

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2018年1月25日(25.01.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/016551 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 30/88 (2006.01) G01N 30/72 (2006.01)  
G01N 27/62 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)  
G01N 30/06 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/026179

(22) 国際出願日: 2017年7月20日(20.07.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2016-142994 2016年7月21日(21.07.2016) JP

(71) 出願人: 株式会社日清製粉グループ  
本社(NISSHIN SEIFUN GROUP INC.) [JP/JP];  
〒1018441 東京都千代田区神田錦町一丁  
目25番地 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 関友輔(SEKI, Yusuke); 〒3568511 埼玉  
県ふじみ野市鶴ヶ岡五丁目3番1号 株式会社  
日清製粉グループ本社内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務  
所(THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA  
PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区  
日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴  
人形町ビル Tokyo (JP).

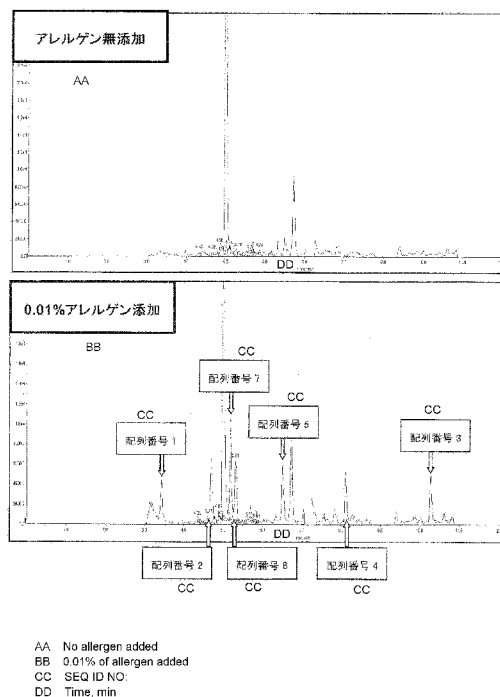
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保  
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,  
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,  
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,  
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,  
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT,  
QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保  
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS,  
MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,

(54) Title: ALLERGEN DETECTION METHOD

(54) 発明の名称: アレルゲン検出方法

[図3]



(57) Abstract: Provided is a highly sensitive allergen measurement method. A method for detecting an allergen in a sample, said method comprising treating the sample with a protease and then detecting the presence or absence of an allergen-derived polypeptide in the enzymatically treated sample by a chromatographic separation analysis, wherein the allergen is one or more members selected from the group consisting of buckwheat, shellfishes, milk, egg and peanut.

(57) 要約: 高感度なアレルゲン測定方法の提供。試料中のアレルゲンを検出する方法であって、試料をタンパク質分解酵素で処理すること、およびクロマトグラフィー分離を利用した分析により、該酵素処理した試料中におけるアレルゲン由来ポリペプチドの存在の有無を検出することを含み、該アレルゲンが、ソバ、甲殻類、乳、卵およびラッカセイからなる群より選択される1種以上である、方法。

ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 国際調査報告（条約第21条(3)）
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

## 明 細 書

発明の名称： アレルゲン検出方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、試料中のアレルゲンを検出する方法に関する。

### 背景技術

[0002] 食物アレルギーは、食物を原因とする免疫応答により、皮膚炎、喘息、胃腸管機能障害、アナフィラキシーショックなどの不利益な症状を引き起こす。食物アレルギーの原因となる食物の種類は様々であるが、特にえび、かに、小麦、そば、卵、乳および落花生の7品目は、アレルギー患者数が多く、また重篤なアレルギー症状を引き起こしやすい。

[0003] アレルゲンとなる食品を原材料に含まない加工食品であっても、アレルゲンを含む加工食品と工場での製造ラインを共有していたり、または当該原材料の製造過程でアレルゲンを使用していたりした場合、最終製品にアレルゲンが混入している場合がある。わずかなアレルゲンの混入でも、食物アレルギーの患者にとっては危険である。食品等の試料中における微量のアレルゲンを検出することができる高感度なアレルゲン測定方法が求められている。

[0004] 高感度なアレルゲン測定方法として、特許文献1には、オボアルブミン、リゾチーム、カゼイン、ラクトグロブリン、高分子量グルテニン、低分子量グルテニン、コムギタンパク質、ライムギタンパク質、カラスムギタンパク質、オオムギタンパク質、カラシナタンパク質、ゴマタンパク質、マカダミアナッツタンパク質、ピスタチオナッツタンパク質、ブラジルナッツタンパク質、クルミタンパク質、ラッカセイタンパク質およびヘーゼルナッツタンパク質からなる群より選択されるアレルゲンを酵素分解して得られる特定の配列のペプチドをLC-MS/MSで検出する、試料中の上記アレルゲンを検出する方法が記載されている。特許文献2には、試料組成物からアレルゲンを含む抽出液を形成し、該抽出液中のアレルゲンの量をLC-UV/MSまたはLC-MSを使用して測定する、組成物中のアレルゲン含有量を測定

する方法が記載されている。

## 先行技術文献

## 特許文献

[0005] 特許文献1：特表 2 0 1 4 － 5 2 5 5 8 8 号公報

特許文献2：特表 2 0 1 3 － 5 3 9 0 3 9 号公報

## 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0006] 食品等の試料中におけるアレルゲン（特にソバまたは甲殻類）の存在を高感度に検出することが求められている。

## 課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、各アレルゲンについて、それに含まれる特定のアミノ酸配列を検出することにより、当該アレルゲンの存在を高感度に検出することができるを見出した。

[0008] したがって、本発明は、試料中のアレルゲンを検出する方法であって、  
試料をタンパク質分解酵素で処理すること、および  
クロマトグラフィー分離を利用した分析により、該酵素処理した試料中におけるアレルゲン由来ポリペプチドの存在の有無を検出することを含み、  
該アレルゲンが、ソバ、甲殻類、乳、卵およびラッカセイからなる群より選択される 1 種以上である、  
方法を提供する。

## 発明の効果

[0009] 本発明は、食品等の試料中における微量のアレルゲン（特にソバまたは甲殻類）の存在を検出することができる、高感度なアレルゲン検出方法を提供する。

## 図面の簡単な説明

[0010] [図1]ソバアレルゲンのトリプシン消化物についての LC－MS／MS 分析結果。

[図2]甲殻類アレルギーのトリプシン消化物についてのLC-MS/MS分析結果。

[図3]ソバアレルギー含有小麦粉のトリプシン消化物についてのLC-MS/MS分析結果。上；ソバアレルギー無添加小麦粉、下；ソバアレルギー添加小麦粉。

[図4]甲殻類アレルギー含有小麦粉のトリプシン消化物についてのLC-MS/MS分析結果。上；甲殻類アレルギー無添加小麦粉、下；甲殻類アレルギー添加小麦粉。

[図5]乳アレルギーについてのLC-MS/MS分析結果。

[図6]卵アレルギーについてのLC-MS/MS分析結果。

[図7]ラッカセイアレルギーについてのLC-MS/MS分析結果。

[図8]乳添加パンにおけるカゼインについてのLC-MS/MS分析結果。

[図9]ラッカセイ添加パンにおけるAra h1またはh3についてのLC-MS/MS分析結果。

### 発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、試料中のアレルギーを検出する方法を提供する。本発明の方法によれば、ソバ、甲殻類、乳、卵およびラッカセイからなる群より選択される1種以上のアレルギーを検出することができる。好ましい実施形態において、本発明の方法により検出されるアレルギーは、少なくともソバおよび甲殻類からなる群より選択される1種以上であり、より好ましくはソバおよび甲殻類からなる群より選択される1種以上であり、さらに好ましくは、ソバまたは甲殻類のいずれかである。あるいは、本発明の方法により検出されるアレルギーは、少なくともソバを含み、例えば、ソバ単独、ソバおよび甲殻類、またはソバ、甲殻類、乳、卵およびラッカセイであり得る。

[0012] 本発明において、アレルギー検出に供する対象物の例としては、食品、化粧品、医薬品、それらの原材料、それらの製造工程で使用する機器類、などが挙げられるが、これらに限定されない。これらの対象物を、通常の前処理、例えば粉碎、溶解、懸濁、抽出等、もしくはそれらの組み合わせにかけた

