

# 食品中アクリルアミドの 免疫測定系の開発



MioBS

高橋美津子<sup>1)</sup>、岡田展広<sup>1)</sup>、山本貴之<sup>1)</sup>、加藤正俊<sup>1)</sup>、本庄勉<sup>1)</sup>、  
堤内要<sup>2)</sup>、古賀秀徳<sup>3)</sup>、漆山哲生<sup>4)</sup>、浮穴学宗<sup>4)</sup>

1)株式会社森永生科学研究所、2)中部大学、  
3)カルビー株式会社、4)農林水産省消費・安全局

## 食品製造過程で生成されるアクリルアミド (AA)

還元糖＋アスパラギン→高温加熱→アクリルアミド( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ; MW=71)

・・・食品製造過程で非意図的に生成される、健康を害する危険性あり！

### 【低減化対策】

世界的には、Codex委員会(FAO/WHO合同食品規格委員会)が

「食品中のAA低減のための実施規範」を採択（2009年7月）

日本では、農林水産省が低減化対策を促進するよう企業に対して指導

### 【問題点】

低減化技術開発のためには定量が必須であるが、確立された定量法（LC/MS、LC/MS/MS、GC/MS）は高コスト・高い分析技術が要求されるため、普及が困難

↓

安価で迅速・簡便なAA分析法の早急な開発が求められている

農林水産省「平成21年度新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」

「食品中のAAを簡易・迅速に測定できる分析技術の開発」

（中部大学・カルビー(株)・(株)森永生科学研究所）

当社は、その一環として免疫測定系(ELISA)の開発を行った

## 抗体作製と間接競合ELISA法

AAは低分子量化合物であるため、

- ・ AA自体を動物に免疫しても抗体は得られない
- ・ サンドイッチELISA法は成功の可能性が低い



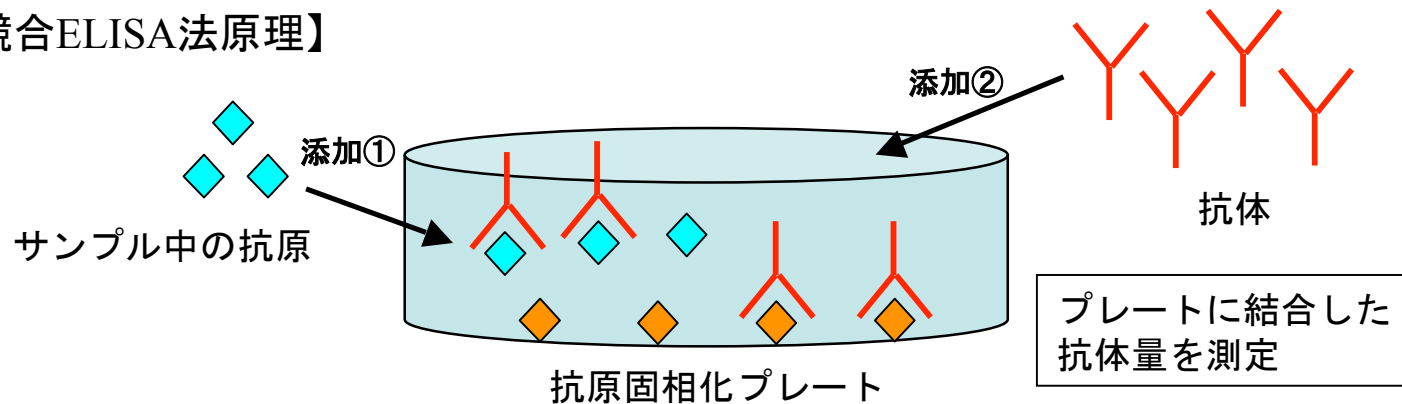
AAの間接競合ELISA法開発を想定し、

AA誘導体である3-[(2-carbamoyl)ethyl]thio] benzoic acid (3-CTBA)を

ハプテンとしてタンパク質に結合し、

これを免疫原としてポリクローナル抗体を得た。

### 【間接競合ELISA法原理】



# 食品サンプル抽出操作

サンプル抽出  
(約2時間/10検体)

## Step 1 【サンプル抽出】

試料 5 g に蒸留水 95 g を加えてポリトロンでホモジナイズ (2 min/検体)



