

イムノクロマト法によるコムギ玄麦およびダイズ子実中カドミウム濃度簡易測定法

中野 亜弓^{*1}・高橋 彩子^{*2}・小菅 裕明^{*3}・阿部 薫^{*4}

2005年7月、FAO/WHO 合同食品規格委員会(Codex 委員会)において、食品中カドミウム濃度の新しい国際基準値が設定された¹⁾。国内では2010年4月8日に食品衛生法が一部改正され、コメのカドミウム基準値が1ppmから0.4ppmに引き下げられ、2011年2月28日から施行されている²⁾。ダイズ、ムギ、野菜等の農作物については、農林水産省が実施している低減対策を引き続き推進するよう要請されており、カドミウム濃度の実態把握に努めることが求められている³⁾。

本県ではコメのカドミウム濃度検査は、専門の検査機関へ依頼して実施されている現状にあるが、その場合検査費に加え検査結果を得るまで数日かかるため、検査点数が限定される。従って、多品目で効率的に実態調査を行い、広域的なカドミウムリスク管理を行うためには、低コストかつ迅速に検査結果が得られる検査手法の確立が必要である。

近年、抗原抗体反応を利用したイムノクロマトグラフィー(以下イムノクロマト法)によるカドミウム測定キットが開発、市販されている。同キットの農作物中カドミウム濃度測定への適用性は、コメについてスクリーニング検査用として確認されている⁴⁾。しかし、同キットのコメ以外の品目への適用に関する知見はメーカー出自データのみであり、不十分である。

このため、本県の主要転作物目であるコムギとダイズについて、コメ用イムノクロマトキットによるカドミウム濃度簡易測定法の適用化を図ったところ、有用な結果が得られたので報告する。

材料および方法

1 供試イムノクロマトキットの概要

供試したカドミウム濃度測定用イムノクロマトキットは、関西電力株式会社、財団法人電力中央研究所、および株式会社住化分析センターにより共同開発され、コメを測定対象として市販されているものである(商品名:カドミエール、販売元:住化分析センター)⁵⁾。同イムノクロマトキットによるコメ中カドミウム濃度測定の手順と原理の概要を図1に示した。

カドミウム分析の公定法としては、原子吸光度計やICPを用いた機器分析法が採用されており、前処理設備と高額な分析機器および分析操作に熟練した分析者を備えた分析体制が必要である。

一方、イムノクロマトキットは、試験紙タイプで、Cd-EDTA錯体とこれに特異的に反応するCd-EDTA抗体による抗原抗体反応を利用し、発色値を専用の小型測定機で読み取り、カドミウム濃度を測定するものである。測定までの操作は機器分析法に比べ簡易迅速であり、専用の設備は不要である。

イムノクロマト測定に供する検体の前処理法としては、カドミウム抽出に希塩酸を用いた振とう抽出、また、抽出液中の夾雑物、特にカドミウム以外の重金属の除去に専用ミニカラム精製を採用している。

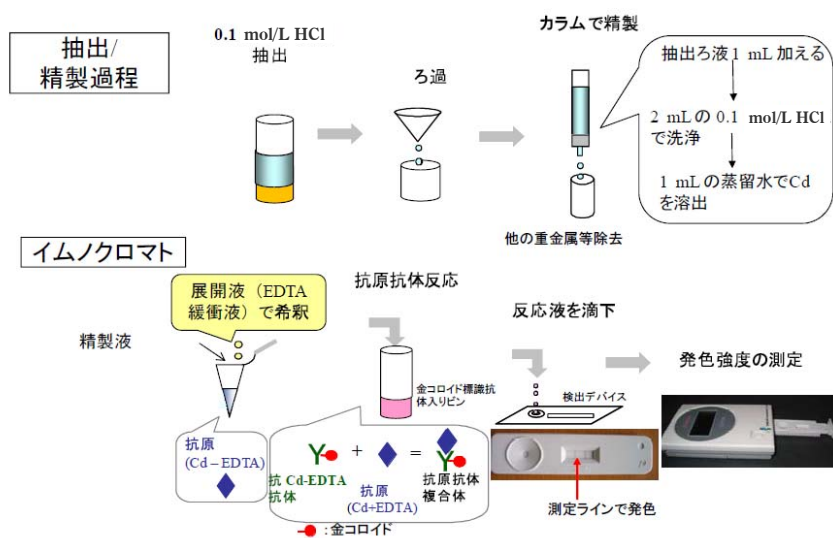


図1 イムノクロマトキットによるカドミウム測定手順と測定原理(コメ・Sep01 カラム精製の場合)