ものを、本発明の方法の試料として用いることができる。あるいは、対象物が機器類の場合、その洗浄液やふき取り検体など、またはそれらを粉砕、溶解、懸濁、抽出等、もしくはそれらの組み合わせにかけたものを、本発明の方法の試料として用いることができる。なお、本発明の方法に用いる試料の調製方法は、上記に限定されず、次に述べるタンパク質分解酵素処理のための試料の調製に用いることができるあらゆる方法を包含し得る。

[0013] 本発明の方法においては、調製した試料を、タンパク質分解酵素で処理する。本発明の方法で用いられるタンパク質分解酵素の例としては、トリプシン、キモトリプシン、エラスターゼ、テルモリシンなどが挙げられ、好ましくはトリプシンである。処理の条件は、酵素の種類に応じて適宜選択すればよいが、例えばトリプシンの場合、酵素濃度1000～20000U、25～45℃、pH7～9程度で4～24時間が好ましい。当該酵素処理は、標的のアレルゲンのタンパク質分子を分解して、該アレルゲンに由来するポリペプチドを生成する。したがって、試料中に標的のアレルゲンが含まれていれば、上記酵素処理後の試料は、標的アレルゲンに由来するポリペプチドを含む。一方、試料中に標的のアレルゲンが含まれていなければ、上記酵素処理後の試料は、標的アレルゲンに由来するポリペプチドを含まない。

[0014] したがって、上記タンパク質分解酵素で処理した試料中における標的アレルゲン由来ポリペプチドの存在の有無を検出することにより、該試料中における標的アレルゲンの存在の有無を判定することができる。

[0015] ソバについては、ソバ22kDaタンパク質分子（配列番号25）の分解産物を、アレルゲン由来ポリペプチドとして検出することができる。本発明の方法の好ましい実施形態においては、アレルゲンがソバの場合、下記配列番号1～7のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを、アレルゲン由来ポリペプチドとして検出する。

VQVVGDEGR (配列番号1)

SVFDDNVQR (配列番号2)

GQILVVPQGFVVLK (配列番号3)

EGLEWVELK (配列番号 4)

NFFLAGQSK (配列番号 5)

GFIVQAR (配列番号 6)

NDDNAITSPIAGK (配列番号 7)

本発明の方法においては、上記配列番号 1～7 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか 1 種以上の有無が検出されればよいが、好ましくはそれらのポリペプチドの全ての有無が検出される。

[0016] カニ、エビなどの甲殻類については、トロポミオシンの分解産物を、アレルゲン由来ポリペプチドとして検出することができる。本発明の方法の好ましい実施形態においては、アレルゲンが甲殻類の場合、下記配列番号 8～12 のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを、アレルゲン由来ポリペプチドとして検出する。

IQLLEEDLER (配列番号 8)

MDALENQLK (配列番号 9)

FLAEEADR (配列番号 10)

IVELEELR (配列番号 11)

LAMVEADLER (配列番号 12)

本発明の方法においては、上記配列番号 8～12 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか 1 種以上の有無が検出されればよいが、好ましくはそれらのポリペプチドの全ての有無が検出される。

[0017] アレルゲンがソバおよび甲殻類の場合、検出されるアレルゲン由来ポリペプチドは、好ましくは配列番号 1～7 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか 1 種以上と、配列番号 8～12 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか 1 種以上であり、より好ましくは、配列番号 1～12 で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの全てである。

[0018] 乳については、カゼインまたは $\beta$ ラクトグロブリン (BLG) の分解産物を、アレルゲン由来ポリペプチドとして検出することができる。本発明の方法の好ましい実施形態においては、アレルゲンが乳の場合、下記配列番号 1

3～17のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを、アレルゲン由来ポリペプチドとして検出する。下記ポリペプチドのうち、配列番号13～15はカゼイン由来ポリペプチドであり、配列番号16～17はBLG由来ポリペプチドである。

FFVAPFPEVFGK (配列番号13)

YLGYLEQLLR (配列番号14)

NAVPITPTLNR (配列番号15)

VLVLDTDYK (配列番号16)

TPEVDDEALEK (配列番号17)

本発明の方法においては、上記配列番号13～17で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上の有無が検出されればよいが、好ましくはそれらのポリペプチドの全ての有無が検出される。カゼインについては、好ましくは配列番号13～15で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上、より好ましくはそれらのポリペプチドの全ての有無が検出され、BLGについては、好ましくは配列番号16～17で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上、より好ましくはそれらのポリペプチドの全ての有無が検出される。

[0019] 卵については、オボアルブミンの分解産物を、アレルゲン由来ポリペプチドとして検出することができる。本発明の方法の好ましい実施形態においては、アレルゲンが卵の場合、下記配列番号18～21のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを、アレルゲン由来ポリペプチドとして検出する。

YPILPEYLQCVK (配列番号18)

ELINSWVESQTNGIIR (配列番号19)

LTEWTSSNVMEER (配列番号20)

HIATNAVLFFGR (配列番号21)

本発明の方法においては、上記配列番号18～21で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上の有無が検出されればよいが、好

ましくはそれらのポリペプチドの全ての有無が検出される。

[0020] ラッカセイについては、Ara h1-3の分解産物を、アレルゲン由来ポリペプチドとして検出することができる。本発明の方法の好ましい実施形態においては、アレルゲンがラッカセイの場合、下記配列番号22～24のいずれかで示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを、アレルゲン由来ポリペプチドとして検出する。下記ポリペプチドのうち、配列番号22～23はAra h1由来ポリペプチドであり、配列番号24はAra h3由来ポリペプチドである。

DLAFPGSGEQVEK (配列番号22)

VLLEENAGGEQEER (配列番号23)

SPDIYNPQAGSLK (配列番号24)

本発明の方法においては、上記配列番号22～24で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上の有無が検出されればよいが、好ましくはそれらのポリペプチドの全ての有無が検出される。Ara h1については、好ましくは配列番号22～23で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上、より好ましくはそれらのポリペプチドの全ての有無が検出され、Ara h3については、好ましくは配列番号24で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの有無が検出される。

[0021] したがって、アレルゲンがソバ、甲殻類、乳、卵およびラッカセイの場合、検出されるアレルゲン由来ポリペプチドは、好ましくは配列番号1～7で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上と、配列番号8～12で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上と、配列番号13～17で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上と、配列番号18～21で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上と、配列番号22～24で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上であり、より好ましくは、配列番号1～24で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの全てである。

[0022] 上記タンパク分解酵素で処理した試料中における標的アレルゲン由来ポリ

ペプチドの存在の有無を検出する手段としては、クロマトグラフィー分離を利用した分析が好適である。クロマトグラフィー分離を利用した分析としては、液体クロマトグラフィー質量分析、例えば、液体クロマトグラフィータンデム型質量分析（LC-MS/MS）、液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析（LC-TOF/MS）などが挙げられる。測定精度（S/N比）が高くかつ複数ペプチドを一度に検出できることから、LC-MS/MSを用いた多重反応モニタリング（MRM）が好ましい。

[0023] 本発明の方法において、標的アレルゲン由来ポリペプチドの検出に用いるクロマトグラフィーとしては、液体クロマトグラフィー（LC）が好ましく、逆相液体クロマトグラフィー（RPLC）がより好ましい。また好ましくは、該LCは高速液体クロマトグラフィー（HPLC）であり、さらに好ましくはRP-HPLCである。RPLC用の担体としては、シリカゲルやポリマーゲル基材に炭化水素鎖（好ましくはオクタデシル基）を結合した充填剤を有する担体、例えばC18カラム、C8カラムなどが挙げられる。該LCの移動相（溶離液）は、目的の各アレルゲン由来ポリペプチドを個別に分離することができるものであればよく、例えば、ギ酸水溶液（A）とギ酸アセトニトリル水溶液（B）との100：0～0：100（体積比）グラジエント溶液が挙げられるが、これに限定されない。

