食品を保証できるようなアレルゲンを網羅して検知する有用な方法は示されていないことが問題となっている。そこで本研究では、食品の食物アレルギー表示の適正さを確認するための分析法として、液体クロマトグラフ質量分析計 LC-MS/MS を用いた亜硫酸塩類の誘導体化物とアレルゲンタンパク質由来のペプチドを同時に検出する方法を開発した。本研究より、第 3 級アミノ基とオクタデシル基を有するカラムを使用し、移動相にギ酸を含む水/アセトニトリルを用いてグラジエント溶出を行うことで、ヒドロキシメタンスルホン酸および特定原材料 8 品目（小麦、そば、乳、卵、甲殻類[えび・かに]、落花生、くるみ）の指標ペプチドの同時分析が可能であることが示唆された。すなわち、添加回収試験では回収率、併行精度、室内再現精度はいずれも良好な結果が得られ、また 10 種類の市販加工食品の測定において各原材料表示と本分析法により検出結果が一致したことから、本研究で開発した方法は、食品に含まれる亜硫酸塩類およびアレルゲンタンパク質の同時検出が可能であることが示唆された。

研究目的

近年、食物アレルギーの発症の報告は世界的に増加傾向にある¹⁾。発症の抑制には、食品への「アレルギー表示」が有効な方法の一つである²⁾。しかしながら、アレルギー表示対象の食品は国や地域で異なっており、食品の国際貿易という観点から、食物アレルギー対応食品を保証できるようなアレルギーゲンを網羅して検知する有用な方法は示されていないことが問題となっている。

わが国においては、令和2年4月1日に「農林水産物及び食品の輸出の促進に関する新しい法律」が施行し、関係省庁間や、国と都道府県が一体となった日本産食品の輸出拡大の強化が進められている。日本産食品の輸出の際には、海外の消費者から求められる「安全性の高い、高品質な食品」の要求に対応する必要がある。そのためには、食品中のアレルギーゲンを高精度で検出し、高いクオリティを保証する方法も求められる。

国際的な食品規格をつくるコーデックス委員会 (CODEX) は、アレルギー反応を引き起こす食品及びその原料についての症例報告を元に、7種類の食品群と亜硫酸塩類 (亜硫酸塩、次亜硫酸塩、二酸化硫黄、ピロ亜硫酸塩等の食品添加物) をアレルギー表示の推奨とした (CODEX STAN 1-1985)。亜硫酸塩類は、食品の褐色化の抑止、抗酸化、生地改良等を目的に、冷凍エビ、冷凍海鮮食品、ジュース、ドライフルーツ、クッキー、クラッカーなど様々な食品に世界中で利用されている。しかし、一部のヒトに「アレルギー様」症状を引き起こすことが報告されて以降、FAO/WHO の判断によりアレルギー表示の推奨リストに加えられた。わが国においては、亜硫酸塩類はアレルギー表示の対象となっていないが、多くの国では対象となっている。海外へ食品を輸出する際には、その国や地域のニーズに合致した科学的エビデンスに基づいたアレルギー対応食品にする必要がある。そのためには、輸出先国から求められているアレルギー対応食品には各種アレルギーゲンを検出する方法が求められるが、現時点で有用な方法は示されていない。

亜硫酸塩類は化学物質であることから、タンパク質の検知に有用である抗原抗体反応を利用した手法 (ELISA、ラテラルフロー、ウェスタンブロット) や、DNA の配列を検知するような PCR やリアルタイム PCR を用いた手法は適用できない。一方、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) 法は、亜硫酸塩類などの低分子化学物質ならびにペプチドの質量と電荷数の比 (m/z) とイオンの相

対存在量を検出するマススペクトルから、各アレルゲンの定性・定量的な同時検出が可能である。本研究では、CODEX で定められたアレルゲンである食品ならびに亜硫酸塩類を LC-MS/MS 法を用いて一斉に検出する再現性の高い方法を開発することを目的とする。

研究計画及び研究手法

測定に用いた試料

小麦 (No.1 Canada Western [カナダ産]、Hard Red Winter [アメリカ産]、Western White [アメリカ産]、Australian Standard White [オーストラリア産]、春よ恋 [日本産]、きたほなみ [日本産]、シロガネ [日本産]) は日清製粉(株)より、そば (北早生 [日本産]、北海 No.3 [日本産]、Jikuri [ロシア産]、Mankan [中国産]、野生種 [中国産]) は農研機構 遺伝資源研究センターより提供いただいたものを試験に供した。牛乳 (日本産)、鶏卵 (日本産)、えび (ウシエビ [タイ産]、バナメイエビ [ベトナム産]、アルゼンチンアカエビ [アルゼンチン産])、かに (ベニズワイガニ [日本産])、落花生 (千葉半立種 [日本産])、くるみ (チャンドラー種 [アメリカ産])、市販食品 10 種 (冷凍エビ 2 種、たこ焼粉、天ぷら粉、唐揚げ粉、乾そば、レトルトパスタソース 2 種、即席めん 2 種) は埼玉県内の量販店で購入したものを試験に供した。

