

食品品質管理と免疫測定技術

－ アクリルアミドの免疫測定について －

株式会社 森永生科学研究所
小路 正博

本日の内容

- はじめに — 弊社の紹介
- アクリルアミドについて
- アクリルアミドの免疫測定
- まとめ

□ はじめに — 弊社の紹介

森永生科学研究所とは？

(株)森永生科学研究所は森永製菓株式会社の100%子会社で、森永製菓グループのバイオビジネス分野を担っている。

©MORINAGA&CO.LTD



何をしているの？

事業活動は分析、特に**免疫測定**に特化、免疫測定技術を使った分析用キットを製造・販売している。

創薬支援分野

マウス・ラット
インスリン測定キット等

食物アレルギー測定キット

食品安全分野

飼料検査キット

測定感度の良さから
海外でも高いシェア！

特徴ある抽出方法で
高い検出率！

□ アクリルアミドについて

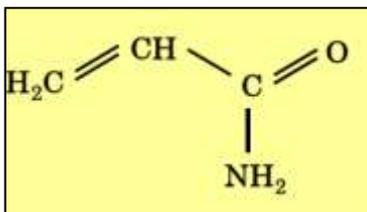
農水省「食品中のアクリルアミドに関する情報」より抜粋

http://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/acryl_amide/index.html

アクリルアミドについてー I

Q.1 アクリルアミドとは何か？

A.1 アクリルアミドは、ポリアクリルアミドの原料として製造されている化学物質



アクリルアミド
(CAS 79-06-1)
分子量：71

Q.2 食品とアクリルアミドの関係は何か？

A.2 アクリルアミドは加熱調理した食品に広く含まれている。

食品中のアクリルアミド濃度（例）

食品	アクリルアミド濃度 (ng/g)
ポテトチップス	117~3,770
フライドポテト	59~5,200
じゃがいも(生)	<10~50
ケーキ・パイ類	18~3,324
朝食用シリアル	11~1,057
インスタントコーヒー	195~4,948
ほうじ茶、ウーロン茶	<9~567
煎り大麦	140~578
缶瓶詰め黒オリーブ	123~1,925

コーデックス委員会食品添加物汚染物質部会
第38回会合討議文書 (2006年)

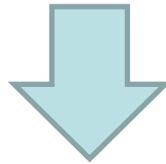
アクリルアミドについてーⅡ

Q.3 なぜ食品にアクリルアミドがあるのか？

A.3 食品の原材料に含まれているある特定のアミノ酸と糖類が、揚げる、焼く、焙るなどの加熱処理（120℃以上）により反応し、アクリルアミドができる。

Q.4 なぜ食品中のアクリルアミドが問題なのか？

A.4 摂取することによりヒトの健康に悪い影響がある。
ヒトがアクリルアミドを大量に摂取した場合、神経障害を起こすことが確認されている。また動物実験の結果から、発がん性がある物質と考えられている。



食品中に、ヒトに有害な、アクリルアミドが含まれていることは、世界中の人々に衝撃を与え、食品中のアクリルアミドを低減するための取組みが進められている。

□ アクリルアミドの免疫測定

食品中のアクリルアミド低減と測定

2009年、CODEX委員会は食品を通して摂取するアクリルアミドがヒトの健康に悪影響をおよぼす可能性があるため、「食品中のアクリルアミド低減のための実施規範」を採択した。
これを受け、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働きかけている。



原材料の選択、配合比率や組成の見直し、調理加工条件の見直し、等でアクリルアミドの低減化を図る。

食品中にどの程度アクリルアミドが含まれているのか、
低減化対策によりどの程度濃度が下がったのか、
これらを確認するためアクリルアミドの測定が必要

アクリルアミドの測定方法

アクリルアミド測定には機器分析
HPLC/MS LC/MS GC/MSが使われている。

しかし、これらの方法は高価で、試料の前処理が必要、
時間がかかる。弊社では、これまで培った免疫測定技術を
生かし、**免疫測定法の開発**を担当する。

**迅速・簡便・安価・多検体同時に
分析できる測定法の開発**

農林水産省「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」及び
「レギュラトリーサイエンス新技術開発事業」
テーマ名：食品中のアクリルアミドを簡易・迅速に測定できる分析技術の開発
参加機関：中部大学、カルビー(株)、(株)森永生科学研究所