[0024] 液体クロマトグラフィー質量分析においては、上記LCの溶出物を質量分析（MS/MS、TOF/MS等）にかける。質量分析は、タンデム四重極型質量分析装置、飛行時間型質量分析装置等の公知の質量分析装置を用いて、ペプチドの検出に用いられる通常の条件に従って実施することができる。例えば、エレクトロスプレーイオン化法（ESI）または大気圧化学イオン化法（APCI）を用いた多重反応モニタリング（MRM）が好ましい。質量分析では、溶出物中の各ポリペプチドは、質量数/電荷（ $m/z$ ）に従って分離される。例えば、目的のポリペプチドの $m/z$ 値を予めデータベース化しておくことにより、測定された $m/z$ 値に基づいて、試料中における目的のポリペプチドの有無を検出することができる。

## 実施例

[0025] 以下に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0026] (試薬)

アセトニトリル (和光純薬工業、特級、HPLC用)

トリプシン (和光純薬工業、ブタ脾臓由来 生化学分析用)

ヨードアセトアミド (IA) (和光純薬工業、生化学分析用)

ジチオスレイトール (DTT) (和光純薬工業、生化学分析用)

尿素 (和光純薬工業、特級)

トリフルオロ酢酸 (TFA) (純正化学 特級)

(緩衝液)

A : 0.1 M DTT \_\_ 0.5 M Tris-HCl \_\_ 4 M 尿素 (pH 8.2)  
) 緩衝液

B : 0.5 M Tris-HCl \_\_ 2 M 尿素 (pH 8.2) 緩衝液

[0027] 参考例1 アレルゲン含有試料の調製

検体0.5 gを15 mL ディスポ試験管に採取し、緩衝液A (試験例1～3) または緩衝液B (試験例4～5) を5 mL 加え、3時間 (試験例1～3) または5時間 (試験例4～5) 振とう抽出した。得られた反応物を3000 rpmで5分間遠心分離し、上清を回収した。

[0028] 実施例1 LC-MS/MSによるトリプシン消化物の分析

1) トリプシン消化

アレルゲン分子1 mg または参考例1で調製した上清0.25 mLを1.5 mL用ポリチューブに採取し、緩衝液A (試験例1～3) または緩衝液B (試験例4～5) を0.25 mL加えて完全に溶解させた。得られた溶液に40 mg/mL DTT 50  $\mu$ Lを加えて、37℃で90分間インキュベートし、次いで40 mg/mL IA 50  $\mu$ Lを加えて、37℃で30分間、遮光化でインキュベートした。反応液に50 mM炭酸水素ナトリウム600  $\mu$ Lを加え、次いで10 mg/mLトリプシン50 mM炭酸水素ナトリウム

溶液を100  $\mu$ L 加え、37℃で16時間インキュベートした（pH 7～9）。反応後、TFA 10  $\mu$ L を加えてトリプシンを失活させた。

[0029] 2) 脱塩

OASIS HLB (3 cc、60 mg; Waters) をメタノール1 mL および水2 mL でコンディショニングした。これに1) で得られた反応液の全量を滴下した後、水1 mL で洗浄し、次いで60%アセトニトリル1 mL により溶出した。

[0030] 3) LC-MS/MSによる多重反応モニタリング (MRM)

2) で得られた溶出物を、40℃で窒素乾固後、25%アセトニトリル0.2 mL に溶解させた。得られた溶液をフィルターろ過後、下記条件にてLC-MS/MS MRMを行った。

[0031] (LC-MS/MS装置)

HPLC: Shimadzu Nexera X2

MS/MS: AB SCIEX QTRAP 5500

(HPLC条件)

カラム: Kinetik C18 150 mm  $\times$  2.1 mm、粒径2.6  $\mu$ m

カラム温度: 50℃

カラム流量: 0.3 mL

溶離液A: 0.1%ギ酸; 溶離液B: 0.1%ギ酸アセトニトリル

グラジエント: A:B 95:5 (0 min)  $\rightarrow$  40:60 (20 min)  $\rightarrow$  20:80 (50 min)  $\rightarrow$  95:5 (55 min)  $\rightarrow$  95:5 (90 min)

(質量分析条件)

イオン化法: エレクトロスプレーイオン化法

極性: ポジティブ

スプレー電圧: 5500 V

ターボヒーター温度: 450℃

## [0032] 試験例 1 ソバアレルゲンの検出

22 kDa タンパク質（配列番号 25）を標的アレルゲン分子として、表 1 に示す条件で LC-MS/MS MRM により標的アレルゲン由来ポリペプチドを検出した。結果を図 1 に示す。

[0033] [表1]

| 検出ポリペプチド                   | MRM トランジション |        |
|----------------------------|-------------|--------|
|                            | Q1          | Q3     |
| VQVVGDEGR<br>(配列番号1)       | 479.5       | 632.1  |
|                            |             | 533.0  |
| SVFDDNVQR<br>(配列番号2)       | 540.0       | 746.2  |
|                            |             | 631.1  |
| GQILVVPQGFAVVLK<br>(配列番号3) | 784.5       | 1057.8 |
|                            |             | 958.6  |
| EGLEWVELK<br>(配列番号4)       | 551.6       | 674.3  |
|                            |             | 488.1  |
| NFFLAGQSK<br>(配列番号5)       | 506.6       | 750.4  |
|                            |             | 603.2  |
| GFIVQAR<br>(配列番号6)         | 395.9       | 586.2  |
|                            |             | 473    |
| NDDNAITSPIAGK<br>(配列番号7)   | 658.2       | 786.4  |
|                            |             | 673.2  |

## [0034] 試験例 2 甲殻類アレルゲンの検出

トロポミオシン（配列番号 26）を標的アレルゲン分子として、表 2 に示す条件で LC-MS/MS MRM により標的アレルゲン由来ポリペプチドを検出した。結果を図 2 に示す。

[0035]

[表2]

| 検出ポリペプチド               | MRMトランジション |        |
|------------------------|------------|--------|
|                        | Q1         | Q3     |
| IQLLEEDLER<br>(配列番号8)  | 629.2      | 1016.6 |
|                        |            | 903.4  |
| MDALENQLK<br>(配列番号9)   | 531        | 815.2  |
|                        |            | 744.1  |
| FLAEEADR<br>(配列番号10)   | 475.5      | 690.2  |
|                        |            | 619.1  |
| IVELEEEELR<br>(配列番号11) | 565.1      | 917.5  |
|                        |            | 788.4  |
| LAMVEADLER<br>(配列番号12) | 573.6      | 1033.6 |
|                        |            | 831.4  |

## [0036] 試験例3 食品組成物からのソバアレルゲンおよび甲殻類アレルゲンの検出

ソバまたは甲殻類（エビパウダー）を0.01質量%添加した小麦粉から、参考例1に従ってアレルゲン含有試料を調製した。得られた試料を、実施例1に従ってトリプシン消化、脱塩およびLC-MS/MS MRMにかけ、標的アレルゲン由来ポリペプチドを検出した。対照として、ソバまたは甲殻類無添加小麦粉を用いて同様の分析を行った。検出するソバおよび甲殻類のアレルゲン由来ポリペプチド、およびLC-MS/MS分析の条件は、それぞれ表1および表2と同じとした。測定結果を図3および4に示す。

## [0037] 試験例4 乳、卵およびラッカセイアレルゲンの検出

全粉乳、全卵粉およびラッカセイ粉のそれぞれから、参考例1に従ってアレルゲン含有試料を調製した。各試料を、実施例1の1)～3)に従ってトリプシン消化、脱塩およびLC-MS/MS MRMにかけ、標的アレルゲン由来ポリペプチドを検出した。全粉乳、全卵粉およびラッカセイ粉のそれぞれについての標的アレルゲン分子、および検出したアレルゲン由来ポリペ

プチドを、表3～5に示す。全粉乳、全卵粉およびラッカセイ粉のいずれのアレルゲンも、LC-MS/MS分析で検出することができた（図5～7）

。

[0038] [表3]