使用した試薬

TPCK 処理済みウシ膵臓由来トリプシン (T1426)、ヨードアセトアミド (BioUltra グレード)、ジチオスレイトール (分子生物学用)、34S 標識亜硫酸ナトリウム (純度 95%以上) はシグマアルドリッチ製のものをを用いた。2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール塩酸塩 (生化学用)、尿素 (生化学用)、炭酸水素アンモニウム (分子生物学用)、ギ酸 (LC-MS グレード)、酢酸 (LC-MS グレード)、アセトニトリル (特級および HPLC グレード)、亜硫酸ナトリウム (特級、純度 97%以上) は富士フイルム和光純薬製のものをを使用した。メタノール (特級)、トリフルオロ酢酸 (特級)、酢酸アンモニウム (特級)、ホルムアルデヒド溶液 (特級) は、純正化学製のものをを使用した。水は超純水製造装置 (Milli-Q IQ 7000, メルク社製) で精製したものをを使用した。

アレルギータンパク質の指標ペプチドの選定

各特定原材料（小麦、そば、乳、卵、えび・かに[甲殻類]、落花生、くるみ）に含まれるアレルギータンパク質の情報を ALLERGEN NOMENCLATURE および Allergome のデータベースから入手し、UniProt から各タンパク質のアミノ酸配列情報を入手した。得られた配列情報を元に、プロテオーム解析ソフトウェアの Skyline を使用し、各タンパク質からトリプシン消化によって生成されるペプチドの候補およびそれらの MRM トランジション条件を得た。その後、各特定原材料を用いて個別に測定を行い、候補ペプチドおよび MRM トランジションの中から、感度とピーク形状および保持時間が良好なものを選定した。

LC-MS/MS 分析用試料の調製①（アレルギータンパク質由来ペプチド）

ラボミルサー（IFM-620DG、IWATANI 製）にて粉碎した試料 1.0 g に 4 M 尿素および 0.1 M DTT を含む 0.1 M トリス-塩酸緩衝液（pH 8.2）を 10 mL 加えてウォーターバス（Personal-11SD、TAITEC 製）で 37°C、1 時間振とう後、遠心分離（2,000×g、5 分、15°C）を行った。遠心分離後の上清をタンパク質抽出液とし、抽出液 1 mL に 50 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液 4 mL および 4%（w/v）ヨードアセトアミド溶液 200 μL を加えて 37°C で 30 分間振とうして遊離チオール基のアルキル化を行った。さらに、1%（w/v）ウシ脾臓由来トリプシン溶液 100 μL を加えて 37°C で 4 時間振とうしてタンパク質の消化を行った後、トリフルオロ酢酸 50 μL を加えて酵素反応を停止させた。その後、遠心分離（2,000×g、5 分、15°C）を行い、メタノール 5 mL および水 5 mL でコンディショニングした固相抽出カラム（OASIS HLB, Waters 製）に上清を全量負荷した。0.5%（v/v）トリフルオロ酢酸水溶液 8 mL にて洗浄した後、70%（v/v）アセトニトリル 6 mL で溶出を行い、脱塩・精製を行った。精製後の溶液を、ロータリーエバポレーター（NVC-2100、東京理化工機製）を用いて乾固させ、0.1%（v/v）ギ酸含有 5%（v/v）アセトニトリル水溶液 0.5 mL に再溶解したものを後述の亜硫酸塩類分析用溶液と体積比 1：1 の割合で混合後、ポリプロピレン製 HPLC 用低吸着バイアル（ジーエルサイエンス製）に分注し、LC-MS/MS 測定に供試した。

LC-MS/MS 分析法試料の調製② (亜硫酸塩類)

ラボミルサー (IFM-620DG、IWATANI 製) で粉碎した試料 1.0 g に 0.2% (v/v) ホルムアルデヒド含有 5 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.5) を 9.8 mL および内部標準として 100 µg/mL の 34S 標識亜硫酸ナトリウム溶液を 200 µL 加えて室温で 60 分間振とう後、遠心分離 (2,000×g、5 分、15°C) を行った。遠心分離後の上清 2 mL をねじ口ガラス試験管に採取して密封した後、80°C のブロックヒーター (DTU-1C、TAITEC 製) にて 30 分間加熱を行い、亜硫酸塩類をヒドロキシメタンスルホン酸 (HMS) へ誘導体化を行った。加熱後の抽出液を室温で放冷した後、100 µL を採取して 0.2% (v/v) ホルムアルデヒド含有 5 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.5) を 4.9 mL 加えて希釈した。この溶液を前述のアレルゲンタンパク質由来ペプチド分析用溶液と体積比 1:1 の割合で混合後、ポリプロピレン製 HPLC 用低吸着バイアルに分注し、LC-MS/MS 測定に供試した。

