

平成 2 4 年 3 月 1 5 日

平成 2 3 年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業
研究実績報告書

課題番号：2 1 0 5 3

「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」

研 究 期 間：平成 2 1 年度～平成 2 3 年度（3 年間）

研究総括者名：堤内 要

試験研究機関名：学校法人中部大学

カルビー（株）

（株）森永生科学研究所

I. 試験研究の全体計画

1. 研究目的

ストックホルム大学とスウェーデン食品庁から加工食品におけるアクリルアミド（AA）の存在が発表され、9年が経過した。AAのヒトへの影響に関しては、食品由来のAA摂取と発がんリスクに関する疫学調査ではほとんど相関が認められない状況にある。しかし、基礎研究ではタンパク質や核酸とAAとの反応が確認されており遺伝毒性があること、動物で発がん性が確認されていることから、2005年に国連食糧農業機関（FAO）/世界保健機関（WHO）合同食品添加物専門家会合（JECFA）がヒトの健康に悪影響が懸念されるとし、食品中のAAの低減の取組を継続するよう各国政府に勧告している。また、2009年にはFAOとWHOが合同で運営しているCodex委員会で食品中AAの低減に関する実施規範が策定された。日本でも実施規範にそった低減対策の実行が求められ、我が国の加工食品のAA低減化を促進することは重要な政策課題といえる。

極めて多様な食品が関係し、事業者毎に製法や条件が異なる中で、AA低減が広く進められていくためには、個々の事業者が、自らの製品におけるAAの含有実態を把握し、それに応じた低減の工夫を行っていく必要がある。また、行政部局は含有実態や低減の状況をサーベイランスやモニタリングで把握していく必要がある。こうしたことから、AAの分析は、低減対策の基礎となるものである。本研究は、このような点から、現在よりも簡便で迅速なAAの分析技術を開発することを通じて、AAの低減の促進に寄与することを目的としている。

食品中のAAの分析については現在のところLC/MS/MSを用いた測定が主流である。この方法は精度が高いという利点があるが、機器が高価（数千万円）である上に高コストな多段階の前処理をしなければならず、高額な初期投資と高い分析技術を備えているところでなくては実施が難しい。

外部委託で分析するにしても一検体あたり3万円程度必要であり、さらに結果が得られるまでに一週間以上かかることから日常の分析には適していない。これが食品分析におけるAA測定が普及しない主な理由となっており、AA低減の自主的な取組等の拡大上のひとつのネックとなっている。

このため、本研究では

- (1) HPLCを用いたAA分析法の開発
- (2) 食品の着色度を代用特性とするAA含有量の測定
- (3) 食品中AAの免疫測定系の開発

の3つを通じて、より簡易・迅速なAAの分析法を確立することを目的としている。

これらは、それぞれ

- (1) ある程度の分析環境が整った場所で、精度の高い分析値を必要とする場面での利用を実現する（高精度かつ安価）
 - 幅広い食品に対応
 - 所要時間1日以内
 - 定量下限20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下、相対標準偏差20%以内
 - 初期投資400万円程度、1検体あたり分析コスト3000円以下
- (2) 食品製造現場での利用を実現する（分光光度計のみの整備で低コストを実現）
 - 事業所製造品に対応（事業所の品質管理室又は研究所での分析を可能とし、AA低減化の取組みを行っている現場で、その効果の把握を実現）
 - 対象食品ごとのきめ細かなメソッド開発（少なくとも、ポテトチップス、フライドポテト、スナック菓子（馬鈴薯由来）、スナック菓子（小麦由来）

の4品目について達成)

- 所要時間1時間以内、分析技術の習熟は不必要
- 定量下限は100 µg/kg以下、相対標準偏差30%以内
- 初期投資100万円程度、1検体あたり分析コスト1000円以下

(3) 多検体の安価な同時測定を実現する

- 幅広い食品に対応
- 所要時間6時間以内、分析技術の習熟は不必要
- 定量下限は50 µg/kg以下、相対標準偏差20%以内
- 初期投資100万円程度、1検体あたり分析コスト3000円以下

を最終的な目標として取り組むものである。1～3のそれぞれの方法は、精度やコスト等が異なり、分析の目的やそれに要求される精度、負担できるコスト等に応じ、多様な場面でのAA分析を可能とすることができる。

これらの分析法が開発された結果、食品業界におけるAA低減化の試みが活発になるとともに、モニタリング等の行政コストの低減にもつながる。ひいては、我が国で製造される加工食品中のAA濃度低下が期待できる。

2. 研究内容

1. HPLCを用いたAA分析法の開発

従来のAA分析法は、[粉碎→水添加→振とう抽出→遠心分離→上澄みを遠心ろ過→固相抽出カラム通過(ODS)→固相抽出カラム通過(イオン交換)→ろ過→LC/MS/MS] という手順があり、高額な分析機器に加え、遠心ろ過フィルター、固相抽出カラムなどの高額な消耗品を必要とする。そこで本課題では、『比較的安価なHPLCで可能な分析法』を確立することを目的とした。そのためには、分析対象のAAを、食品抽出物に含まれる多様な物質群から識別検出しやすい吸光特性を有するように誘導体化することが必要である。本課題では、近年しばしば利用される2-メルカプト安息香酸(2-MBA)を用いたAAの誘導体化に着目し、AAに対するチオール化合物の付加反応による誘導体化を目指す。

(1) 2-MBAによるAA誘導体の合成とHPLCによる分析条件の検討

2-MBAとAAとの付加反応を行い、AA誘導体を合成する。さらに、合成したAA誘導体を用いてHPLCによる分析条件の検討を行う(2009年3月期限であったが未完了のため2010年9月まで延長)。

(2) 新たなAA誘導体化試薬の探索

チオール残基を有する種々の水溶性化合物を用いてAAの誘導体化を検討する。AAとの反応が定量的で、誘導体の吸光特性が最も好ましい試薬を選定し、HPLCによる分析条件の最適化を行う。

なお、2009年度の進捗状況が思わしくなかったため、2010年度は(1)に専念するよう農林水産省から指示を受け、実施を保留した。しかし、2011年度に(1)を順調に進めることができ、また、免疫測定系の開発グループからイムノクロマト用の高感度検出試薬として3-MBAを蛍光あるいは色素標識した化合物を合成してほしいとの要望があったことから、本研究課題に再び取り組むこととした(2012年1月まで)。

(3) 応用範囲の確認と有効性の検証

(1)及び(2)で最適化した試料の前処理と分析条件が、広く利用できることを確認するため、少なくともポテトチップス、フライドポテト、スナック菓子(馬

铃薯由来)、スナック菓子(小麦由来)、スナック菓子(トウモロコシ由来)、米菓、麦茶、ほうじ茶の8品目について分析精度の確認を行う。また、異なる研究機関や分析室でも同様の結果を得られることを確認するため、同様の分析を他機関でも検討してもらい、室間相対標準偏差を調べる(2012年3月期限)。

2. 食品の着色度を代用特性とするAA含有量の測定

AAの生成機構は、主にアスパラギンが関与するメイラード反応であり、食品においてAAはいわゆる褐変反応での生成物の1つとして考えられる。そのため、アスパラギンとグルコース溶液を使ったフライモデル系において、着色度とAA含有濃度との間に強い相関が認められている。さらに、ポテトチップスにおいて、測色計によりその表面の褐変度を測定しAA濃度との関係を調査したところ、褐変度を測定することでAAの含有濃度を推定できる可能性が認められた。

(1) モデル系およびポテトチップスの褐変物質の抽出方法検討

ポテトチップスの表面の褐色度合いは、場所によりムラが大きい。測色計によって測定される表面の褐変度(赤-黄色の数値より算出)そのものをAA含有濃度の代用特性値として使用するのでは、極めて低い精度しか期待できない。従って本研究では、試料から褐変物質を抽出して測定することを目指し、その抽出方法を検討する。具体的には、ガラス繊維濾紙にグルコース溶液およびアスパラギン溶液を浸透させたものをモデル系とし、フライまたはオーブン加熱することで褐変物質およびAAを調製する。また、じゃがいもからポテトチップスを調製し、それぞれから褐変物質およびAAを抽出する。その抽出液について褐変度および蛍光度について測定し、AA含有量との関係を検討する。ポテトチップスからの抽出方法を種々検討し、分析値とAA濃度との相関が最も良い抽出方法を決定する(2010年3月期限)。

(2) モデル系およびポテトチップスからの抽出褐変溶液の着色度および蛍光度とAAとの関係解析

(1)で抽出した方法について、低濃度および高濃度域など広範囲への応用についても検討し、加えて褐色度以外の着色度や紫外可視吸光度測定及び蛍光測定を検討することで、広範囲の濃度域でAA濃度と相関が高い測定方法について検討を試みる(2011年3月期限)。

(3) 工場生産ポテトチップスでの検証および他食品での検証

(2)で得られた紫外可視吸光度測定及び蛍光測定結果とAA含有濃度との関係について、工場で生産されているポテトチップスにおいて複数の工場の製品で検証する。さらにポテトチップス以外の食品について応用の可能性についても検討する(2012年3月期限)。

3. 食品中AAの免疫測定系の開発

ラジオイムノアッセイから始まった抗体を利用する微量定量法は、現在では殆どが酵素免疫測定法(ELISA法)に置き換わっている。当初はタンパク質が主な測定対象であったが、ハプテンに対する抗体も次々と作製されるようになり、現在ではリン酸基やアセチル基、アクロレインなどの分子量が100以下の物質に対する抗体も作られるようになってきている。これらの抗体を用いた低分子物質のELISA測定キットも市販されつつある。2008年にはAAの免疫測定を目的とした抗体の作製と定量系に関する報告があり、検出限界(LOD)が10 µg/kg程度の測定系が開発されるに至っている。しかし、この測定系は食品中に含まれるAAの測定にとって実用上満足出来るものでは

なく、抗体の作製法や測定系を改良するなどの工夫をして定量下限値 (LOQ) を 50 µg/kg 程度にまで感度アップする必要がある。本研究では、免疫原のデザインの仕方によって、また、動物の種類によって抗体のでき方が大きく異なることに着目し、AA に対するアフィニティーと特異性の双方に優れた抗体を得るための方法を確立して、定量下限値が 50 µg/kg 以下である食品中 AA 測定用 ELISA キットを完成しようとする。また、ロット間差の少ないキットを作製するため、モノクローナル抗体の取得も視野に入れる。

(1) AA に対する抗体の作製

タンパク質化学修飾の手法により AA をハプテンとして AA-タンパク質複合体(最大 10 種類)を調製し、これらを免疫原として概ね 1 ヶ月に 1 種類のペースで各種動物(ウサギ、モルモット、ヤギなど)を順次免疫し、AA の免疫測定に最も適した特異性とアフィニティーの高い抗体を得るための免疫原調製方法および動物種を決定する(2010 年 9 月期限)。

(2) AA 免疫測定系の開発(三段階で開発: ELISA、イムノクロマト、簡易定量測定系)

上記(1)のスケジュールに従って免疫を順次行くと、毎月異なる免疫原についてウサギ、モルモット、ヤギなど(原則各々 3 匹ずつ)の抗血清が得られる。これらの抗血清(および精製抗体)を用いて、それぞれの免疫原(AA-タンパク質複合体あるいは AA 誘導体-タンパク質複合体)に見合った測定用抗原をコートしたイムノプレート上で ELISA を行い、抗体の力価、適切な抗原コート濃度、適切な抗体濃度を決定して最適条件における AA の検量線および検出限界を求める。これらのことを各免疫原について時間を 1 ヶ月ずつずらしながら最大 10 種類について調べ、ELISA の結果を比較検討して最も優れた免疫原調製方法および動物種を決定する。ELISA 系が確立できた時点から若干遅れて、測定機器を全く必要とせずスティック上に抽出液を一滴垂らして 20 分後に判定部位の着色の有無を目視判定することにより一定濃度以上の AA 混在を確認できる半定量イムノクロマトの開発を行う。また、簡易測定器を必要とするが抗体を金表面にコートした水晶振動子等をセンサーとして利用した定量性を有する簡易な短時間測定法(所要時間は 20 分/検体)についても開発を実施する予定(2011 年 3 月期限)。

(3) AA を含む食品への応用

上記(2)で開発した ELISA などの測定法を用いて種々の食品中に含まれる AA を測定すると同時に、同じサンプルを在来の機器分析法(LC/MS/MS)により測定し、両者の測定値について相関を調べ、本開発による測定系の妥当性を検証する。イムノクロマトについては、カットオフ値による半定量法となる。食品からの AA 抽出方法については在来の機器分析の抽出法を基本とするが、抽出液の安定性および保存方法などについてもこの期間中に検討を終了する予定(2012 年 3 月期限)。

3. 達成目標及び期待される成果

本研究領域の目標は、食品の安全確保のためのリスク管理に資する科学データを比較、判断、予測して行政における規制・指導に活用するレギュラトリーサイエンスの推進と、食品に起因する健康への悪影響の未然防止のための危害要因の適切な把握、そして生産から加工・流通、消費に至るフードチェーンを通して危害要因による汚染防止・低減を可能とする技術の確立である。

食品中 AA が発見された 2002 年には、早速行政側から産業界に対して、AA 生成を抑

制する製造条件等の研究を早急に実施するよう要請があった。しかし、実際には食品中 AA の定量には LC/MS/MS や GC/MS という高価な分析機器が必要であり、試料の前処理にも多額のコストがかかるため、AA 低減にはごく一部の企業しか対応できていないのが実情である。

本研究で実施する『食品中の AA を簡易・迅速に測定できる分析技術の開発』は、分析の目的やそれに要求される精度、負担できるコスト等に応じ、多様な場面での AA 分析を可能とすることができるものであり、食品中 AA の適切な把握とそれに伴う AA 低減化を可能とする技術の確立に資するものとなっている。

現在、食品中の AA 濃度の測定に要する費用は、外部委託であれば 1 サンプルあたり 3 万円であり、またサンプル送付から結果の受理まで 15 日ほど要する。また、自社による分析においても初期投資に約 2,000 万円は必要で、1 検体あたり消耗品や賃金で 1.5 万円以上は要し、かつ 2.5 日以上時間を要する。この費用と分析時間を中課題 1－3 ではそれぞれ以下のようにすることを目指す。

中課題 1． 初期投資 400 万円程度、1 検体あたり分析コスト 3000 円以下、
所要時間 1 日以内、定量下限 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下

中課題 2． 初期投資 100 万円程度、1 検体あたり分析コスト 1000 円以下、
所要時間 1 時間以内、定量下限 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下

中課題 3． 初期投資 100 万円程度、1 検体あたり分析コスト 3000 円以下、
所要時間 6 時間以内、定量下限 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下

これらの目標が達成された結果、食品業界における AA 低減化の試みが活発になるとともに、モニタリング等の行政コストの低減にもつながる。ひいては、我が国で製造される加工食品中の AA 濃度低下が期待できると思われる。

4. 年次計画

研究項目	2009年度	2010年度	2011年度
1. HPLC を用いた AA 分析法の開発 (1) 2-MBA による AA 誘導体の合成と HPLC による分析条件の検討 (2) 新たな AA 誘導体化試薬の探索 (3) 応用範囲の確認と有効性の検証	2-MBA による AA 誘導体の合成と HPLC による分析条件の検討 (2009 年度で完了せず。2010 年度末まで延長した。) (中部大学) 新たな AA 誘導体化試薬の探索 (2010 年度は (1) に専念するため保留。しかし 2011 年度はイムノクロマト用検出試薬にも利用できるため、再び検討する。) (中部大学) 応用範囲の確認と有効性の検証 (中部大学) 		
2. 食品の着色度を代用特性とする AA 含有量の測定 (1) モデル系およびポテトチップスの褐変物質の抽出方法検討 (2) モデル系およびポテトチップスからの抽出褐変溶液の着色度および蛍光度と AA との関係解析 (3) 工場生産ポテトチップスでの検証および他食品での検証	モデル系およびポテトチップスの褐変物質の抽出 (カルビー) モデル系およびポテトチップスからの抽出褐変溶液の着色度および蛍光度と AA との関係解析 (カルビー) 工場生産ポテトチップスでの検証および他食品での検証 (カルビー) 		
3. 食品中 AA の免疫測定系の開発 (1) AA に対する抗体の作製 (2) AA 免疫測定系の開発 (3) 免疫測定系の評価と食品への応用	AA に対する抗体の作製 (森永生科学研究所) AA 免疫測定系の開発 (ELISA 系その他、イムノクロマト系、簡易定量測定系も視野に入れる) (森永生科学研究所) 免疫測定系の評価と食品への応用 (森永生科学研究所) 		
所要経費 (合計)	29,900 千円	22,750 千円	20,090 千円

II. 実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者	エフォート (%)
研究総括者	中部大学応用生物学部	堤内 要	20
1. HPLC を用いた AA 分析法の開発	中部大学応用生物学部	◎ 堤内 要	前出
(1) 2-MBA による AA 誘導体の合成と HPLC による分析条件の検討	中部大学応用生物学部	◎ 堤内 要 服部雄哉 木邑和広 (~2010.3) 岩越江美 (~2010.3)	前出 70 30 30
(2) 新たな AA 誘導体化試薬の探索	中部大学応用生物学部	◎ 堤内 要 服部雄哉 木邑和広 (~2010.3)	前出 前出 前出
(3) 応用範囲の確認と有効性の検証	中部大学応用生物学部	◎ 堤内 要 服部雄哉 木邑和広 (~2010.3)	前出 前出 前出
2. 食品の着色度を代用特性とする AA 含有量の測定	カルビー (株) R&D グループ R&DDE センター基礎研究チーム	○ 古賀秀徳	25
(1) モデル系およびポテトチップスの褐変物質の抽出方法検討	カルビー (株) R&D グループ R&DDE センター基礎研究チーム	△ 石原克之 米澤弥矢子 (~2010.3)	40 60
(2) モデル系およびポテトチップスからの抽出褐変溶液の着色度および蛍光度と AA との関係解析	カルビー (株) R&D グループ R&DDE センター基礎研究チーム	△ 石原克之 米澤弥矢子 (~2010.3)	前出 前出
(3) 工場生産ポテトチップスでの検証及び他食品での検証	カルビー (株) R&D グループ R&DDE センター基礎研究チーム	○ 古賀秀徳 石原克之 米澤弥矢子 (~2010.3)	前出 前出 前出
3. 食品中 AA の免疫測定系の開発	(株)森永生科学研究所	○ 本庄 勉	15
(1) AA に対する抗体の作製	(株)森永生科学研究所	△ 加藤正俊 山本貴之 (~2011.5)	20 15

(2) AA 免疫測定系の開発	(株)森永生科学研 究所	△	岡田展広	50
			(～2010.3)	
			境 雅寿	50
			(2010.4～)	
			高橋美津子	85
			鶴間理恵子	40
			(2010.4～)	
			遠藤 究	15
			(2011.6～)	
			加藤正俊	前出
(3) 免疫測定系の評価と食品 への応用	(株)森永生科学研 究所	△	山本貴之	前出
			(～2011.5)	
			岡田展広	前出
			(～2010.3)	
			境 雅寿	前出
			(2010.4～)	
			高橋美津子	前出
			鶴間理恵子	前出
			(2010.4～)	
			遠藤 究	前出
(3) 免疫測定系の評価と食品 への応用	(株)森永生科学研 究所	△	(2011.6～)	
			加藤正俊	前出
			山本貴之	前出
			(～2011.5)	
			岡田展広	前出
			(～2010.3)	
			境 雅寿	前出
			(2010.4～)	
			高橋美津子	前出
			鶴間理恵子	前出
(3) 免疫測定系の評価と食品 への応用	(株)森永生科学研 究所	△	(2010.4～)	
			遠藤 究	前出
			(2011.6～)	