乳アレルゲン

| 標的アレルゲン分子                 | 検出ポリペプチド                 | MRMトランジション |       |
|---------------------------|--------------------------|------------|-------|
|                           |                          | Q1         | Q3    |
| カゼイン                      | FFVAPFPEVFGK<br>(配列番号13) | 692.9      | 920.3 |
|                           |                          |            | 991.3 |
|                           | YLGYLEQLLR<br>(配列番号14)   | 634.3      | 249.2 |
|                           |                          |            | 991.3 |
|                           | NAVPITPTLNR<br>(配列番号15)  | 598.3      | 158.3 |
|                           |                          |            | 911.4 |
| $\beta$ ラクトグロブリン<br>(BLG) | VLVLDTDYK<br>(配列番号16)    | 533.3      | 853.4 |
|                           |                          |            | —     |
|                           | TPEVDDEALEK<br>(配列番号17)  | 623.5      | 819.4 |
|                           |                          |            | —     |

[0039] [表4]

卵アレルゲン

| 標的アレルゲン分子 | 検出ポリペプチド                     | MRMトランジション |        |
|-----------|------------------------------|------------|--------|
|           |                              | Q1         | Q3     |
| オボアルブミン   | YPILPEYLQCVK<br>(配列番号18)     | 733.4      | 1092.7 |
|           |                              |            | 979.5  |
|           | ELINSWVESQTNGIIR<br>(配列番号19) | 930.0      | 888.5  |
|           |                              |            | 1017.5 |
|           | LTEWTSSNVMEER<br>(配列番号20)    | 791.4      | 951.4  |
|           |                              |            | 1052.5 |
|           | HIATNAVLFFGR<br>(配列番号21)     | 673.4      | 223.2  |
|           |                              |            | 1095.6 |

## [0040] [表5]

## ラッカセイアレルギー

| 標的アレルギー分子 | 検出ポリペプチド                   | MRMトランジション |       |
|-----------|----------------------------|------------|-------|
|           |                            | Q1         | Q3    |
| Ara h1    | DLAFPGSGEQVEK<br>(配列番号22)  | 688.8      | 930.5 |
|           |                            |            | 300.2 |
|           | VLLEENAGGEQEER<br>(配列番号23) | 786.9      | 989.5 |
|           |                            |            | 804.4 |
| Ara h3    | SPDIYNPQAGSLK<br>(配列番号24)  | 695.4      | 977.5 |
|           |                            |            | 700.4 |

## [0041] 試験例5 食品組成物からの乳およびラッカセイアレルギーの検出

全粉乳および落花生粉のいずれかを添加したパン（添加パン；添加量0.84質量%）、ならびに乳および落花生を含まないパン（無添加パン）を製造した。添加パンと無添加パンを混合し、100倍希釈添加パン（全粉乳および落花生粉の添加量0.0084質量%）を調製した。得られた100倍希釈添加パンに含まれる乳またはラッカセイアレルギー（カゼインおよびAra hを含むラッカセイ可溶性タンパク質）の濃度をELISA法にて測定した（定量下限値1 ppm）。測定結果を表6に示す。

## [0042] [表6]

| アレルギー | 無添加パン<br>(ppm) | 添加パン<br>(ppm) | 100倍希釈添加パン<br>(ppm) |
|-------|----------------|---------------|---------------------|
| 乳     | N.D.           | 625           | 6.5                 |
| ラッカセイ | N.D.           | 745           | 8.7                 |

[0043] 次に、無添加パンおよび100倍希釈添加パンから参考例1に従ってアレルギー含有試料を調製した。得られた試料を、実施例1に従ってトリプシン消化、脱塩およびLC-MS/MS MRMにかけ、標的アレルギー由来ポリペプチドを検出した。検出対象には、乳についてはカゼイン由来ポリペプチド（配列番号13～15）、ラッカセイについてはAra h1またはh3由来ポリペプチド（配列番号22～24）を選択した。

[0044] その結果、100倍希釈添加パンについて、乳アレルギー（カゼイン）およびラッカセイアレルギー（Ara h1またはh3）のピークを十分な感度で確認することができた（図8および9）。さらに、500倍希釈添加パンを用いた同様のLC-MS/MS MRM測定でも、ピークのS/Nが10以上あることが確認された。他方、無添加パンではピークは確認されなかった。したがって、本発明の方法によれば、ELISA法と同等の測定感度（定量下限値1 ppm）でアレルギーを検出することができる。

## 請求の範囲

- [請求項1] 試料中のアレルゲンを検出する方法であって、  
試料をタンパク質分解酵素で処理すること、および  
クロマトグラフィー分離を利用した分析により、該酵素処理した試料中におけるアレルゲン由来ポリペプチドの存在の有無を検出することを含み、  
該アレルゲンが、ソバ、甲殻類、乳、卵およびラッカセイからなる群より選択される1種以上である、  
方法。
- [請求項2] 前記アレルゲンがソバおよび／または甲殻類である、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 前記アレルゲンがソバ、甲殻類、乳、卵およびラッカセイである、請求項1記載の方法。
- [請求項4] 前記アレルゲンがソバであり、前記アレルゲン由来ポリペプチドが、配列番号1～7で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上である、請求項1記載の方法。
- [請求項5] 前記アレルゲンが甲殻類であり、前記アレルゲン由来ポリペプチドが、配列番号8～12で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上である、請求項1記載の方法。
- [請求項6] 前記アレルゲン由来ポリペプチドが、配列番号1～7で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上と、配列番号8～12で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上である、請求項2記載の方法。
- [請求項7] 前記アレルゲン由来ポリペプチドが、配列番号1～7で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上と、配列番号8～12で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上と、配列番号13～17で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上と、配列番号18～21で示されるアミノ

酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上と、配列番号22～24で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドのいずれか1種以上である、請求項3記載の方法。

[請求項8] 配列番号1～7で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの全てについて存在の有無を検出する、請求項4記載の方法。

[請求項9] 配列番号8～12で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの全てについて存在の有無を検出する、請求項5記載の方法。

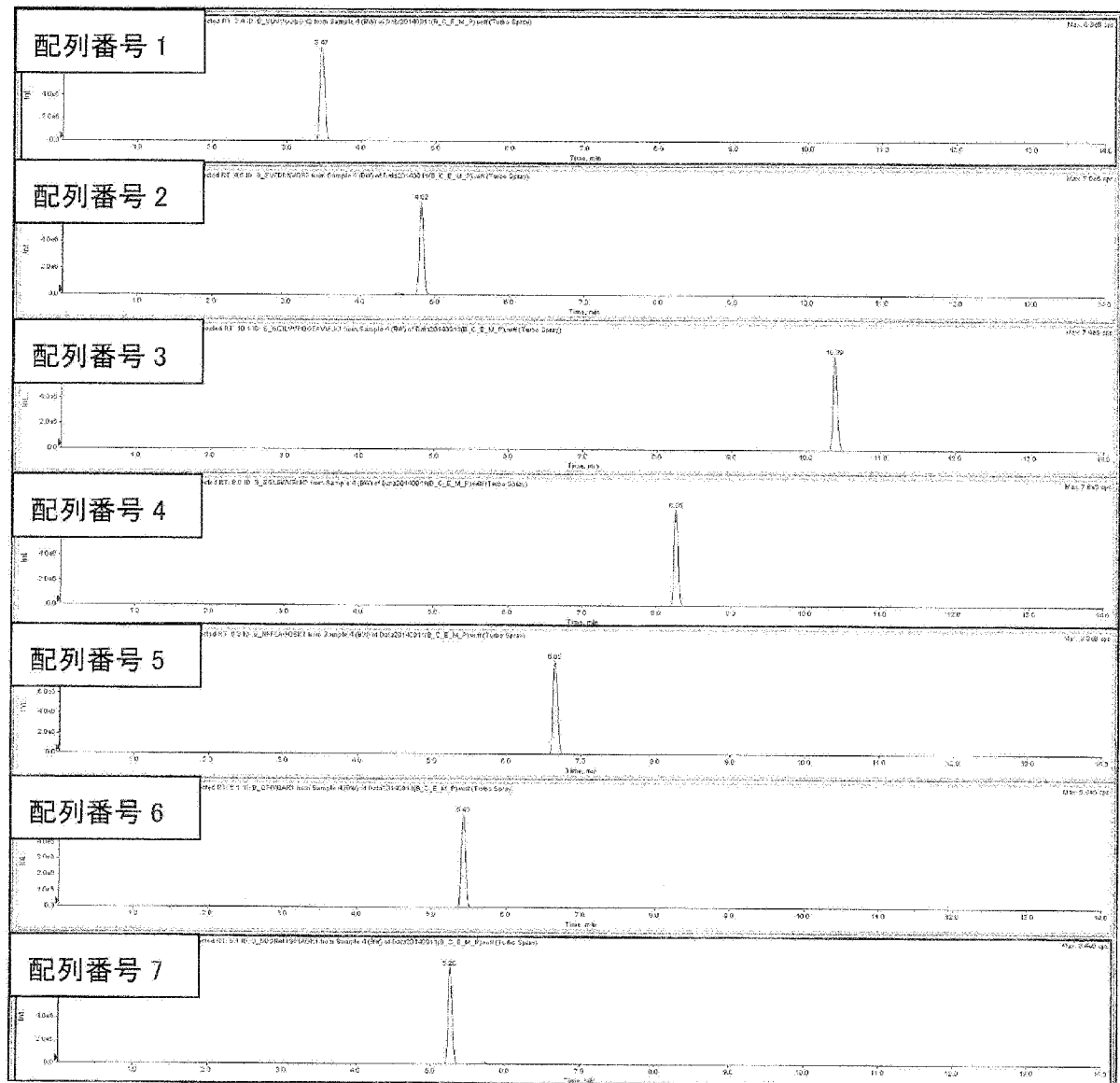
[請求項10] 配列番号1～12で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの全てについて存在の有無を検出する、請求項6記載の方法。