遠心分離で上清を採取 (20 min)



上清を0.45 $\mu$ mフィルタで濾過 (1 min/検体)



濾液を Isoluteカラムに通し、素通り画分を採取 (5 min/検体)

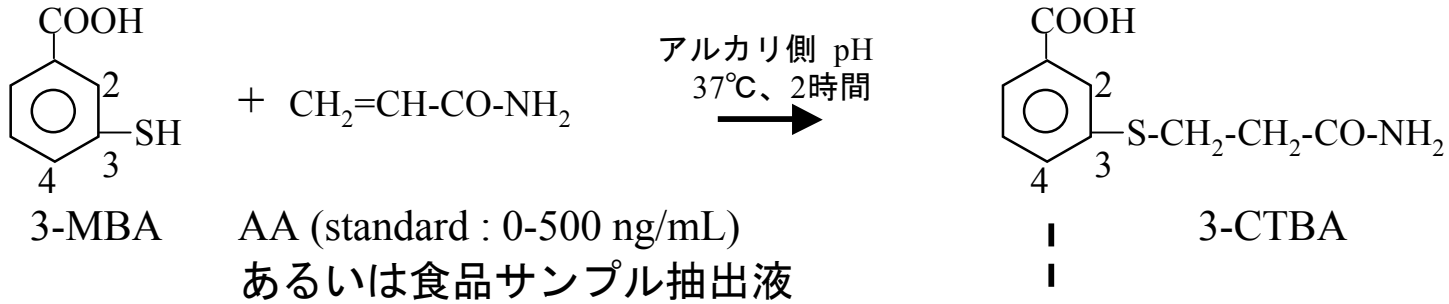


(Step 2へ)

# 誘導体調製と間接競合ELISA測定

Step 2 【誘導体調製】 (試験管中)

誘導体調製  
(正味2時間)



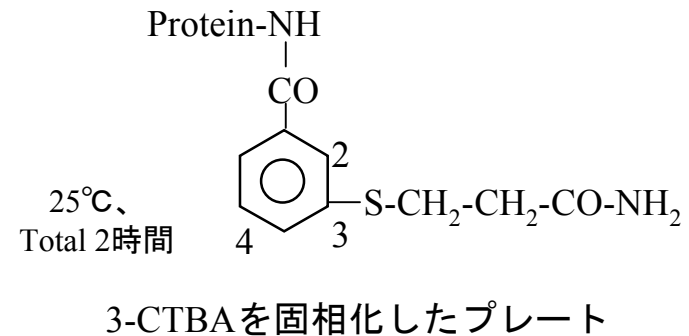
添加①

ELISA測定  
(正味2時間)

Step 3 【 ELISA 】 (イムノプレート上)