免疫測定法設計におけるポイント

アクリルアミドは低分子物質であるため、

- ・抗体産生活性(免疫原性)がなく、免疫しても抗体は得られない。

✓抗体の得られやすいように、アクリルアミドを

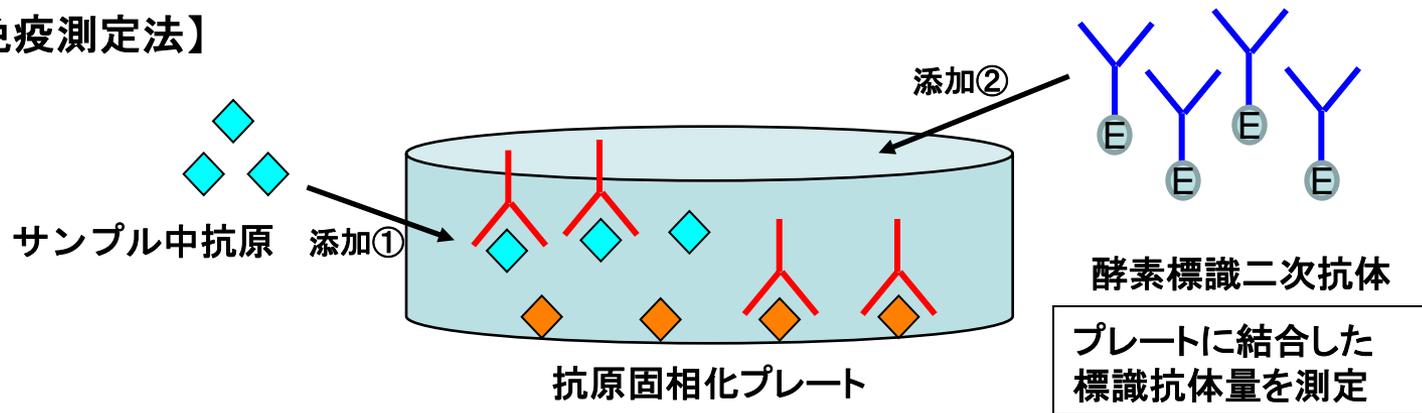
3-[(2-carbamoylethyl)thio] benzoic acid (3-CTBA)という誘導体に変換し、この3-CTBAをヘモシアニン(KLH)に結合した3-CTBA-KLHをウサギに免疫して、免疫測定に必要なポリクローナル抗体を取得した。

※分子量が小さいため免疫原性を示さない物質(不完全抗原)は適当なタンパク質と結合すると、免疫原性をもつ完全抗原になる。

- ・サンドイッチ免疫測定法は使えない。

✓測定法として競合免疫測定法を採用した。

【競合免疫測定法】



測定手順(概略)

① 抽出



均質化された食品検体からアクリルアミドを水で抽出し、遠心・ろ過後、ろ液をクリーンアップカラムに通す(=検体抽出液)。

所要時間: 8検体で約2時間

② 誘導體化



検量線用アクリルアミド溶液および検体抽出液に3-メルカプト安息香酸(3-MBA)を加え、3-CTBAへ変換する。

所要時間: 約2時間

③ 酵素免疫測定(*Enzyme Immunoassay: EIA*)

誘導體化後、検量線用アクリルアミド測定溶液、検体測定溶液を競合免疫測定法で測定する。

所要時間: 約2時間

測定操作①食品サンプルからのアクリルアミド抽出

サンプル抽出 (約2時間/8検体)

ミルサーを用いて**検体の粉碎・均質化**する。

ミルサーカップに均質化した検体1gに
水19mLを加え30秒間×3回**攪拌抽出**する。

3,000～12,000xgで20分間**遠心**、
上清を0.45μ mのフィルターで**ろ過**する。

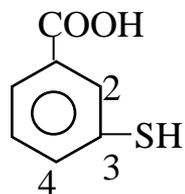
クリーンアップカラムに口液を1mL**チャージ**し、
精製水3mLで溶出し、3mLの**検体抽出液**を得る。



ミルサーによる抽出

測定操作②アクリルアミドの誘導体化

【誘導体化】(試験管中)

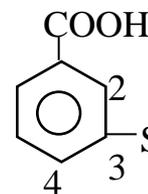


3-MBA



検量線用アクリルアミド溶液
もしくは検体抽出液

アルカリ下
37°C、2時間



3-CTBA

誘導体調製
(約2時間)