[請求項11] 配列番号1～24で示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドの全てについて存在の有無を検出する、請求項7記載の方法。

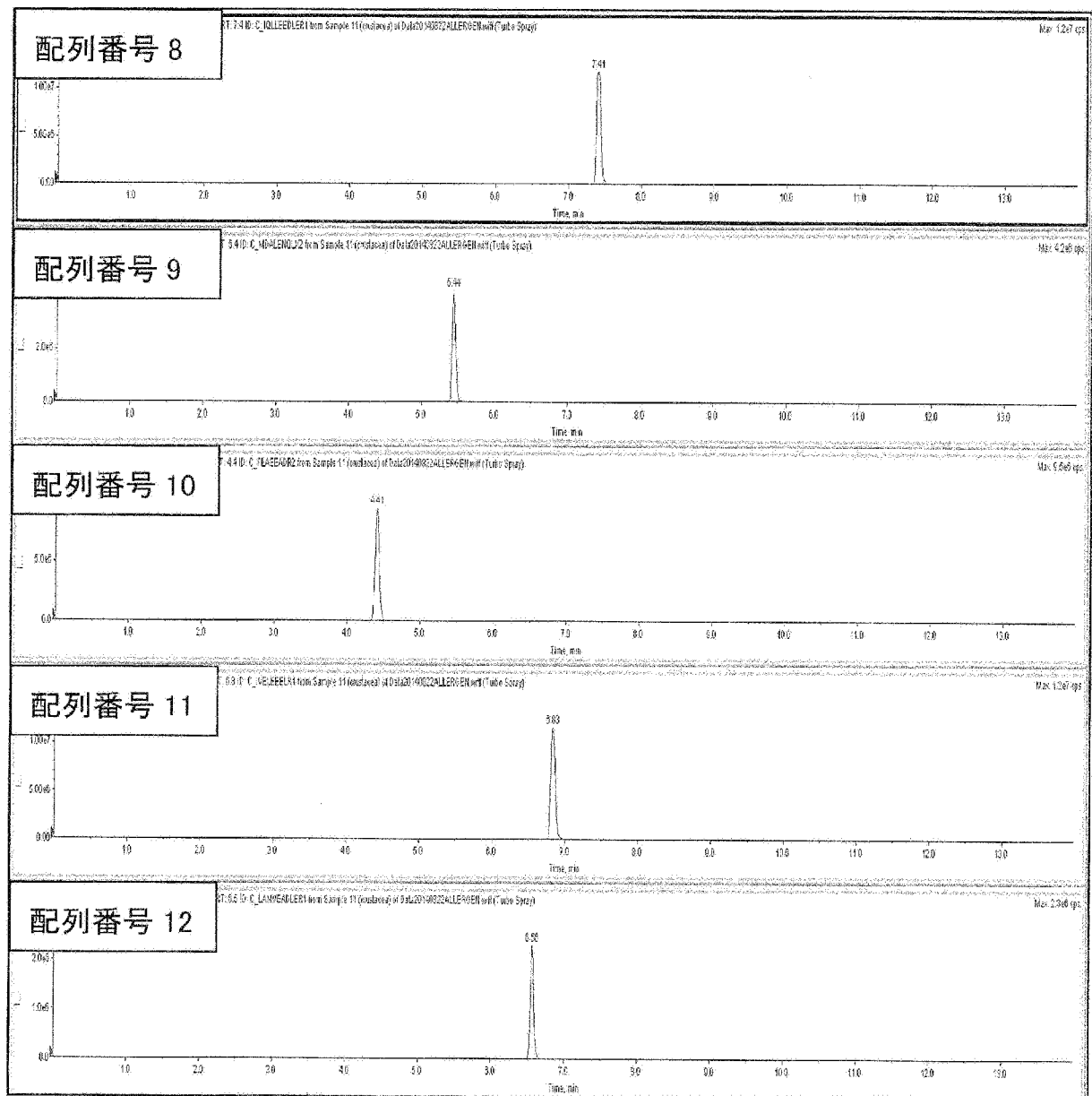
[請求項12] 前記クロマトグラフィー分離を利用した分析が液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（LC-MS/MS）である、請求項1～11のいずれか1項記載の方法。

[請求項13] 前記タンパク質分解酵素がトリプシンである請求項1～12のいずれか1項記載の方法。

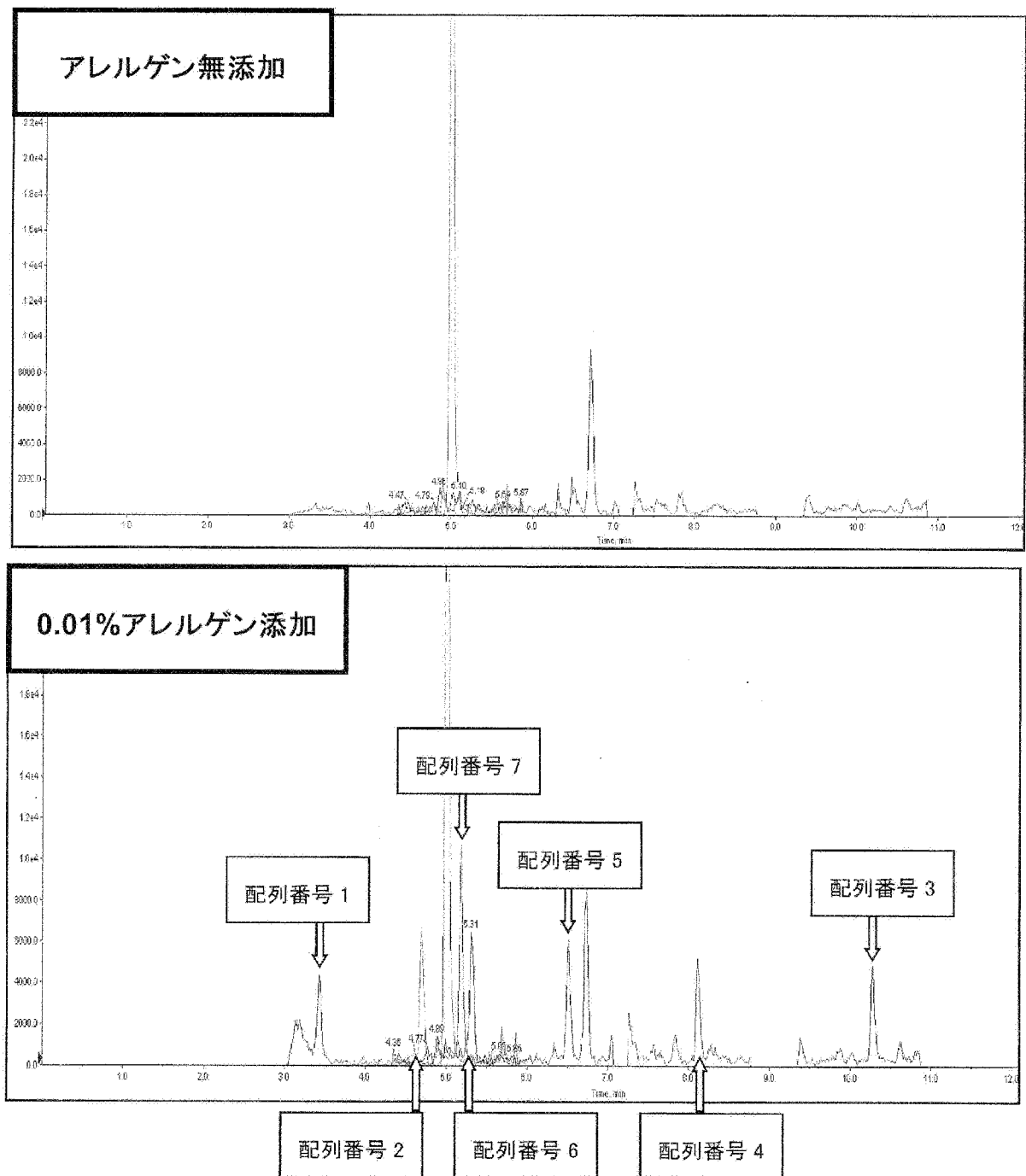
[図1]



