

コメ中カドミウム簡易迅速測定キット (カドミエール™)について

大阪事業所 佐治 幾太郎・大西 良和 / 本社 山科 清

1 はじめに

昭和40年頃富山県神通川下流域において、上流にある亜鉛鉱山精錬所の廃水が原因でコメをはじめとする農作物がカドミウム(Cd)に高濃度汚染され、これを長期にわたり摂取し続けたことによりイタイタイ病が発生した。

その後、昭和45年「農用地の土壤の汚染防止等に関する法律」が制定され、わが国の主要農産物であるコメについて、産地段階でのリスク管理のため、Cd濃度調査を毎年継続し、汚染米が市場に流通しないように規制されている。この調査で0.4ppm以上の玄米については、農林水産省(全国米麦改良協会)が農家から買い上げ、0.4ppm~1.0ppm未満のものは非食用(工業用糊等)に、1.0ppm以上のものは焼却処理している。

一方、食品中Cdの国際基準値がCODEX委員会食品添加物・汚染物質部会で検討され、平成18年7月に表1に示す検討結果(精米0.4ppm、葉菜0.2ppm等)が発表された。

この結果を受けて、今後我が国でもコメを筆頭に穀類、農作物、果物、魚介類など食品中のCd濃度基準が制定されると考えられる。

Cd濃度の測定法は、原子吸光法(公定法)などの機器分析法が一般的である。しかし、分析精度は高いが、測定に時間を要する、分析装置導入コストが高いなどの問題点があり、簡便かつ安価な測定法の開発が望まれていた。

このような中、関西電力株式会社と財団法人電力中央研究所が平成16年に世界に先駆けて開発に成功した重金

表1 CODEX委員会で採択されたCdの国際基準値(2006)

食品群	基準値(mg/kg)	備考
穀類(そばを除く)	0.1	小麦, 米を除く ぶすま, 麦芽を除く
小麦	0.2	
根菜, 茎菜	0.1	セロリアック, ばれいしょを除く
ばれいしょ	0.1	皮を剥いたもの
豆類	0.1	大豆(乾燥したものを除く)
葉菜	0.2	
その他の野菜 (鱗茎類, アブラナ科野菜, ウリ科果菜, その他果菜)	0.05	食用キノコ, トマトを除く
精米	0.4	
海産二枚貝	2	カキ, ホタテガイを除く
頭足類	2	内蔵を除去したもの

属(例えばCd)を識別できる抗体産生技術¹⁾をもとに、上記2社と株式会社住化分析センターが共同でコメ中のCd濃度測定用バイオセンサーの製品化²⁾⁻⁵⁾に成功し、測定キット(商品名:カドミエール™)として平成19年8月から試験販売を開始した。

2 カドミエール™とは

本製品は、コメ中に含まれるCd濃度を測定するためのキットであり、図1に示す前処理キット(1)、イムノクロマトキット(2)から構成されている。商品化にあたっては、前記2社がイムノクロマトキット、弊社が前処理キットの開発を主に担当した。

3 測定法の概要と特徴

測定は、大別すると(1)コメ中からCdを選択的に抽出する前処理工程と、(2)抗原抗体反応を原理とするイムノクロマトグラフィー(ImC法)により、簡易にCd濃度を測定するイムノクロマト測定工程からなる。以下に各工程の概要を説明する。

3.1 前処理工程

前処理工程の操作フローを図2に示す。

コメ試料(玄米、精米)をミルサーで細かく粉碎し、希塩酸で振とう抽出後、懸濁液をろ過する。得られた透明の抽出液を分離カラムに通液し、Cd



図1 カドミエール™キットの概要

を選択的に分離する。

分離カラムの操作は コメ抽出液のカラムへのチャージ、希塩酸による他金属イオン洗浄除去、希硝酸によるCdの溶出回収、の3段階から成っている。図3にカラム処理によるCdの選択分離の概要を图示した。

この操作は、1検体毎の自然落下カラム法でも可能であるが、固相抽出でよく使われる吸引マニホールキットを用いることにより、短時間で多検体のカラム処理が同時に可能である。

希塩酸抽出については、図4に示す

ように現行の硝酸分解法との相関性もよく、コメ試料への適用が十分可能である。

コメの希塩酸抽出液中には、Cd以外にも多量他金属成分（Cu、Mn、Zn、Fe、Mg）が含まれている。これらの金属成分を除去し、Cdを選択的分離するために分離カラムを開発した。

