

## 課題番号9

### LC-MS/MS<sup>®</sup>による食物アレルゲン中の特異的配列ペプチドの一斉分析

※液体クロマトグラフ質量分析計

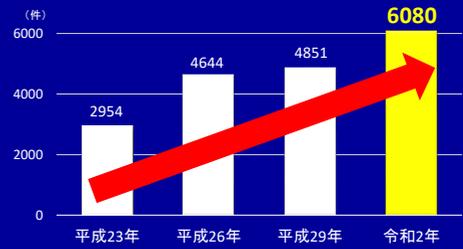
衛生化学部

○河野雄介 高山清子 白川綾乃<sup>1)</sup>  
黒木麻衣 野中勇志 落合克紀<sup>2)</sup>

1) 現 日南病院 2) 現 環境管理課

1

## 日本での食物アレルギーの現状

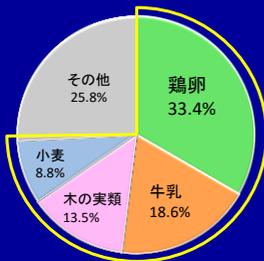


消費者庁「食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業」における解析症例数の推移

参考：消費者庁「食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書」(令和3年度/平成30年度/平成27年度/平成24年度)を基に作成

2

## 食物アレルギーの原因食品



上位4品目(鶏卵・牛乳・木の実類・小麦)で、  
全体の74%を占める

参考：消費者庁「令和3年度 食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書」を基に作成

3

## 本県における収去検査の不適事案

(平成29年度～令和5年度)

年度	品名	検査項目
平成29年度	焼豚	卵
	海老フライ	卵
平成30年度	マカロニサラダ	乳
令和元年度	中華ダンゴ	卵
令和4年度	いかフライ	卵
令和5年度	ソース焼きそば	卵

4

## 調査研究の目的

### ELISAの問題点

- ・ 選択性が低く、偽陽性・偽陰性を示す食品がある
- ・ 一度に複数のアレルゲン検査不可
- ・ 検査コスト・時間がかかる

↓ 解決策

LC-MS/MSによる食物アレルゲンの一斉分析法の確立

5

## 調査計画

令和5年度：LC-MS/MS分析条件の検討

- ・ 標準品の入手
- ・ ターゲットペプチドの選定

令和6年度：分析方法の検討

- ・ 試料ごとの抽出・精製法の検討

令和7年度：分析方法の確立

- ・ 分析法の妥当性評価の実施
- ・ 標準作業書(SOP)の作成

6

## 標準品の入手

雑質技術研究所が令和5年10月2日に販売開始



製品情報  
 容量 : 50~100 μL/本  
 濃度 : 約5~50 mg/mL  
 外観 : 液体  
 保管条件 : -20°C

消費者庁通知法\*)に準じた市販品の  
 食物アレルギーの標準品を入手した

\*) 消費者庁、平成14年11月6日付け食発第1106001号「アレルギー物質を含む食品の検査方法について」

7

## ターゲットペプチドの選定方法



### ペプチド選択時のチェック項目

- 測定に適切な長さ (10~30 アミノ酸残基程度)
- 不安定なアミノ酸を含むペプチドの除外
- BLAST検索によるアミノ酸配列の特異性確認

タンパク質のTrypsin消化ペプチドLC/MS/MS分析  
 分析メソッド作成例Waters参照

8

## ターゲットペプチドの選定方法

配列 検索 ツール  
 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)



BLAST検索により目的の食品のみ存在する  
 アミノ酸配列を選択可能

9

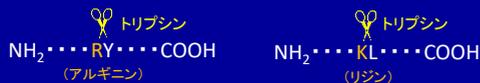
## 卵白のタンパク質組成

50~60%	オボアルブミン アミノ酸配列 MGSIGAASMEFCFDVFK ELK VHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGAKDSTR TQINKVVRFDKLP GFGDSIEAQCGTSSVNVHSSLRDLNQTIPNDVYSFSLASRLVAEERYPIPEYLQCVKELVGGLE PINFQTAADQARELINSWVESQTNIGIRNVLQPSVSDQTAMVLVNAIVFKGLWEKAFKDED QAMPPFRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMK ILELPEYVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEK ESINFEKLEWTSSTSNVMEERKIKVYLRPMKMEEKYNYLTVLMMGIDTVFSSANLSGISSAES LKISQAVHAAHAEINEAGREVVGSAEAGVDAASVSEEFRAHPFLFCIKHIATNAVLFVGRVSP
12~13%	オボトランスフェリン
11%	オボムロイド
10~13%	オボグロブリン
10%	その他

