

LC-MS/MSによる 食物アレルギー検査用標準物質の紹介

Introduction of Food Allergen Analytical Standards by LC-MS/MS

稲垣 江梨 ERI INAGAKI

一般財団法人雑質技術研究所 研究開発室 主査
Assistant Section Chief,
Research & Development, SAIKA Technological Institute Foundation.

キーワード

食物アレルギー、LC-MS/MS、標準物質

01 はじめに

雑質技術研究所では、残留農薬検査をはじめとする食品の品質と安全性に関する研究を行ってきた。その中で、多成分の農薬を効率的に検査できる残留農薬一斉検査法を開発し、国内で初めて受託検査サービスを提供した。また、中国産冷凍ギョーザ有機リン系農薬中毒事件では、迅速な対応が求められる中で、短期間で結果を提供できる「わんでい」検査サービスを実施した。このように、時代の要求に対応できる新たな検査技術の開発を積極的に進めている。

近年、食物アレルギー疾患を持つ患者が増加傾向にあることから、食物アレルギー分野に着目している。食物アレルギーは、アナフィラキシー等の緊急性の高い症状を引き起こすことがあり、社会的な取り組みとして食品表示の義務化や推奨が行われている。正確な食品情報の提供は、アレルギー患者の健康と生活の質向上において重要である。しかし、現在スクリーニング検査に広く用いられているELISA法では、複数アレルギーを同時に検査できない、偽陽性を示す食品がある等の課題があり、複数アレルギーを同時にかつ高い選択性で検査できる新しい検査方法の開発が求められている。

我々はこの課題に対処するため、LC-MS/MS(液体クロマトグラフ質量分析計)を用いた食品中の食物アレルギー検査方法(以下、LC-MS/MS法)の開発に取り組んでいる。LC-MS/MS法は、複数の食物アレルギーを同時に高感度で検出でき、高い選択性を持つ手法である。しかしながら、LC-MS/MS法に適した標準物質が市販されておらず、検査手法の確立が進んでいない。そこで「総タンパク質を含有しながらLC-MS/MSの質量分析部で使用可能な標準物質」を開発し、広く一般に提供することとした。本稿では、「LC-MS/MSによる食物アレルギー検査用標準物質」について詳しく説明する。

02 食物アレルギーと食品表示

食物アレルギーとは、食物を摂取した際に、身体が食物に含まれる特定のタンパク質を異物として認識し、過剰に免疫反応を引き起こす症状である。これらの食物アレルギーを引き起こすタンパク質はアレルギーと呼ばれ、一般的に複数のタンパク質で構成されている。

日本では、食物アレルギー患者の健康を守るために、アレルギーを含む食品の表示が定められている。発症数や重篤度から勘案して「えび・かに・くるみ・小麦・そば・卵・乳・落花生」の8品目を特定原材料として表示を義務付けるとともに、特定原材料に準ずるものとして「アーモンド・あわび・いか・いくら・オレンジ等」の20品目の表示が推奨されている(図1)。

■特定原材料 8品目 表示義務 (症例が多いもの、重篤なもの)



■特定原材料に準ずるもの 20品目 表示推奨 (一定の頻度で健康被害がみられたもの)



図1 食物アレルギー表示について
(出展 公益財団法人ニッポンハム食の未来財団ホームページ
<https://www.miraizaidan.or.jp/allergy/illustrations.html>)

03 食品中のアレルゲン検査方法

3-1 従来の検査方法

アレルゲンを含む食品の検査方法は、消費者庁次長通知として発出されている¹⁾。検査技術の進歩に対応し、順次見直される方針となっている。検査方法は、特定原材料については、まずELISA法によるスクリーニング検査が行われ、陽性反応がある場合、確認検査が実施されることが多い。確認検査では、「卵、乳」についてはウエスタンブロット法が、「えび・かに、くるみ、小麦、そば、落花生」についてはPCR法が一般的に用いられる。これらの方法は、対象とするアレルゲン毎にそれぞれ個別に検査を行う必要がある。ELISA法では偽陽性を示す食品が存在し、キットメーカーによる反応性データが公開されている。また、特定原材料に準ずるものについては、具体的な検査方法は定義されていない。