表2に示すようにカラム処理前後の各金属成分の含有量を比較すると、このカラム処理によりCdが極めて選択的にカラムに吸着していることがわかる。これにCd抗体の交差反応性を組

み合わせることでCdの選択性が更に向上する。

3.2 イムノクロマト工程

3.2.1 カドミウムの抗体作製

抗体は生物によって作られるタンパク質の一種である。動物の体に病原菌などの異物が侵入すると免疫と呼ばれる生体防御機構が働き、異物を無害化するために抗体が産生される。抗体は異物を分子レベルで認識し、その表面に結合する性質を持つ。Cdを検出するためのイムノクロマトグラフィーを確立するには、Cdを認識し、Cdに結合する抗体を動物に作らせることが必要になる。ところが、Cdを含む金属イオンは小さすぎるために免疫機能の対象にはならず、ただ単にCdを異物として動物に与えただけではCdに結

表2 コメ抽出液のカラム処理前後における各金属成分含有量

	Cd	Mn	Fe	Cu	Mg	Zn
カラム前(平均値: ppm)	0.040	2.7	0.45	0.33	123	2.0
カラム後(平均値: ppm)	0.041	0.000	0.33	0.011	0.015	0.20
Cd抗体交差反応性(%)	100	0.72	0.031	1.4	0.0055	0.57
カラム後(平均値)×交差反応性	4	0.00	0.01	0.01	0.00	0.11