全タンパク質に占める比率が大きいオボアルブミン  
 をターゲットとした

10

## トリプシン消化後の候補ペプチド



### 鶏卵 (オボアルブミン) アミノ酸配列

MGSIGAASMEFCFDVFK ELK VHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGA  
 DSTR TQINK VVR FDK LPGFGDSIEAQCGTSSVNVHSSLR DLNQTIK  
 PNDVYSFSLASRLVAEERYPIPEYLQCVK ELYR GGLEPINFQTAADQAR  
 ELINSWVESQTNIGIR NVLQPSVSDQTAMVLVNAIVFK GLWEK AFK  
 DEDTQAMPFR VTEQESK PVQMMYQIGLFR VASMASEK MK  
 ILELPEYVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMK ILELPEYVTEQESK  
 VYLRPMK MEEK YNYLTVLMMGIDTVFSSANLSGISSAESLK  
 ISQAVHAAHAEINEAGR EVVGSAAEAGVDAASVSEEFRAHPFLFCIK  
 HIATNAVLFVGRVSP

11

## ターゲットペプチドの選択

測定に適切な長さ (10~30 アミノ酸残基) & 不安定なアミノ酸を含まない

NVLQ.....VFK & C.....R (システイン) E.....R (グルタミン酸)  
 M.....R (メチオニン)

### 鶏卵 (オボアルブミン) アミノ酸配列

MGSIGAASMEFCFDVFK ELK VHHANENIFYCPIAIMSALAMVYLGA  
 DSTR TQINK VVR FDK LPGFGDSIEAQCGTSSVNVHSSLR DLNQTIK  
 PNDVYSFSLASRLVAEERYPIPEYLQCVK ELYR GGLEPINFQTAADQAR  
 ELINSWVESQTNIGIR NVLQPSVSDQTAMVLVNAIVFK GLWEK AFK  
 DEDTQAMPFR VTEQESK PVQMMYQIGLFR VASMASEK MK  
 ILELPEYVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMK ILELPEYVTEQESK  
 VYLRPMK MEEK YNYLTVLMMGIDTVFSSANLSGISSAESLK  
 ISQAVHAAHAEINEAGR EVVGSAAEAGVDAASVSEEFRAHPFLFCIK  
 HIATNAVLFVGRVSP

タンパク質のTrypsin消化ペプチドLC/MS/MS分析  
 分析メソッド作成例Waters参照

12

## ターゲットペプチドの選択

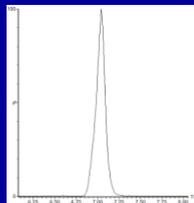
BLAST検索による**特異性**の確認

特異性あり	GGLEPINFQTAADQAR	
	HIATNAVLFFGR	
	DEDTQAMPFR	←→ カルガモ等
特異性なし	PNDVYSFLASR	←→ コジュケイ
	ISQAVHAAHAEINEAGR	←→ コジュケイ

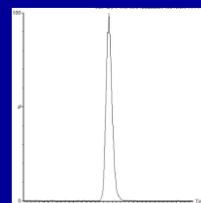
13

## LC-MS/MS測定結果

GGLEPINFQTAADQAR  
(563.285 > 560.279)



HIATNAVLFFGR  
(449.251 > 320.184)



卵アレルギーに関して、LC-MS/MS測定条件の  
設定ができた

14

## 現時点のまとめ

- ・ 消費者庁通知法に準じた食物アレルギーの標準品を入手
- ・ 卵アレルギータンパク質に特異的かつ安定的なターゲットペプチドをLC-MS/MSで感度及びピーク形状良く測定可能

15

## 調査計画

令和5年度：LC-MS/MS分析条件の検討

- 標準品の入手
- ターゲットペプチドの選定

令和6年度：分析方法の検討

- 試料ごとの抽出・精製法の検討

令和7年度：分析方法の確立

- 分析法の妥当性評価の実施
- 標準作業書(SOP)の作成

16