検量線用アクリルアミド溶液、検体抽出液に3-MBA溶液を添加する。

37°Cで2時間静置する。

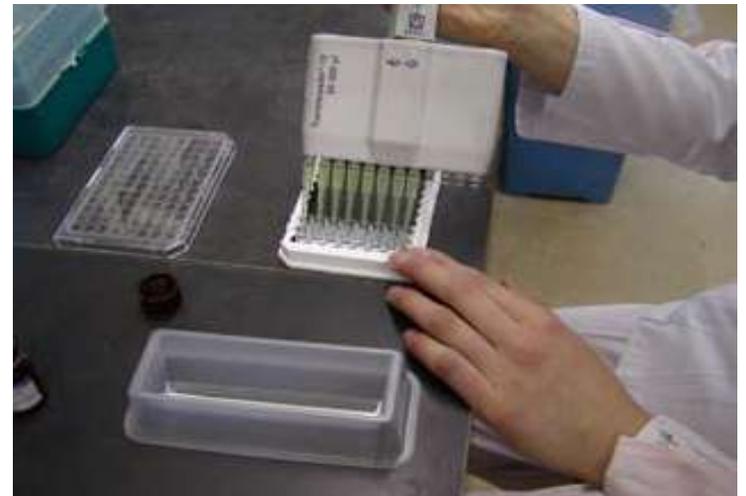
検体希釈液を加え、測定溶液とする。

測定操作③免疫測定(EIA)

免疫測定 (約2時間)

- ↓検量線用アクリルアミド測定溶液、**検体測定溶液を分注**(50 μ L/ウェル)
- ↓**ウサギ抗3-CTBA抗体を分注**(50 μ L/ウェル)
(室温、1時間反応)
- ↓**洗浄**x6回
- ↓**酵素標識二次抗体の分注**(100 μ L/ウェル)
(室温、30分)
- ↓**洗浄**x6回
- ↓**酵素基質溶液の分注**(100 μ L/ウェル)
(室温、30分)
- ↓**反応停止液の分注**(100 μ L/ウェル)
- ↓**吸光度の測定**
(主波長: 450nm、副波長: 600~650nm)

