

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：84407

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K13044

研究課題名（和文）食物由来化粧品原料の加水分解によるアレルギー性消失と安全性指標の確立に関する研究

研究課題名（英文）Study on the reduction of allergen levels and the degradation degree for safety use in food derived-cosmetic materials with protein hydrolysis

研究代表者

清田 恭平（Kiyota, Kyohei）

地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所・衛生化学部・主任研究員

研究者番号：10516743

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：化粧品の一部には、保水性を有する食物由来タンパク、およびその加水分解物が使用されている。本研究では、化粧品原料として鶏卵に着目し、鶏卵の安全性指標の確立に資する情報を得るために、卵白アレルギー4種類（オボムコイド、オボアルブミン、オボトランスフェリン、リゾチーム）に対するLC-MS/MS定量分析法を開発した。本法を使用することで、生鮮卵白または乾燥卵白におけるアレルギー含有量の制御が可能となり、さらに、これらの酵素加水分解物において、オボアルブミン分解度を算出することで加水分解の進行を定量化することが可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鶏卵アレルギーは複数種類存在するため、免疫学的手法に基づく従来の個別分析の手法では分析が煩雑であった。本研究では、質量分析計を用いて複数種類の鶏卵アレルギーに対する同時定量を可能とした。また、本法を利用することで、従来の手法では分析困難とされていた鶏卵加水分解物中のアレルギー定量が可能となり、その分解度の制御が可能となった。これらの客観的な情報を指標として活用することで、鶏卵タンパクおよびその加水分解物を使用した化粧品の安全性と品質の向上が期待される。

研究成果の概要（英文）：Food-derived proteins and its hydrolysates are being used for beneficial application for cosmetic products such as moisturizers. In this study, we focused on hen's eggs as a representative food derived-cosmetic material. In order to obtain information that contributes to the establishment of safety index, we have developed an LC-MS/MS method for simultaneous four egg white allergens quantification, such as ovomucoid, ovalbumin, ovotransferrin, and lysozyme. Using this method, we assessed the allergen levels in fresh and dried egg white and determined the degradation degree of ovalbumin in enzymatic hydrolysates derived from fresh and dried egg white, indicating the progress of the hydrolysis reaction.

研究分野：食品化学

キーワード：鶏卵アレルギー アレルギー分析法 タンパク加水分解物 LC-MS/MS

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

化粧品原料の一部には、保湿等の機能性向上のために、小麦や鶏卵、大豆のような食物タンパクおよびその加水分解物が多く使用されている。これらを含む化粧品を継続的に使用し、皮膚を介して感作が成立した場合、食物アレルギーを発症し、健康危害をもたらすリスクがある。一般に、加水分解処理により食物タンパクは分解され、そのアレルギー性は低下する。しかし、どの程度まで食物タンパクを加水分解すれば、アレルギー性を失活させられるのか、詳細は不明である。また、食物には複数種類のアレルゲンが存在するため、それぞれの含有量を制御するためには、効率的な定量分析法が必要である。しかし、免疫学的手法に基づく従来の個別分析的手法では作業が煩雑でコストが高くなり現実的ではない。さらに、従来の手法では、加水分解物中のアレルゲン定量が困難とされていることから、その分解度について情報が少ない。そのため、これらを解決する高い信頼性と効率性を備えた分析手法の開発が必要とされてきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、化粧品原料として使用される鶏卵について、複数種類のアレルゲンに対して同時定量が可能な一斉分析法を開発し、本法を利用して鶏卵加水分解物の分解度を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試料

市販品の鶏卵試料を使用した。

#### (2) 主な試薬

鶏卵アレルギーの標準品には、オボムコイド、オボアルブミン、オボトランスフェリン、リゾチームを用いた。また加水分解用の酵素には、*Bacillus licheniformis* 由来プロテアーゼ (以上 Merck 製) を用いた。タンパク分析用の酵素には、トリプシン (Thermo Fisher Scientific 製) を用いた。

#### (3) 試料抽出

試料を 100 mmol/L Tris 緩衝液 (pH 8.0) で振とう抽出し、その遠心上清を抽出液とした。

#### (4) 卵白タンパクの加水分解処理

プロテアーゼ固定化担体を含むリン酸緩衝液に乾燥卵白の抽出液を添加して、40 から 55 の温度で 30 分から 20 時間まで処理した。その遠心上清を加水分解物溶液とした。陰性対照には、ウシ血清アルブミン固定化担体を使用した。

#### (5) LC-MS/MS 分析

抽出液または加水分解物溶液に対して還元およびアルキル化処理を行い、トリプシンで消化した。この消化液を次の条件の LC-MS/MS 分析に供した (MS 法)。LC-MS/MS: ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S (Waters 製)、LC カラム: ACQUITY UPLC HSS T3 (Waters 製)、カラム温度: 50、注入量: 2  $\mu$ L、移動相: A 液 0.1%ギ酸、B 液 0.1%ギ酸アセトニトリル、グラジエント分析、イオン化モード: ESI (+)。