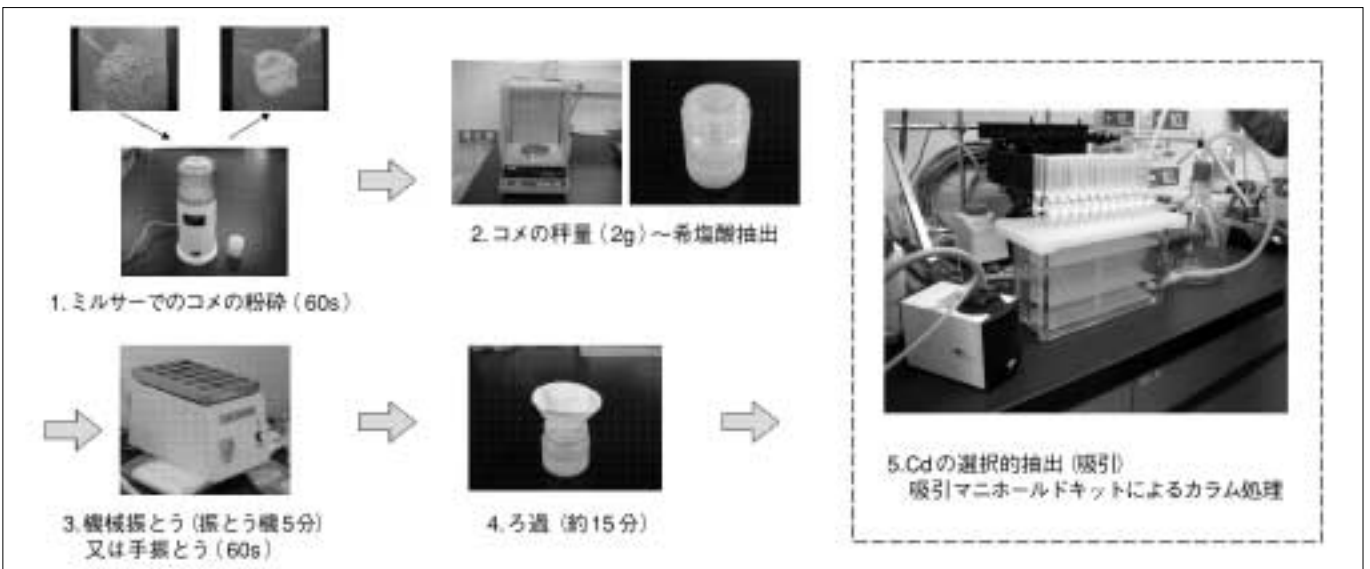


図2 前処理工程の操作フロー

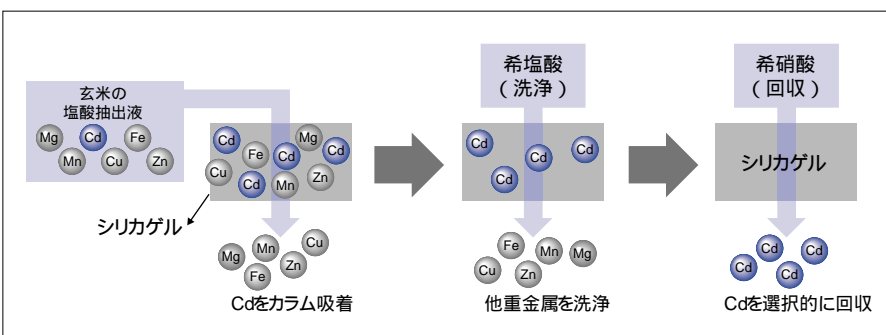


図3 カラム処理によるCdの選択分離

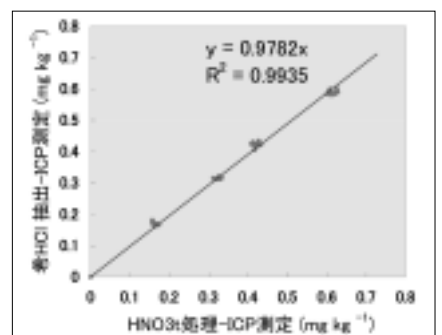


図4 玄米中カドミウムの希塩酸抽出と硝酸分解の相関

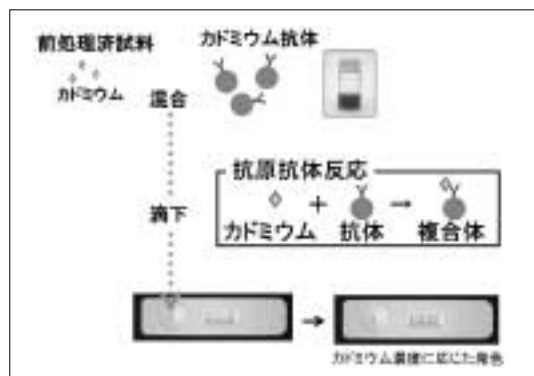


図5 イムノクロマト測定のプロフロー

表3 各金属抗体の交差反応性¹⁾

EDTA complex	Nx2C3	
	Kd, M	cross-reactivity, %
Cd () - EDTA	1.3×10^{-8}	100
Cu () - EDTA	9.6×10^{-7}	1.4
Mn () - EDTA	1.8×10^{-6}	0.72
Zn () - EDTA	2.3×10^{-6}	0.57
Fe () - EDTA	4.2×10^{-5}	0.031
Mg () - EDTA	2.4×10^{-4}	0.0055
Ca () - EDTA	$> 1 \times 10^{-3}$	< 0.002
metal free EDTA	$> 5 \times 10^{-3}$	< 0.0003

Kd : equilibrium dissociation constant

合する抗体を作ることにはできない。そのため、金属に対する抗体を作製する際に、金属原子をキレート分子と結合させて錯体とし、さらにこの錯体をタンパク質に付加した複合体として動物に与えることによってCd-EDTAに極めて結合性の高い抗体 (Nx2C3) を得ることに成功した。この抗体のCd-EDTAに対する平衡解離定数は約20nMである。このことは、この抗体がppbオーダーのCdが検出できる高感度なバイオセンサーの作製に十分な反応性を持っていることを示す。また、このCd抗体は、表3に示すように他金属との交差反応性でも優れた性質を持っている。例えば、亜鉛のこの抗体に対する反応性はCdに対する反応性に対して約200分の1である。