研究担当者欄について、中課題担当者には○、小課題担当者には△を付すこと。

Ⅲ. 主要な成果

1. 成果の内容

1) 間接競合 ELISA キット『モリナガ アクリルアミド EIA キット』の開発

本事業の最も大きな成果は間接競合 ELISA キット『モリナガ アクリルアミド EIA キット』を開発することができたことである。

中課題 3『食品中 AA の免疫測定系の開発』で、AA と誘導体化試薬 [3-メルカプト安息香酸 (3-MBA)] との反応生成物である 3-[(3-カルバモイルエチル)チオ]安息香酸 (3-CTBA) に対する優れた抗体を得ることができた。(IV. 3. (1). 1))

この抗 3-CTBA 抗体を用いた ELISA 法の開発を行い、試料抽出方法から誘導体化条件や ELISA 条件等を種々検討した結果、間接競合 ELISA キット『モリナガ アクリルアミド EIA キット』が開発された。(IV. 3. (2). 1). (A) および IV. 3. (3). 1). (A))

さらに、共同研究機関である(株)森永生科学研究所は自社費用を用いて本キットの Single-Lab Validation および Multi-Lab Validation を実施し、平成 23 年 10 月 12 日にこの間接競合 ELISA キットを「モリナガ アクリルアミド EIA キット」として発売した。(IV. 3. (2). 2). (A) および IV. 3. (3). 2). (A))

研究成果を商品として市場に提供できるようにしたことは、研究成果の社会への還元という観点から判断して最も大きな成果であり、これにより LC/MS/MS や GC/MS といった分析機器が導入できない比較的規模の小さな食品製造会社でも、自ら自社製品の AA 濃度を分析することができ、AA 低減化への企業努力を進めることができると期待している。

2) 間接競合イムノクロマト法の構築

本事業の次なる成果は抗 3-CTBA 抗体を用いた間接競合イムノクロマト法の構築であると判断した。

この成果も中課題 3『食品中 AA の免疫測定系の開発』で、AA と 3-MBA との反応生成物である 3-CTBA に対する優れた抗体が得られたことに起因する。(IV. 3. (1). 1))

本研究では ELISA 法より簡便な AA の免疫測定系としてイムノクロマト法を開発し、カラーラテックスビーズ (Merck Blue) で標識した抗体を用いることにより、300 ng/g 食品相当の標準 AA を目視によって検出できる間接競合イムノクロマト法を構築し、さらにシグナル強度の僅かな変化を定量できる安価で簡易な普及版イムノクロマト用測定機器の開発にも着手し試作機を作成した。(IV. 3. (2). 2). (B))

食品の抽出液中に含まれる AA が実際に検出可能かどうかを調べた結果、標準 AA、標準食品群およびポテトチップス群に対する定量下限値がそれぞれ 300 ng/g 食品相当、560 ng/g および 880 ng/g という水準まで達しており、まだ検討の余地は多く残されているものの、食品の種類によっては既に利用できる水準にあると判断している。(IV. 3. (3). 2). (B))

3) 食品のアルコール溶液抽出液の蛍光および吸光度測定による AA 含有量の測定法の開発

本事業で実用性を大いに期待される成果として、他にも『食品のアルコール溶液抽出液の蛍光および吸光度測定による AA 含有量の測定法の開発』が挙げられる。

この成果は中課題 2『食品の着色度を代用特性とする AA 含有量の測定』で開発された方法である。モデル系およびポテトチップスを用いた検討により、一度その食品の加工条件を変えて様々な AA 濃度の食品を試作し、それらの AA 濃度を LC/MS/MS や GC/MS などの方法で把握する必要があるが、それらのアルコール溶液抽出液の蛍光および吸

光度測定をすることで、相関係数 0.990 以上と良好な相関が取れる条件を見出すことができ、非常に簡便に精度よく AA 濃度をモニタリングできることが判明した。

(IV. 2. (1). 1) および IV. 2. (2). 1))

さらに、工場生産ポテトチップス (4 工場、各 6 サンプル) での検証を行ったところ、吸光度測定では 0.844、蛍光測定では 0.978 という相関係数が得られた。吸光測定で精度の低下が認められる結果となったが、工場ごとに AA 濃度との相関をとるといずれも 0.990 以上と高い相関が認められ、工場ごとに検量線を作成すれば非常に高い精度で製品中の AA 濃度を把握できると判明した (IV. 2. (3). 1))

また、ポテトチップス以外の食品として生地スナックや市販の味付けスナック、さらにはコーヒー豆についても同様の分析法が適用できるか試したところ、いずれも蛍光測定で 0.97 以上の高い相関係数を示すことが判明した。(IV. 2. (3). 1) および IV. 2. (3). 2))

これらの結果から、本研究で開発した測定法により生産現場における AA 濃度のモニタリングが簡単にできる可能性を示すことができたと判断した。

4) HPLC を用いた AA 分析法の開発

上記 3 件の成果と比較して実用的な水準に達しているとは断言できないが、これまで困難とされてきた HPLC による AA 分析法としては比較的精度良く分析できる方法が開発できたと判断している。

試料前処理から分析条件まで様々な条件を検討した結果、食品をメタノール溶媒中でホモジナイズして、メタノール溶液を採取し、固相抽出カラム (Bond Elut AccuCAT) の素通り画分を集めてメタノール中で 2-MBA と濃縮させながら誘導体化反応させ、最後に固相抽出カラム (InertSep SCX) で大過剰に用いている 2-MBA の未反応試薬をできるだけ取り除き HPLC 測定する方法が提案された。なお、HPLC 測定条件はカラムに Inertsil Ph-3 (G+φ 3.0 x 150 mm)、溶媒に (A) 蒸留水 (0.085 %リン酸含有) (B) メタノール (0.085 %リン酸含有) の混合溶媒を用い、B 溶媒 75%の組成で溶出を行った。検量線作成での最低濃度の標準試料 (10 ng/g) における測定結果の標準偏差を 10 倍した値から、定量下限は 15 ng/g と見積もられた。(IV. 1. (1). 2))

この検量線をもとに AA 濃度が明確な食品試料 8 種を測定したところ、フライドポテトとビスケットでは試料 1.0 g に対してメタノール 10 mL で抽出、ポテトチップスとかりんとうでは試料 0.20 g に対してメタノール 10 mL で抽出する手法で比較的良好的な結果が得られた。また、本研究で開発した分析法の有効性評価のため、英国食料環境研究庁が実施している技能試験 FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) に参加し、試料中の AA 濃度 260 ng/g に対して 235 ± 75 ng/g という AA 濃度を得た。この測定における z-score が -0.5 であったことから、本研究で開発された HPLC 法は少なくともビスケットにおいて妥当な AA 濃度を導くことが期待された。

(IV. 1. (3). 2))

2. 成果の活用

- 1) 本事業で開発された各種分析法が普及することにより、製造現場等で従来と比べ食品中の AA を簡易、迅速に分析でき、行政が推進する、食品製造事業者等における AA 低減に向けた取組がより活発になることが期待される。
- 2) 特に、免疫測定法については、平成 23 年 10 月 12 日に間接競合 ELISA キット『モ

リナガ アクリルアミドEIA キット』を発売した。現在のところ、生産・加工・流通の現場や行政措置における活用状況などはそれほど活発ではないが、比較的安価な設備投資で簡便に精度良く AA 濃度を測定できることから、今後広く普及してゆくものと期待している。

IV. 研究実績報告

1. 中課題名「HPLC を用いた AA 分析法の開発」

アクリルアミド (AA) はヒトへの神経毒性があり、動物実験で発がん性も確認されている化学物質である。近年、食品を加熱加工することで食品中のアスパラギンと糖質が Maillard 反応し、その副生成物として AA が生成することが判明した。食品中 AA の低減化が大きな課題となっているが、その分析には液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) もしくはガスクロマトグラフィー-質量分析計 (GC/MS) が必要であるため、多くの企業では製品中の AA 濃度が把握できず低減化を難しくしている。そこで本研究では AA を 2-メルカプト安息香酸 (2-MBA) で誘導体化して高速液体クロマトグラフ (HPLC) で定量する方法の開発を目指した。この目的を達成するため、以下の 2 点に着目した。1 点目は低分子量の分画分子量を有する透析膜を用いた高分子量成分の除去、2 点目は誘導体化による識別検出しやすい吸光特性の付与である。誘導体化試薬は近年いくつかの論文で利用される 2-MBA を用いた。当初、食品からの抽出、透析、固相抽出、誘導体化を全て水溶媒中で行っていたが、処理条件を種々検討した結果、溶媒にメタノールを用いて抽出を行うことで、透析の処理を省略することができるようになり、さらに、誘導体化反応を効率良く進められることを見出した。

HPLC 測定条件はカラムに Inertsil Ph-3 (G+ ϕ 3.0 x 150 mm)、溶媒に (A) 蒸留水 (0.085 %リン酸含有) (B) メタノール (0.085 %リン酸含有) の混合溶媒を用い、B 溶媒 75%の組成で溶出を行った。検量線作成での、最低濃度の標準試料 (10 ng/g) における測定結果の標準偏差を 10 倍した値から、定量下限は 15 ng/g と見積もられた。この検量線をもとに日本食品分析センター (GC/MS 法) で AA 濃度を確認した食品試料 8 種 (ポテトチップス、フライドポテト、ビスケット、かりんとう、麦茶、ほうじ茶、ココア、コーヒー) を測定したところ、フライドポテトとビスケットでは試料 1.0 g に対してメタノール 10 mL で抽出、ポテトチップスとかりんとうでは試料 0.20 g に対してメタノール 10 mL で抽出する手法で良好な結果が得られた。本研究で開発した分析法の有効性評価のため、英国食料環境研究庁が実施している技能試験 FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) に参加した。FAPAS では $z = (x - x_a) / \sigma_p$ [x = 参加者の結果、 x_a = 付与値、 σ_p = 技能上の標準偏差] という式で算出される z-score が与えられ、これが $|z| \leq 2$ であれば許容な測定値されている。提供されたビスケット試料に含まれる AA 濃度を今回開発した HPLC 法で測定したところ、試料中の AA 濃度 260 ng/g に対して 235 ± 75 ng/g という AA 濃度を得た。この測定における z-score が -0.5 であったことから、本研究で開発された HPLC 法は少なくともビスケットにおいて妥当な AA 濃度を導くことが期待された。

(1) 小課題名「2-MBA による AA 誘導体の合成と HPLC による分析条件の検討」

1) 平成 22 年度までの研究実績概要

2-MBA による AA 誘導体の合成に成功し、結晶化により単離精製した標準試料を用いて HPLC による分析条件の検討を行った。定量下限を調べ、誘導体化と分離ができれば十分目標の感度を達成できることが判明した。ポテトチップスの実サンプルを用いた前処理方法の検討も行い、水抽出液を透析し、膜外液をミックスモードのイオン交換固相抽出カラムに通過させた試料溶液に 2-MBA を加えて誘導体化する方法が比較的良好であることを見出した。ちなみに、LC/MS/MS や GC/MS で測定した値を基準とした回収率は 112 % (相対標準偏差 6 %) であった。

初めに、誘導体化反応における反応温度の検討を行った。溶媒に水を用いて、AA 濃

度 14 $\mu\text{mol/L}$ 、2-MBA 濃度 50 mmol/L、水酸化ナトリウム (NaOH) 濃度 50 mmol/L で 3.5 時間の反応を行った。結果を図 1 に示す。

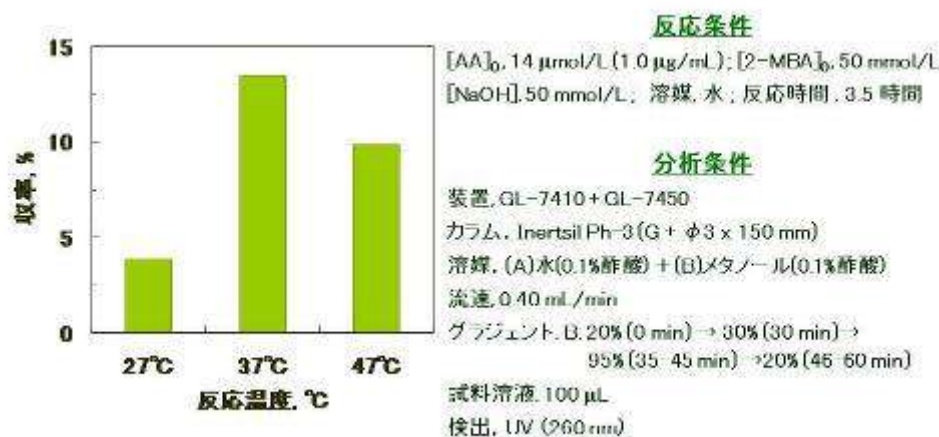


図 1. 2-MBA を用いた AA 誘導体化における反応温度の検討

これらの結果から反応温度は 37°C が最適であると判断した。

次に、2-MBA の濃度と反応時間を検討した。反応条件は AA 濃度 14 $\mu\text{mol/L}$ 、反応温度 37°C で NaOH 濃度は 2-MBA と同濃度で行った。結果を図 2 に示した。

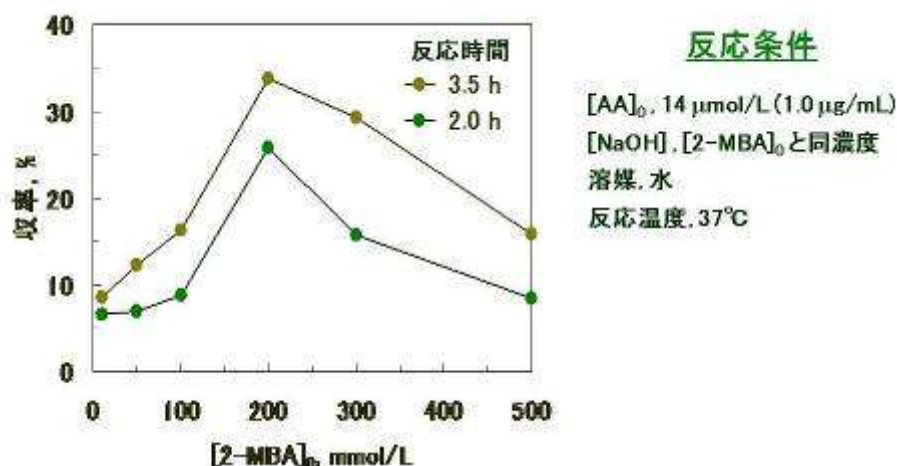


図 2. 2-MBA を用いた AA 誘導体化における 2-MBA 濃度の検討

なお、反応時間は 1 日以内で結果を出すためには 3.5 時間が最長と考えられたためそれ以上は検討していない。図 2 からわかるように、200 mmol/L の 2-MBA 濃度で 3.5 時間の反応が最も収率良く 2-CTBA を得ることができた。なお、一般的には、化学反応速度は試薬濃度に比例するはずであるため、2-MBA が 200 mmol/L 以上で 2-CTBA の収率が低下することは考えにくい。2-MBA 濃度と同濃度で用いている NaOH による反応および分析への悪影響が懸念されるが、今回はそれらを突き詰めることはせず、さらなる条件検討を急いだ。

続いて、誘導体化反応における NaOH 濃度の検討を行った。反応条件は AA 濃度 14 $\mu\text{mol/L}$ 、2-MBA 濃度は 200 mmol/L で水溶媒中、反応温度 37°C で 3.5 時間反応を行った。結果を図 3 に示した。

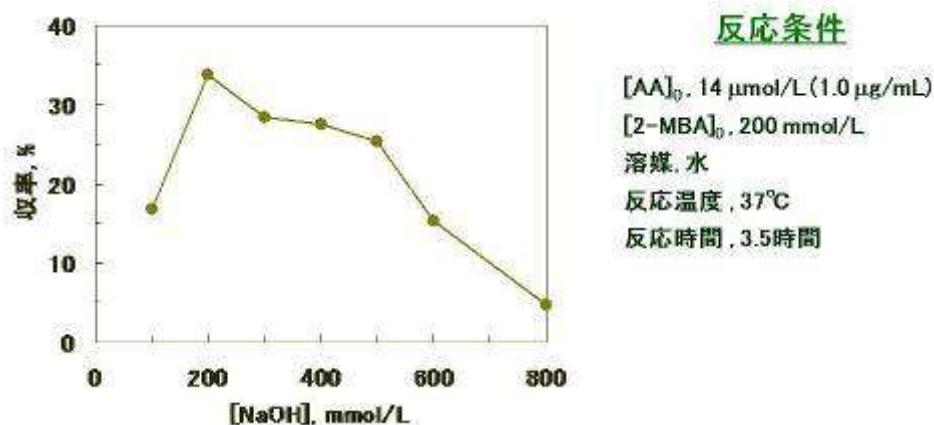


図 3. 2-MBA を用いた AA 誘導体化における NaOH 濃度の検討

NaOH は 2-MBA を水に溶解するために必要とされており、2-MBA と同じモル濃度は必要のようである。しかし、NaOH 濃度が上昇すると 2-CTBA の収率は低下する。そこで、2-MBA 濃度の検討でも述べたように NaOH が 2-CTBA の収率を低下させる原因と考え、NaOH を用いないという発想で条件検討をすることにした。

2-MBA はそのままでは水に溶けないが、メタノールには溶解する。同様にアクリルアミドもメタノールに易溶なので誘導体化反応の溶媒をメタノールに置き換えて実験を試みた。結果を図 4 に示す。

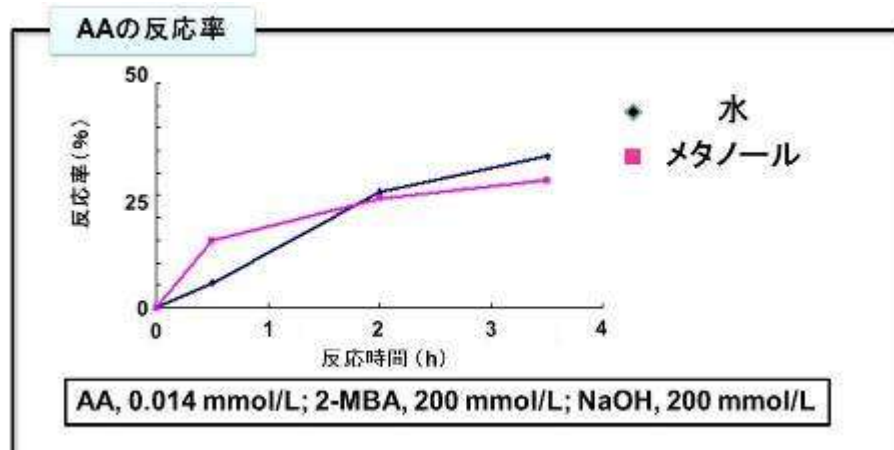


図 4. 2-MBA を用いた AA 誘導体化における溶媒の比較

図 4 からわかるように、溶媒をメタノールに変更しても反応挙動に大きな差は見られないことが判明した。ゆえに、この反応系から NaOH を使わずに同様の条件で実験を行った。しかし、その結果は 2-CTBA の収率が 12 % と半分以下になるという残念なものであった。ただ、NaOH を不使用とするのは再現性のよい HPLC 分析を行うためにも重要であるため、さらに反応液を濃縮して試薬濃度を高める検討を行った。結果を図 5 に示した。



図5. メタノール中 NaOH 不使用条件での AA 誘導体化における濃縮操作有無の比較

図5からわかるように、メタノール溶媒で NaOH 不使用でも1時間でほぼ定量的に誘導体化反応が進行すると判明した。

この結果から、2-MBA を用いた AA の誘導体化反応はメタノール溶媒を用いることとして条件検討をすることとなった。まず、2-MBA 濃度の検討を行った。メタノール溶媒を用いて、AA 濃度 14 $\mu\text{mol/L}$ 、NaOH 不使用という条件で、室温で30分間反応させた後、37°Cの湯浴で温めながら減圧度 110 mmHg で10分間かけて2-MBAの結晶が析出し始めるまで濃縮し、その後、減圧度 300 mmHg で20分間攪拌、最後に再び減圧度 110 mmHg として乾固するという手順で誘導体化反応を行った。結果を図6に示した。