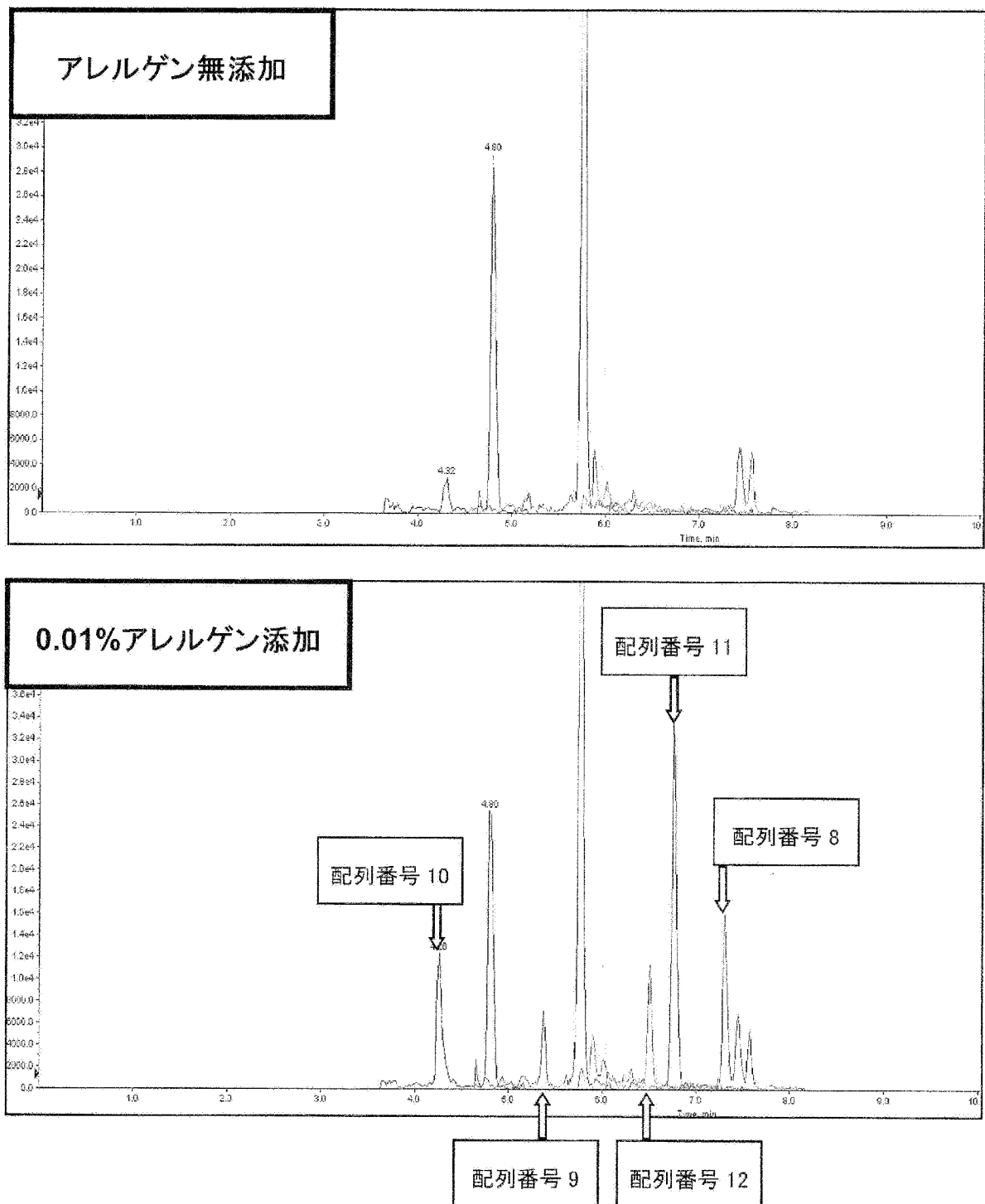
[図2]



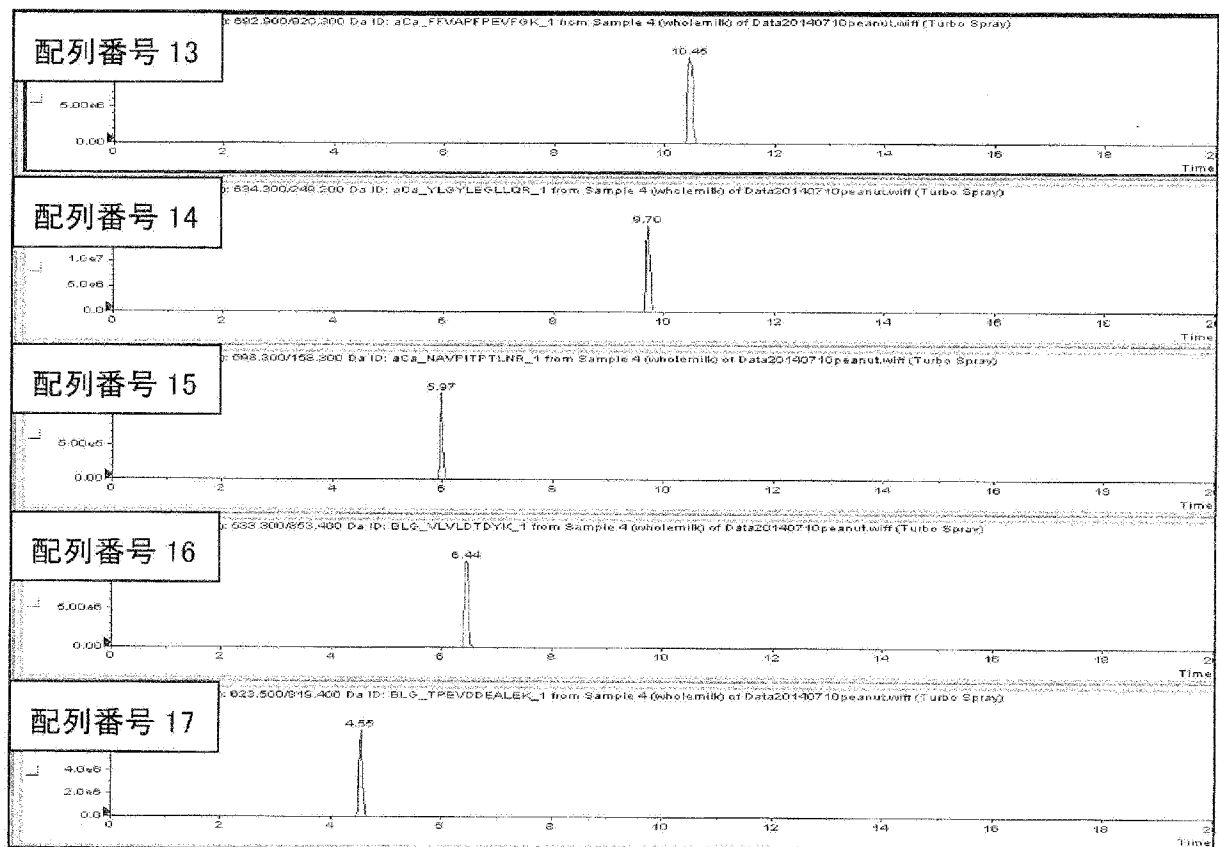
[図3]