イムノクロマト法によるカドミウム濃度測定について阿部らは、測定精度が機器分析に劣るため、カドミウム濃度を簡易判定するのに適していると述べている⁴⁾。

2 測定方法

(1) 機器分析法

コムギ玄麦またはダイズ子実の粉碎物 1g に対し硝酸:過塩素酸(3:1)混液 10mL を添加, 混合後分解チューブの口を時計皿で覆い, ドラフト内で 1 晩静置し, 125°C で試料液の褐色が消えるまで加熱分解した後, 250°C で約 8 時間加熱して得られた分解液の全量を蒸留水で 100mL に定容したものを試料液とした。試料液中カドミウム濃度の測定は, フレームレス原子吸光度計(島津製作所製 AA-6500S/GFA-1200)を用いた。試料液注入量は 10 μ L とし, 測定は 2 反復で行った。カドミウム濃度の定量下限値は, 乾物当たり 0.02mg/kg であった。

また, 一部 ICP 発光分析法を用いたが, 本法による分析は, 株式会社分析センターに依頼した。

(2) イムノクロマト法

① コムギ玄麦

コムギ玄麦粉碎物 2g に対し 0.1M 塩酸 20mL を添加し, 振とう機(ヤマト製作所製 shaker MK200D) で 200rpm, 60 分間振とうし, No.2 ろ紙でろ過した後, 低濃度域測定用精製カラム Sep02 にろ液 5mL を添加し, 0.1M 硝酸 5mL で夾雑物を洗浄流下した後, 0.1M 塩酸 5mL でカラムに吸着したカドミウムを溶出させ精製液とした。精製カラムの乾燥が著しいものについては, ろ液添加前に蒸留水 2mL を通水して湿潤させた。精製液 40 μ L に緩衝液 360 μ L を添加, 混合した溶液を試料液としてイムノクロマト分析に供し, カドミウム濃度を測定した。測定は 3 反復で行った。カドミウム濃度の定量下限値は乾物当たり 0.05mg/kg であった。

② ダイズ子実

ダイズ子実粉碎物 2g に対し 0.1M 塩酸 20mL を添加し, 前述の振とう機で 200rpm, 30 分間振とうし, No.2 ろ紙でろ過した後, 精製カラム Sep01 にろ液 1mL を添加し, 0.1M 塩酸を 3mL 流下した後, 蒸留水 1mL でカラムに吸着したカドミウムを溶出させ精製液とした。精製液 20 μ L に緩衝液 380 μ L を添加, 混合した溶液を試料液としてイムノクロマト分析に供しカドミウム濃度を測定した。測定は 3 反復で行った。カドミウム濃度の定量下限値は乾物当たり 0.05mg/kg であった。

3 イムノクロマト法のコムギ玄麦およびダイズ子実への適用化

(1) コムギ玄麦の粉碎方法

コメ, コムギ, ダイズ等の子実中成分を測定する際, 多くの時間を要するのが粉碎操作である。多検体の迅速な測定を目標

とするイムノクロマト法を行うにあたり, 第一に汎用卓上粉碎器を用いた簡易な子実粉碎方法の適用性を検討した。

汎用卓上小型粉碎器には, LABCAT 製 Labo Milser LM-Plus を使用し, 比較用としてラボ用粉碎器(日本精機製作所製 Retsch ZM 1000, 0.5 μ 篩付)を用いてそれぞれコムギ玄麦 43 検体について粉碎し, フレームレス原子吸光度計によりカドミウム濃度を測定した。

(2) ダイズ子実の希塩酸抽出時における固液分離性の向上

ダイズ子実粉碎物に 0.1M 塩酸を添加して振とうすると, ダイズ子実中のタンパク質や脂質がコロイド状に分散して抽出液の固液分離が不十分となり, ろ液が殆ど得られなかったため, 抽出前の子実を焼成処理することにより固液分離性の向上を試みた。

ダイズ子実 20g を 100mL ビーカーに計り入れ, 卓上式恒温乾燥器(ヤマト製作所製 Drying oven DV400)内で 135°C, 3 時間焼成した。焼成後のビーカー重量を測定し, 子実中水分を算出後, 3(1)と同じ卓上小型粉碎器でビーカー内の全試料を粉碎した。この焼成粉碎物と未焼成粉碎物について各々 0.1M-塩酸抽出操作を行い, 5mL 以上のろ液が得られる時間を測定した。

(3) 機器分析値とイムノクロマト測定値との比較

コムギ玄麦 78 検体およびダイズ子実 29 検体について, 原子吸光分析値とイムノクロマト測定値との比較を行った。玄麦および子実の粉碎には, 3(1)と同じ卓上小型粉碎器を用いた。

(4) 試料前処理の簡略化による分析時間短縮化

イムノクロマト法は, 従来の機器分析に比べて安価なうえに短時間でカドミウム濃度を測定できる方法であるが, 測定までの時間を更に短縮するため, 0.1M-塩酸抽出操作およびダイズ子実焼成処理操作について以下の検討を行った。