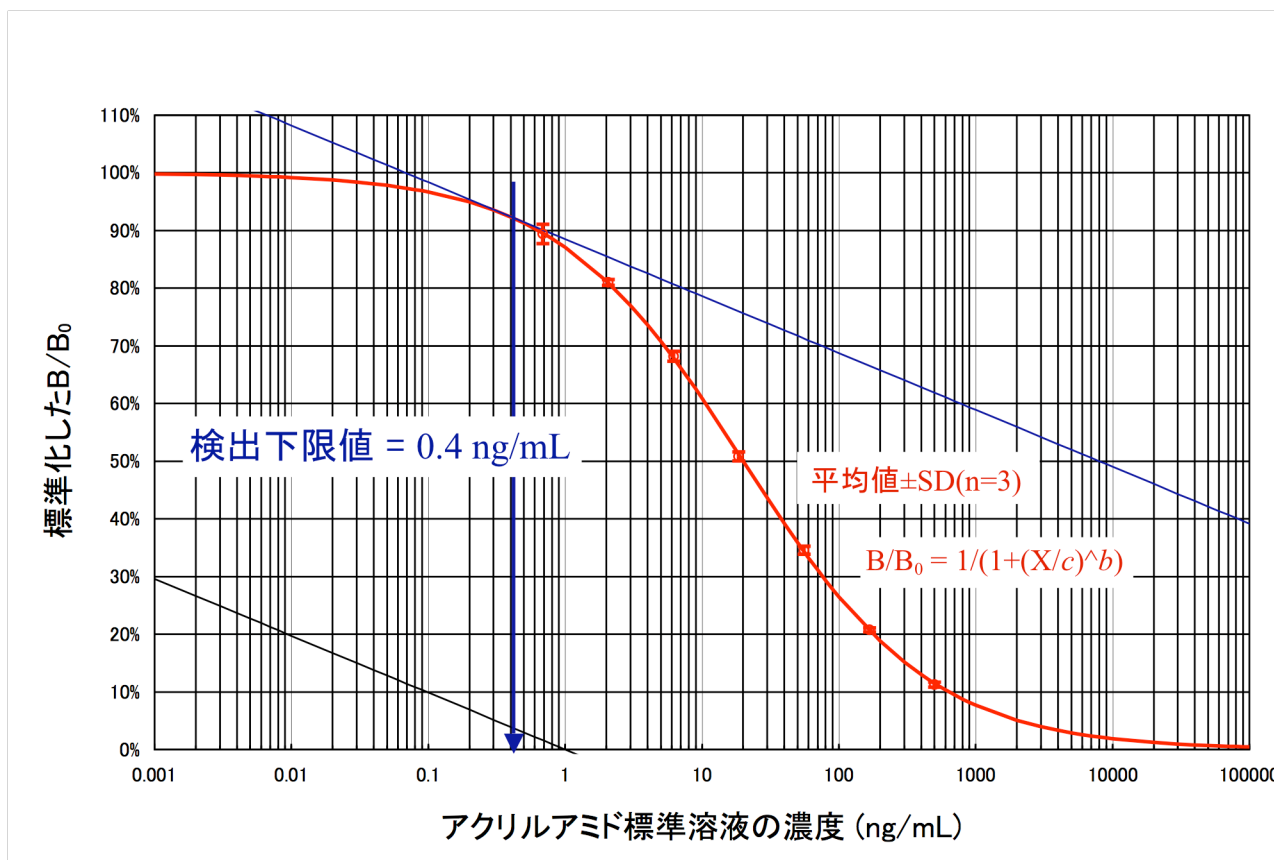
抗3-CTBAポリクローナル抗体

添加②



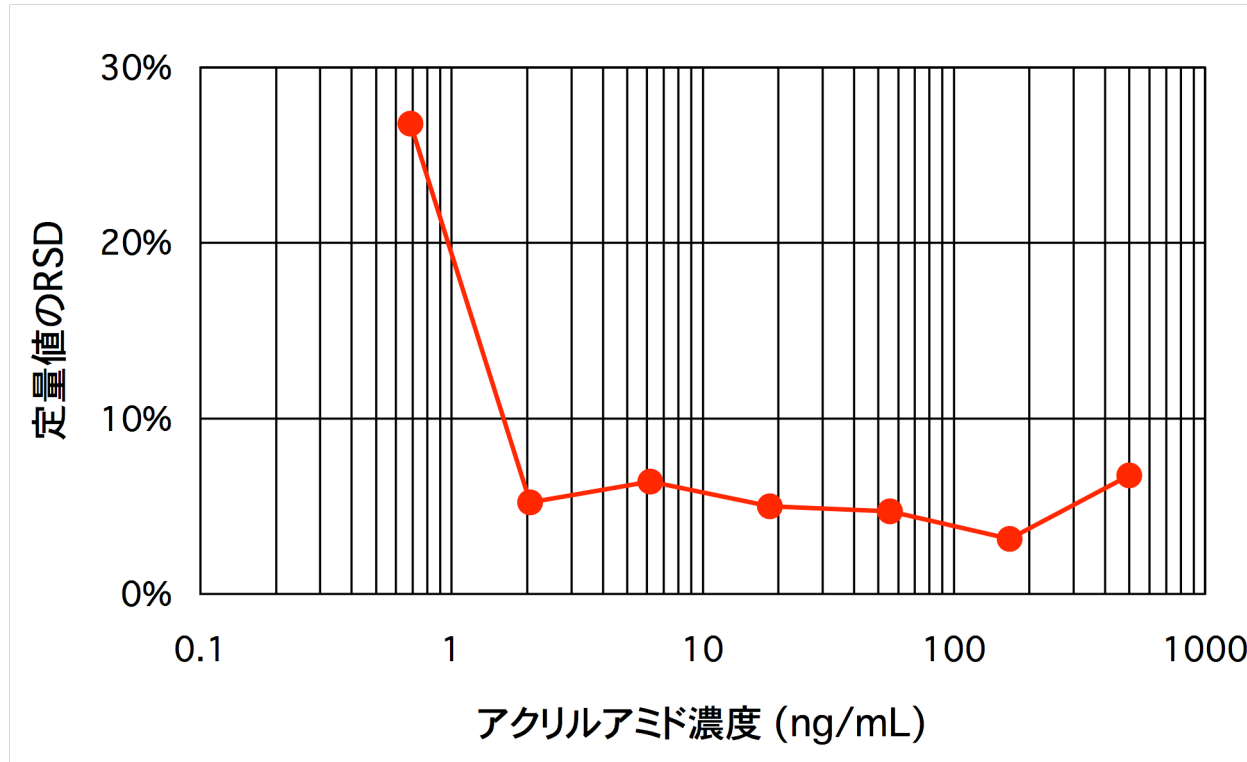
プレートに結合した抗体量を指標としてAAを定量

## 抗3-CTBAポリクローナル抗体を用いた間接競合ELISA法の 検量線と検出下限値