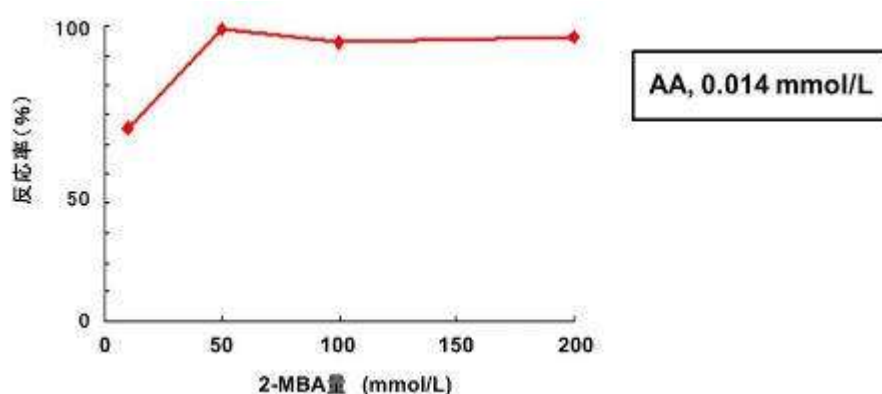


図6. メタノール中 2-MBA を用いた AA 誘導体化における 2-MBA 濃度の比較

図6からわかるように、AA 濃度 14 $\mu\text{mol/L}$ ならば2-MBA 量は50 mmol/Lで十分であった。ちなみにこのAA濃度は1.0 $\mu\text{g/mL}$ に相当し、1 gの試料を40 mLの溶媒で透析することを考えると40,000 $\mu\text{g/kg}$ (40 ppm)というAA濃度に相当する。後処理およびHPLC分析のことを考えると2-MBAの使用量はできるだけ少なく抑えたいことから、2-MBA濃度は50 mmol/Lで進めることとした。

誘導体化反応後に存在する大過剰の2-MBAはHPLC分析における大きな障害となる。この2-MBAを、生成した2-CTBAと分離することで大幅に感度を向上させることができる。2-MBAと2-CTBAを種々の固相カラムで溶出し、その溶出挙動を調べたところ、InertSep SCXが最も効果的であることが分かった。図7に酢酸エチルと酢酸エチル

(1 %ギ酸含有) で溶出した際のクロマトグラムを示した。

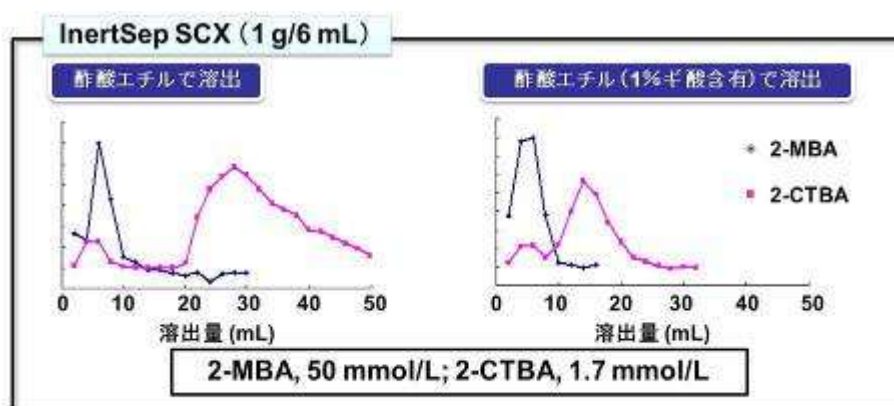


図7. 固相抽出カラム (InertSep SCX) における 2-MBA と 2-CTBA の溶出挙動

図7の結果から誘導体反応で大過剰に用いた 2-MBA の除去には InertSep SCX (1 g/6 mL) を用いて酢酸エチル 10 mL で洗浄後、酢酸エチル (2%ギ酸含有) を 45 mL 用いて溶出させることとした。

さらに、HPLC の溶出溶媒の条件検討も行った。分析感度の向上に特に効果的であったのは添加剤としてリン酸を用いることであった。添加剤として酢酸、ギ酸、リン酸、トリフルオロ酢酸 (TFA) を比較した場合の 2-CTBA のピーク面積を図8に示した。実験の結果、リン酸を用いた際に最もピーク面積が大きくなることが判明した。

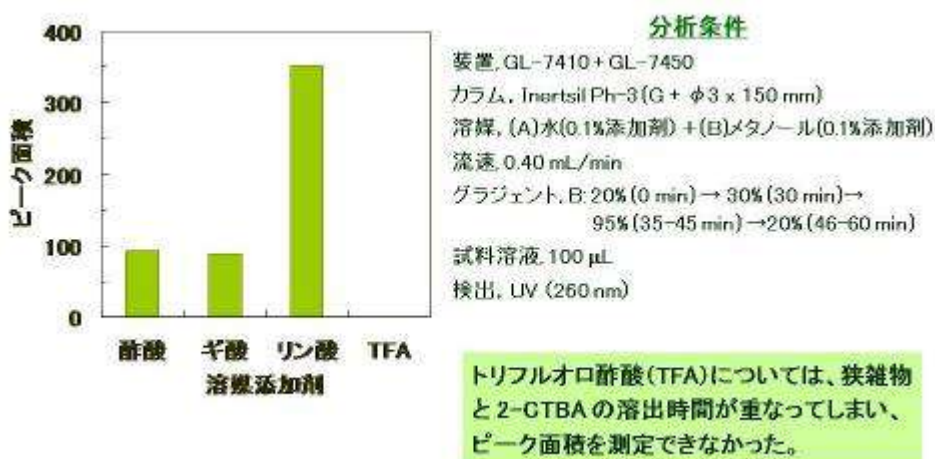


図8. HPLC 測定における溶媒添加剤の検討

次に、実試料での分析を想定した検討をおこなった。本手法では食品試料を透析して高分子量物質を除去するが、メタノール溶媒での誘導体化を進める場合に、水溶液として得られる透析膜外側の試料溶液をどのようにしてメタノール溶媒に置換するかということが問題となった。水とメタノールは共沸しないので水分が入っていると濃縮した際、溶液がほぼ水溶液となってしまう、2-MBA が溶解できず反応が進まない。しかし、あらかじめ水溶液を濃縮乾固すると濃縮に時間を要することに加え、AA が酸化やその他の成分と反応してしまい、適切な分析値を得ることができない。ゆえに、透析をメタノール溶媒で行うという方法を検討することとなった。透析膜が膨潤せず、簡単に破れてしまうことが懸念されたが、メタノール中でも問題なく透析するこ

とができたので、今後は透析の時点からメタノールを用いることとした。
これらの検討により図9のような測定方法が提案された。



図9. HPLC を用いた AA 分析法の概略 (平成 22 年 11 月時点)

この条件で作成した検量線は図10の通りであり、最低濃度の標準試料における標準偏差の10倍として算出した定量下限は 14 µg/kg であった。

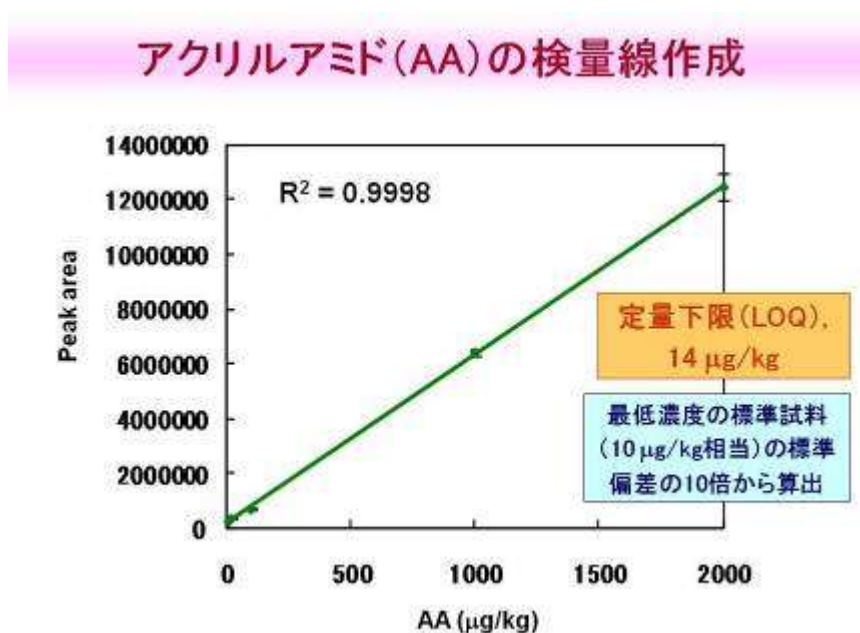


図10. 図9で提案された分析法における検量線

この分析方法が確定した時点で小課題 (3) 「応用範囲の確認と有効性の検証」に取り掛かった。FAPAS 試料や食品総合研究所から提供してもらったほうじ茶葉標準物質、そして共同研究機関であるカルビー (株) が調製した分析精度評価用ポテトチップ

プス〔AA 分析で ISO17025 を取得している第三者機関（日本食品分析センター）における GC/MS 法にて AA 濃度を確認した分析値あり〕などを検討した。回収率 80 - 120% の範囲で分析できた試料もあったが、ポテトチップスのような油脂成分の多い試料を透析する際に試料が十分分散できず、回収率が低くなる点（日本食品分析センターの測定値の 10% 以下）が問題視された。

そこで透析前の処理方法を再検討することとした。油分を取り除くためにヘキサンを用いて脱脂・乾燥する方法と、試料をメタノールとともにチューブホモジナイザーで 10 分間ホモジナイズする方法である。結果を図 1 1 に示した。

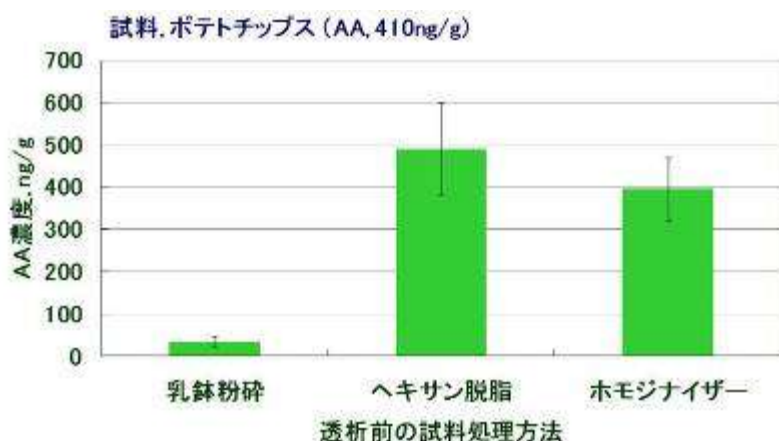


図 1 1. ポテトチップスにおける試料粉碎方法の検討

図 1 1 からわかるようにヘキサン脱脂もホモジナイザー処理もともに効果的であった。しかし、ヘキサン脱脂は粉碎、ヘキサン処理、ろ過、乾燥という操作が新たに必要となり、結果として所要時間の増大となる。一方、ホモジナイザー処理は乳鉢粉碎や粉碎試料を細い透析チューブに入れる操作に比べ、むしろ簡単に進めることができるため、今後は透析前の試料処理としてホモジナイザー処理を用いることとした。

このほか、分析コストを抑えるため透析膜の繰り返し利用の検討も行い、透析膜が破れるまで利用可能なこと、繰り返し利用が可能な回数は平均 4 回以上であることを確認した。

以上の結果から、最終的な測定方法は図 1 2 のようになった。定量下限、所要時間、初期投資費用、分析コストについては当初の目標水準に到達したものと判断した。なお、所要時間、初期投資費用、分析コストにおける判断基準の詳細は図 1 3 - 図 1 5 のとおりである。

測定方法の概略

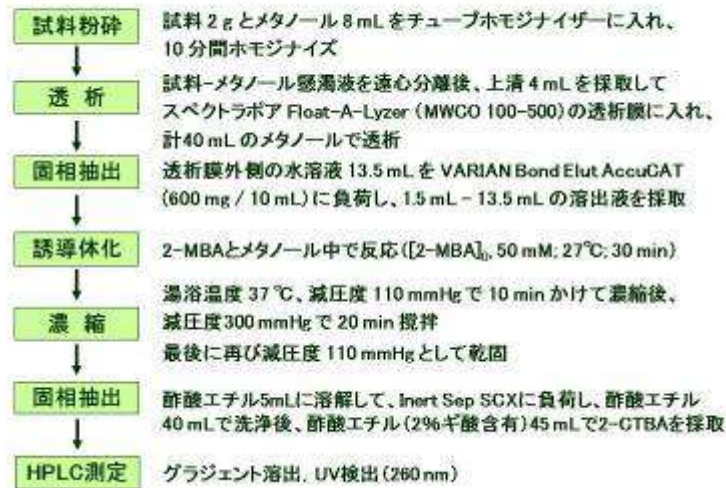


図 1 2. HPLC を用いた AA 分析法の概略 (平成 22 年度終了時)

測定所要時間

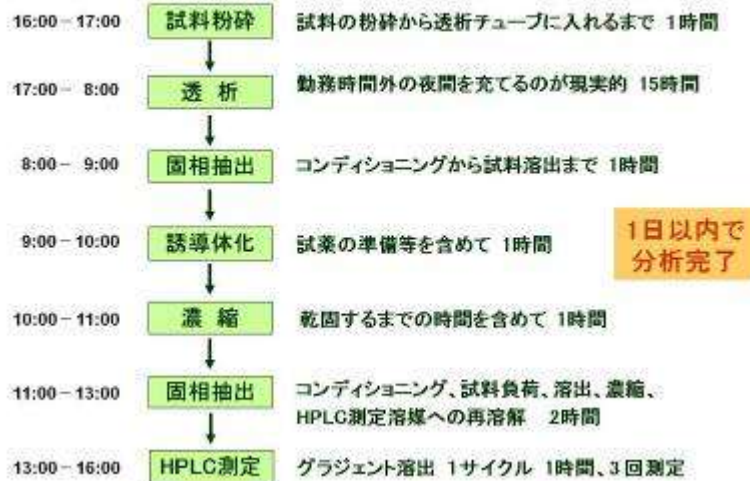


図 1 3. HPLC を用いた AA 分析法における所要時間 (平成 22 年度終了時)

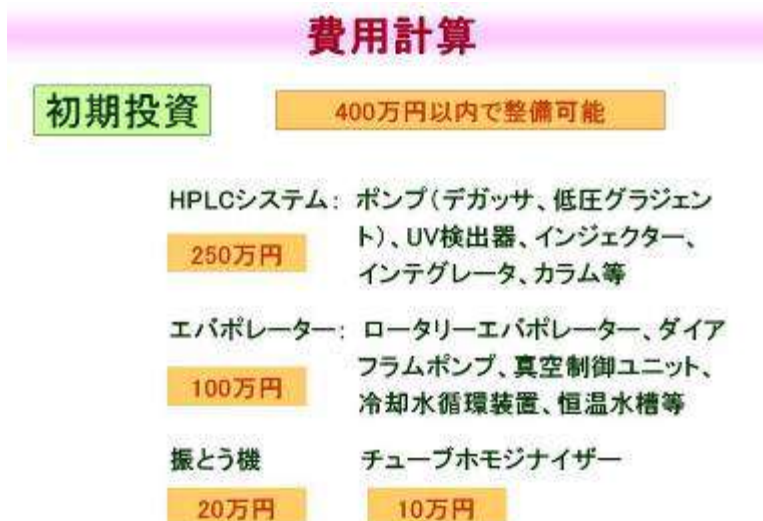


図 1 4. HPLC を用いた AA 分析法における初期投資費用（平成 22 年度終了時）

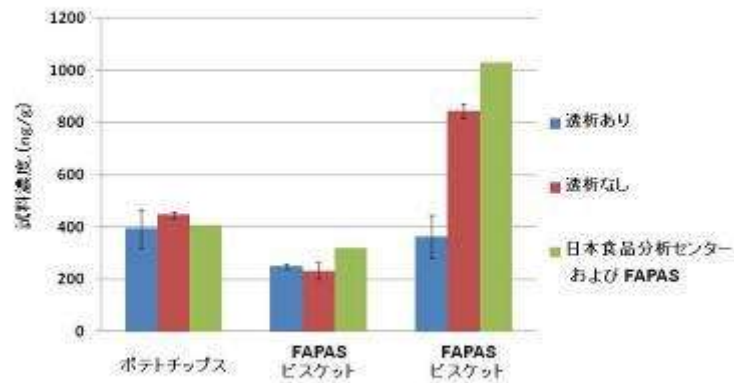


図 1 5. HPLC を用いた AA 分析法における消耗品費（平成 22 年度終了時）

2) 平成 2 3 年度における研究実績概要

平成 2 2 年度に最適化した分析方法（図 1 2）は所要時間や初期投資、消耗品費などにおいて当初の目標を達成しているが、透析膜を 4 回繰り返し利用するという条件設定がされており、まだ十分に目標が達成されているとは言い難い。より短時間で安価に測定できるほうが好ましいことから、まず、本分析法で時間と費用の両方で大きな割合を占める透析の操作を見直すこととした。結果を図 1 6 に示す。

透析処理の必要性確認



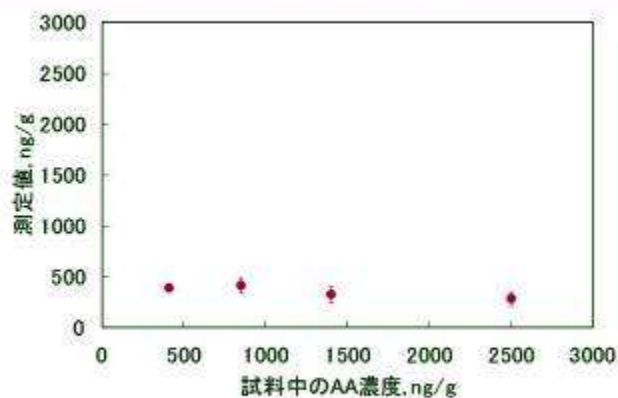
メタノール溶媒の採用で、透析処理は必要なくなっていた

図 1 6. HPLC を用いた AA 分析法における透析処理の必要性確認

図 1 6 からわかるように透析処理をしなくても、良好な AA 濃度を測定でき、場合によっては透析処理をした時よりも良好な分析値を示せることがわかった。これは平成 22 年度に一連の前処理操作にメタノール溶媒を採用したことが大きく影響していると考えられた。すなわち、透析によって除去しようとしていた多糖などの高分子量化合物が、メタノールに溶解しにくいため透析処理の効果がほとんど認められなかったのであろう。むしろ、透析処理によって大幅に希釈できたり、長時間放置されることで、検出感度が低下するのを抑えることができたりするため、今後は透析処理を省略することとした。

次に、この透析処理を省略した方法でポテトチップスの AA 濃度が異なる試料を分析した。結果を図 1 7 に示した。

ポテトチップスの分析



AA濃度の高い試料には2-MBA が少ない可能性あり

図 1 7. 透析処理を省略した方法によるポテトチップス試料の AA 濃度分析

図 1 7 を見てわかるように、これまで分析条件を検討していた比較的 AA 濃度の低い試料 (466 ng/g) 以外では全く妥当な分析値が得られないことが判明した。こ

これらの結果から、AA 濃度が高い試料ではより多くの 2-MBA が必要であることが考えられたため、それぞれの食品試料に対して 2-MBA 濃度を変えた実験を行った。結果を図 1 8、1 9 に示した。