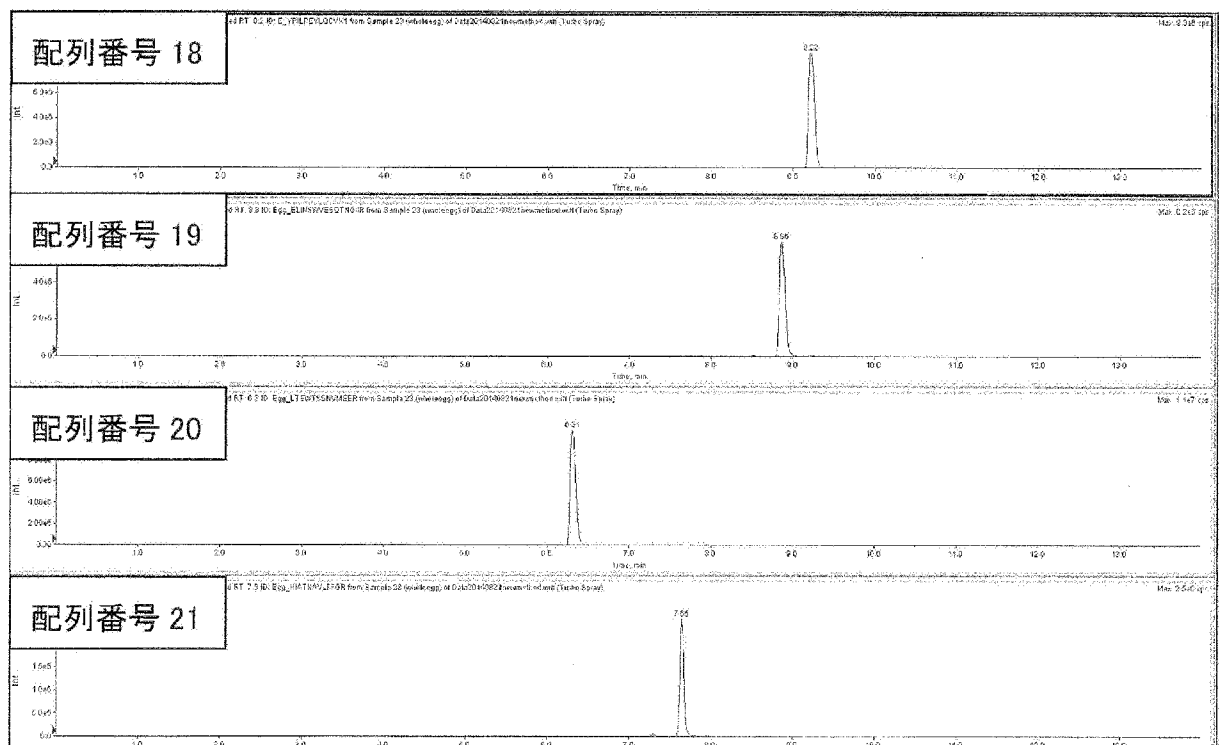
[図4]



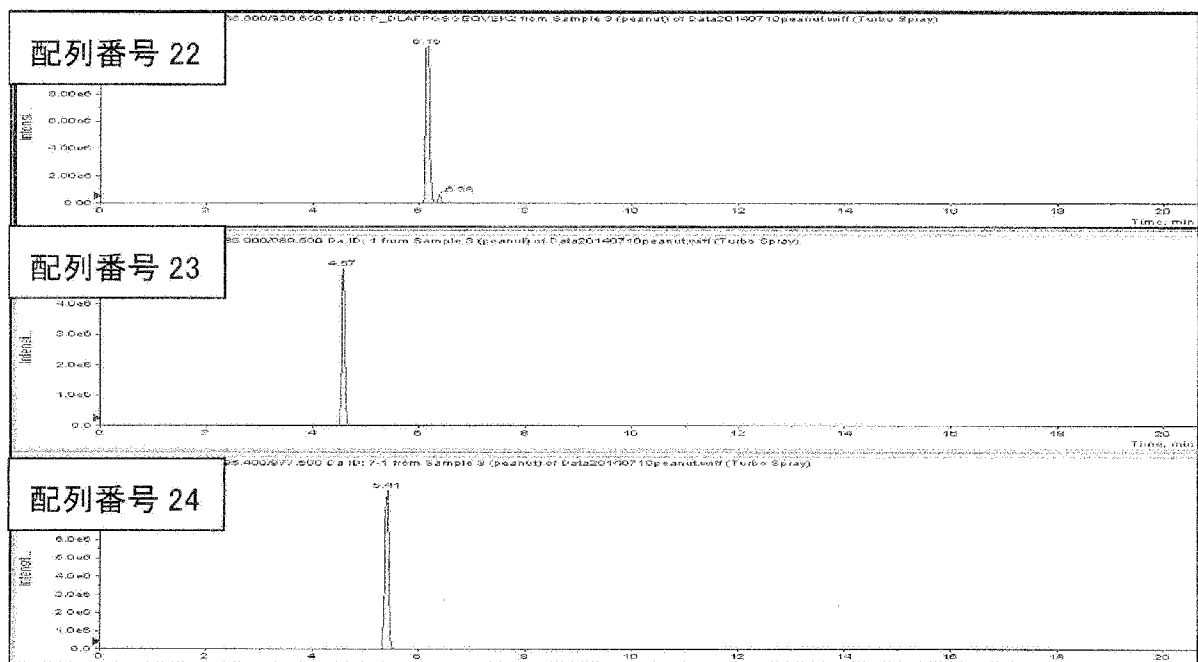
[図5]



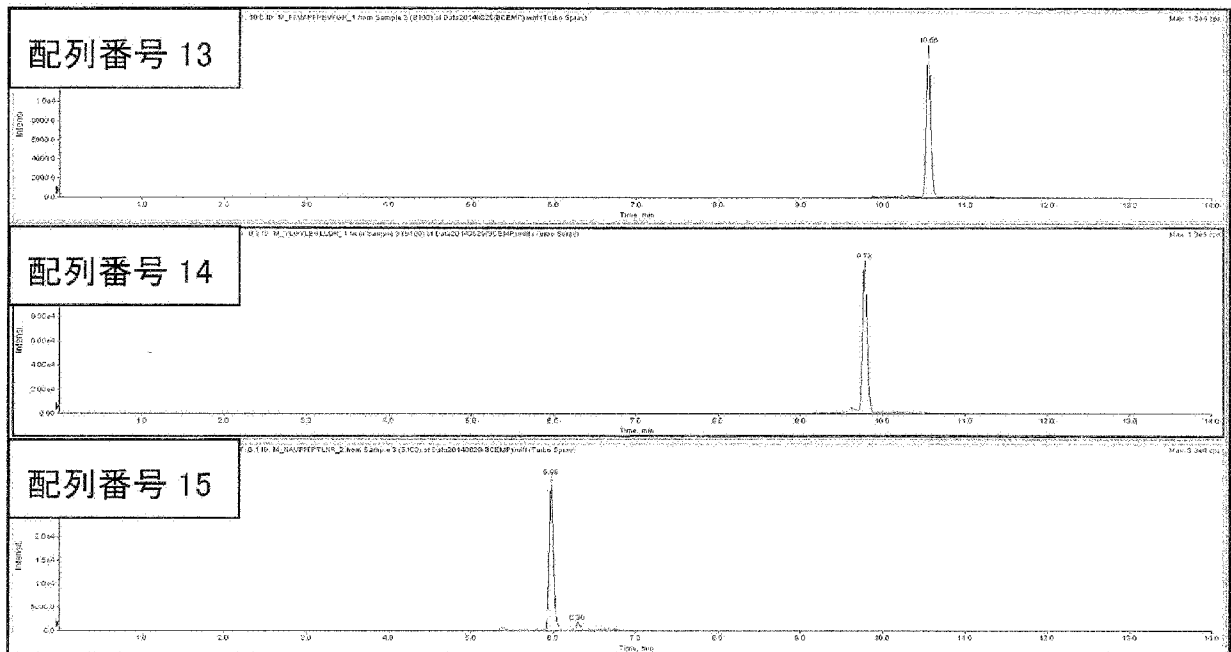
[図6]