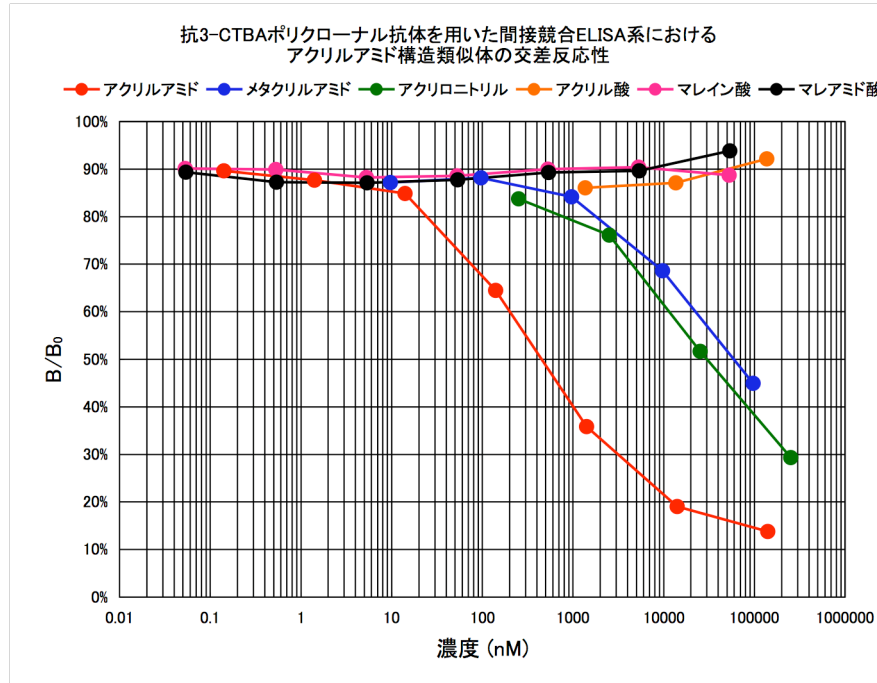
検出下限値は、ISO 11843-5:2008(E) [Capability of detection; Part 5: Methodology in the linear and non-linear calibration cases]に記載の方法によって求めた。

