LC-MSによる小麦アレルゲン分析法の検討

○高橋洋武，佐野勇気，橘田　規，照井善光
（一般財団法人日本食品検査）

一般財団法人 日本食品検査
Japan Food Inspection Corporation

目的

● 食物アレルゲンを含む食品の誤食による健康被害の発生を防止する観点から，平成13年4月にアレルゲンを含む食品に関する表示制度が創設された。その後の改正と平成27年4月に施行された食品表示法によって，**特定原材料7品目（卵，乳，小麦，えび，かに，そば，落花生）とそれに準ずる20品目が表示の対象**となった。

表示義務（特定原材料7品目）	
発症数が多いもの	卵　乳　小麦　えび　かに
症状が重いもの	そば　落花生
表示が推奨されているもの（20品目）	
発症数が少ないもの	あわび，いか，いくら，オレンジ，カシューナッツ，キウイフルーツ，牛肉，くるみ，ごま，さけ，さば，大豆，鶏肉，バナナ，豚肉，まつたけ，もも，やまいも，りんご，ゼラチン

● 平成14年11月と平成17年11月には，この表示制度が適切に実施されていることを検証するための検査方法が通知され，その中で定量検査法としてELISA法[1)]が示されたが，ELISA法には検査対象原材料ごとに専用のELISAキットを2種類ずつ用いる必要があることや交差反応によって偽陽性の判定を完全には避けることができないなどの欠点がある。

分析法	メリット	デメリット
ELISA法	• キットが市販されている。 • 高額な機器は不要。 • 前処理が簡便。 • 多検体処理に向いている。	• 特定原材料の種類ごとに2種類のキットを準備しなければならない。 • 同時に複数の特定原材料の検査をすることができない。 • 陽性の判定が出た場合，定性検査が必要。
LC-MS（MS/MS）法	• 複数のアレルゲンタンパク質を同時に分析することができる。 • 定性検査が不要。	• 定量用標準物質が市販されていない。 • 高額な機器が必要。 • 前処理が煩雑。 • 多検体処理に向いていない。

● 本発表では、**LC-MSを用いた小麦アレルゲンの分析法開発について、小麦を検出・定量するためのターゲットペプチドの探索結果及び定量分析法開発**について紹介する。

表示の必要性を確認するための**検知法**は,加工食品中の特定原材料等のタンパク質を**数μg/g含有レベル以下まで検出可能なもの**でなければならない（基準値は10 μg/g）。

方法

① 検討試料

強力粉	No.1 Canada Western Red Spring, Dark Northen Spring, Hard Red, Australian Prime Hard, ハルユタカ
中力粉	Australian Standard White, きたほなみ, チクゴイズミ, きぬあかり
薄力粉	US Western White, 農林61号, シロガネ
デュラム粉	Canada Western Amber Durum

② 前処理

≪ターゲットペプチド探索≫

サンプル
↓
タンパク質抽出
↓　⇒ タンパク質を定量する
酵素消化　**（SMART Digest, Thermo Fisher Scientific製）**
↓
ペプチド　**耐熱性酵素によって12時間以上⇒1時間に短縮**
↓
LC-MS測定

≪検量線作成≫

グリアジン溶液
↓　⇒タンパク質を定量
段階希釈　**小麦タンパク質であるグリアジンを標準品として使用**
↓
酵素消化
↓
ペプチド
↓
SCX固相濃縮
↓
LC-MS測定

③ LC-MS測定条件

HPLC
装置: UltiMate3000RSLC (Thermo Fisher Scientific)
分析カラム: Acclaim 120 C18 (2.1 mm × 150 mm, 2.2 μm) (Thermo Fisher Scientific)
移動相: A液 ; 0.1 vol%ギ酸含有アセトニトリル溶液, B液 ; 0.1 vol%ギ酸

MS
装置: Q Exactive Focus (Thermo Fisher Scientific)
イオン化モード: HESI(+),
測定モード: Full MS及び$dd\text{-}MS^2$(ターゲットペプチド探索), SIM(検量線作成)
Full MS範囲: *m/z* 200 to *m/z* 2000
分解能: Full Ms ; 70,000, $dd\text{-}MS^2$; 17,500, (*m/z* 200における値)

④ ターゲットペプチドの選出方法

種の特異性：UniProtなどのデータベースから入手した小麦のもつタンパク質の配列情報に検出したペプチドを当てはめた。この際、小麦以外の主要な穀類のデータベースに当てはまるペプチドは除外した。
種内網羅性：検討試料すべてにおいて検出したペプチドを選出した。

結果及び考察

● 小麦を検出するためのLC-MS測定用ターゲットペプチドとして、Gamma-gliadin等に由来する7種類を設定した。

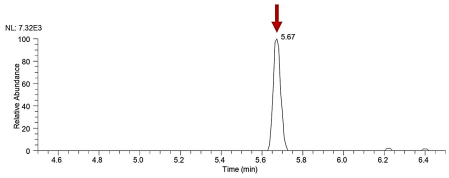
● 小麦タンパク質の一つであるグリアジンを標準品として用いて検量線を作成し、矢印の示す濃度における残渣のばらつきを評価したところ、相対標準偏差3.3 %（n = 5）と良好な結果が得られた。

● 今後は，選出した小麦判別用ターゲットペプチドを用いた小麦定量分析法の妥当性確認を行う予定である。

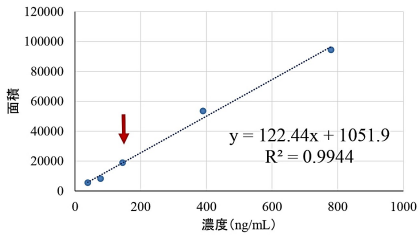
● 小麦判別用ターゲットペプチド

原材料	保持時間	アミノ酸数	由来タンパク質
小麦	9.56	19	HMW glutenin By8
	10.23	11	HMW glutenin subunit
	12.11	10	Globulin 1
	14.14	33	Gamma-gliadin
	16.12	13	Gamma-gliadin
	17.62	13	Gamma-gliadin
	18.17	13	Gamma-gliadin

● ターゲットペプチドのクロマトグラム例



●ターゲットペプチドの検量線例



注：矢印の濃度における残渣のばらつきの評価結果：相対標準偏差3.3 %（n = 5）

1) 食品表示基準について（平成27年3月30日 消費者庁次長通知 消食表第139号）別添「アレルゲンを含む食品の検査方法」