LC-MS/MS の測定条件

HPLC は Nexera X2 (島津製作所製)、タンデム四重極型質量分析計は LCMS-8060 (島津製作所製) を使用した。分析用カラムには InertSustain AX-C18 メタルフリーカラム (内径 2.1 mm × 長さ 150 mm、粒子径 3 µm、ジューエルサイエンス製)、Atlantis Premier BEH C18 AX (内径 2.1 mm × 長さ 150 mm、粒子径 2.5 µm、Waters 製)、bioZen Peptide PS-C18 (内径 2.1 mm × 長さ 150 mm、粒子径 3 µm、Phenomenex 製)、Acclaim Mixed Mode WAX-1 LC カラム (内径 2.1 mm × 長さ 150 mm、粒子径 3 µm、Thermo Fisher Scientific 製)、Scherso SM-C18 MF (内径 2.0 mm × 長さ 150 mm、粒子径 3 µm、Imtakt 製) を用いて検討を行った。移動相には 0.1% (v/v) ギ酸を含む水およびアセトニトリルを使用してグラジエント条件を検討した。カラムオーブン温度は 50°C、移動相流速は 0.3 mL/min に設定し、注入量は 10 µL とした。オートサンプラーの洗浄液は 0.1% (v/v) ギ酸を含む 50% (v/v) アセトニトリル水溶液を用いた。イオン化はエレクトロスプレー法 (ESI) で行い、多重反応モニタリング (MRM) モードにて測定を行った。

ペプチドの測定はポジティブモード、亜硫酸塩類誘導体（HMS）の測定はネガティブモードで行い、極性を切り替えながら同時測定を行った。質量分析計のネブライザーガス流量は 3.0 L/min、ドライイングガス流量は 10.0 L/min、ヒーティングガス流量は 10.0 L/min、インターフェイス温度は 300°C、脱溶媒温度は 526°C、DL 温度は 250°C、ヒートブロック温度は 400°C、コンバージョンダイノード電圧は 10.0 kV、CID ガス圧力は 270 kPa、インターフェイス電圧は-1.0 kV（ポジティブモード）および 1.0 kV（ネガティブモード）、ループタイムは 1.0 秒（Dwell Time は自動）にそれぞれ設定した。

分析法の妥当性確認

分析法の妥当性を確認するため、原材料に特定原材料 8 品目および亜硫酸塩類を含まない加工食品 2 種（カレールーおよび、コーンスープ）に、各特定原材料（小麦、そば、乳、卵、えび、落花生、くるみ）から抽出したタンパク質および亜硫酸ナトリウムを試料中濃度で 10 µg/g となるよう添加（亜硫酸ナトリウムは二酸化硫黄に換算した濃度）して、それぞれ n=5×2 日間測定を行い、回収率、併行精度、室内再現精度を算出した。各特定原材料から抽出したタンパク質（トリプシン消化前）の濃度は、Pierce 660 nm Protein Assay kit（Thermo Fisher Scientific 製）を用いて測定した。既知濃度の抽出タンパク質溶液を用いて前述の方法でトリプシン消化、精製、濃縮を行い、タンパク質濃度として 0.1~20 µg/mL の濃度範囲で検量線を作成して絶対検量線法により定量を行った。亜硫酸塩類は、内部標準物質として 34S 標識亜硫酸ナトリウムを測定溶液中濃度で 20 ng/mL になるよう亜硫酸ナトリウム（32S）溶液（0.5~50 ng/mL）に添加し、内部標準法により定量を行った。亜硫酸ナトリウムから二酸化硫黄への濃度換算は 64（二酸化硫黄の分子量）/126（亜硫酸ナトリウムの分子量）を乗ずることで算出した。

分析法の適用性確認

分析法の適用性を確認するため、10 種類の市販食品を用いて測定を行い、特定原材料 8 品目および亜硫酸塩類の原材料表示と、本分析法による各原材料の検出結果の一致性を確認した。