上記の検査方法以外にも、迅速で簡便なアレルゲン検査法が存在する。イムノクロマト法による拭き取り検査等は、食品製造現場で広く採用され、自主検査に活用されている。

3-2 LC-MS/MSによる検査方法

LC-MS/MS法は、複数のアレルゲンを同時に検査でき、高い選択性を持つ新たな検査方法である。LC-MS/MSは、一つのアレルゲンに対して複数のイオンを設定できるため、特異性の高いイオンを選択することで、対象アレルゲンを類似したタンパク質と区別して検出できる。この特性により、ELISA法で問題となる偽陽性反応のリスクが低減する。また、検査を妨害する食品成分(以下、夾雑物)を除去する精製工程を導入することで、様々な加工食品に適応できる。消費者庁通知の検査方法では、「ELISA法以外の定量検査法を用いることは妨げないが、この場合には、この検査法と同等又は同等以上の性能をもっていること」とされている。LC-MS/MS法は、消費者庁通知の検査方法ではないが、自主検査に活用できると考えている。

図2は、大麦入りパックご飯の小麦アレルゲン検査の例を示している。ELISA法では、小麦アレルゲンは大麦にも反応性があるため、大麦入りの食品は偽陽性を示す。一方、LC-MS/MS法で

は、小麦と大麦の両方の穀物を検出するイオンでは検出されたが、小麦のみを検出するイオンでは検出されなかった。この結果から、LC-MS/MS法で複数のイオンを用いることが偽陽性低減に有効であることがわかる。

04 LC-MS/MS法のための標準物質

4-1 標準物質の特長

今回紹介する標準物質の特長は、①総タンパク質を含有すること、②LC-MS/MSの質量分析部に悪影響を及ぼさないこと、の2点である。

①総タンパク質を含有する

食物アレルギー症状は、総タンパク質量と密接な関連性がある。mg/mL(g)濃度レベルで確実に誘発され、μg/mL(g)濃度レベルでは個人差があり、ng/mL(g)濃度レベルでは誘発されないと考えられている。健康危害回避の観点から、食物アレルゲン量の検査では、特定のタンパク質量ではなく総タンパク質量として考慮する必要がある。消費者庁通知の検査方法では、「標準タンパク質は特定のタンパク質や抗原性を持つタンパク質ではなく、なるべく全てのタンパク質を含んでいることが望ましい」とされている。

また、LC-MS/MSは、複数のタンパク質を同時測定でき、複数のタンパク質を含有する標準物質を用いることで、高い定性能力を活用できる。

市販されている標準物質は、アルブミンやカゼイン等の特定のタンパク質を含有しており、現時点では総タンパク質を含む標準物質は市販されていない。

②LC-MS/MSの質量分析部に悪影響を及ぼさない

ELISA法用標準物質のタンパク質抽出時に使用される界面活性剤は、LC-MS/MSの質量分析部に悪影響を及ぼす恐れがある。そこで、本標準物質では後工程で除去可能なPTS²⁾(相間移動溶解剤)を用いている。

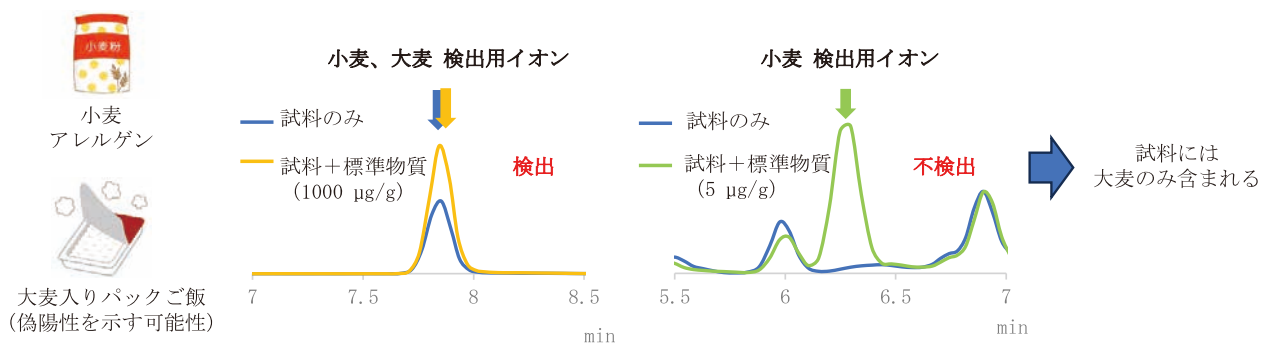


図2 大麦入りパックご飯の小麦アレルゲン検査例

4-2 標準物質の品質管理

標準物質は以下の①～④の工程により、調製及び品質管理されている(図3参照)。

①標準粉末の調製

材料となる標準粉末は、別添3標準品規格¹⁾を参考に調製する。例えば、乳の場合、ホルスタイン種(乳用牛)の新鮮乳を冷却遠心し、乳脂肪が凝固して生じる乳脂塊を脱脂綿で濾過する。この操作を3回繰り返して脂肪を除去した後、濾液を凍結乾燥し、乾燥物を微粉碎して乳の標準粉末とする。