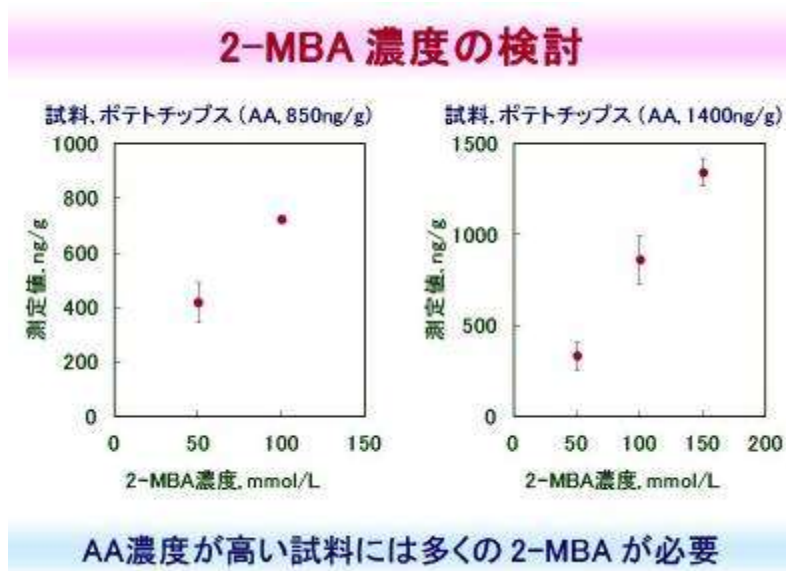


図 1 8. ポテトチップス試料の AA 濃度分析における 2-MBA 濃度の検討 (1)

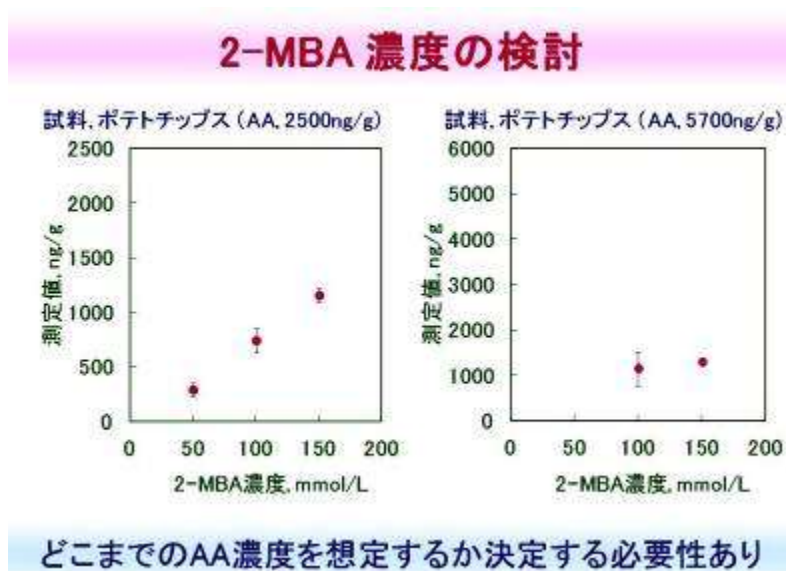


図 1 9. ポテトチップス試料の AA 濃度分析における 2-MBA 濃度の検討 (2)

図 1 8 および 1 9 の結果からわかるように、2-MBA 濃度の上昇に比例して AA 濃度の分析値が上昇した。このことは誘導体化試薬が少なかったことを意味している。しかし、誘導体化反応時に溶解させられる 2-MBA 濃度は 150 mmol/L が上限であり、この測定方法では AA 濃度が 1500 ng/g 以上のポテトチップスは測定できないことがわかった。これらの結果を受けて 2-MBA 濃度を 150 mmol/L として測定することも検討したが、2-MBA 濃度を 150 mmol/L とすると大量に残存する未反応の 2-MBA がその後の測定の障害となり定量下限が 183 ng/g と大幅に悪くなってしまうことがわかった。従って、誘導体化反応時の 2-MBA 濃度は 50 mmol/L のままとすることとし、濃度の高い食品試料については試料溶液を希釈することで対

応することとした。

次に、本分析法で操作が難しい点として誘導体化時に反応液を濃縮させなければならない問題がある。この濃縮操作については減圧度と時間を規定しているので、分析担当者が代わっても同様の条件で誘導体化反応ができるはずであるが、減圧度の加減で反応液を乾固させてしまうと誘導体化が進まなくなってしまうという懸念があった。そこでエバポレーター減圧度調製装置がなくても簡単に誘導体化ができるよう反応液に乾固防止剤として高沸点アルコール溶剤を添加することを検討した。結果を図 20 に示した。

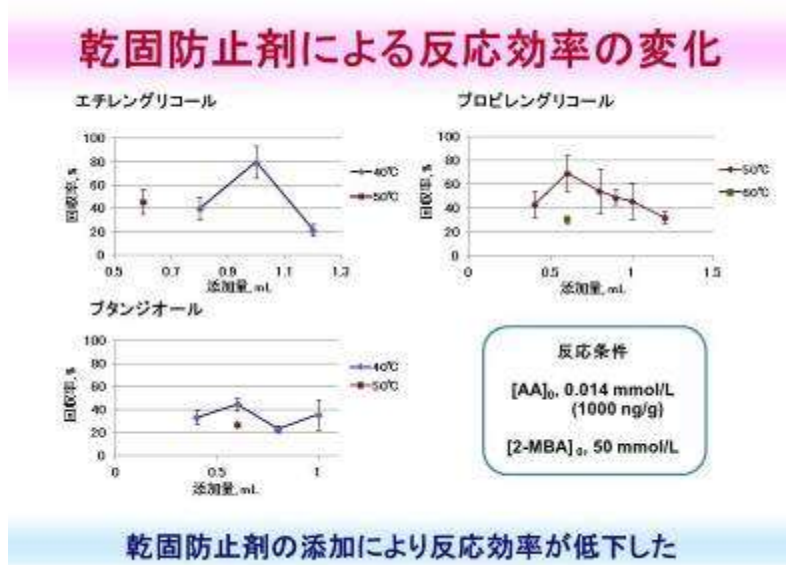
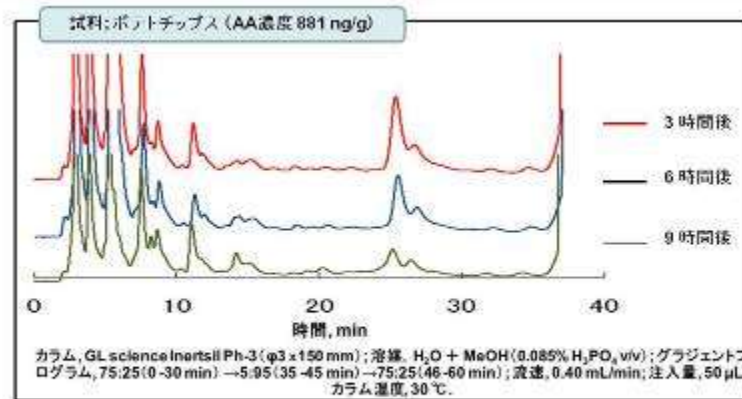


図 20. AA と 2-MBA との反応における乾固防止剤の検討

図 20 からわかるように、種々のジオール成分を用いて反応効率を検討したが、どのジオールも反応を阻害してしまい 2-CTBA の回収率が 80% にも到達しない結果となってしまった。ジオールのメチレン鎖長が長くなると収率が低下するのは、溶媒の疎水性が高くなり、AA と 2-MBA との 1,4-付加反応に不向きとなるためと考えられた。これらの検討から、乾固防止剤の活用による誘導体化反応操作の簡略化は見送ることとした。

誘導体化反応後、固相抽出で過剰な 2-MBA を除去したあと、一旦溶媒を乾固して HPLC の溶出液に溶解するが、その際、溶液を作成後しばらくおいておくと分析値が低下する現象が認められることに気付いた (図 21)。



試料溶液調製後、時間経過に伴い2-CTBAのピークが減少

図 2 1. HPLC 測定試料溶液調製後の経過時間とクロマトグラム

図 2 1 で 26 分に溶出している比較的大きなピークが 2-CTBA である。この挙動は複数の試料を同時に処理してオートサンプラーで HPLC 測定をする場合には致命的である。試料溶液を調製する溶媒は HPLC の溶離液であり、化合物の変性を促すような化合物として添加剤のリン酸が最も考えられることから、試料溶液調製時における溶媒にリン酸を添加しない実験を試みた (図 2 2)。

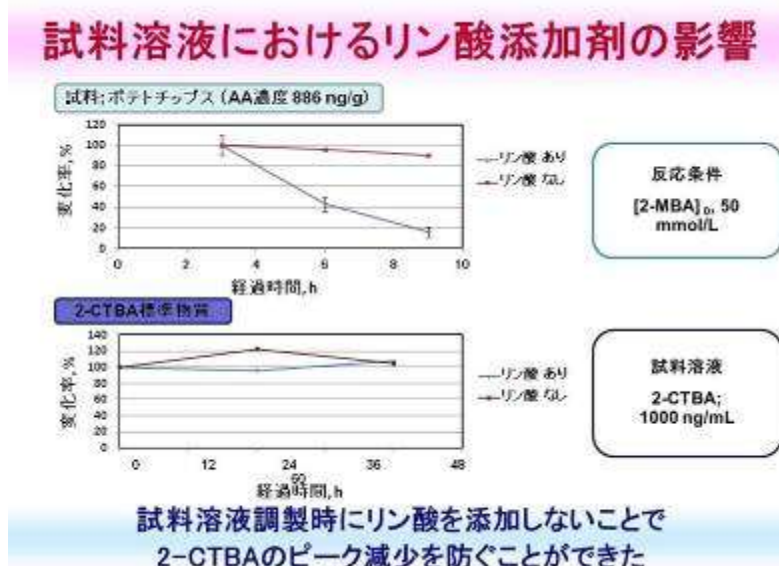


図 2 2. HPLC 測定試料溶液におけるリン酸添加剤の影響

図 2 2 を見てわかるように、2-CTBA 標準試料単独では全く影響がないにも関わらず、ポテトチップスからの試料溶液では、リン酸が添加されていると時間経過とともにピーク面積が大きく減少するが、リン酸が添加されていないとほとんど影響しないことが判明した。この原因はリン酸が試料溶液の何らかの成分に作用し、その生成物が 2-CTBA と複合体を作成してしまうのではないかと考えている。これらの結果から、今後は HPLC 測定用試料溶液調製時の溶媒にはリン酸を添加しないこととした。

本研究ではさらに HPLC 測定条件も再検討した。図 2 1 のクロマトグラムを見

でもわかるように本測定系では分析対象である 2-CTBA から少し遅れて妨害ピークが現れる。分析精度を向上させるために、できるだけこのピークを分離することが望ましい。この分析では定量したいのは 2-CTBA だけなので、これまで用いていたグラジェント溶出ではなくアイソクラティック溶出のほうがきれいに分離できると考え、溶媒組成を再検討した。結果を図 2 3 に示した。

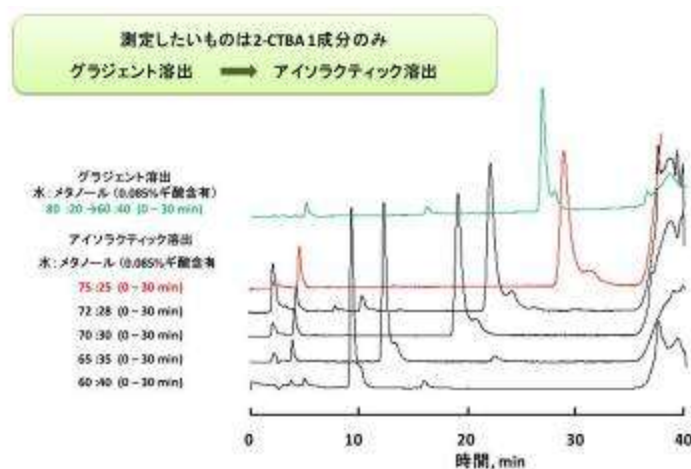


図 2 3. HPLC 溶出条件の再検討

図 2 3 の結果から、完全にピーク分離ができていないわけではないが、溶出時間の長さも考慮して、今後は水:メタノール (0.085%ギ酸含有) が 75:25 の組成でアイソクラティック溶出することとした。

これらの測定条件を整えて再度ポテトチップス試料 (AA 含有量 1400 ng/g) の希釈率および反応時間の検討を行った。結果を図 2 4 に示した。

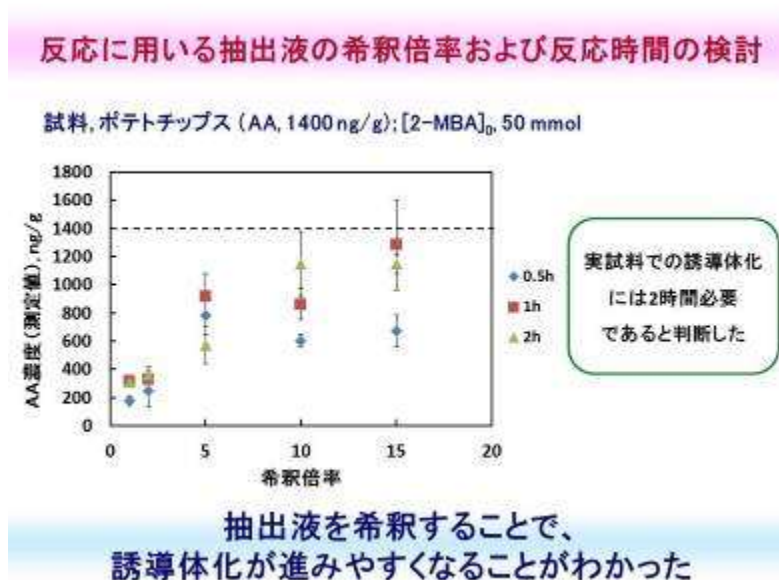


図 2 4. 反応に用いる抽出液の希釈倍率および反応時間の検討

図 2 4 の結果から、抽出溶媒を希釈することで分析値は日本食品分析センターの

GC/MS による AA 含有量と同様の値を示すようになることと、これまで用いていた 0.5 時間の反応時間では反応時間が足りないことが判明した。以上の結果から、今後は反応時間を 2 時間必要であると判断した。

これらの結果をもとに我々は抽出液の希釈を取り入れた AA 濃度の決定方法を図 2 5 のように提案した。

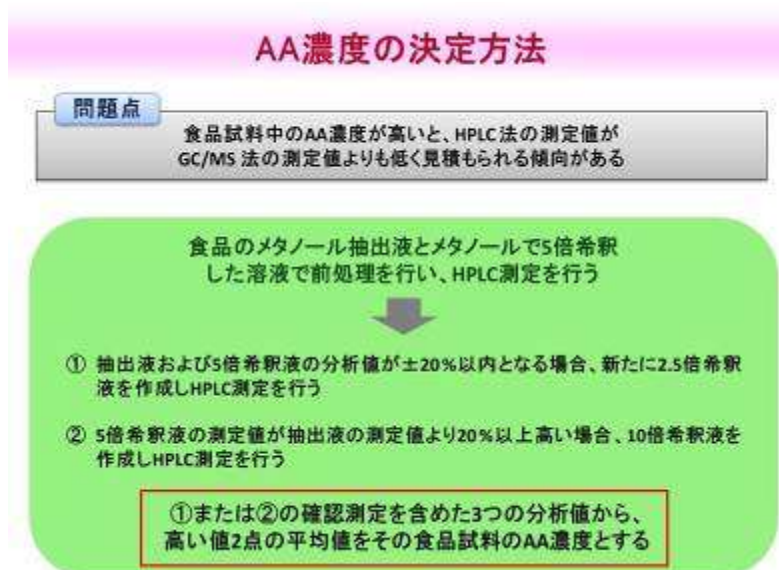


図 2 5. 抽出液の希釈を取り入れた AA 濃度の決定方法

研究推進会議では、このような判断基準で本当に妥当な AA 濃度を判断できるのか疑問視される意見が出された。しかし、研究期間も残りわずかとなってきたため、とにかく一度この方法のように誘導体化反応直前の抽出液を段階的に希釈する方法で AA 濃度を測定してみることにした。なお、それらの具体的なデータは IV.1.(3) 2) の表 1 に記した。しかし、結果として抽出液を希釈せずにそのまま処理して HPLC 測定したデータが妥当な数値を示したのはフライドポテトとビスケットだけでそれ以外はほとんど AA 濃度を過少評価する傾向が認められた。いずれの試料も希釈することで GC/MS の値に近づいてゆくが、希釈するほど相対標準偏差が大きくなるため、図 2 5 の AA 濃度決定方法はあまり好ましくないことが判明した。

ところで、これまでに検討してきた抽出液の希釈は 1.0 g の試料を 10 mL のメタノール中でホモジナイズした溶液部分を固相抽出カラム Bond Elut AccuCAT (600 mg/ 10 mL) に通過させ、素通り画分 4.0 mL (溶出体積 1.5 - 5.5 mL) を希釈していた。この抽出液中における誘導体化反応を阻害している化合物が、この固相抽出処理で除かれるはずのもので、量が多すぎるために固相抽出カラムから漏出している可能性もある。そこで、希釈しなければ妥当な分析値を出せない試料 (ポテトチップスおよびかりんとう) に関しては、最初の試料量を減らすことで妨害物質も低減化され、固相抽出処理がより効果的になることが期待された。実際に実験した結果を図 2 6 に示した。

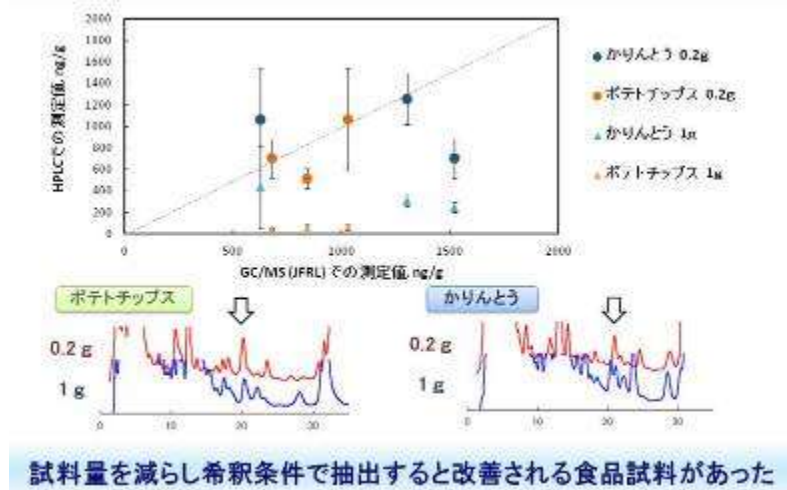


図 2 6．抽出試料量の検討

図 2 6 からわかるように、0.20 g の試料を 10 mL のメタノール中でホモジナイズした溶液部分を固相抽出カラム Bond Elut AccuCAT (600 mg/ 10 mL) に通過させ、素通り画分 4.0 mL (溶出体積 1.5 - 5.5 mL) を誘導体化に用いたほうが、誘導体化直前に 5 倍希釈した測定値よりも、より GC/MS に近い値を示すことがわかった。

以上の結果を総合して、本研究課題では最終的にフライドポテトとビスケット (試料量を 0.20 g に減らせば、ポテトチップスとかりんとう) に適用可能な方法として図 2 7 のような測定方法を提案した。定量下限、所要時間、初期投資費用、分析コストについては当初の目標水準に到達したものと判断した。なお、所要時間、初期投資費用、分析コストについては昨年度よりさらに改善されており、透析膜の繰り返し使用などといった条件がなくても当初の目標値を達成できていることを強調したい。これらの判断基準の詳細は図 2 8 - 図 3 0 のとおりである。