[図7]



[図8]



[illegible]

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/026179

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N30/88(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i, G01N30/06(2006.01)i, G01N30/72(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N30/88, G01N27/62, G01N30/06, G01N30/72, G01N33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

|                           |           |                            |           |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho       | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2017 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2017 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2017 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),  
CAPLUS/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                      | Relevant to claim No.     |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| X<br>Y    | NAGAI, H. et al., Development of a Method for Crustacean Allergens Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, Journal of AOAC International, 2015.10, Vol. 98, No. 5, pp. 1355-1365                                                                                                                          | 1-2, 5, 12-13<br>3-4, 6-7 |
| X<br>Y    | KORTE, R. et al., New High-Performance Liquid Chromatography Coupled Mass Spectrometry Method for the Detection of Lobster and Shrimp Allergens in Food Samples via Multiple Reaction Monitoring and Multiple Reaction Monitoring Cubed, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016.07.08, Vol. 64, pp. 6219-6227 | 1-2, 12-13<br>3-4, 6-7    |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 August 2017 (07.08.17)

Date of mailing of the international search report  
22 August 2017 (22.08.17)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office  
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,  
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/026179

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                      | Relevant to claim No.  |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| X<br>Y    | Hiroyuki NAGAI et al., "Development of analytical method for egg and milk allergens in processed foods by LC-MS/MS", Report of Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences, 2014, vol.22, pages 1 to 5                    | 1,12-13<br>2-4,6-7     |
| X<br>Y    | ANSARI, P. et al., Selection of possible marker peptides for the detection of major ruminant milk proteins in food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Analytical Bioanalytical Chemistry, 2011, Vol. 399, pp. 1105-1115                 | 1,12-13<br>2-4,6-7     |
| X<br>Y    | CHASSAIGNE, H. et al., Proteomics-Based Approach To Detect and Identify Major Allergens in Processed Peanuts by Capillary LC-Q-TOF (MS/MS), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, Vol. 55, pp. 4461-4473                                    | 1,12-13<br>2-4,6-7     |
| X<br>Y    | LOCK, S. et al., The Detection of Allergens in Bread and Pasta by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, Food & Environmental, AB SCIEX, 2010, pp. 1-5                                                                                         | 1,12-13<br>2-4,6-7     |
| Y<br>A    | YANO, M. et al., Purification and Properties of Allergenic Proteins in Buckwheat Seeds, Agricultural Biological Chemistry, 1989, Vol. 53, No. 9, pp. 2387-2392                                                                                          | 1-4,6-7,<br>12-13<br>8 |
| Y<br>A    | TAKAOKA, M. et al., Changes in Proteome Patterns in Buckwheat Seed under Submergence, Proceeding of the 9th International Symposium on Buckwheat, 2004, pp. 95-98                                                                                       | 1-4,6-7,<br>12-13<br>8 |
| P,X       | NAGAI, H., Development of a Method for Determination of Buckwheat Allergens Using Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry, Journal of AOAC International, 2017.03.03, Vol.100, No.4, pp. 1051-057                                           | 1-2,4,12-13            |
| A         | RAHMAN, A.M.A. et al., Analysis of the allergic proteins in black tiger prawn (Penaeus monodon) and characterization of the major allergen tropomyosin using mass spectrometry, RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, 2010, Vol. 24, pp. 2462-2470 | 1-3,5-7,9-13           |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N30/88(2006.01)i, G01N27/62(2006.01)i, G01N30/06(2006.01)i, G01N30/72(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N30/88, G01N27/62, G01N30/06, G01N30/72, G01N33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

|             |            |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報   | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2017年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2017年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2017年 |

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)  
CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                              | 関連する<br>請求項の番号            |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| X<br>Y          | NAGAI, H. et al., Development of a Method for Crustacean Allergens Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, Journal of AOAC International, 2015.10, Vol. 98, No. 5, pp. 1355-1365 | 1-2, 5, 12-13<br>3-4, 6-7 |

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.08.2017

国際調査報告の発送日

22.08.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大瀧 真理

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

2 J

6202

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                         |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 関連する<br>請求項の番号          |
| X<br>Y                | KORTE, R. et al., New High-Performance Liquid Chromatography Coupled Mass Spectrometry Method for the Detection of Lobster and Shrimp Allergens in Food Samples via Multiple Reaction Monitoring and Multiple Reaction Monitoring Cubed, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016.07.08, Vol. 64, pp. 6219-6227 | 1-2, 12-13<br>3-4, 6-7  |
| X<br>Y                | 永井宏幸ほか, LC-MS/MS を用いたアレルギー物質検査法開発, 岐阜県保健環境研究所報, 2014, Vol. 22, pp. 1-5                                                                                                                                                                                                                                                  | 1, 12-13<br>2-4, 6-7    |
| X<br>Y                | ANSARI, P. et al., Selection of possible marker peptides for the detection of major ruminant milk proteins in food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Analytical Bioanalytical Chemistry, 2011, Vol. 399, pp. 1105-1115                                                                                 | 1, 12-13<br>2-4, 6-7    |
| X<br>Y                | CHASSAIGNE, H. et al., Proteomics-Based Approach To Detect and Identify Major Allergens in Processed Peanuts by Capillary LC-Q-TOF (MS/MS), Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, Vol. 55, pp. 4461-4473                                                                                                    | 1, 12-13<br>2-4, 6-7    |
| X<br>Y                | LOCK, S. et al., The Detection of Allergens in Bread and Pasta by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, Food & Environmental, AB SCIEX, 2010, pp. 1-5                                                                                                                                                         | 1, 12-13<br>2-4, 6-7    |
| Y<br>A                | YANO, M. et al., Purification and Properties of Allergenic Proteins in Buckwheat Seeds, Agricultural Biological Chemistry, 1989, Vol. 53, No. 9, pp. 2387-2392                                                                                                                                                          | 1-4, 6-7,<br>12-13<br>8 |
| Y<br>A                | TAKAOKA, M. et al., Changes in Proteome Patterns in Buckwheat Seed under Submergence, Proceeding of the 9th International Symposium on Buckwheat, 2004, pp. 95-98                                                                                                                                                       | 1-4, 6-7,<br>12-13<br>8 |
| P X                   | NAGAI, H., Development of a Method for Determination of Buckwheat Allergens Using Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry, Journal of AOAC International, 2017.03.03, Vol. 100, No. 4, pp. 1051-1057                                                                                                        | 1-2, 4, 12-13           |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                                                                                                    |                |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                                                                                  | 関連する<br>請求項の番号 |
| A                     | RAHMAN, A. M. A. et al., Analysis of the allergic proteins in black tiger prawn ( <i>Penaeus monodon</i> ) and characterization of the major allergen tropomyosin using mass spectrometry, RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, 2010, Vol. 24, pp. 2462-2470 | 1-3, 5-7, 9-13 |