なお、市場で入手できない材料は必要性が低いと判断し、使用しない方針である。また、季節による材料のタンパク質量変動が懸念されたが、現時点では顕著な差異は観察されていない。

②タンパク質抽出

タンパク質抽出には、PTSを使用する。PTSはタンパク質の抽出効率に優れており、疎水性の高いタンパク質であっても親水性

タンパク質と同等に抽出できる。また、PTSは界面活性剤の一種であるが、トリフルオロ酢酸等の使用により酸性環境で調製されると疎水性が高まり、酢酸エチル側へ移行する。この性質を利用して、PTSを液液分配法により酢酸エチルと共に除去できる(図4)。PTSを除去後LC-MS/MSで測定すると、質量分析部に導入されないために悪影響を及ぼさない。

③濃度決定

標準物質の濃度は、BCA法を用いて測定することにより決定する。

④品質管理

標準物質は、所内基準に従って品質管理を行う。再現性、均質性及び安定性を確保し、SDS-PAGEによる電気泳動を実施する。例えば、乳の電気泳動像には、別添3標準品規格に基づき、40～25 kDaの範囲に3本、16 kDa付近に1本の明瞭なバンドが観察されることを確認している(図5)。



図3 標準物質の作製方法

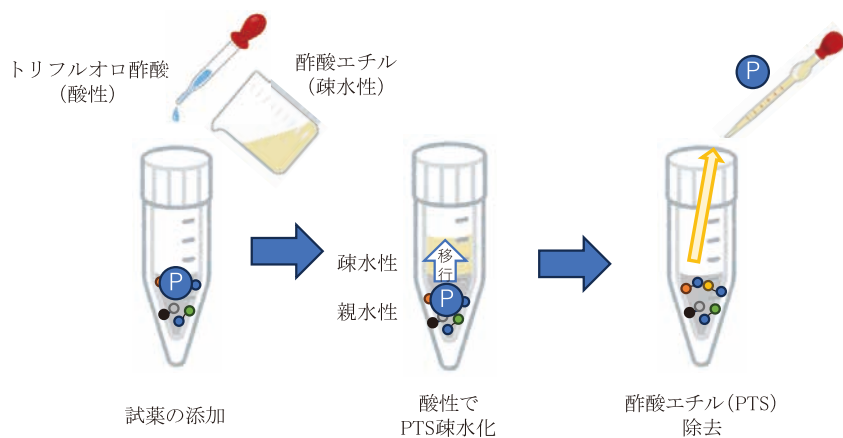


図4 PTSの除去

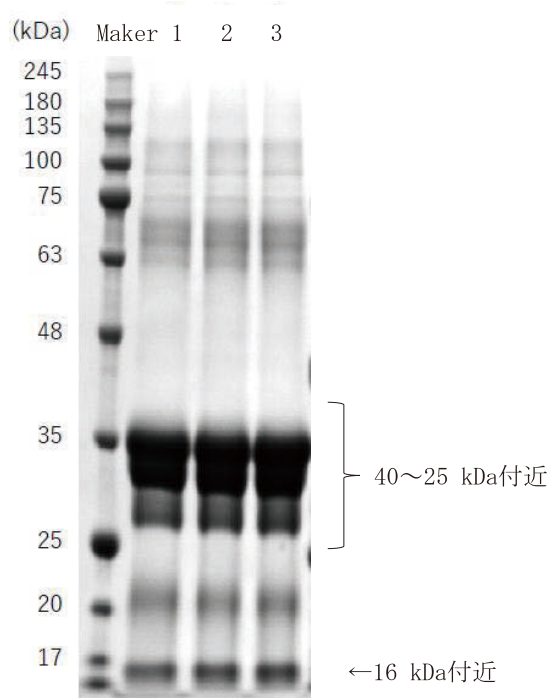


図5 標準物質の電気泳動像(乳)