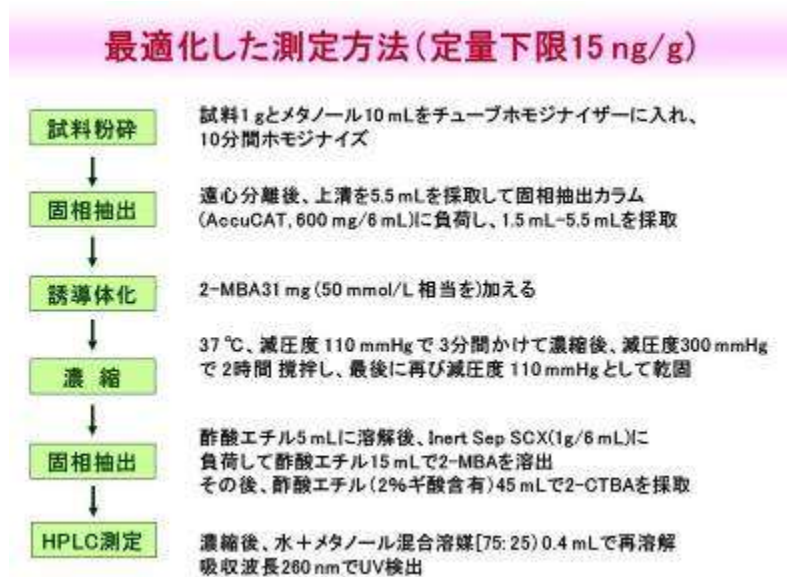


図 2 7．HPLC を用いた AA 分析法の概略 (平成 23 年度終了時)



図 2 8. HPLC を用いた AA 分析法における所要時間（平成 23 年度終了時）



図 2 9. HPLC を用いた AA 分析法における初期投資費用（平成 23 年度終了時）

費用計算	
消耗品費	1検体あたり約2100円（目標は3000円以内）
固相抽出カラム： VARIAN Bond Elut AccuCAT (600 mg / 10 mL)	600円／本
Inert Sep SCX(1 g / 6 mL)	900円／本
溶媒： メタノール、蒸留水、酢酸エチル、リン酸、ギ酸	600円／検体
プラスチック製品： 50mL遠沈管、DISMICフィルター	

図 30. HPLC を用いた AA 分析法における消耗品費（平成 23 年度終了時）

3) 成果の内容

1. HPLC を用いた食品中 AA 分析法の条件検討として、透析前の試料処理・透析・固相抽出（反応前）・誘導体化・固相抽出（反応後）・HPLC 測定・検量線の各項目で最適化を試みた結果、食品試料からメタノール溶媒を用いてホモジナイズ抽出し、ミックスモードのイオン交換カラムを通過させた後、メタノールを留去しながら 2-MBA との誘導体化反応を進め、最後にカチオン交換カラムで固相抽出することで、汎用 HPLC 装置でも AA が分析可能となった。
2. 諸条件を最適化することで、所要時間 1 日以内、定量下限 20 ng/g 以下初期投資 400 万円程度、1 検体あたりの分析コスト 3,000 円以下という当初の目標を達成することができた。

(2) 小課題名「新たな AA 誘導体化試薬の探索」

1) 平成 22 年度までの研究実績概要

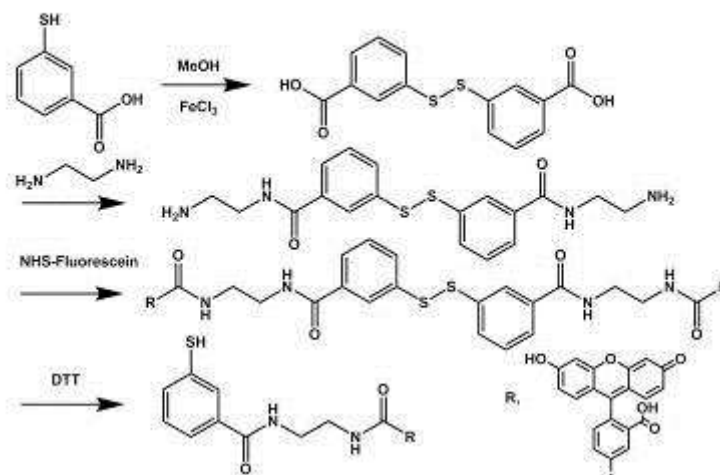
新たな AA 誘導体化試薬として 3-および 4-MBA の検討を行った。これらを用いた AA 誘導体である 3-および 4-CTBA を合成、単離精製し、それらを標準物質として検量線作成および定量下限の決定を行った。また、誘導体化反応における 3-および 4-CTBA の生成挙動を調べ、いずれも 2-MBA より反応速度が低いことを確認した。当初の予定では、さらに様々な誘導体化試薬を検討する予定であったが、小課題（1）の進捗状況が予定より遅れていたため、平成 23 年度は本小課題の検討を保留し、小課題（1）に専念することとなった。

2) 平成 23 年度における研究実績概要

本小課題は平成 23 年度保留となっていたため、HPLC 法のためだけに新たに誘導体化試薬を探索する意思はなかったが、中課題 3 「食品中 AA の免疫測定系の開発」における AA 濃度依存的に呈色するイムノクロマト系を開発するためにフルオ

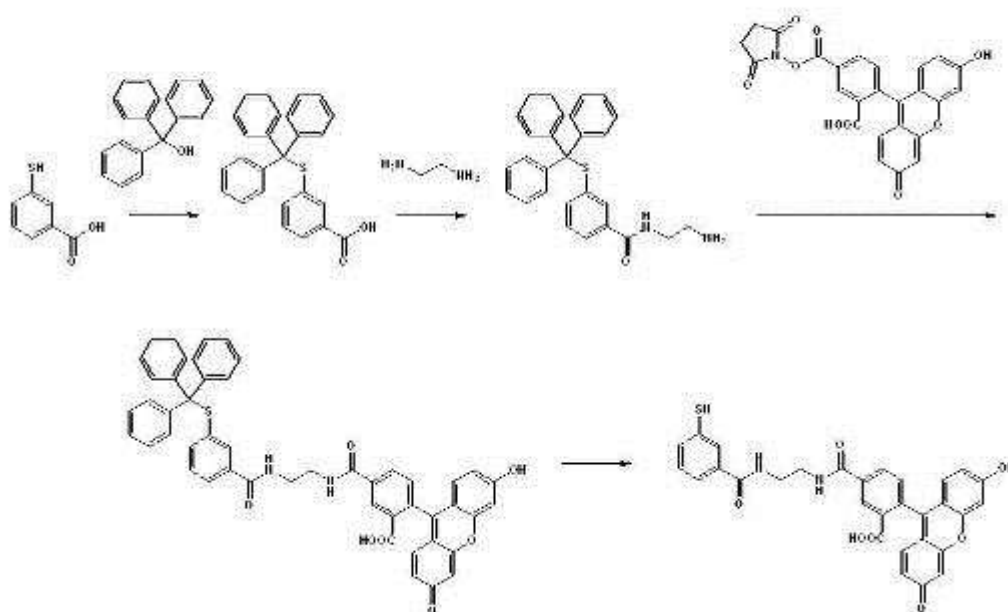
レセイン標識 3-MBA の化学合成を検討した（平成 22 年度第 3 回推進会議にて提案、了承済）。当初は 3-MBA 二分子でジスルフィド結合を形成させて、チオール基を保護して合成を進める検討をした（図式 1）。

図式1 フルオレセイン標識3-MBAの合成戦略-1



しかし、この方法では最初のジスルフィド結合を形成させる反応がうまく進まず、この合成戦略でのフルオレセイン標識 3-MBA の化学合成は断念した。ゆえに、図式 2 で示したように 3-MBA のチオール基をトリチル基で保護する合成戦略を検討することとなった。

図式2 フルオレセイン標識3-MBAの合成戦略-2



この合成戦略ではチオール基の保護とエチレンジアミンの導入までは順調に進んだが、フルオレセインの導入反応後から核磁気共鳴（NMR）スペクトルによる生成物の構造確認ができなくなってしまった。逆相の分取カラムクロマトグラフィー

では蛍光を発する誘導体の生成が確認できていたのでそれらを分取し、最終目的物と思われる化合物まで合成を進めた。各段階とも 70%程度の収率で生成物を得ることができたが、生成物を AA と反応させた後、中課題 3「食品中 AA の免疫測定系の開発」で開発された抗 3-CTBA 抗体で認識されるかを確認したところ、残念ながら全く結合が観測されなかった。

3) 成果の内容

1. 2-MBA に代わる新たな AA 誘導体化試薬として 3-MBA や 4-MBA を検討したが、HPLC 法に関して言えば、2-MBA を凌ぐ感度が得られなかった。
2. 中課題 3「食品中 AA の免疫測定系の開発」における AA 濃度依存的に呈色するイムノクロマト系を開発するためにフルオレセイン標識 3-MBA の化学合成を検討したが、目的とする蛍光標識 3-MBA 試薬は得られなかった。

(3) 小課題名「応用範囲の確認と有効性の検証」

1) 平成 22 年度までの研究実績概要

応用範囲の確認と有効性の検証は AA 濃度が明確な食品試料を用いて行った。具体的には FAPAS 試料（クリスピーブレッド、ビスケット）や食品総合研究所から提供してもらったほうじ茶葉標準物質、そして共同研究機関であるカルビー（株）が調製した分析精度評価用ポテトチップス（日本食品分析センターの分析値あり）である。メタノールを用いて透析、前処理、誘導体化反応をするようになり定量下限値が 20 µg/kg 以下となったところで、これらの試料の分析を行った。その結果、回収率 80 - 120%の範囲で分析できた試料もあったが、油脂成分の多い試料では透析する際に試料が十分分散できず、回収率が低くなる（日本食品分析センターの測定値の 10%以下）などの問題点が明らかとなった。また、ほうじ茶においてはクロマトグラムに妨害ピークが認められる試料が存在するため、ロットの違いにより妥当な結果を示すものと過少評価してしまうものが混在することが判明した。なお、油脂成分の多い試料に関しては、小課題（1）「2-メルカプト安息香酸による AA 誘導体の合成と HPLC による分析条件の検討」に戻り、試料粉碎方法を乳鉢粉碎からメタノール存在下チューブホモジナイザーを用いる方法に切り替えることで適切に分析できるよう改善された。

2) 平成 23 年度における研究実績概要

応用範囲の確認と有効性の検証は平成 22 年度に用いた試料に加え（株）森永生科学研究所が ELISA キットのバリデーション用に集めた試料（日本食品分析センターの分析値あり）を用いて行った。それらのいくつかは IV.1.(1). 2) の研究実績概要に記されている。

ここでは図 25 の AA 濃度決定法の提案に伴い実施された、誘導体化反応直前の抽出液を段階的に希釈する方法で AA 濃度を測定した結果を表 1 に示した。表 1 の中の AA 濃度 > HPLC 法 > 希釈率 X1 のカラムをみるとわかるように、希釈せずに妥当な分析値を示すことができたのはフライドポテトとビスケットのみである。本分析法の特徴として、抽出液を希釈することで GC/MS の値に近づいてゆくが、希釈するほど相対標準偏差が大きくなるため、図 25 の AA 濃度決定方法はあまり好ましくないことが判明した。

表 1. 市販食品試料の AA 濃度測定

原料	食品名		AA 濃度, ng/g (RSD, %)				
			HPLC 法			GC/MS 法	
			希釈率				
			× 1	× 2.5	× 5	× 10	(JFRL)
じゃがいも	ポテトチップス	①	62 (3)		381 (15)	825 (23)	1031
		②	59 (3)		354 (1)	733 (14)	843
		③	48 (1)		347 (4)	775 (81)	680
	ポテトスナック	①	136 (22)		168 (35)	279 (57)	526
		②	92 (3)		184 (38)	363 (52)	576
		③	51 (3)		193 (18)	218 (25)	1285
	フライドポテト	①	681 (7)	715 (18)	943 (35)		831
		②	318 (8)	273 (68)	254 (26)		265
小麦	ビスケット	①	54 (29)	n.d.	n.d.		30
		②	151 (35)	151 (37)	214 (45)		137
		③	180 (26)	213 (48)	211 (24)		159
	クラッカー	①	86 (4)		201 (22)	817 (118)	428
		②	132 (6)		230 (44)	667 (44)	470
		③	174 (15)		356 (25)	792 (15)	727
	かりんとう	①	439 (62)	352 (8)	502 (7)	697 (28)	628
		②	354 (1)		1186 (10)	2122 (65)	2080
		③	243 (3)		608 (18)	1657 (42)	1520
		④	312 (13)		1391 (19)	1378 (22)	1300
とうもろこし	コーンスナック	①	60 (15)		263 (87)	n.d.	248
		③	280 (49)		139 (48)	n.d.	111
		④	242 (22)		204 (33)	n.d.	345
さつまいも	芋けんぴ	①	285 (34)		294 (21)	n.d.	277
		②	80 (27)		183 (55)	n.d.	206
大麦	麦茶	①	298 (56)		253 (72)	n.d.	161
		②	187 (38)		149 (54)	n.d.	292
		③	144 (37)		181 (88)	n.d.	168
茶葉	ほうじ茶	①	n.d.		n.d.		314
		②	n.d.		n.d.		292
		③	n.d.		n.d.		168
コーヒー豆	コーヒー	②	195 (56)		234 (100)	n.d.	155
		③	217 (50)		158 (70)	n.d.	178
カカオ	ココア	①	58 (13)		n.d		120
		②	57 (20)		69 (69)	n.d.	126
		③	n.d.		n.d		28

ところで、これまでに検討してきた抽出液の希釈は 1.0 g の試料を 10 mL のメタノール中でホモジナイズした溶液部分を固相抽出カラム Bond Elut AccuCAT (600 mg/ 10 mL) に通過させ、その素通り画分 4.0 mL (溶出体積 1.5 - 5.5 mL) を希釈したものである。IV.1.(1). 2) でも述べたように、この抽出液中における誘導体化反応の阻害因子が、この固相抽出処理で除かれるはずのもので、量が多すぎるために固相抽出カラムから漏出している可能性が、これまでの実験結果から示唆された。そこで、希釈しなければ妥当な分析値を出せない試料 (ポテトチップスおよびかりんとう) に関しては、最初の試料量を減らすことで妨害物質も低減され、固相抽出処理がより効果的になることが期待された。実際に実験した結果は既に IV.1.(1). 2) の図 2 6 に示している。その結果、0.20 g の試料を 10 mL のメタノール中でホモジナイズした溶液部分を固相抽出カラム Bond Elut AccuCAT (600 mg/ 10 mL) に通過させ、素通り画分 4.0 mL (溶出体積 1.5 - 5.5 mL) を誘導体化に用いたほうが、誘導体化直前に 5 倍希釈した測定値よりも、より GC/MS に近い値を示すことがわかった。

最後に、本研究で開発した分析法の有効性評価のため、英国食料環境研究庁が実施している技能試験 FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) に参加した (図 3 1)。



図 3 1. 技能試験 FAPAS の説明

我々が参加した FAPAS の試験番号は 3032 で試料はビスケットであった。試料がビスケットであるならば、本分析系の測定方法 (図 2 7) でそのまま測定すれば妥当な結果が得られるはずである。実際に分析を行った結果、 235 ± 75 ng/g という AA 濃度を得た。後日送付されてきた FAPAS Proficiency Test Report 3032 では、この試料の AA 濃度が 260 ng/g であったことが記されており、我々の分析値が妥当な値であったことが確認された。なお、参加機関は 61 機関であり、我々の実験室番号 (Laboratory Number) は 45 であった。結果を図 3 2 に示した。

FAPAS試料(ビスケット)への適用

本測定法はビスケットに対して有効であることが確認された

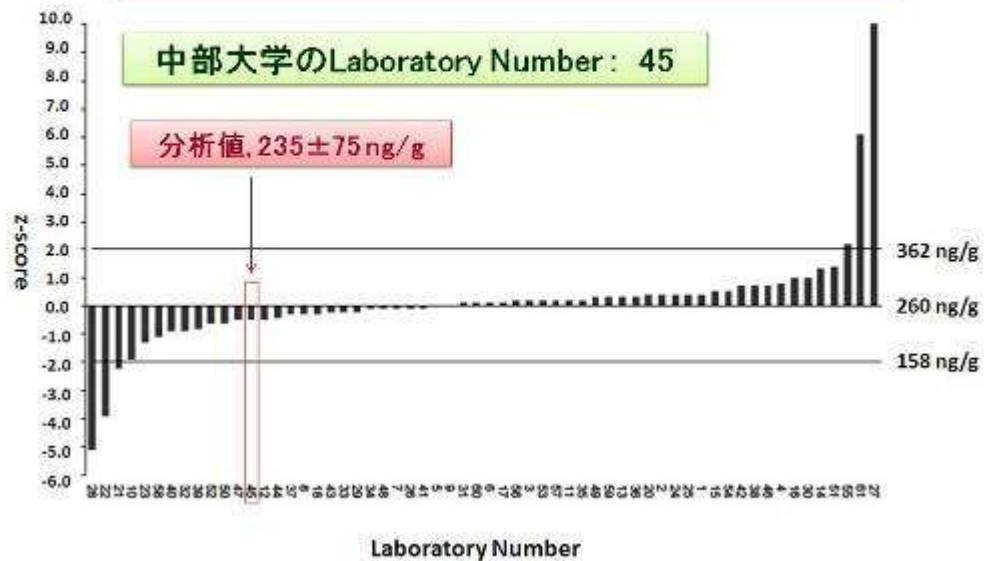


図 3 2 . FAPAS (#3032) に参加した全機関の分析結果

図 3 2 からわかるように、この測定における z-score が -0.5 であったことから、本研究で開発された HPLC 法は少なくともビスケットにおいて妥当な AA 濃度を導くことが期待された。

この技能試験に参加した分析機関には FAPAS Proficiency Test Report が送付されてくるが、この資料の中には参加機関が分析に用いた諸条件が細かく記されている。その中から今回の試験で LC を用いた測定がどのような検出方法を採用したかをまとめたものを図 3 3 に示した。

FAPAS (#3032) における AA 検出方法

AA の検出方法として UV を用いたのは我々 (045) のみ

Acrylamide Detection	laboratory number
MS	011 018 020 030 039 046 053 061
MS-MS	001 003 004 005 006 008 009 012 013 014 015 016 017 022 024 025 026 027 028 029 032 033 034 035 036 037 038 040 041 042 043 044 047 048 049 051 052 054 055 056 057 058 059 060
UV (260nm)	045

FAPAS Proficiency Test Report 3032, p.16.