結果と考察

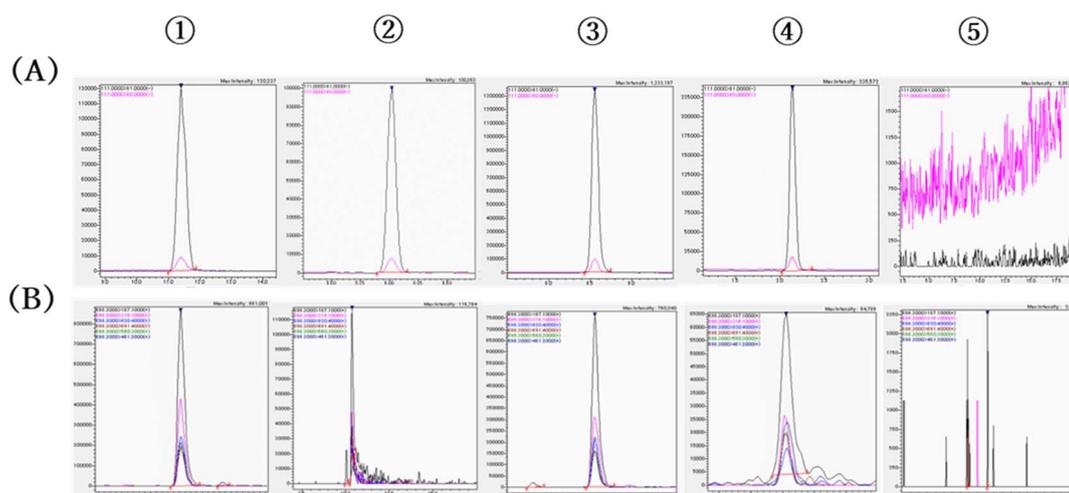
アレルギータンパク検出用指標ペプチドの選定

小麦、そば、乳、卵、えび（甲殻類）、落花生、くるみ由来のアレルギータンパク質の情報を ALLERGEN NOMENCLATURE および Allergome から入手し、小麦は高分子量グルテニンサブユニット（Tri a 26）、低分子量グルテニンサブユニット（Tri a 36）、 γ -グリアジン（Tri a 20）を、そばは 13S グロブリン（Fag e 1）を、乳は α -S1-カゼイン（Bos d 9）、 α -S2-カゼイン（Bos d 10）、 β -ラクトグロブリン（Bos d 5）を、卵はオボアルブミン（Gal d 2）、オボトランスフェリン（Gal d 3）、リゾチーム C（Gal d 4）、ビテロジェニン（Gal d 6）を、えび（甲殻類）はトロポミオシン（Pen m 1 他）を、落花生は 7S グロブリン（Ara h 1）、2S アルブミン（Ara h 2）、11S グロブリン（Ara h 3）を、くるみは 2S アルブミン（Jug r 1）、7S グロブリン（Jug r 2）をそれぞれ選択した。それぞれのアレルギータンパク質のアミノ酸配列情報を UniProt データベースから入手し、得られた配列情報を元にプロテオーム解析ソフトウェアの Skyline を用いて各タンパク質からトリプシン消化によって生成されうるペプチドの候補およびそれらの MRM トランジション条件を得た。各原材料について個別に測定を行い、候補ペプチドおよび MRM トランジション条件の中から、感度とピーク形状および保持時間が良好かつ他の原材料から検出されないペプチドを指標ペプチドとして選定した。その結果、これらの指標ペプチドの中で、感度、保持時間、ピーク形状、選択性を考慮し、各原材料由来のタンパク質定量用のペプチドとして、小麦は高分子量グルテニンサブユニット由来ペプチド SVAVSQVAR (m/z 458.9 > 730.4)、そばは 13S グロブリン由来ペプチド GFIVQAR (m/z 395.8 > 473.3)、乳は α -S1-カゼイン由来ペプチド YLGYLEQLLR (m/z 634.4 > 249.2)、卵はオボアルブミン由来ペプチド GGLEPINFQTAADQAR (m/z 844.4 > 666.3)、甲殻類はトロポミオシン由来ペプチド IVELEEEELR (m/z 565.3 > 213.2)、落花生は 7S グロブリン由来ペプチド QINQNLNLR (m/z 435.5 > 530.1)、くるみは 2S アルブミン由来ペプチド GEEMEEMVQSAR (m/z 698.3 > 316.1) をそれぞれ選択した。