4-3 標準物質の種類

以下のアレルギー品目に対応する標準物質が、関東化学株式会社を通じて販売されている(図6)。

①くるみを除く特定原材料7品目

(甲殻類:えび・かに、小麦、そば、卵、乳、落花生)

②大豆(特定原材料に準ずるもの)

さらに、くるみについても販売予定であり、大豆以外の特定原材料に準ずるものやマイナーアレルギーについても、今後の応用を検討している。

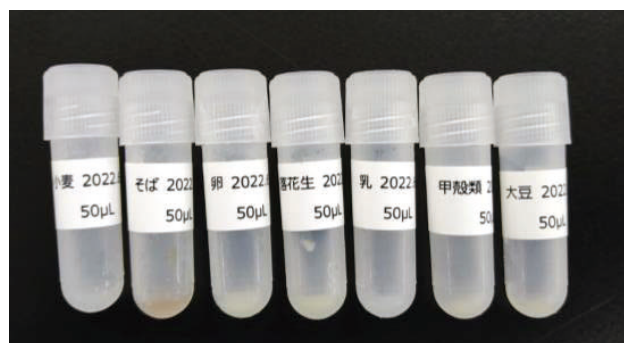


図6 標準物質
「食物由来アレルギー抽出物™」

ためには、③標準添加法が最適な選択である。

LC-MS/MS法は様々な種類の食品が対象であるが、各食品によるマトリックス効果の度合いは異なっている。マトリックス効果とは、夾雑物が目的成分のイオン化効率に影響を及ぼし、感度に変動をもたらす現象のことである。標準添加法の使用により、各食品のマトリックス効果に適応し、正確な定量結果が得られる。

一方で内部標準法は、マトリックス効果を補正できるが、適切な内部標準物質を選定する難しさがある。アレルギー検査では、複数のアレルギータンパク質が存在し、それぞれの特性や挙動が異なることから、適切な内部標準物質を見つけるのは困難である。標準添加法であれば、内部標準物質は使用しない。

標準添加法は、マトリックス効果や内部標準物質に関連する問題に対処できるため、アレルギー検査に有用である。

主な定量方法

①絶対検量線法:既知濃度の標準試料を用いて検量線を作成し、未知試料中の目的成分を定量する方法である。一般的に広く利用され、残留農薬検査等で主要な定量法として採用されている。

②内部標準法:目的成分と内部標準物質のピーク面積比と濃度比の関係を元に、目的成分の濃度を定量する方法である。全ての未知試料に内部標準物質を添加する必要がある。また、内部標準物質の選定が難しく、条件として、試料中の全ての成分との分離が必要であり、目的成分と類似した性質を持ち(同じマトリックス効果を受ける)、化学的な安定性が求められる。

③標準添加法:既知濃度の標準試料を未知試料に添加し、添加していない未知試料を同様に測定し、得られたピーク強度の差を利用して定量する方法である。

05 標準物質の使用方法

5-1 標準物質を用いた定量方法

LC-MS/MSで化学物質を定量するには、一般的に①絶対検量線法、②内部標準法、③標準添加法の3つの定量方法が使用されている(図7)。アレルギー検査において、正確な定量を実現する