図 3 3 . FAPAS (#3032) における AA 検出方法

図3-3からLCを用いて分析を行った場合のAA検出方法は、ほとんどがMS/MSであることがわかる。MSを採用したのは8機関、そしてUVで検出したのは我々のみであった。この結果はHPLCを用いたAAの分析方法がまだ世界中で確立されていないことを示しており、本研究で開発された方法がHPLCを用いた食品中AAの分析方法としていかに進歩しているものかを窺い知ることができた。

3) 成果の内容

1. AA分析でISO17025を取得している第三者機関（日本食品分析センター）でAA濃度を確認した食品試料を用いて、本研究で開発したHPLCを用いたAA分析法の測定値を評価したところ、フライドポテト、ビスケットのAA分析に利用できることが示唆された。また、抽出時の試料量を1.0 gから0.20 gに変更することでポテトチップスやかりんとうに応用できる可能性が示された。
2. 本研究で開発した分析法の有効性評価のため、英国食料環境研究庁が実施している技能試験FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme)に参加し、AA濃度が260 ng/gのビスケット試料に対して 235 ± 75 ng/gという分析値を示すことができた。この測定におけるz-scoreが-0.5であったことから、本研究で開発した分析法が、ビスケットに関しては妥当なAA濃度を導くことが期待された。

2. 中課題名「食品の着色度を代用特性とする AA 含有量の測定」

ポテトチップスでは、アルコール溶液抽出液を蛍光測定した値が化学的分析 AA 濃度値と相関が高く、代用特性としての適用性、汎用性が高いことがわかった。さらには、生産工場ごとに抽出液の測定条件を設定した場合には蛍光測定に加えて吸光測定でも AA 濃度の代用特性値として使用できる可能性が示唆された。また、生地スナック、味剤付きスナック製品においても、蛍光測定、吸光測定のどちらもが、コーヒーにおいては蛍光測定が AA 濃度との相関が高く、代用特性値として可能性が示唆された。

(1) 小課題名「モデル系およびポテトチップスの褐変物質の抽出方法検討」

1) 平成 22 年度までの研究実績概要

ガラス繊維濾紙にフルクトースおよびアスパラギン溶液を滴下し、それをフライ調理し、各種 AA 濃度 40、380、1220、1530、2060、2390 $\mu\text{g/kg}$ のモデル系を調製した。またポテトチップスでは褐変度を基に 6 つに分類し、AA 濃度 680、1520、2110、2600、2990、3660 $\mu\text{g/kg}$ の標準サンプルを調製した。前処理としてミキサーにて粉碎後、ヘキサンで脱脂し、脱脂粉末サンプルを水、酢酸エチル、アセトン、そして 50%~100% のエタノール溶液で褐変物質等を抽出した。結果としてエタノール溶液での抽出が望ましい事が分かった。

加えて、ヘキサン脱脂後のヘキサン留去では減圧乾燥器を使用することで 15 分程度での短時間が可能であることが分かった。

2) 平成 23 年度における研究実績概要

平成 21 年度で終了。

3) 成果の内容

1. モデル系およびポテトチップスからの褐変物質抽出にはヘキサン脱脂後、エタノール溶液による抽出方法が最も望ましいことを解明した。
2. ヘキサン脱脂後のヘキサン留去では、減圧乾燥により短時間処理が可能であることを明らかとした。

(2) 小課題名「モデル系およびポテトチップスからの抽出褐変溶液の着色度および蛍光度と AA との関係解析」

1) 平成 22 年度までの研究実績概要

ガラス繊維濾紙にフルクトースおよびアスパラギン溶液を滴下し、それをフライ調理し、各種 AA 濃度 40、380、1220、1530、2060、2390 $\mu\text{g/kg}$ のモデル系を調製した。またポテトチップスでは褐変度を基に 6 つに分類し、AA 濃度 680、1520、2110、2600、2990、3660 $\mu\text{g/kg}$ の標準サンプルを調製した。これら調製サンプルをモデル系では、80~90%のエタノール溶液にて抽出し、300~450 nm の吸光測定で、また蛍光測定では 75~90%のエタノール溶液にて抽出し、励起波長 (Ex) 400 および 450 nm での測定波長 (Em) 600~640nm において AA の化学的分析値と 0.981 以上の相関係数が得られた。また、ポテトチップスでは、50~75%エタノール溶液抽出、400~500 nm の吸光測定、また 75~90%エタノール抽出、Ex:450 nm、Em:560~640 nm において AA の化学的分析値と 0.990 以上の相関係数が得られた。

2) 平成 23 年度における研究実績概要

平成 22 年度で終了。

3) 成果の内容

1. モデル系において、吸光測定や蛍光測定の値と AA の化学的分析値と 0.981 以上の相関係数が得られた。
2. ポテトチップスサンプルにおいても、吸光測定や蛍光測定で 0.990 以上の高い相関係数が得られ、AA 値の代用特性値として応用可能であることが分かった。

(3) 小課題名「工場生産ポテトチップスでの検証および他食品での検証」

1) 平成 22 年度までの研究実績概要

生産工場を異にするポテトチップスサンプル（4 工場、各 6 サンプル）において吸光測定（75%エタノール抽出、378 nm）や蛍光測定（50%エタノール抽出、Ex : 450 nm、Em : 510 nm）と AA 値との相関係数はそれぞれ 0.844、0.978 であった。また、生産工場が異なるサンプル抽出液では同じ着色度でも AA 値が異なることが認められ、生産工場毎に着色度とアクリルアミド値との相関関係を明確にする必要が示唆された。加えて、低濃度域のポテトチップスサンプル 290 $\mu\text{g}/\text{kg}$ においても同様に測定が可能であることが確認できた。

2) 平成 23 年度における研究実績概要

生産工場毎に吸光測定、蛍光測定条件を解析した結果、吸光測定と AA 値との相関係数はそれぞれ 1.000、0.995、0.990、1.000、蛍光測定と AA 値との相関係数は 1.000、0.997、0.996、0.998 と極めて高い相関が得られた。

また、2 種類の生地スナック製品のフライ時間をコントロールすることにより AA 値を調整したサンプル（A : 110、170、490、1070、1230 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、B : 190、300、700、1040、1370 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）においても同様に検討を行った結果、吸光測定（製品 A : 75%エタノール抽出、272 nm、製品 B : 50%エタノール抽出、360 nm）、蛍光測定（製品 A : 80%エタノール抽出、Ex : 400 nm、Em : 500 nm、製品 B : 水抽出、Ex : 400 nm、Em : 520 nm）と AA 値との相関は、それぞれ 1.000、0.999、1.000、1.000 と極めて高い相関が得られた。

さらに、市販されていた味剤付きスナック製品（AA 値 : 880、1180、1400、1500、1640、1650、3210、3520 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）において、吸光測定（75%エタノール抽出、410 nm）、蛍光測定（水抽出、Ex : 400 nm、Em : 490 nm）と AA 値との相関は、それぞれ 0.973、0.987 であり、製品の味剤による着色の影響を受けずに測定できる可能性が示唆された。

また、コーヒー豆（AA 値 : 190、190、220、280、320、440 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）において、吸光測定（水抽出、648 nm）、蛍光測定（水抽出、Ex : 450 nm、Em : 630 nm）と AA 値との相関は、それぞれ 0.920、0.991 であり、吸光測定よりも蛍光測定の方が高い相関が認められ、AA 値の代用特性値としての可能性が示唆された。

3) 成果の内容

1. 異なる 4 工場で生産したポテトチップスサンプルにおいて吸光測定・蛍光測定と AA 値との相関係数はそれぞれ 0.844、0.978 であり、吸光測定ではやや相関係数が低くなったが、工場毎に解析を行うことで、1.000、0.995、0.990、1.000 と極めて高い相関が得られることが分かった。

2. 生地スナックや味剤付きスナックについても、吸光測定、蛍光測定で AA 値との高い相関が得られ、生地スナックへの応用が可能であること、また味剤の影響を受けずに AA 値の代用特性値として使用できる可能性が示唆された。
3. コーヒー豆においては、吸光測定より蛍光測定の方が AA 値との相関が高くなり、AA 値の代用特性値としての可能性が示唆された。

3. 中課題名「食品中 AA の免疫測定系の開発」

合計 7 種類のデザインにより調製した免疫原および 5 種類の動物種を用いてアクリルアミド(AA)の間接競合 ELISA 用ポリクローナル抗体の作製方法を検討し、最適方法を決定した。ウサギ抗 3-CTBA 抗血清を用いて、(1)幅広い食品に対応、(2)所要時間が 6 時間以内で分析技術の習熟は不必要、(3)定量下限は 60 ng/g (相対標準偏差 20%以内)、(4)初期投資 100 万円程度で 1 検体あたりの分析コストが 3,000 円程度、の条件を満たす安価かつ迅速で多検体同時測定が可能な実用水準の AA 測定用間接競合 ELISA 法を確立した。標準曲線 (4 パラメータロジスティック関数) の作成に用いる AA 濃度範囲は 0.69~500 ng/mL、検出下限値は 0.4 ng/mL、定量範囲(RSD<20%)は 1~500 ng/mL すなわち 60~30,000 ng/g 食品相当である。本 ELISA 法用に開発したウサギ抗 3-CTBA 抗体は、誘導体化前の intact な AA および 3-MBA とは反応しない。また、AA 構造類似体との交差反応率は、交差反応性が最も高いアクリロニトリルおよびメタクリルアミドでそれぞれ AA の 1.4%および 0.7%であった。以上の結果より、本 ELISA 法は食品中の AA を特異的に測定できると結論された。なお、平成 23 年 10 月 12 日にこの間接競合 ELISA キットを「モリナガ アクリルアミド EIA キット」として発売した。

より簡便な AA の免疫測定系としてイムノクロマト法を開発し、カラーラテックスビーズ (Merck Blue) で標識した抗体を用いることにより、300 ng/g 食品相当の標準 AA を目視によって検出できる間接競合イムノクロマト法を構築した。目視によらず、イムノクロマトリーダー装置によりシグナル強度を数値化して有意差検定した結果からも、300 ng/g 食品相当の標準 AA を検出可能であることが確認された。この間接競合イムノクロマト法によって食品の抽出液中に含まれる AA が実際に検出可能かどうかを、6 種類の標準食品[ERM-BD274 Rusk (74 ± 7 ng/g)、FAPAS-T3026 Crispbread (157 ± 33.2 ng/g)、FAPAS-T3025 Biscuit (322 ± 61.1 ng/g)、ほうじ茶葉 NFRI-AA 001a (560 ± 160 ng/g)、ERM-BD272 Crispbread (980 ± 90 ng/g)、ほうじ茶葉 NFRI-AA 001b (1490 ± 350)] および 6 種類のモデル加工ポテトチップス[① (6300 ng/g)、② (2400 ng/g)、③ (1600 ng/g)、④ (880 ng/g)、⑤ (590 ng/g)、⑥ (470 ng/g)]を用いて検討した。判定ラインのシグナル強度をクロマトリーダーにより数値化して有意差検定 (一元配置分散分析および Tukey ならびに Dunnett の多重比較) を行った結果、この間接競合イムノクロマト法により食品中の AA を濃度依存的に検出可能ではあるが、標準 AA に対する検出下限値 (300 ng/g 食品相当) と標準食品群やポテトチップス群に対する検出下限値 (それぞれ 560 ng/g および 880 ng/g) が異なっていた。この原因は食品マトリックスの影響と推察され、食品マトリックスの影響を回避するためには、食品抽出液を更に希釈して測定するなどの更なる検討が必要である。また、もしも食品マトリックスの影響を完全に排除できない場合には、各種食品に対する本イムノクロマト法の適用性に関して食品ごとの検出下限値を提示する必要がある。

(1) 小課題名「AA に対する抗体の作製」

1) 平成22年度までの研究実績概要

平成21年度には、合計7種類のデザインにより調製した免疫原および5種類の動物種を用いて、AAの間接競合ELISA法用ポリクローナル抗体の最適な作製方法を検討した。

まず始めに予備試験として、7種類のAA誘導体をKLH (keyhole limpet hemocyanin; スカシ貝ヘモシアニン) へ共有結合させて調製した免疫原 (以下の①～⑦)

- ① $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{KLH}$
- ② $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{12}-\text{NH}-\text{CO}-\text{KLH}$
- ③ $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_5-\text{CO}-\text{NH}-\text{KLH}$
- ④ $\text{KLH}-\text{NH}-\text{CO}-\phi-3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ (ϕ はベンゼン環を表す)
- ⑤ $\text{KLH}-\text{NH}-\text{CO}-\phi-4-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$
- ⑥ $\text{KLH}-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$
- ⑦ $\text{KLH}-\text{NH}-\text{CO}-\phi-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$

によりモルモットおよびウサギ (1種類の免疫原につきそれぞれ3羽) を免疫し (免疫スケジュールは、初回免疫のあと2週間おきに4回の追加免疫を行い、最終追加免疫の1週間後に全採血)、初回免疫から5, 7, 9週間後に各個体から採血して血清中の抗体力価を測定した。この結果、ウサギおよびモルモットはいずれのデザインの免疫原に対しても抗体を産生したが、モルモットの抗血清はウサギの抗血清に比べて抗体力価が明らかに低かった。また、同じ動物種であっても抗体力価は個体ごとに大きな差異が認められた。抗体力価の経時変化を7種類の免疫原について比較すると、あるデザインの免疫原では徐々に増加した抗体力価はプラトーに達したあとあまり減少しないのに対し、別のデザインの免疫原では抗体力価がある時点でピークに達し、その後追加免疫しても力価は減少した。

上記の予備試験で得られた7種類の免疫原に対する抗血清を用いて、小課題(2)「AA免疫測定系の開発」の測定系構築を併行して実施し、得られた検量線の結果から目標とする実用感度に到達可能な抗体作製方法について検討した結果、免疫原として上記の④ $\text{KLH}-\text{NH}-\text{CO}-\phi-3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$ (3-CTBA-KLH)を用いる方法が最適であることを見いだした。

この結果を受けて、④の3-CTBA-KLHを免疫原に用いて5種類の動物種 (マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ) を免疫し、血清中の抗3-CTBA抗体力価を経時的に追跡することにより抗3-CTBA抗体が最もできやすい動物種および追加免疫回数ならびに全採血の時期などを検討した。その結果、最も高い力価の抗体を得るために最適な動物種はウサギであり (ヤギが2番目によい)、追加免疫回数は3～4回、全採血時期は最終追加免疫の1週間後であると結論された (図1)。また、このようにして得たウサギ抗血清は、併行して検討を実施した小課題(2)「AA免疫測定系の開発」の測定系開発の結果より、3-CTBAに対する特異性とアフィニティーが共に十分に高い実用的な抗体であり、このウサギ抗血清を利用した間接競合ELISA法は実用水準に到達することが十分に可能と判断された。

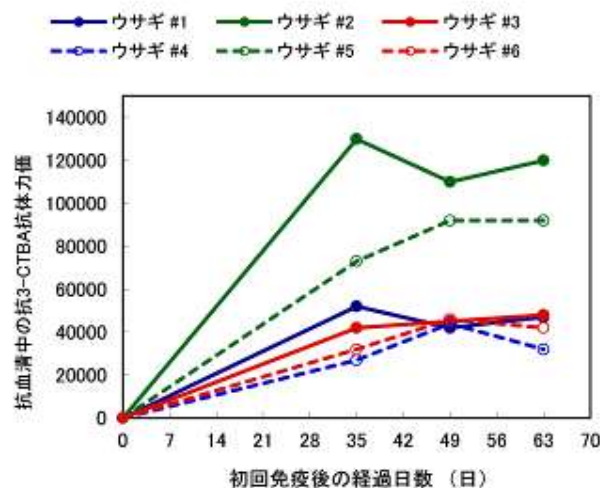


図1 ウサギ抗 3-CTBA 抗血清の力価

平成22年度には、イムノクロマト法開発用にモノクローナル抗体の取得を試みた。平成21年度の結果は、マウスはウサギに比べて3-CTBAに対する抗体ができにくいことを示しているが、一般的な知見からもまた当社の経験からも、イムノクロマト法にはポリクローナル抗体よりもモノクローナル抗体が適するため、AAのイムノクロマト法開発用としてマウス抗3-CTBAモノクローナル抗体の取得に敢えて挑戦した。しかし、結果的には、得られたマウスモノクローナル抗体は上記ウサギ抗体と比較してIgG当たりの力価（広義のアフィニティー）が大略2桁低く、性能的にも経済的にもウサギ抗体に劣っていたため、イムノクロマト法へのモノクローナル抗体の利用を断念した。従って、AA測定用イムノクロマト法の開発にはウサギの抗3-CTBA抗体を用いることとし、これ以上の抗体作製は行わないこととした。

2) 平成23年度における研究実績概要

AA測定用の抗体作製方法については、平成21年度（合計7種類のデザインによる免疫原および5種類の動物を用いたELISA用ポリクローナル抗体の検討）および平成22年度（イムノクロマト法開発用の3-CTBAに対するマウスモノクローナル抗体の検討）を以てすべての検討を終了しており、平成23年度における研究実績はない。

3) 成果の内容

1. AA測定用のELISA法およびイムノクロマト法に使用する抗体の作製方法として、ウサギによる抗3-CTBA抗体の作製方法を開発した。
2. 3-CTBA-KLHによるウサギの最適免疫スケジュールは、初回免疫（0.5 mg/ウサギ）のあと2週間おきに3~4回の追加免疫（0.9 mg/ウサギ/回）を行い、最終追加免疫の1週間後に全採血する。
3. 得られた抗血清は3-CTBAに対する特異性とアフィニティーが共に十分に高い実用的な抗体であった。

(2) 小課題名「AA 免疫測定系の開発」

1) 平成 22 年度までの研究実績概要

(A) ELISA 系

平成 21 年度には、上記の小課題(1)「AA に対する抗体の作製」に記載の予備試験で得られた 7 種類の免疫原に対するウサギ抗血清を用いて、それぞれの ELISA 用抗原（例えば 3-CTBA-BSA）を 1 $\mu\text{g/mL}$ 濃度にてコートしたイムノプレート上で、まず、抗血清の抗体力価を測定し、抗血清中に十分な力価の抗体が存在することを確認したあと、次に、それぞれのデザインについて chequerboard titration 法により最適条件（できるだけ低いコート抗原濃度とできるだけ高い抗血清希釈倍率の組合せ条件）を決定して、7 種類の測定系を個別に構築した。各測定系で大まかな検量線を作成し、目標感度を達成できそうな抗体を作製するための抗原デザインを検討した結果、上記④ $\text{KLH-NH-CO-}\phi\text{-3-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-NH}_2$ (3-CTBA-KLH) のデザインが最適であることを見いだした。その後、AA から 3-CTBA への誘導体化反応条件（3-MBA 濃度、反応温度、反応時間など）および ELISA の反応条件（一次反応、二次反応、酵素反応など）について詳細な検討を行い、全ての条件を最終決定して測定系の構築を完了した。

このようにして、平成 21 年度中に、小課題(1)に記載のウサギ抗 3-CTBA 抗血清を用いて、(1)幅広い食品に対応、(2)所要時間が 6 時間以内で分析技術の習熟は不必要、(3)定量下限は 50 ng/g 以下(相対標準偏差 20%以内)、(4)初期投資 100 万円程度で 1 検体あたりの分析コストが 3,000 円程度、の条件を満たす安価かつ迅速で多検体同時測定が可能な実用水準の AA 測定用間接競合 ELISA 法を確立した。

標準曲線（4 パラメータロジスティック関数）の作成に用いる AA 濃度範囲は 0.69 ～500 ng/mL、検出下限値は 0.4 ng/mL、定量範囲(RSD<20%)は 1～500 ng/mL すなわち 60～30,000 ng/g 食品相当であり、目標感度を達成できている。

本 ELISA 法に使用するウサギ抗 3-CTBA 抗体は、誘導体化前の AA および 3-MBA とは反応しない。また、AA 構造類似体との交差反応率は、交差反応性が最も高いアクリロニトリルおよびメタクリルアミドでそれぞれ AA の 1.4%および 0.7%であった。以上の結果から、本測定法は食品中の AA を特異的に測定できると結論された。

【参考】平成 22 年度においては、株式会社森永生科学研究所が自社費用によって独自に行う取り組みとして、本プロジェクトの成果を広く社会に還元し、食品中 AA の低減に向けた取り組みの促進に資するために、上記の AA 測定用間接競合 ELISA 法（安価・迅速・多検体同時測定が可能）をキット化するために必要な基礎検討を行った。キットの構成要素（3-CTBA-BSA をコートしたイムノプレート、検量線作成用の AA 標準品、3-MBA、抗 3-CTBA 抗体、洗浄液、酵素標識抗ウサギ IgG 抗体、酵素基質など）の調製方法、品質、安定性、および測定値の信頼性等、キット全体のパフォーマンスに関する基礎的データを蓄積すると共に、細部の条件を検討してキット化を達成した。

(B) イムノクロマト系

平成 22 年度より取り組んだ AA 用イムノクロマト法の開発では、目標定量下限を 100 ng/g 食品として平成 21 年度に取得した ELISA 用ウサギ抗 3-CTBA 抗血清を用いて、まず、金コロイド標識抗体による競合イムノクロマト法の開発をスタートした。ウサギ抗 3-CTBA 抗血清は金コロイドへの抗体標識効率を高めるために、硫安分画および DEAE クロマトにより IgG フラクシオンを粗精製して用いた。流速の異なるイムノクロマト担体 3 種類、判定ラインへの 3-CTBA-BSA の塗布量、抗体の金コロイド標