#### (6) オボアルブミンと加水分解物の分離

加水分解物溶液は、次の条件において、サイズ排除クロマトグラフィーにより分離された (size exclusion chromatography; SEC 法)。HPLC: Prominence-i LC-2030C 3D Plus system (島津製作所製)、LC カラム: Inertsil WP300 Diol (GL サイエンス製)、カラム温度: 35、注入量: 10  $\mu$ L、移動相: 0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0)。

#### (7) 分析法の性能評価

625 ng/mL または 1250 ng/mL の濃度となるように、生鮮鶏卵と乾燥卵白の抽出液へ各鶏卵アレルギーをそれぞれ添加した。添加回収試験を 1 名の分析者が 1 日 2 併行、5 日間の実験を行う計画とした。一元配置分散分析により、得られたデータから併行精度 (%) および室内精度 (%) を算出した。加水分解物溶液には、1250 ng/mL の濃度となるようにオボアルブミンを添加して、その回収率を算出した。

#### (8) 分解度 (degradation degree、DD) の算出

次式で算出した。DD (%) =  $100 - C_H \times 100 / C_B$ 、 $C_H$ : プロテアーゼで加水分解されたオボアルブミン濃度、 $C_B$ : 陰性対照のオボアルブミン濃度

### 4. 研究成果

#### (1) MS法におけるトリプシン消化と分析条件の最適化

測定対象の定量用および確認用ペプチドは、*in silico*で予測した候補から検出感度を基準に選定し、その測定条件を合成ペプチドにより最適化した。この条件で、トリプシンによる消化時間を検討したところ、3時間が最適であった。

#### (2) MS法の分析性能

定量下限値は、オボムコイドは39.1 ng/mL、その他は9.77 ng/mLであった。生鮮鶏卵および乾燥卵白の各抽出液における真度は68.3-121.3%で、併行精度と室内精度は、それぞれ1.5-15.7%、2.4-38.1%であった。本法の特異性を確認したところ、本法では、ウズラ卵において鶏卵オボトランスフェリンと鶏卵リゾチームのペプチドを検出した。これはウズラ卵にそれぞれに相同なタンパクが内在したためと考えられた。また、ウズラ卵では鶏卵オボムコイドと鶏卵オボアルブミンが不検出であったことから、本法はウズラ卵と鶏卵の判別が可能であった。他の動物性・植物性食品計25種類では、卵白アレルギー4種類はすべて不検出であった。

#### (3) MS法による鶏卵アレルギーの定量

卵白アレルギー4種類の濃度は、生鮮鶏卵では文献値と概ね一致し、乾燥卵白では生鮮鶏卵の約6-10倍高かった。

#### (4) オボアルブミン加水分解物における分解度の算出

標準品のオボアルブミンを *Bacillus licheniformis* 由来プロテアーゼで加水分解し、SEC法で分析したところ、オボアルブミンと加水分解物の分離が可能であった。同じ加水分解物をMS法でも分析し、両法で得られたオボアルブミン濃度を基にそれぞれ分解度を算出したところ、高い相関性が確認された。乾燥卵白の加水分解物（分解度91.7%）に標準品オボアルブミンを添加したところ、その真度はMS法により88.3%と算出され良好であった。さらに、乾燥卵白の加水分解物（分解度69.4%）の希釈系列に対し、MS法でオボアルブミンを測定したところ、希釈直線性が確認された。これらのことから、従来の手法であるenzyme-linked immunosolvent assayと比較して、MS法は加水分解物中の夾雑物の影響を受けずオボアルブミンの定量が可能で、実試料における分解度測定への適用性が示された。

#### (5) まとめ

今回開発したMS法は、LC-MS/MSを利用した、鶏卵の卵白アレルギー4種類の同時定量が可能で、高い信頼性と効率性を備えた分析法である。本法は、鶏卵実試料の分解度測定法としても適用可能で、今後、MS法の応用展開により、化粧品原料に使用されるタンパク加水分解物の品質管理技術の発展が見込まれ、その安全性指標の確立に役立つ手法として期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kiyota Kyohei, Yoshimitsu Masato, Uchida Kotaro, Kajimura Keiji	4. 巻 345
2. 論文標題 Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of hen's egg white allergens Gal d 1-4 in fresh and processed eggs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 128022
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foodchem.2020.128022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清田恭平、吉光真人、内田耕太郎、梶村計志
2. 発表標題 4種類の鶏卵アレルギーGal d 1-4に対するLC-MS/MS分析法の構築について
3. 学会等名 第115回日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清田恭平、吉光真人、内田耕太郎、梶村計志
2. 発表標題 鶏卵アレルギー4種類に対する一斉分析法の開発
3. 学会等名 日本食品衛生学会創立60周年記念第116回学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清田恭平、吉光真人、松井啓史、内田耕太郎、梶村計志
2. 発表標題 卵白の酵素加水分解物におけるオボアルブミンの分解度の測定
3. 学会等名 第58回全国衛生化学技術協議会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 清田恭平
2. 発表標題 これから始めるアレルギー物質の機器分析
3. 学会等名 令和3年度衛生理化学分野研修会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関