亜硫酸塩類誘導体の分析条件検討および HPLC 用カラムの比較

亜硫酸塩類誘導体のヒドロキシメタンスルホン酸とタンパク質のトリプシン消化で生じるペプチドを同時に保持・溶出可能な HPLC 用カラムを選定するため、InertSustain AX-C18 (ジーエルサイエンス)、Atlantis Premier BEH C18 AX (Waters)、bioZen Peptide PS-C18 (Phenoemex)、Acclaim Mixed Mode WAX-1 (Thermo Fisher Scientific)、Scherzo SM-C18 MF (Imtakt) を用いて検討した。亜硫酸塩類の分析法について参考にした FDA の方法³⁾では、カラムに両性イオン型 HILIC カラムの ZIC-pHILIC (Merck) を使用して有機溶媒比率が高い HILIC モードでヒドロキシメタンスルホン酸を保持・溶出させているが、HILIC モードでは疎水性が高い中性ペプチドの保持が難しいと考えられ、またペプチドは移動相の pH や塩濃度によって様々な電荷状態を示して保持・溶出の予測が難しい。一方で、疎水性基のみを有する一般的な逆相系カラムでは、親水性が高い陰イオン性低分子化合物であるヒドロキシメタンスルホン酸の保持が困難であると考えられたため、疎水性基であるオクタデシル (ODS) 基と陰イオン交換基の両方の官能基を有する充填剤を使用したカラムを候補とし、移動相にギ酸含有水/アセトニトリルを使用して分析を行った。各種カラムを用いて分析した際のヒドロキシメタンスルホン酸およびくるみの 2S アルブミン由来ペプチド (GEEMEEMVQSAR) の抽出イオンクロマトグラムを図 1 に示す。

図 1. 5 種類のカラムを用いて分析した際の (A) ヒドロキシメタンスルホン酸、および、(B) くるみ 2S アルブミン由来ペプチド GEEMEEMVQSAR の抽出イオンクロマトグラム



- ① InertSustain AX-C18 (ジーエルサイエンス) , ②Scherzo SM-C18 (Imtakt) , ③Atlantis Premier BEH C18 AX (Waters) , ④bioZen Peptide PS-C18 (Phenomenex) , ⑤Acclaim Mixed Mode WAX-1 (Thermo Fisher Scientific)

ピーク強度、ピーク形状、保持時間が良好であるカラムを選定した結果、ヒドロキシメタンスルホン酸と主要な指標ペプチドをどちらも良好に保持・溶出させることができたのは InertSustain AX-C18 メタルフリーカラム（ジーエルサイエンス）と Atlantis Premier BEH C18 AX（Waters）の2つであり、その中でよりピーク強度が高かった InertSustain AX C-18 を分析用カラムに採用した。これら2種類のカラムに共通するのは、シリカゲル担体表面に第3級アミノ基と C18（オクタデシル）基がそれぞれ結合された充填剤が使用されていることである。LC-MS で使用する一般的な移動相（ギ酸、アセトニトリル等）を用いて溶出できるよう各官能基の密度が調整されていることから、0.1%ギ酸含有水/アセトニトリルを用いたグラジエントで、ヒドロキシメタンスルホン酸および各指標ペプチドの溶出を試みた。その結果、保持時間約 1.5 分～11 分の間で分離、溶出可能であることが示唆された（図 1）。なお、本検討で用いた移動相のグラジエント条件は、有機溶媒（アセトニトリル）の比率を、1%（0～3 分）⇒50%まで増加（3 分～16 分）⇒95%まで増加（16 分～17 分）⇒95%（17 分～22 分）⇒1%（22 分～30 分）と変化させた。一方、弱陽イオン交換基と弱陰イオン交換基と C18 基を有するトリプルミックスモードカラムの Scherzo SM-C18（Imtakt）ではヒドロキシメタンスルホン酸の保持・溶出は良好であったものの、一部のペプチドはピークのテーリングが著しく不適であった。また、C18 基を有しシリカゲル表面に弱い正電荷を有する bioZen Peptide PS-C18（Phenomenex）は、ヒドロキシメタンスルホン酸の保持がやや弱く（保持時間約 2 分）、一部のペプチドのピーク強度およびピーク形状が悪かった。C18 基の末端側にさらに第3級アミノ基が結合された Acclaim Mixed Mode WAX-1（Thermo Fisher Scientific）では、ヒドロキシメタンスルホン酸および各指標ペプチドのどちらも保持・溶出させることができないことが示唆された（図 1）。