3. 2. 2 イムノクロマト測定工程

イムノクロマトグラフィーによるCd濃度測定のプロフローおよび測定

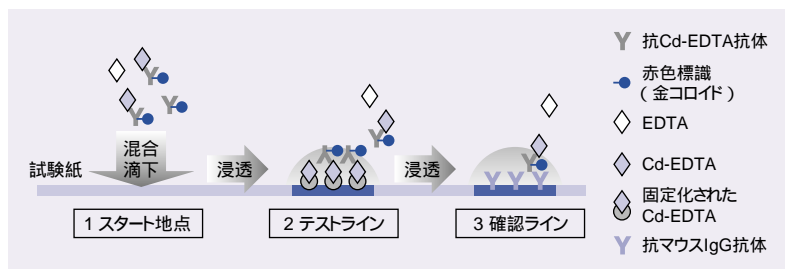


図6 イムノクロマトグラフィーの測定原理

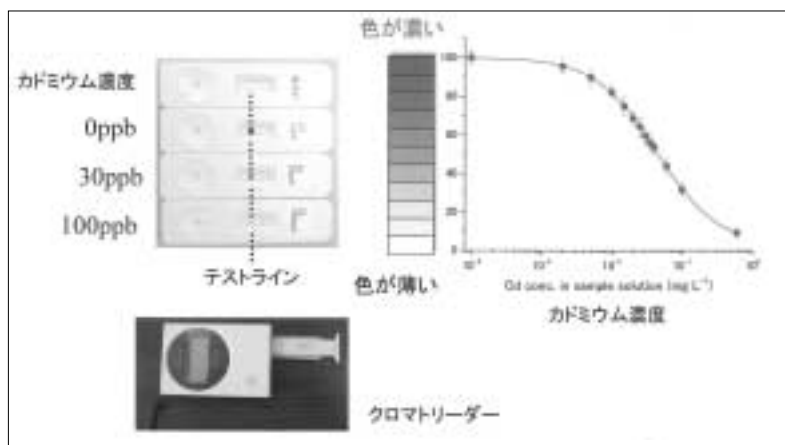


図7 Cd濃度と発色の関係

表4 ImC法(カドミエール)と原子吸光法(公定法)の比較

	カドミエール法	原子吸光法
測定時間	2時間 / 20検体	4時間以上 / 5検体
測定室	特別な実験室は不要	専用測定室が必要
簡単測定	特別な習熟がなくとも誰でも測定可能	習熟必要
価格	測定キット定価(2千円/本)	約8千円/本(受託測定)
測定形態	キット販売と受託測定	受託測定のみ

原理を図5と図6に示す。

前処理後得られる抽出液を、金コロイド標識抗体(抗Cd-EDTA抗体)と混合・反応させ、抗体とCdをあらかじめ結合させておく。その混合液を専用のデバイス上に滴下し、メンブレンに浸透させ展開させる。その際、未反応の標識抗体がテストライン上に固定化されたCdに結合するため、赤色の発色バンドが現れる。すなわち、抽出液中にCdが少ないと、未反応の標識抗体が多くなり、テストライン上で多くの標識抗体が反応し、強い発色が起こることになる。よって、試料中にCdが少ないほど強い発色が観察される。確認ラインには抗体に結合する抗体が固定化されているため、試料と抗

体の混合液がテストラインを通過したことが確認できる。Cd濃度に応じた色の変化は肉眼でも確認可能であるが、専用の読み取り機(クロマトリーダー)によって発色を数値化することで、Cdの定量測定が可能となる。Cd濃度0~0.6ppmと発色の関係を図7に示す。図からわかるようにCd標準液では0.01ppmでも十分検出可能である。コメの規制値が0.4ppm($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)なので、十分に実用的な感度を有している。

4 キット製品特徴・性能

今回開発した迅速測定キットは表4に示すような特徴を有する。

本測定キットを使うと、例えばコメ

20検体中のCdを玄米の状態から2時間程度で測定できる。このような迅速な測定法はこれまでになく、本キットは迅速な、コメ中Cd測定キットとして有用性の高いものである。

本法は実試料にて実証試験を重ね、図8に示すように53検体のコメ実試料において、イムノクロマト法とICP-AES法は $r^2 = 0.96$ の高い相関性を示した。さらに、60検体のコメ実試料を用いて測定した結果、表5に示すようにイムノクロマト法と原子吸光法(公定法)はよく一致しており、誰でも簡便に測定できることが実証できた。