## 抗3-CTBAポリクローナル抗体を用いた間接競合ELISA法による 定量値の誤差プロファイル (n=3)



定量範囲（相対標準偏差 $\leq 10\%$ ）は、  
1.5-500 ng/mL = 90-30,000 ng/g 食品

# 抗3-CTBAポリクローナル抗体を用いた間接競合ELISA法における アクリルアミド構造類似体の交差反応性



アクリルアミド



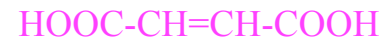
メタクリルアミド



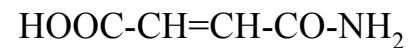
アクリロニトリル



アクリル酸



マレイン酸



マレアミド酸

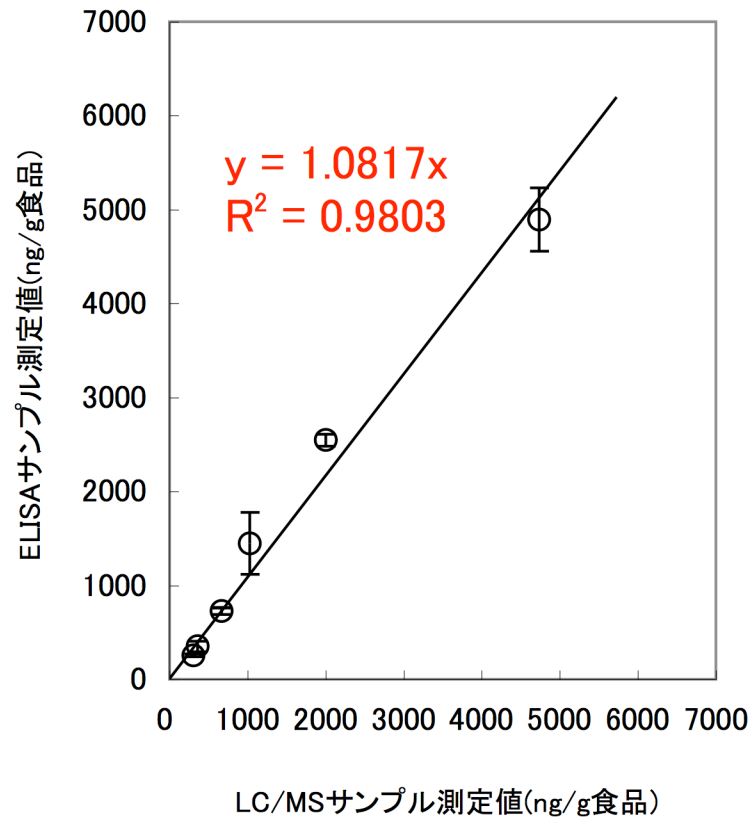
アクリルアミドを100%とした時の交差反応率(%)

構造類似体	IC <sub>50</sub> (nM)	1/IC <sub>50</sub> (nM <sup>-1</sup> )	交差反応率 (%)
アクリルアミド	430	0.00233	100%
メタクリルアミド	60000	0.00002	0.72%
アクリロニトリル	30000	0.00003	1.43%
アクリル酸	>1000000	<0.000001	<0.04%
マレイン酸	>1000000	<0.000001	<0.04%
マレアミド酸	>1000000	<0.000001	<0.04%



# ELISA法とLC/MS法によるモデルサンプル測定値の相関

ポテトチップスモデルサンプル6品目の相関  
(n=3 平均値±SD)



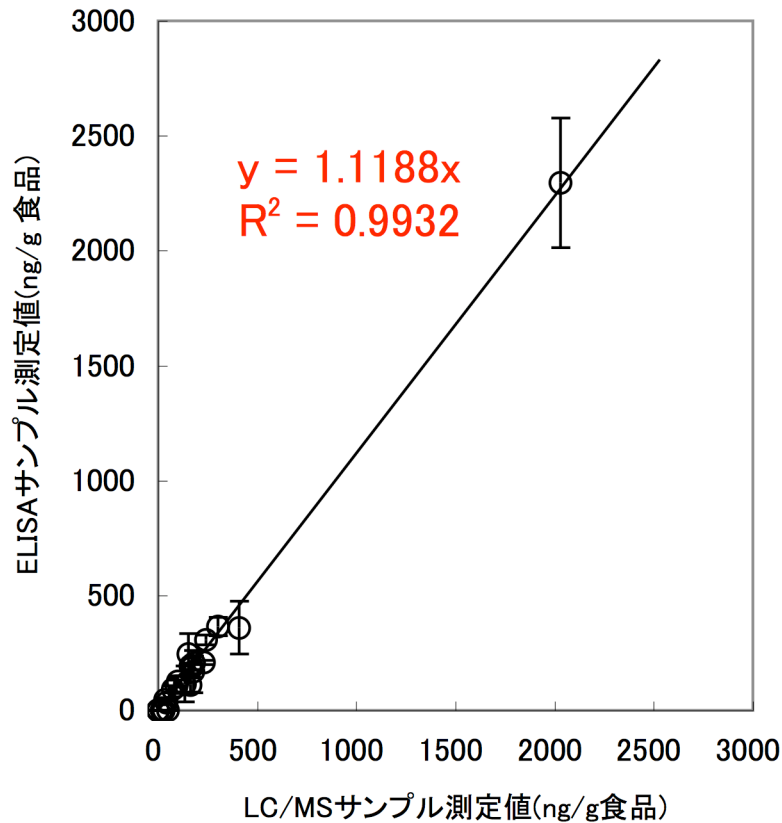
サンプルNo.	LC/MS (ng/g食品)	ELISA 平均値±SD (ng/g食品)
①	4733	4894 ± 340
②	2002	2546 ± 63
③	1031	1446 ± 333
④	667	729 ± 38
⑤	364	351 ± 55
⑥	303	256 ± 15