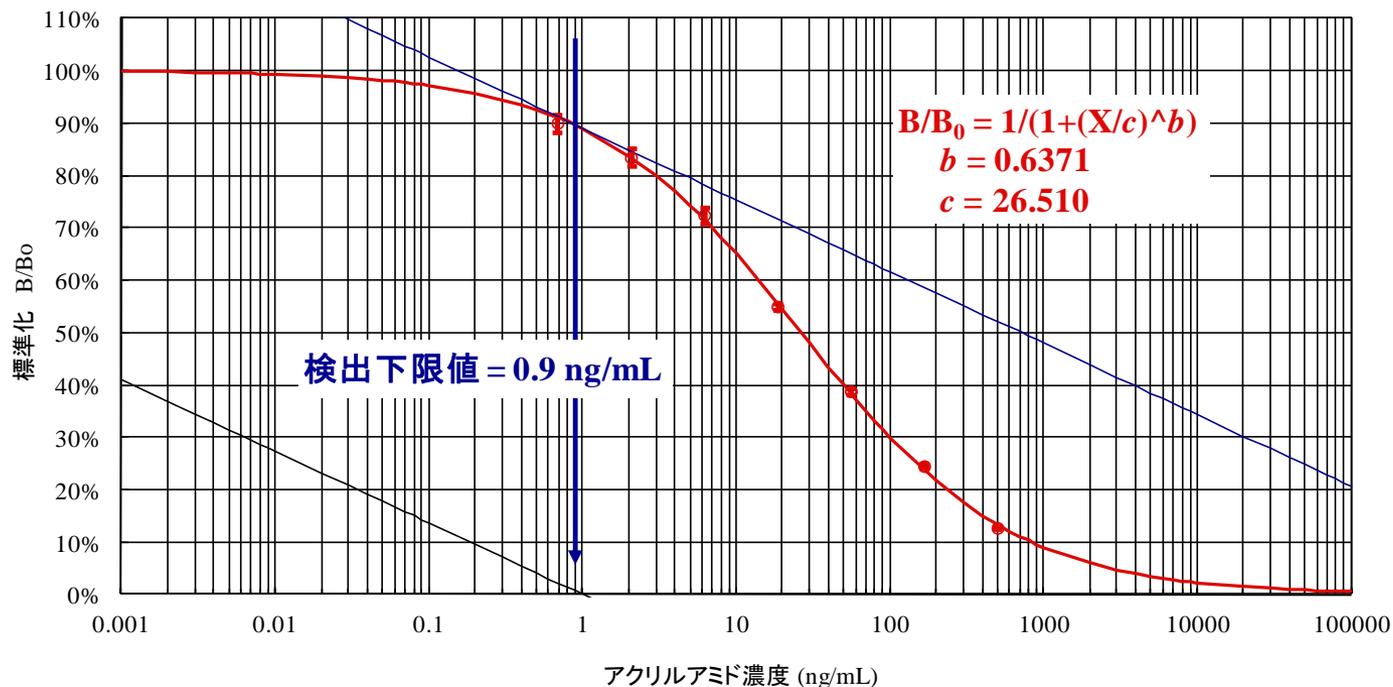
検量線を作成、解析



マイクロピペットを用いて正確に分注

競合免疫測定法による検量線と検出限界

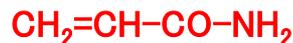
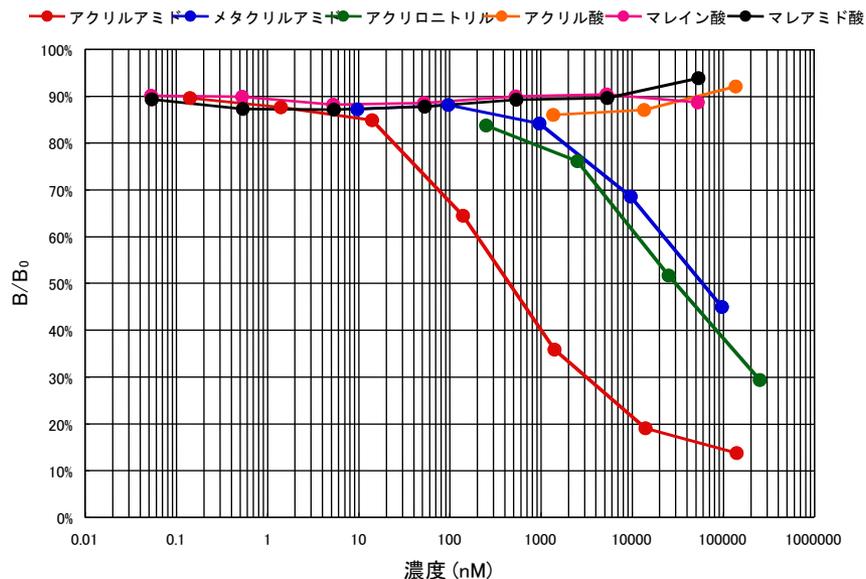
標準化 B/B_0 (12回繰り返し測定 of 平均値) および
 b, c (12回繰り返し測定 of 平均値) を用いた検量線と検出限界
 $mean \pm s_{int} (p=12, n=3)$



$$B/B_0 = \frac{\text{検量線用アクリルアミド測定溶液または検体測定溶液の吸光度}}{\text{アクリルアミド濃度が0 ng/mLの検量線用アクリルアミド測定溶液の吸光度}}$$

アクリルアミド構造類似体との交差反応

抗3-CTBAウサギ血清を用いた競合免疫測定における
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

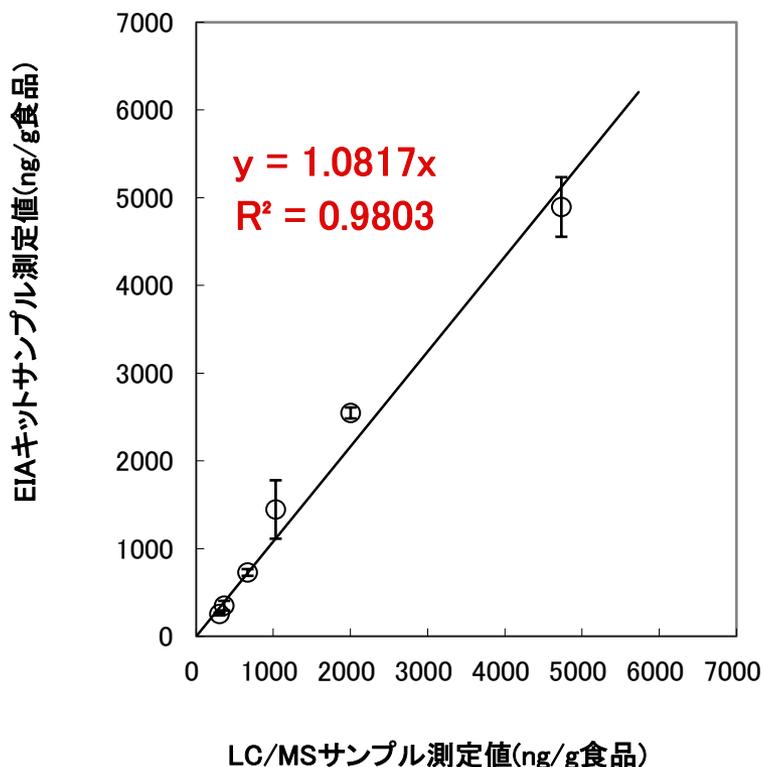
アクリルアミドを100%とした時の交差反応率(%)

構造類似体	IC ₅₀ (nM)	1/IC ₅₀ (nM) ⁻¹	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%