5 おわりに

今回開発されたCdの迅速測定キットは、待ち望まれていた利便性と低価格性を有し、小型で携帯可能であるためオンサイトでも使用可能と考えている。

今後、顧客ニーズを的確に捉えた商品開発を行い、産業の発展に寄与して行きたいと考えている。

表5 ImC法(カドミエール)と原子吸光法(公定法)の比較データ

単位: ppm AA法: 原子吸光

試料	本法	AA法	試料	本法	AA法	試料	本法	AA法
1	< 0.1	0.09	21	< 0.1	0.07	41	< 0.1	0.06
2	< 0.1	0.12	22	< 0.1	0.12	42	< 0.1	0.08
3	< 0.1	0.11	23	< 0.1	0.09	43	< 0.1	0.11
4	< 0.1	0.07	24	< 0.1	0.06	44	0.10	0.10
5	< 0.1	0.08	25	< 0.1	0.07	45	< 0.1	0.10
6	< 0.1	0.08	26	< 0.1	0.08	46	< 0.1	0.09
7	0.11	0.10	27	< 0.1	0.09	47	< 0.1	0.06
8	< 0.1	0.09	28	< 0.1	0.07	48	0.11	0.10
9	0.11	0.12	29	< 0.1	0.08	49	< 0.1	0.10
10	< 0.1	0.07	30	< 0.1	0.10	50	< 0.1	0.08
11	< 0.1	0.05	31	0.11	0.12	51	< 0.1	0.07
12	< 0.1	0.08	32	< 0.1	0.11	52	0.12	0.11
13	< 0.1	0.07	33	0.10	0.10	53	< 0.1	0.08
14	< 0.1	0.06	34	0.14	0.13	54	< 0.1	0.07
15	< 0.1	0.06	35	< 0.1	0.10	55	< 0.1	0.06
16	< 0.1	0.09	36	0.13	0.12	56	< 0.1	0.08
17	0.13	0.12	37	0.28	0.24	57	< 0.1	0.08
18	< 0.1	0.06	38	< 0.1	0.08	58	< 0.1	0.09
19	< 0.1	0.07	39	< 0.1	0.08	59	< 0.1	0.06
20	< 0.1	0.08	40	0.11	0.12	60	< 0.1	0.07

文 献

- 1) 佐々木和裕, 俵田啓, 奥山亮他 分析化学, 56: 29-36.(2006)
- 2) 佐々木和裕, 俵田啓, 奥山亮, 大西良和, 荒金玉実 日本土壤肥料学会関西支部大会発表(2006.12) 「米中カドミウム濃度を簡易分析するためのイムノクロマトグラフィーシステム」
- 3) 佐々木和裕, 俵田啓, 奥山亮, 荒金玉美, 大西良和, 大村直也, 奥畑博史, 丸山幸直 日本農芸化学会東京大会発表(2007.3)「カドミウムを対象とした簡易分析キットの開発」
- 4) 俵田啓, 佐々木和裕, 大西良和, 奥山亮, 荒金玉美, 宮坂均, 大村直也 第16回環境化学討論会発表(2007.6)「コメ測定用Cd抗体簡易測定キット(カドミエール)の開発」
- 5) 佐々木和裕, 俵田啓, 大西良和, 奥山亮, 荒金玉美, 大村直也, 宮坂均 日本土壤肥料学会2007年東京大会発表(2007.8)「玄米などに含まれるカドミウムの簡易測定キット」

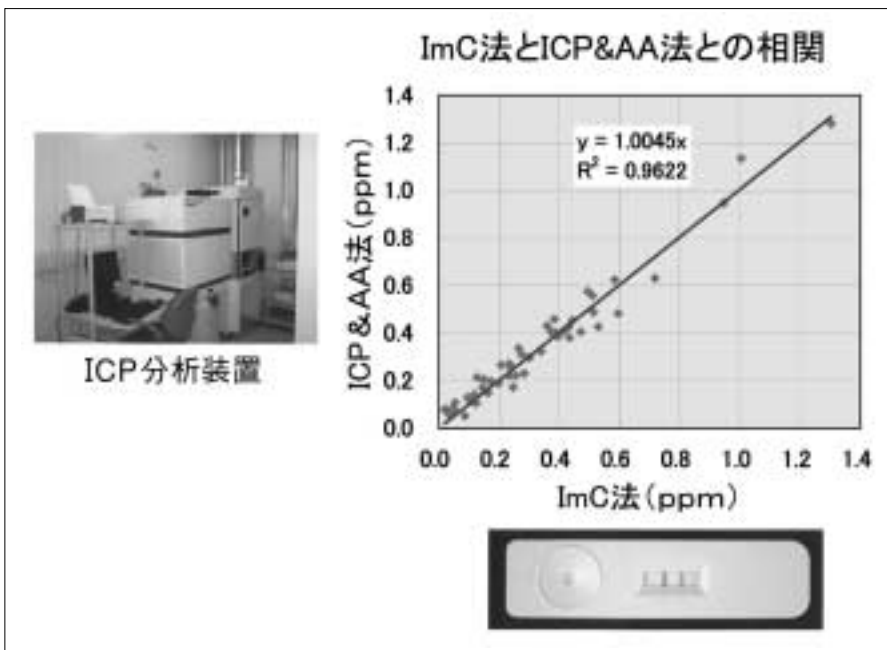


図8 ImC法(カドミエール)とICP-AES法の相関



佐治 幾太郎
(さじ いくたろう)
大阪事業所



大西 良和
(おおにし よしかず)
大阪事業所



山科 清
(やましな きよし)
本社