識を行う pH、金コロイド標識する抗体の濃度、標識時の凝集防止剤濃度、サンプル添加後の測定時間などについて条件検討を行い、最適な測定系を構築した。測定に際し、シグナル強度（ラインの濃さ）はイムノクロマトリーダー装置を用いて数値化し、目視判定と併せて評価を行った。AA 標準溶液を用いた検討（理想系）の結果は、ブランク対照（AA 濃度ゼロ）のシグナル強度を 100%としたとき、AA 濃度が 8.33 ng/mL（500 ng/g 食品相当）で 80%のシグナル強度、AA 濃度が 16.7 ng/mL（1,000 ng/g 食品相当）で 65%のシグナル強度となった（図 2）。目視判定では、AA 含有量が 500 ng/g 食品相当のときブランク対照とのはっきりとした差を認知できず、1,000 ng/g 食品相当においてはじめてはっきりとした差を認知できた（図 3）。すなわち、到達できた定量下限値は 500～1,000 ng/g 食品相当であり、目標とする感度には 1 桁足りなかった。

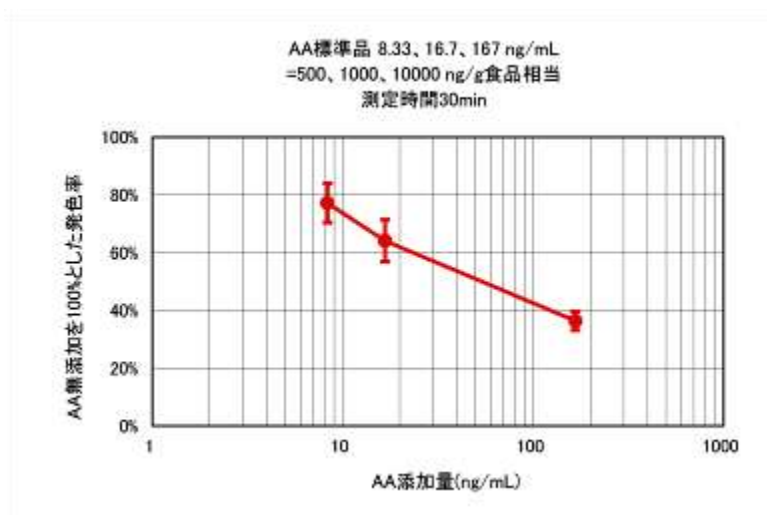


図 2 金コロイド標識ウサギ抗 3-CTBA 抗体を用いた間接競合イムノクロマト法による標準曲線（n=6）

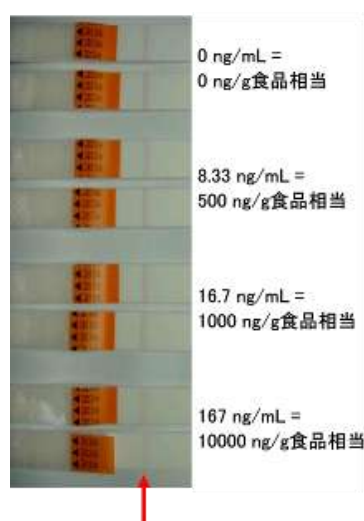


図 3 金コロイド標識ウサギ抗 3-CTBA 抗体を用いた間接競合イムノクロマト法による AA の検出

そこで、金コロイド標識抗体を用いるイムノクロマト法の感度アップを目指して、

- ① ウサギ抗 3-CTBA 抗体を従来の IgG フラクションからアフィニティー精製した特異抗体へ変更
- ② ヤギポリクローナル抗体の利用
- ③ マウスモノクローナル抗体の利用

などを検討した。検討の結果、①の特異精製したウサギ抗 3-CTBA 抗体を用いたイムノクロマト法は、IgG フラクションを用いた場合よりも感度が低下し、10,000 ng/g 食品相当でしか競合がかからなかった。②のヤギポリクローナル抗体を用いたイムノクロマト法では、十分なシグナル強度を得ることができなかった。また、③のマウスモノクローナル抗体を用いたイムノクロマト法では、ブランク対照のシグナル強度は増強したが、3-CTBA との競合反応が見られず、適用を断念した。

上記のとおり、金コロイド標識したウサギ抗 3-CTBA 抗体によるイムノクロマト法の感度が十分ではなかったので、次に、金コロイドの代わりに Fluorescein isothiocyanate を用いて蛍光標識したウサギ抗 3-CTBA 抗体により感度アップの検討を行った。

Excitation 波長のバンドパスフィルターを装着した光源と emission 波長のカットオフフィルター付き眼鏡を用いて目視により蛍光を検出した結果、500 ng/g 食品相当が目視判定で検出可能であった（図 4）。

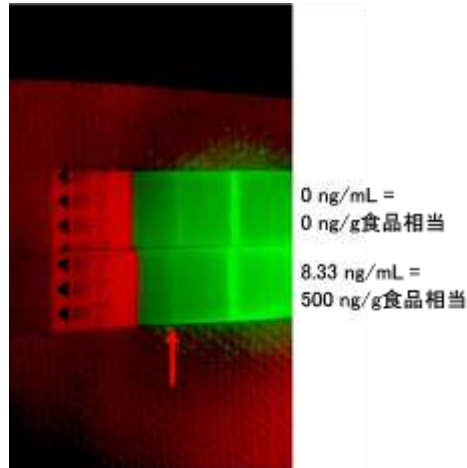


図4 蛍光標識ウサギ抗 3-CTBA 抗体を用いた
間接競合イムノクロマト法による AA の検出

しかし、バックグラウンドの蛍光が強く、目標とする感度に到達できなかった。そこでバックグラウンドの蛍光を低減するため、(1) 従来どおりのイムノクロマト操作を行ったあと洗浄液の中に単体を浸して担体上に残存する蛍光標識抗体を洗い流す(図5)、(2) イムノクロマト担体を前もってブロッキングしておくことにより担体へ吸着する蛍光標識抗体の量を減らす(図6)、などの検討を試みた。両方法ともバックグラウンドの低減にある程度の効果はあったが、大幅な感度改善には至らなかった

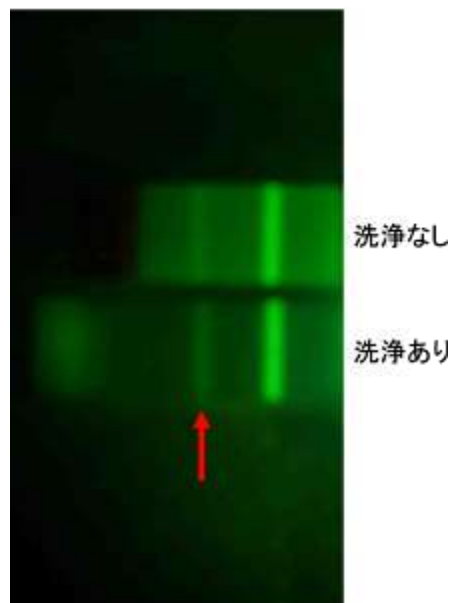


図5 洗浄前後の比較

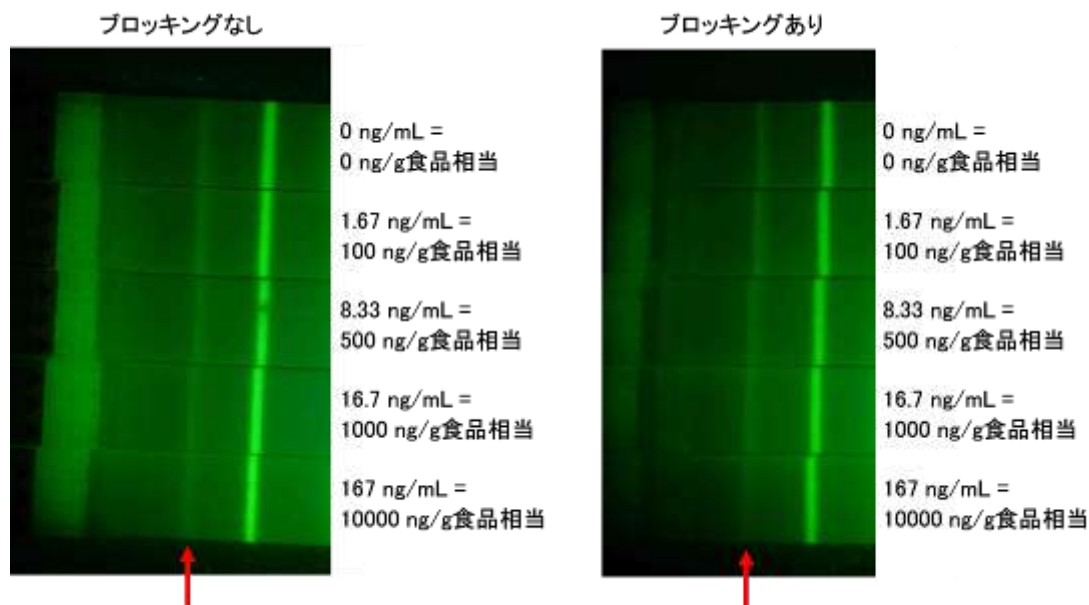


図6 ブロッキングの比較

2) 平成23年度における研究実績概要

(A) ELISA系

【参考】平成23年度においては、株式会社森永生科学研究所が自社費用によって独自に行う取り組みとして、上記AA測定用間接競合ELISAキットのSingle-Lab Validation および Multi-Lab Validation を実施した。また、平成23年10月12日にこの間接競合ELISAキットを「モリナガ アクリルアミドEIAキット」として発売した。

(B) イムノクロマト系

平成23年度は、平成22年度に到達したイムノクロマト法（定量下限値 500～1,000 ng/g 食品相当）の10倍感度アップを目標として、

- ① サンプル中のAAを3-MBAと反応させて3-CTBAへ誘導体化したあと、平成22年度に作製したマウス抗3-CTBAモノクローナル抗体を結合したイムノソーベントカラムを用いて3-CTBAを濃縮する方法
- ② 市販固相抽出カラムによりサンプル中のAAを直接濃縮する方法
- ③ 新たな試みとして、3-MBA-Fluoresceinを用いたAA濃度依存的なシグナル強度を与える測定系の構築
- ④ 平成22年度に検討した金コロイド（赤色）およびFluorescein Isothiocyanateの代わりにカラーラテックスビーズ（赤色、青色、黒色など）を用いて抗体を標識する方法
- ⑤ シグナル強度の僅かな変化を定量できる安価で簡易な普及版イムノクロマト用測定機器の開発

を検討した。

これらの検討を行った結果、

①の検討については、マウス抗3-CTBAモノクローナル抗体を用いたイムノソーベントカラムが低濃度の3-CTBAを定量的に吸着・回収できず、成功しなかった。

また、高濃度の3-CTBAを用いた場合では大半が吸着されずに素通りした。

②については、ISOLUTE ENV+ 10 mg/1 mL カラム（バイオタージ・ジャパン販売）による検討で、標準 AA の水溶液（理想系）がカラムと弱い相互作用を示した。そこで、より大容量の ISOLUTE ENV+ 100 mg/1 mL カラムを用いて検討を進めた結果、約 90%の回収率にて 4.5 倍の AA 濃縮を達成できた（表 2）。濃縮方法を具体的に説明すれば、ISOLUTE ENV+ 100 mg/1 mL カラムをコンディショニング（順次、300 μ L の 100%メタノールで 1 回と 300 μ L の精製水で 2 回洗浄）したあと、標準 AA の水溶液 2.5 mL を 10 等分して 250 μ L ずつを 10 回カラムへアプライする。1 回アプライするごとに 1 分間放置し、2.5 mL の全量をアプライするのに 10 分間の時間をかける。続いて、カラムに 1 回当たり 250 μ L の 60%メタノールを合計 4 回添加し、AA を溶出する（250 μ L ずつのフラクションを採取）。

表 2 ISOLUTE ENV+ 10 mg/1mL カラムによる AA の濃縮

フラクション	AA 濃度 (ng/mL)	液量(mL)	Total AA (ng)	回収率
添加 AA 水溶液	10.0	2.5	25.0	100%
素通り 1	定量限界以下	0.25	－	0%
素通り 2	定量限界以下	0.25	－	0%
素通り 3	定量限界以下	0.25	－	0%
素通り 4	定量限界以下	0.25	－	0%
素通り 5	定量限界以下	0.25	－	0%
素通り 6	定量限界以下	0.25	－	0%
素通り 7	定量限界以下	0.25	－	0%
素通り 8	定量限界以下	0.25	－	0%
素通り 9	定量限界以下	0.25	－	0%
素通り 10	定量限界以下	0.25	－	0%
溶出 1	定量限界以下	0.25	－	0%
溶出 2	75.5	0.25	22.4	89.5%
溶出 3	14.0	0.25		
溶出 4	定量限界以下	0.25	－	0%

10 ng/mL AA 水溶液を 0.25 mL ずつ 10 回に分けて ISOLUTE ENV+カラムへ添加した。溶出は 60%メタノールにより行った。

続いて、標準 AA 水溶液（理想系）の代わりに 4 種類の標準食品（ERM-BD274 Rusk (74 $\pm$ 7 ng/g)、FAPAS-T3026 Crispbread (157 $\pm$ 33.2 ng/g)、FAPAS-T3025 Biscuit (322 $\pm$ 61.1 ng/g)、ほうじ茶葉 NFRI-AA 001a (560 $\pm$ 160 ng/g)) およびモデル加工ポテトチップス (465 ng/g) の抽出液を用いて上記の方法により濃縮を行ったとき、認証値あるいは日本食品分析センターの機器分析値をもとに算出した理論値に対して 70~80%程度の回収率(ERM-BD274 Rusk は 78.2%、FAPAS-T3026 Crispbread は 84.0%、FAPAS-T3025 Biscuit は 80.0%、ほうじ茶葉 NFRI-AA 001a は 72.6%、ポテトチップス

は 68.2%) で大略 $3.5 \sim 4$ 倍の濃縮が達成された。

③の試みは、3-MBA-Fluorescein の合成を中部大学に依頼し、少量の 3-MBA-Fluorescein を入手して誘導体調製を行い、抗体との反応性を調べたがウサギ抗 3-CTBA 抗体とは反応しなかった。

④のカラーラテックスビーズ（赤色、青色、黒色など）による抗体標識法では、Merck Blue（Merck, Cat. No. K010; 平均粒径 104 nm）による成績が最もよく、300 ng/g 食品相当の標準 AA でブランク対照との間にはっきりとした差が目視によって確認できた（図 7）。また、シグナル強度をイムノクロマトリーダー装置により数値化したあと、有意差検定（Tukey および Dunnett の多重比較、 $n=5$ 、有意水準 5%）をブランク対照と 4 濃度（1.67 ng/mL（100 ng/g 食品相当）、5 ng/mL（300 ng/g 食品相当）、16.7 ng/mL（1000 ng/g 食品相当）、167 ng/mL（10000 ng/g 食品相当））との間で行った結果も、ブランク対照と 5 ng/mL（300 ng/g 食品相当）の間には有意差が認められた（ブランク対照と 1.67 ng/mL（100 ng/g 食品相当）の間には有意差が認められなかった）（図 8）。

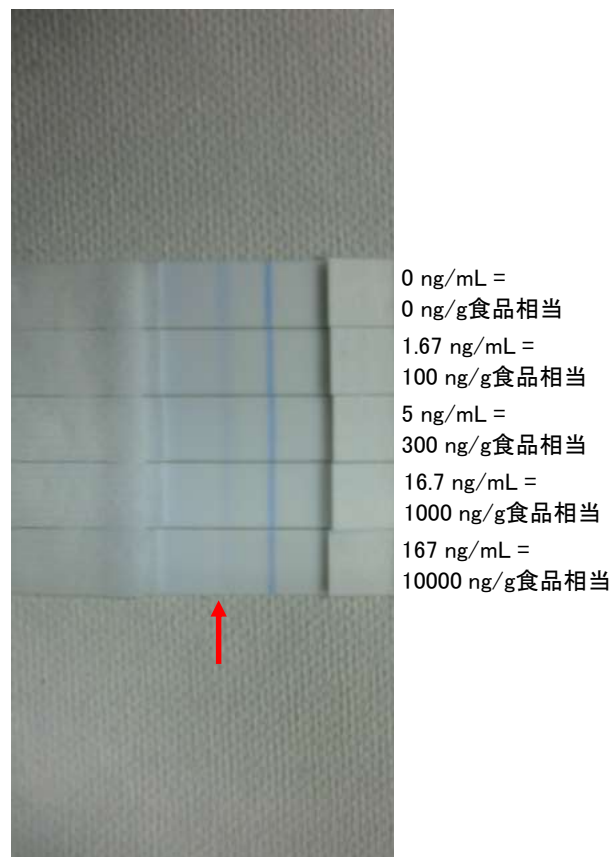


図 7 カラーラテックス標識ウサギ抗 3-CTBA 抗体を用いた
間接競合イムノクロマト法による AA の検出

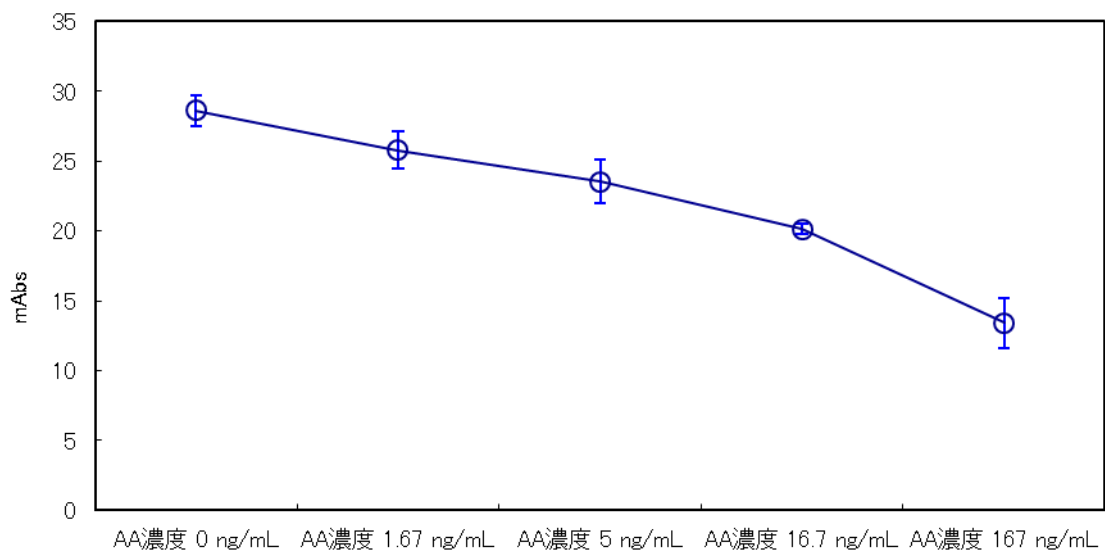


図8 カラーラテックス標識ウサギ抗 3-CTBA 抗体を用いた
間接競合イムノクロマト法による標準曲線（平均値±SD;n=5）

⑤の検討については、1台10万円程度の原材料費で量産が可能な普及版簡易測定器のプロトタイプ試作を完了した（図9）。



図9 普及版イムノクロマト用測定器のプロトタイプ

3) 成果の内容

(A) ELISA 系【参考】

1. AA 測定用間接競合 ELISA キットの Single-Lab Validation を実施し、良好な結果を得た。

2. AA 測定用間接競合 ELISA キットの Multi-Lab Validation を実施し、良好な結果を得た。
3. 間接競合 ELISA キットを「モリナガ アクリルアミド EIA キット」として発売した。

(B) イムノクロマト系

1. ISOLUTE ENV+ 100 mg/1 mL カラムにより標準食品抽出液中の AA を約 75%の回収率で 3.5 倍濃縮できた。
2. カラーラテックスビーズ (Merck Blue) により抗体を標識することにより、目視によって 300 ng/g 食品相当の標準 AA を濃度依存的に検出できるイムノクロマト法を構築した。また、イムノクロマトリーダー装置によりシグナル強度を数値化して有意差検定した結果においても、300 ng/g 食品相当の AA 検出が可能であった。