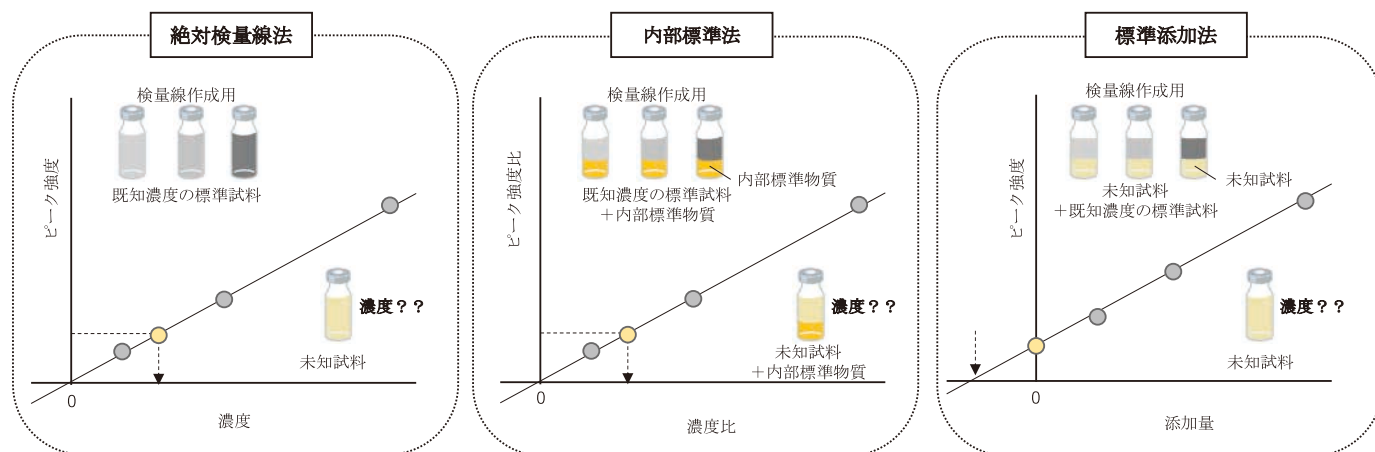


図7 主な定量方法

5-2 標準物質を用いた検査フロー

標準物質の使用例を、食品中のアレルゲン検査フローシート(図8)に従って紹介する。

①食品を粉砕・混合

食品を粉砕・混合する。標準添加法を用いて定量するため、各試料に必要な応じて標準物質を添加する(図9)。

②タンパク質抽出

PTSを用いて、タンパク質を抽出する。PTSは高いタンパク質抽出能力を持ち、標準物質の作製にも使用されている。

③酵素切断

タンパク質を還元・アルキル化した後、酵素を用いてタンパク質をペプチドに切断する。

④PTS除去

LC-MS/MSでの測定の前に、PTSを除去する(図4)。

⑤精製、LC-MS/MSへ

最後に、固相カラム等を用いて夾雑物を除去し、LC-MS/MSで測定する。アレルゲン量を標準添加法にて定量する(図10)。

06 おわりに

本稿では、「LC-MS/MSによる食物アレルゲン検査用標準物質」について紹介した。LC-MS/MS法は、複数のアレルゲンを同時に検査でき、高い選択性を持っている。特にELISA法で偽陽性の問題が生じる場合に、LC-MS/MS法を用いた検査を実施すると偽陽性を回避でき、アレルギー患者に正確な情報を提供できる。

標準物質の普及により、LC-MS/MS法を用いた食品中のアレルゲン検査が一般的になり、食品業界全体の品質管理技術が向上することを期待している。今後も検査方法の開発をはじめとする様々な取り組みを通じて、食物アレルギー患者が安心して食を楽しむ社会の実現に向けて努力を続けていく。

参考文献

1. 消費者庁. 平成 27 年 3 月 30 日消費表第 139 号. 食品表示基準について (別添) アレルゲンを含む食品の検査方法.
2. T. Masuda, M. Tomita, Y. Ishihama. Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion for membrane proteome analysis. J Proteome Res. 2008. 7, 731-740.



図8 食品中のアレルゲン検査フローシート

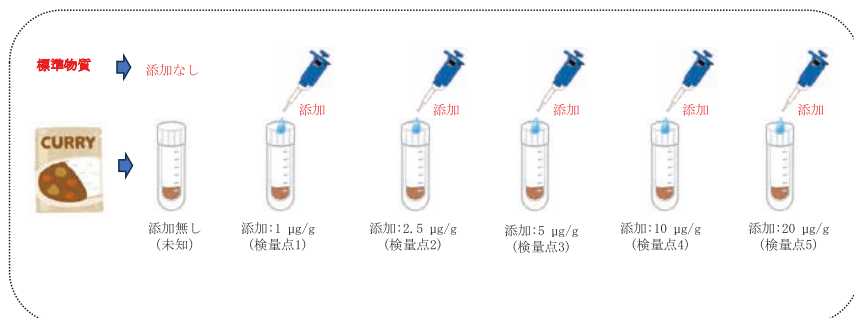


図9 標準物質の添加例

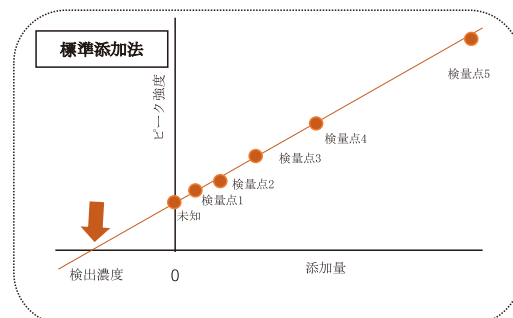


図10 標準添加法での定量例