モデルサンプル①～⑥はカルビー(株)様にAAの含量が異なるように加工度を変えて作製いただいたもの

LC/MS測定は森永製菓(株)研究所分析研究室にて実施スクリーニング的に行った為1回測定となる

# ELISA法とLC/MS法による市販食品測定値の相関

市販食品25品目の相関( n=3 平均値±SD )



食品名	主原材料	LC/MS (ng/g食品)	ELISA 平均値±SD (ng/g食品)
ビスケットA社	小麦	182	206 ± 30
ビスケットB社	小麦	171	186 ± 41
乳幼児用 ビスケットA社	小麦	nd	nd
乳幼児用 ビスケットC社	小麦	164	192 ± 15
乳幼児用 ビスケットD社	小麦	75	92 ± 15
クラッカーE社	小麦	34	47 ± 7
バタークラッカーF社	小麦	410	359 ± 115
かりんとう	小麦	243	306 ± 21
食パン	小麦	49	nd
ドーナツ	小麦	28	nd
コーンスナック	とうもろこし	93	103 ± 28
コーンフレーク	とうもろこし	19	nd
揚げ煎餅	米	99	125 ± 25
マッシュポテト	馬鈴薯	43	33 ± 9
ポテトスナック	馬鈴薯	2031	2296 ± 283
フレンチフライ	馬鈴薯	230	208 ± 9
芋けんぴ	さつまいも	162	110 ± 30
黒砂糖	さとうきび	151	246 ± 89
ココア	カカオ豆	178	169 ± 92
ブラックチョコレート	カカオ豆	134	115 ± 78
焼豆腐	大豆	<6	nd
厚揚げ	大豆	<6	nd
ほうじ茶葉	茶葉	303	365 ± 40
紅茶葉	茶葉	<6	nd
緑茶葉	茶葉	<6	nd

nd: not detected

## 本分析法の利点

本分析法=3-MBAを用いてAAを定量的に3-CTBAに誘導体化したあと  
抗3-CTBA抗体を用いた間接競合ELISA法により定量する

- 初期投資は100万円程度（マイクロプレートリーダーなど）
- 1 検体あたりの分析コストはLC/MSの1/10程度（安価）
- 分析の所要時間は 6 時間以内、分析技術の習熟は容易（迅速）
- 多検体同時測定が可能



従来の分析法=LC/MS、LC/MS/MS、GC/MS

- 高額な初期投資（数千万円）、維持費が高価
- 高い分析技術が必要
- 外部委託では、1 検体あたりの分析コスト30,000円程度で結果を入手するまでに1週間以上かかる

1. 抗3-CTBAポリクローナル抗体を用いた間接競合ELISA法の性能
  - 1) 検出下限値は0.4 ng/mL、  
定量範囲（相対標準偏差 $\leq 10\%$ ）は1.5～ 500 ng/mL  
すなわち、90～ 30,000ng/g 食品であり実用的な検出・定量感度である。
  - 2) 抗体はAA構造類似体にはほぼ反応せずAA(3-CTBA)に高い特異性を有する。
  - 3) 食品サンプル測定値のLC/MS法との相関係数は $R^2=0.98\sim 0.99$ と良好であり、広範囲な食品のAA分析に利用できる。
2. 本分析法の利点は、安価・簡便・迅速に多検体同時測定できることである。
3. 早期のキット化と市場への供給を目指して開発を継続中である。