(3) 小課題名「AA を含む食品への応用」

1) 平成 22 年度までの研究実績概要

(A) ELISA 系

平成 21 年度においては、小課題(2)「AA 免疫測定系の開発」により構築した ELISA 法により、4 種類の食品 (ポテトチップス、ビスケット、かりんとう、ほうじ茶) の水抽出液中に含まれる AA 濃度を LC/MS 法 (森永製菓株式会社研究所にて測定) および間接競合 ELISA 法により同時測定し、測定値の相関性を調べた。両者の測定値はよく一致し、 $R^2=0.99$ の良好な相関が認められた。これらの結果は、本 ELISA 法によって従来の機器分析と同等の信頼できる AA 測定結果が得られることを示唆した。

平成 22 年度には、平成 21 年度の推進会議にて指摘を受けた事項 (①AA 用標準食品サンプルを用いて本 ELISA 法による測定値の妥当性を検証する、②異なるマトリックスからの AA 抽出率を検討する) について開発を推進するとともに、本測定法の食品への適用範囲を検討するために多品目の食品サンプルについて測定を行った。

まず、本 ELISA 法による測定値の妥当性を検証するために、5 品目の AA 用標準食品 (認証標準物質および FAPAS 食品サンプル) の AA 含有率を本 ELISA 法、森永製菓株式会社研究所 (LC/MS) および日本食品分析センター (GC/MS; AA 分析に関して ISO/IEC17025 の認定機関) により測定し、それぞれの測定値を認証値と比較した (表 3)。なお、本 ELISA 法は 1 回につき 3 重測定を行い、これを日を変えて 3 回繰り返し測定して、その平均値を測定値とした。また、LC/MS では、1 回の測定で 1 本の抽出液を 3 回繰り返し測定し、これを日を変えて抽出から 3 回繰り返し測定して、その平均値を測定値とした。表 3 の結果は、本 ELISA 法による測定値が認証値 (平均値) とよく一致し、従来の機器分析による測定値ともよく相関することを示しており、本 ELISA 法による測定値の妥当性を証明している。

表 3 ELISA 測定値と機器分析測定値の比較

AA 用標準食品	認証値 (ng/g)	ELISA (森永生科学研究所)		LC/MS (森永製菓)		GC/MS (日本食品分析センター)	
		測定値 (ng/g)	測定値/認証 値 (%)	測定値 (ng/g)	測定値/認証 値 (%)	測定値 (ng/g)	測定値/認証値 (%)
Crispbread*	157	143	91.2	140	89.4	140	89.2
Biscuit*	322	344	106.7	294	91.2	290	90.1
Crispbread**	980±90	969	98.9	846	86.3	870	88.8
ほうじ茶葉 a***	560±160	783	139.8	473	84.4	530	94.6
ほうじ茶葉 b***	1,490±350	1,691	113.5	1202	80.7	1300	87.2

また、表 3 の結果より、森永製菓株式会社研究所の LC/MS による測定値と日本食品分析センターの GC/MS による測定値はよく一致し、森永製菓株式会社研究所の LC/MS 測定値は信頼できると考えられる。そこで、市販食品の品目を前年度の 5 品目から 25 品目（ビスケット 2 社、乳幼児用ビスケット 3 社、クラッカー 2 社、かりんとう、食パン、ドーナツ、コーンスナック、コーンフレーク、揚げ煎餅、マッシュポテト、ポテトスナック、フレンチフライ、芋けんぴ、黒砂糖、ココア、ブラックチョコレート、焼豆腐、厚揚げ、ほうじ茶葉、紅茶葉、緑茶葉）に増やし、品目ごとに ELISA 測定値と LC/MS 法による測定値との相関を調べた。この結果においても ELISA と LC/MS の測定値はよく一致し（表 4）、両者間には $R^2=0.99$ の相関が認められた（図 10）。

表 4 本 ELISA 法と LC/MS 法（森永製菓株式会社研究所）による
市販食品 25 品目の AA 含有率測定値の比較

市販食品の品目	主原材料	LC/MS (ng/g 食品)	ELISA Mean±SD (n=3) (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

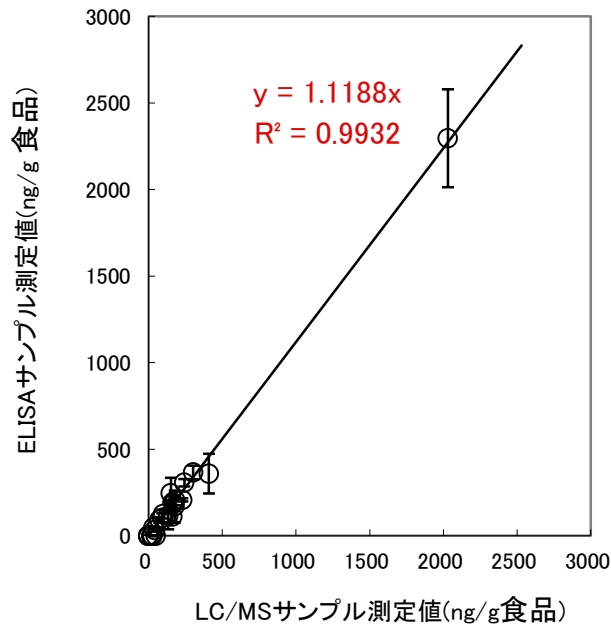


図 10 ELISA 法と LC/MS 法（森永製菓株式会社研究所）による市販食品 25 品目の AA 含有率測定値の相関性 (n=3)

以上の結果は、本 ELISA 法による測定値は従来の機器分析法による測定値とよく一致し、相関性も高いことを示している。

更に、測定対象とする市販食品の品目を代表的な食品 15 品目（ポテトチップス、ポテトスナック、フライドポテト、ビスケット、かりんとう、コーンスナック、ラスク、芋けんぴ、揚げ煎餅、豆スナック、即席麺、麦茶、ほうじ茶、ココア、コーヒー）に絞り込み、1 品目当たりメーカーの異なる 5 サンプルを収集し、表 2 および図 2 の場合と同様にして ELISA と機器分析の測定値を比較することにより、本キットの適用性を食品ごとに調べた。その結果、ポテトチップス、ポテトスナック、フライドポテト、ビスケット、かりんとう、コーンスナック、芋けんぴ、ほうじ茶に関しては良好な測定値の相関性が得られた。しかし、ラスク、揚げ煎餅、豆スナック、即席麺は AA 濃度が低く、ELISA の定量下限値以下であったため、相関性の十分な評価が困難であった。麦茶、ココア、コーヒーでは、AA 濃度が ELISA の定量範囲内であっても LC/MS 法による測定値との相関は低く、更なる検討が必要である。

(B) イムノクロマト系

平成 22 年度中には、イムノクロマト法の測定感度が目標に到達できなかったため、イムノクロマト法によって食品サンプルを測定する段階には到らなかった。

2) 平成 23 年度における研究実績概要

(A) ELISA 系【参考】

平成 23 年度においては、株式会社森永生科学研究所が自社費用によって独自に行う取り組みとして、上記 AA 測定用間接競合 ELISA キットの Single-Lab

Validation および Multi-Lab Validation を実施した。また、平成 23 年 10 月 12 日にこの間接競合 ELISA キットを「モリナガ アクリルアミド EIA キット」として発売した。

(B) イムノクロマト系

平成 23 年度に開発した小課題(2)「AA 免疫測定系の開発」(B)に記載のカラーラテックスビーズ (Merck Blue) で標識したウサギ抗 3-CTBA 抗体を用いた競合イムノクロマト法によって、食品の抽出液中に含まれる AA が実際に検出可能かどうかを調べた。測定に用いた食品サンプルは、6 種類の標準食品 [ERM-BD274 Rusk (74 ± 7 ng/g)、FAPAS-T3026 Crispbread (157 ± 33.2 ng/g)、FAPAS-T3025 Biscuit (322 ± 61.1 ng/g)、ほうじ茶葉 NFRI-AA 001a (560 ± 160 ng/g)、ERM-BD272 Crispbread (980 ± 90 ng/g)、ほうじ茶葉 NFRI-AA 001b (1490 ± 350)] および 6 種類のモデル加工ポテトチップス [① (6300 ng/g)、② (2400 ng/g)、③ (1600 ng/g)、④ (880 ng/g)、⑤ (590 ng/g)、⑥ (470 ng/g)] の合計 12 種類とした。対照には AA を全く含まない水を用いた。

まず、これらの食品抽出液を濃縮しないでそのまま 3-MBA と反応させて 3-CTBA へ誘導体化したあと (対照の水も同様に処理した) イムノクロマト法を行い、対照 (水) と食品抽出液の間にシグナル強度の差が認められるかどうかを判定した。判定は、浜松ホトニクス社製クロマトリーダーによる数値化 (有意差検定) および目視により行った。

クロマトリーダーにより数値化したデータ (図 11) を用いて有意差検定 (一元配置分散分析および Tukey ならびに Dunnett の多重比較、 $n=2$ 、有意水準 5%) を対照 (水) と各標準 AA 希釈列 4 濃度 (1.67 ng/mL (100 ng/g 食品相当)、 5 ng/mL (300 ng/g 食品相当)、 16.7 ng/mL (1000 ng/g 食品相当)、 167 ng/mL (10000 ng/g 食品相当)) との間で行ったとき、標準 AA 希釈列の 1.67 ng/mL (100 ng/g 食品相当) では対照 (水) との間に有意差が認められず AA の存在を確認できなかったが、 5 ng/mL (300 ng/g 食品相当) 以上では有意差が認められ、明確に AA の存在を確認できた。一方、標準食品では、ERM-BD274 Rusk (74 ± 7 ng/g)、FAPAS-T3026 Crispbread (157 ± 33.2 ng/g)、FAPAS-T3025 Biscuit (322 ± 61.1 ng/g) は有意差が認められず AA の存在を確認できなかったが、ほうじ茶葉 NFRI-AA 001a (560 ± 160 ng/g)、ERM-BD272 Crispbread (980 ± 90 ng/g)、ほうじ茶葉 NFRI-AA 001b (1490 ± 350 ng/g) については有意差が認められ、AA の存在を明確に確認できた。また、ポテトチップス⑥ (470 ng/g) および⑤ (590 ng/g) では有意差が認められず AA の存在を確認できなかったが、④ (880 ng/g)、③ (1600 ng/g)、② (2400 ng/g)、① (6300 ng/g) では有意差が認められ、AA の存在を明確に確認できた。目視による判定は、上記のクロマトリーダーにより数値化したデータの有意差が確認されるレベルと同等のレベルで検出可能であった。

以上の結果より、ラテックスビーズで標識したウサギ抗 3-CTBA 抗体を用いた競合イムノクロマト法により食品中の AA を濃度依存的に検出可能であったが、このイムノクロマト法の標準 AA に対する定量下限値 (300 ng/g 食品相当) と標準食品群やポテトチップス群に対する定量下限値 (それぞれ 560 ng/g および 880 ng/g) は同等ではなかった。このことは、図 11 において標準食品群およびポテトチップス群の近似直線が標準 AA の近似直線から右側 (感度低下の方向) へずれていることから明らかである。この原因は食品マトリックスの影響と推察される。食品マ

トリックスの影響を回避するためには、食品抽出液を更に希釈して測定するなどの検討が必要であろう。また、もしも食品マトリックスの影響を完全に排除できない場合には、各種食品に対する本イムノクロマト法の適用性に関して食品ごとの検出下限値を提示する必要があると考えられる。

次に、『小課題(2)「AA 免疫測定系の開発」の2』平成23年度における研究実績概要(B)イムノクロマト法』に記載の ISOLUTE ENV+ 100 mg/mL カラムにより濃縮した4種類の標準食品[ERM-BD274 Rusk (74 ± 7 ng/g)、FAPAS-T3026 Crispbread (157 ± 33.2 ng/g)、FAPAS-T3025 Biscuit (322 ± 61.1 ng/g)、ほうじ茶葉 NFRI-AA 001a (560 ± 160 ng/g)]およびモデル加工ポテトチップス(465 ng/g)の抽出液を用いて、イムノクロマト法の検出下限が予定どおり $1/3.5 \sim 1/4$ に低くすることができるかどうかを検討した。結果として、予定どおりに検出下限を低くすることはできなかった。原因は、イムノクロマト法のメタノール感受性が極めて高く、ISOLUTE ENV+ カラムから溶出された AA 濃縮液(60%メタノール溶液)から持ち込まれるメタノールによって測定系自体が影響を受け、発色が弱くなるためと考えられた。メタノールの影響を排除するための解決策については更なる検討が必要と思われる。

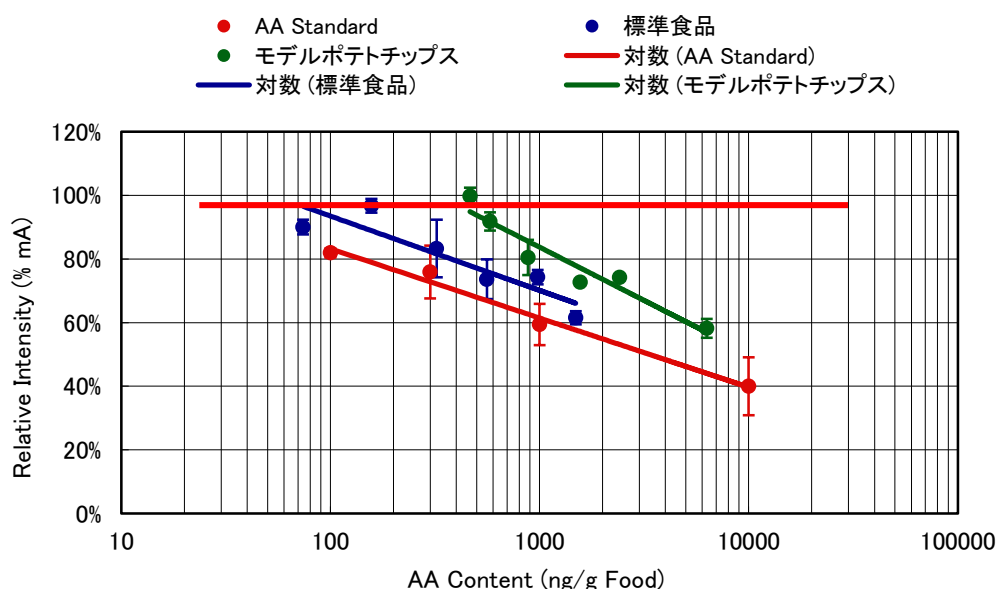


図 11 カラーラテックス標識間接競合イムノクロマト法による食品抽出液中の AA 測定

3) 成果の内容

(A) ELISA 系【参考】

1. AA 測定用間接競合 ELISA キットの Single-Lab Validation を実施し、良好な結果を得た。
2. AA 測定用間接競合 ELISA キットの Multi-Lab Validation を実施し、良好な結果を得た。

3. 間接競合 ELISA キットを「モリナガ アクリルアミド EIA キット」として発売した。

(B) イムノクロマト系

1. カラーラテックスビーズ (Merck Blue) で標識したウサギ抗 3-CTBA 抗体を用いることにより、食品中の AA を濃度依存的に検出することが可能な競合イムノクロマト法を開発した。
2. しかし、このイムノクロマト法はまだ完全ではなく、標準 AA に対する定量下限値 (300 ng/g 食品相当) と標準食品群やポテトチップス群に対する定量下限値 (それぞれ 560 ng/g および 880 ng/g) が異なっている。
3. この原因は食品マトリックスの影響と推察され、食品マトリックスの影響を回避するために食品抽出液を更に希釈して測定するなどの更なる検討が必要である。また、もしも食品マトリックスの影響を完全に排除できない場合には、各種食品に対する本イムノクロマト法の適用性に関して食品ごとの検出下限値を提示する必要がある。

V. 論文、特許等の実績等

別添のとおり。

これまでの論文、特許等の実績等

学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名
Determination of acrylamide in foods by HPLC-method using derivatization with 2-mercaptobenzoic acid, K. Tsutsumiuchi, Y. Hattori, A. Kanematsu, H. Koga, K. Ishihara, T. Honjo, M. Kato, T. Ukena, T. Urushiyama, <i>Food Hyg. Safety Sci.</i> , to be submitted.	中部大学

口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名
「メルカプト安息香酸を用いたアクリルアミド誘導体の合成と食品分析への応用」、堤内要、服部雄哉、古賀秀徳、石原克之、本庄勉、加藤正俊、漆山哲生、大島潔、三輪錠司、谷口肇、第98回日本食品衛生学会学術講演会、(2009. 10)	中部大学、カルビー(株)、(株)森永生科学研究所、農林水産省消費・安全局、石川県立大学
「食品中アクリルアミドの免疫測定系の開発」、高橋美津子、岡田展広、山本貴之、本庄勉、加藤正俊、堤内要、古賀秀徳、漆山哲生、浮穴学宗、日本農芸化学会2010年度大会、(2010. 3)	(株)森永生科学研究所、中部大学、カルビー(株)、農林水産省消費・安全局
「HPLCを用いた食品中アクリルアミド分析法の検討ー透析処理とメルカプト安息香酸による誘導体化反応の評価ー」、堤内要、服部雄哉、古賀秀徳、石原克之、本庄勉、加藤正俊、浮穴学宗、漆山哲生、三輪錠司、谷口肇、第99回日本食品衛生学会学術講演会、(2010. 05)	中部大学、カルビー(株)、(株)森永生科学研究所、農林水産省消費・安全局、石川県立大学
「食品中アクリルアミドの免疫測定系の開発」、高橋美津子、岡田展広、山本貴之、本庄勉、加藤正俊、堤内要、古賀秀徳、漆山哲生、浮穴学宗、第99回日本食品衛生学会学術講演会、(2010. 05)	(株)森永生科学研究所、中部大学、カルビー(株)、農林水産省消費・安全局
「HPLCを用いた食品中アクリルアミド分析法の検討-2-2-メルカプト安息香酸との誘導体化反応におけるメタノール溶媒の利用ー」、堤内要、服部雄哉、古賀秀徳、石原克之、本庄勉、加藤正俊、浮穴学宗、漆山哲生、三輪錠司、谷口肇、第100回日本食品衛生学会学術講演会、(2010. 09)	中部大学、カルビー(株)、(株)森永生科学研究所、農林水産省消費・安全局、石川県立大学

「褐変度を代用特性としたポテトチップス中アクリルアミドの測定方法の検討」、石原克之、米澤弥矢子、中田民枝、菅間史子、古賀秀徳、堤内要、本庄勉、漆山哲生、浮穴学宗、第100回日本食品衛生学会学術講演会、(2010、09)	カルビー(株)、中部大学、(株)森永生科学研究所、農林水産省
「HPLCを用いた食品中アクリルアミド分析法の検討－3－応用範囲の確認と有効性の検証－」、堤内要、服部雄哉、兼松亜由美、古賀秀徳、石原克之、本庄勉、加藤正俊、浮穴学宗、漆山哲生、第102回日本食品衛生学会学術講演会、(2011. 09)	中部大学、カルビー(株)、(株)森永生科学研究所、農林水産省消費・安全局
「食品中の着色度を代用特性とするアクリルアミド含有量の測定－ポテトチップスを例として－」、石原克之、米澤弥矢子、中田民枝、久保美沙子、古賀秀徳、堤内要、本庄勉、漆山哲生、浮穴学宗、日本農芸化学会2012年度大会、(2012、03)	カルビー(株)、中部大学、(株)森永生科学研究所、農林水産省

出版図書

区分:①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名
①	「食品中の化学物質と安全性」、古賀秀徳 他共著、(社)日本食品衛生協会、2009. 7	カルビー(株)
④	「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」が採用されて、堤内要、中部大学広報誌「ANTENNA」、2010. 2	中部大学

国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名
免疫測定試薬	高橋美津子、岡田展広、山本貴之、加藤正俊、本庄勉、堤内要	森永製菓株式会社	特許権	P2011-195453A	2010.3.2	—	(株)森永生科学研究所、中部大学

国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名