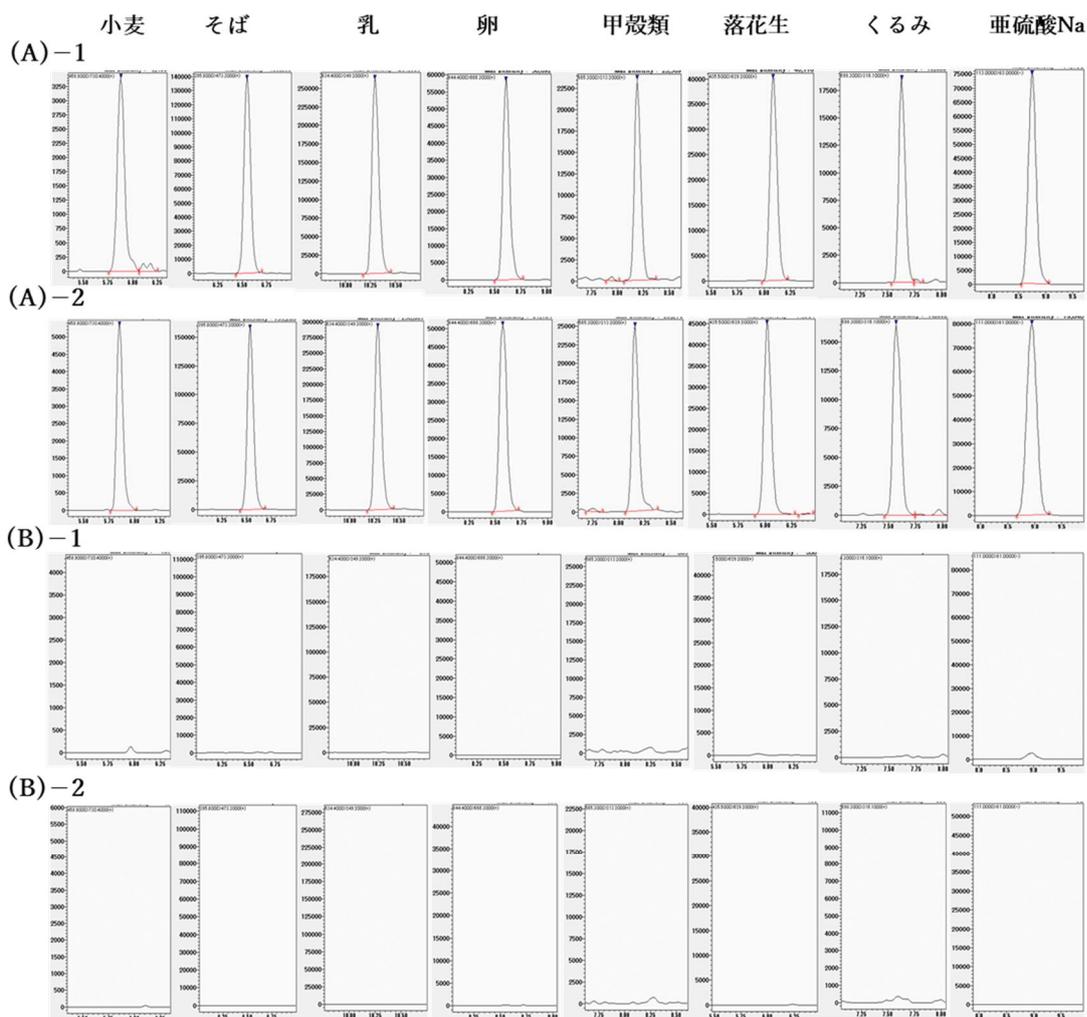
ヒドロキシメタンスルホン酸は電離したスルホ基が第3級アミノ基（陰イオン交換基）と静電的相互作用によって保持され、また側鎖に酸性アミノ酸（グルタミン酸、アスパラギン酸）を含むペプチドは同様のメカニズムでカラムへの保持が強くなると考えられる。一方、0.1%ギ酸水溶液の pH は約 2.7 であり、各指標ペプチドの予測等電点を考慮すると、移動相中ではほとんどのペプチドは

分子全体では正に荷電していると考えられるため、充填剤の第 3 級アミノ基とは静電反発を生じ、移動相中の有機溶媒比率が同じ場合、C18 基のみを含むカラムと比較すると保持時間は全体的に早くなると考えられる。本研究において選定した指標ペプチドの中では、小麦由来ペプチドの **QIPEQSR** とくるみ由来ペプチドの **QQQQQLR** の保持時間はそれぞれ約 1.7 分と約 1.3 分であり、一般的な C18 カラムを使用した場合と比較して大幅に保持時間が早くなった。これらのペプチドは側鎖に複数のグルタミン残基を含み、全体的に親水性アミノ酸残基の割合が高いため、C18 基および第 3 級アミノ基双方との相互作用を生じづらく、保持時間が短くなったと考えられる。以上の結果から、カラムには C18 基と第 3 級アミノ基を有するもの、および、ギ酸含有水/アセトニトリルを移動相として用いた場合、陰イオン性低分子化合物との同時分析に適するペプチドは、疎水性アミノ酸残基（バリン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン等）および酸性アミノ酸残基（グルタミン酸、アスパラギン酸）を分子内に適度に有するものの解析に有用であることが示唆された。