(IC₅₀: 50%阻害濃度)

LC/MSとの相関性①モデルサンプル

モデルサンプル6品目の相関 (n=3)



サンプル名	LC/MS (ng/g食品)	EIAキット Mean±SD (ng/g食品)
①	4,733	4,894 ± 340
②	2,002	2,546 ± 63
③	1,031	1,446 ± 333
④	667	729 ± 38
⑤	364	351 ± 55
⑥	303	256 ± 15

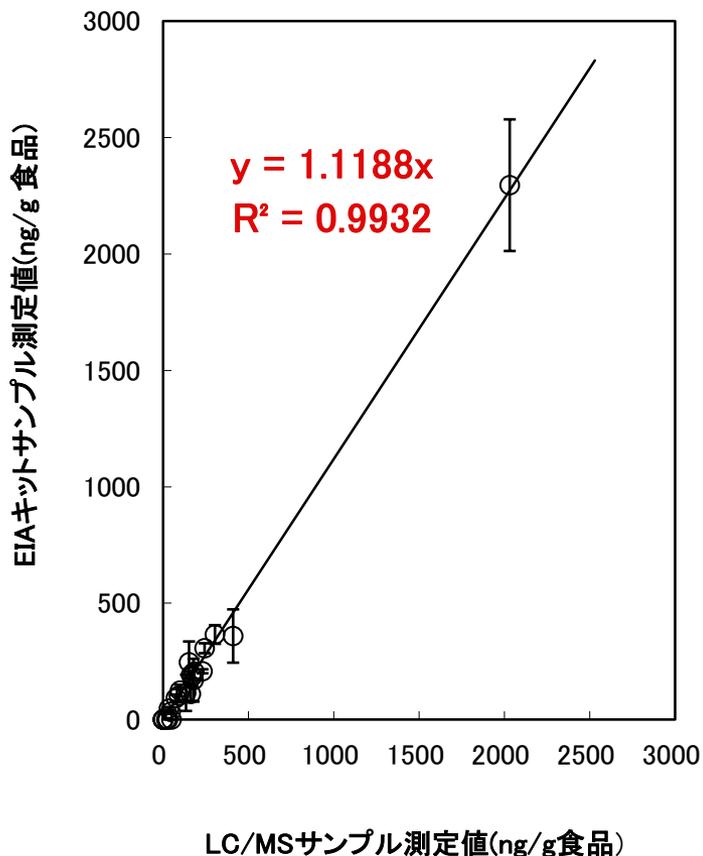
(※LC/MSの精度は±5%)

モデルサンプル①～⑥はカルビー(株)にアクリルアミド含量が異なるよう、実験的に加工度を変えて作製して頂いた。

LC/MS測定は森永製菓(株)研究所分析研究室にて分析した。

LC/MSとの相関性②市販食品

市販食品25品目の相関 (n=3)



食品名	主原材料	LC/MS (ng/g食品)	EIAキット Mean±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

免疫測定と機器分析の比較

	免疫測定	機器分析
設備投資	小さい(プレートリーダー)	大きい(GC/MS, LC/MS, LC/MS/MS)
保守・維持	簡単	維持費用・技量のあるオペレーター必要
測定操作	簡単	比較的複雑(測定機器の操作)
テストあたりの分析時間	短い(多検体処理にて)	長い(標準曲線作成・カラム再生等)
感度	ng/mL(μ g/kg)	ng/mL(μ g/kg)
精度	$\pm 20\%$	$\pm 5\%$
参考	自社分析の場合	受託分析機関での分析の場合
測定価格	3,000円/検体	約30,000円/検体
結果取得に要する時間	6時間	約一週間



まとめ

- I. アクリルアミド免疫測定法を開発した。
 - i. 抗3-CTBAウサギポリクローナル抗体を用いた競合免疫測定法
 - 検出限界は0.9 ng/mL (54 μ g/kg 食品)、測定範囲は3～ 200 ng/mL (180～ 12,000 μ g/kg 食品)、相対標準偏差 \leq 20%
 - ii. 本測定法はアクリルアミドに高い特異性を示す。
 - iii. LC/MS法との相関係数は $R^2=0.98\sim 0.99$ と良好であり、広範囲な食品のアクリルアミド分析に利用できた。
 - iv. 本アクリルアミド測定により、安価・簡便・迅速に多検体同時測定できる。

- II. 食品品質管理分野で、食物アレルギー、カビ毒等に免疫測定技術が応用されて来た。
今回アクリルアミドという非常に低分子の化学物質にまで免疫測定が可能となった。

引き続き食品品質管理への免疫測定技術の応用に努める。