① 振とう抽出の最適所要時間

供試試料はコムギ玄麦 4 検体, ダイズ子実 4 検体とし, 0.1M-塩酸抽出時の振とう時間を 10, 15, 20 および 30 分として, カラム精製液中カドミウム濃度をフレームレス原子吸光度法およびイムノクロマト法で測定し, 酸分解-ICP 発光分析法による測定値と比較した。

② 家庭用電子レンジを用いたダイズ子実焼成処理

乾燥器がなくてもできるダイズ子実の焼成処理方法として, 家庭用電子レンジの適用性を検討した。供試試料は未焼成ダイズ 4 検体, 焼成ダイズ 4 検体とした。未粉碎のダイズ子実 10g を紙袋に平らに入れてレンジ皿に 6 袋づつ並べ, 2 分加熱後, 紙袋を振って子実混和後 1 分加熱(以下 2 分+1 分), 2 分+1 分を 2 回反復, 2 分+1 分を 3 回反復, 2 分+2 分として各々 500W のレンジで加熱した。また紙袋は, 純白袋(95mm×145mm)および褐色封筒(90mm×205mm)を用いた。乾熱機では各試料 10g をアルミカップに入れて 135°C, 3 時間処理した。

各区のろ液量と子実量減少率を測定し、3(4)①と同じく各測定法によるカラム精製液中カドミウム濃度を比較した。

③ダイズ子実抽出液精製時のカラム洗浄液の減量

ダイズ抽出液をカラム精製する時、試料液負荷後の洗浄を当初は予備試験の結果に基づき 3mLにしたが、精製時間を短縮するため 2mLに減量した際の洗浄効果について再確認を行った。供試検体は焼成ダイズ 42 検体とした

結果および考察

1 コムギ玄麦の粉碎方法

ラボ用粉碎器と汎用卓上小型粉碎器によるコムギ玄麦のカドミウム濃度測定値の関係を図 2 に示した。ラボ用粉碎測定値に対する汎用粉碎測定値の一次回帰式は $y=1.31x$ であり、汎用粉碎測定値がラボ用粉碎測定値の約 130%となった。この原因としては、ラボ用粉碎器がスクリー粉碎後 0.5 μ 篩を通して検体を得る方式であったため、カドミウム濃度が高いとされる外皮の未粉碎部分が篩別され検体に入らなかったためと考えられた。この場合、篩を通らない部分も乳鉢等で全て粉碎し検体に入れる必要があるため、粉碎操作に多くの時間を要する。従って、玄麦のカドミウム測定には全粒粉碎が可能なボールミルや汎用卓上小型粉碎器が必要であり、イムノクロマト測定に用いる場合は高額機器であるボールミルより、安価(10,000 円程度)で取り扱いが簡単な汎用卓上小型粉碎器が適当と考えられた。

なお、汎用卓上小型粉碎器による抽出効率については、今後確認が必要と思われる。

2 ダイズ子実の希塩酸抽出時における固液分離性の向上

ダイズ子実を 135 $^{\circ}$ C、3 時間焼成処理することにより希塩酸抽出後の固液分離性が向上し、No2 ろ紙でのろ過所要時間は 10 検体で未焼成の 60 分以上から 20 分に短縮した(表 1)。これは、焼成によりダイズ子実中のタンパク質が変成・不溶化し、希塩酸抽出時に液層に分散しなくなったためと考えられた。ダイズ子実の焼成処理時期は、粉碎前処理の方が粉碎器への試料の付着が少なく、連続粉碎する際の粉碎器洗浄が容易であり操作性がよかった。

表 1 ダイズ子実の処理方法の違いによる操作所要時間比較

処理方法	操作所要時間(分/10検体)						対焼成比
	乾熱	静置	ろ過	負荷	洗浄	計	
焼成	180	10.0	20.0	14.7	29.6	254.3	(100)
電子レンジ	15.5	10.0	20.0	14.7	29.6	89.8	35
未焼成	-	10.0	60.0 以上	-	-	-	-

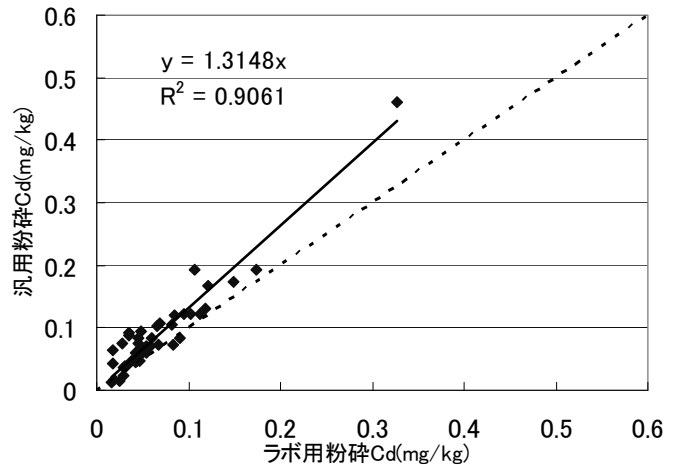


図2 コムギ玄麦のラボ用粉碎と汎用粉碎によるカドミウム濃度測定値

(原子吸光光度法測定値, n=43)