加工食品を用いた添加回収試験による妥当性確認

最適化した分析法の妥当性を評価するため、原材料に特定原材料 8 品目および亜硫酸塩類を含まない加工食品 2 種（カレールーおよび、コーンスープ）に、各特定原材料（小麦、そば、乳、卵、えび、落花生、くるみ）から抽出したタンパク質および亜硫酸ナトリウムを試料中濃度で $10 \mu\text{g/g}$ となるよう添加（亜硫酸ナトリウムは二酸化硫黄に換算した濃度）して、それぞれ $n=5 \times 2$ 日間測定を行い、回収率、併行精度、室内再現精度を算出した。ペプチドについては、トリプシン消化前のタンパク質濃度として $0.1 \sim 20 \mu\text{g/mL}$ の濃度範囲で検量線を作成して絶対検量線法により定量を行った。亜硫酸塩類は、内部標準物質として 34S 標識亜硫酸ナトリウムを測定溶液中濃度で 20 ng/mL となるよう亜硫酸ナトリウム（32S）溶液（ $0.5 \text{ ng/mL} \sim 50 \text{ ng/mL}$ ）に添加し、内部標準法により定量を行った。カレールーおよびコーンスープ測定時の抽出イオンクロマトグラムの例を図 2 に、検量線の傾きおよび切片、決定係数、タンパク質および二酸化硫黄の平均回収率、併行精度、室内再現精度の結果を表 1 に示す。

図 2. 添加回収試験サンプルおよびブランクサンプルの抽出イオンクロマトグラム例



(A)-1: 10 µg/g のタンパク質 (小麦、そば、乳、卵、甲殻類、落花生、くるみ由来) および亜硫酸ナトリウム (二酸化硫黄換算) 添加カレー、(A)-2: 同添加コンスープ、(B)-1: 無添加カレー、(B)-2: 無添加コンスープ

小麦: 高分子量グルテニンサブユニット由来ペプチド SVAVSQVAR (m/z 458.9 > 730.4)、そば: 13S グロブリン由来ペプチド GFIVQAR (m/z 395.8 > 473.3)、乳: α -S1-カゼイン由来ペプチド YLGYLEQLLR (m/z 634.4 > 249.2)、卵: オボアルブミン由来ペプチド GGLEPINFQTAADQAR (m/z 844.4 > 666.3)、甲殻類: トロポミオシン由来ペプチド IVELEEEELR (m/z 565.3 > 213.2)、落花生: 7S グロブリン由来ペプチド QINQNLN (m/z 435.5 > 530.1)、くるみ: 2S アルブミン由来ペプチド GEEMEEMVQSAR (m/z 698.3 > 316.1)、亜硫酸ナトリウム: ヒドロキシメタンスルホン酸 (m/z 111 > 81)

原材料	対象成分	検量線			添加した食品	添加回収試験		
		傾き	切片	決定係数(R ²)		平均回収率(%)	併行精度(%)	室内再現精度(%)
小麦	SVAVSQVAR	8214.9945	-1051.4137	0.9986	カレールー	115.84	4.43	4.68
					コーンスープ	112.14	2.60	2.75
そば	GFIVQAR	325899.2196	14883.2389	0.9998	カレールー	101.96	3.65	5.46
					コーンスープ	102.45	3.16	3.45
乳	YLGYLEQLLR	856482.7219	-66571.0245	0.9971	カレールー	84.99	1.99	3.18
					コーンスープ	86.38	1.29	2.69
卵	GGLEPINQTAADQAR	127607.6918	-2065.9437	0.9998	カレールー	108.49	2.32	2.87
					コーンスープ	105.00	2.59	3.22
甲殻類	IVELEELR	60831.4331	8468.8655	0.9990	カレールー	84.96	5.70	6.15
					コーンスープ	85.70	4.03	6.03
落花生	QINQNLR	105824.0413	13783.4320	0.9988	カレールー	96.35	4.55	5.32
					コーンスープ	103.73	6.38	6.96
くるみ	GEEMEEMVQSAR	42963.7531	-110.7940	0.9996	カレールー	103.71	3.82	4.15
					コーンスープ	103.30	3.16	4.04
亜硫酸ナトリウム*	ヒドロキシメタンスルホン酸	1.1147	0.0780	0.9989	カレールー	101.60	0.68	0.74
					コーンスープ	100.90	0.48	1.61

表 1. 亜硫酸ナトリウム（二酸化硫黄換算）の検量線および添加回収試験（n=5×2 日間）における平均回収率、併行精度、室内再現精度一覧

* 亜硫酸ナトリウムの検量線は、内部標準法により内部標準物質（34S 亜硫酸ナトリウム）と対象成分（32S 亜硫酸ナトリウム）の濃度比およびピーク面積比から作成した。

亜硫酸ナトリウム誘導体であるヒドロキシメタンスルホン酸の検量線の決定係数 R² は 0.99 といずれも良好な直線性を示した（データ示さず）。また、カレールーおよびコーンスープを用いた添加回収試験では、亜硫酸ナトリウムは内部標準法を用いることで、良好な回収率と併行精度、室内再現精度で分析可能であることが示された。以上の結果から、本分析法は食物アレルギー表示を確認するための分析法として、アレルギータンパク質由来のペプチドと亜硫酸塩類を極めて高い精度で同時分析が可能な有用な手法であることが示唆された。

市販加工食品を用いた適用性の確認

本分析法の適用性を確認するため、10 種類の市販食品を用いて測定を行い、特定原材料 8 品目および亜硫酸塩類の原材料表示と、本分析法による各原材料の検出結果の一致性を確認した。その結果を表 2 に示す。測定を行った市販食品 10 種について、小麦、そば、乳、卵、甲殻類（えび・かに）、落花生、くるみについては、各食品の原材料表示の有無と、本分析法による検出の有無が一致した。亜硫酸塩類については、原材料表示がある冷凍エビ①で約 4.2 μg/g、亜硫酸塩類の表示が無い即席めん①で約 3.0 μg/g それぞれ検出され、EU および Codex で表示基準となる 10 μg/g を超える食品

は無かった。以上の結果から、本分析法は食物アレルギーの表示を確認するための分析法として、広範な食品に適用できることが示唆された。

市販食品	原材料表示								検出結果							
	小麦	そば	乳	卵	甲殻類	落花生	くるみ	亜硫酸塩類	小麦	そば	乳	卵	甲殻類	落花生	くるみ	亜硫酸塩類
冷凍エビ①	無し	無し	無し	無し	有り(えび)	無し	無し	有り	-	-	-	-	+	-	-	+(4.2 µg/g)
冷凍エビ②	無し	無し	無し	無し	無し	無し	無し	無し	-	-	-	-	-	-	-	-
たこ焼粉	有り	無し	有り	無し	無し	無し	無し	無し	+	-	+	-	-	-	-	-
天ぷら粉	有り	無し	無し	無し	無し	無し	無し	無し	+	-	-	-	-	-	-	-
唐揚げ粉	有り	無し	有り	有り	無し	無し	無し	無し	+	-	+	+	-	-	-	-
乾そば	有り	有り	無し	無し	無し	無し	無し	無し	+	+	-	-	-	-	-	-
レトルトパスタソース① (カルボナーラ)	有り	無し	有り	有り	無し	無し	無し	無し	+	-	+	+	-	-	-	-
レトルトパスタソース② (トマトクリーム)	有り	無し	有り	無し	有り (えび・かに)	無し	無し	無し	+	-	+	-	+	-	-	-
即席めん①	有り	無し	有り	有り	有り (かに)	無し	無し	無し	+	-	+	+	+	-	-	+(3.0 µg/g)
即席めん②	有り	無し	無し	無し	無し	無し	無し	無し	+	-	-	-	-	-	-	-

+; 検出、-; 不検出

表 2. 市販加工食品の原材料表示および測定結果

今後の研究活動について

本研究では、食品の食物アレルギー表示の適正さを確認するための分析法として、LC-MS/MS を用いて亜硫酸塩類の誘導体化合物とアレルギータンパク質由来のペプチドを同時に検出する方法を開発した。第 3 級アミノ基とオクタデシル基を有するカラムを使用し、移動相にギ酸を含む水/アセトニトリルを用いてグラジエント溶出を行うことで、亜硫酸塩類誘導体（ヒドロキシメタンスルホン酸）および特定原材料 8 品目（小麦、そば、乳、卵、甲殻類（えび・かに）、落花生、くるみ）の指標ペプチドの同時分析が可能であることが示唆された。添加回収試験では回収率、併行精度、室内再現精度はいずれも良好な結果が得られ、また 10 種類の市販食品の測定において各原材料表示と本分析法により検出結果が一致したことから、本分析法は、食品に含まれる亜硫酸塩類およびアレルギータンパク質を同時に検出する有用な手法であると考えられた。本分析法を応用することで、亜硫酸塩類以外の陰イオン性低分子化合物とペプチドの同時分析も可能になり、食品の安全性確認のみならず、機能性成分の分析など幅広い分野で活用が期待される。

参考文献

- 1) Warren CM, Brewer AG, Grobman B, Jiang J, Gupta RS. Racial/ethnic differences in food allergy. *Immunol. Allergy Clin. North Am.*, 2021 May;41(2): 189-203.
- 2) Hadley C. Food allergies on the rise? Determining the prevalence of food allergies, and how quickly it is increasing, is the first step in tackling the problem. *EMBO rep.* 2006 Nov;7(11): 1080-83.
- 3) Carlos KS, de Jager LS. Determination of sulfite in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry: collaborative study. *J. AOAC Int.* 2017 Nov;100(6), 1785-94.

以上