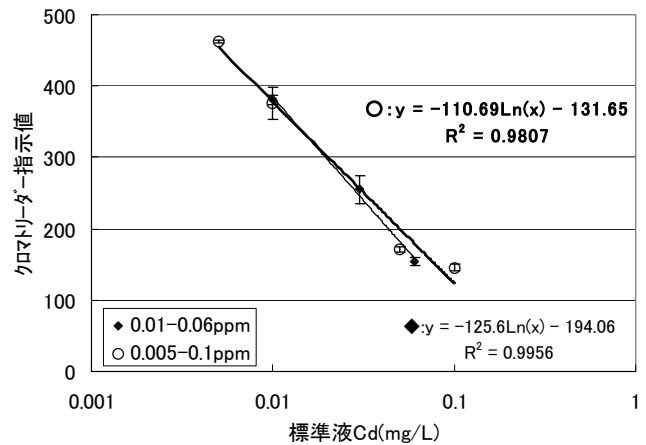


図3 イムノクロマト法の検量線の例

(エラーバーは標準偏差)

3 機器分析値とイムノクロマト測定値との比較

(1)コムギ玄麦

図 3 にカドミウム標準液によるイムノクロマト法の検量線の例を示した。検量線は、0.005~0.06mg/L の範囲では良好な直線性を示したが、最大濃度を 0.1 mg/L とした場合には直線性が劣ったため、検量は検液濃度 0.005~0.06 mg/L の範囲で行うことが適当と考えられた。

希塩酸抽出時の固液比 1:10 の場合、コムギ玄麦での定量濃度は 0.05~0.6 mg/kg となり、国際基準値 0.2 mg/kg はこの範囲に入った。

コムギ玄麦中カドミウム濃度のイムノクロマト法測定値の併行相対標準偏差^{註 2}は、0.6mg/kg 以下で最大 11%、平均 4~8%であり(表 2)、「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン」の目標値 0.1mg/kg 超で 10%未満、0.01 mg/kg~0.1 mg/kg で 15%未満(以下「ガイドライン目標値」とする。)を概ね満たす範囲であった⁶⁾。

コムギ玄麦粗粉砕物中カドミウム濃度の原子吸光光度法測定値とイムノクロマト法測定値との関係を図 4 に示した。原子吸光光度法測定値に対するイムノクロマト法測定値の一次回帰式は、精製の前にカラムを蒸留水で湿潤させた場合、 $y=0.99x$ であり、決定係数 R^2 は 0.79 であった。0.3mg/kg 以上の検体でバラツキが大きかったが、コムギ玄麦中カドミウムの国際基準値 0.2mg/kg の近傍あるいはそれ未満の範囲ではバラツキは小さかった。

なお、蒸留水湿潤を行わず、乾燥したままカラム精製を行った場合、イムノクロマト法による測定値は原子吸光光度法より著しく低かったため、精製カラムは湿潤状態で使用する必要性が示された。この結果を受け、メーカーでは精製カラムの開口部を密栓して、乾燥させないようにする措置を行った結果、測定時まで湿潤状態が保持され、湿潤処理は不要となった。

(2)ダイズ子実

イムノクロマト法測定値の併行相対標準偏差は、0.4mg/kg 以下で最大 14%、平均 3~5%であり(表 3)、「ガイドライン目標値」を概ね満たす範囲であった⁶⁾。

ダイズ子実全粒粉砕物中カドミウム濃度の原子吸光光度法測定値とイムノクロマト法測定値との関係を図 5 に示した。原子吸光光度法測定値に対するイムノクロマト法測定値の一次回帰式は $y=1.0x$ であり、決定係数 R^2 は 0.80 であった。

注 2) 同一と見なせるような測定試料について、同じ方法を用い、同じ試験室で同じオペレーターが同じ装置を用いて、短時間のうちに独立な測定結果を得る測定条件で得られた結果の標準偏差を平均値で除して%で表したもの。

注 y) 同一と見なせる測定試料について、同じ方法を用い、異なる試験室で異なるオペレーターが異なる装置を用いて、独立な測定結果を得る測定の条件で得られた測定結果の標準偏差を平均値で除して%で表したもの。異なる試験室で分析したときの分析値のばらつきを考慮した標準偏差で、多数ある試験所の中のある 1ヶ所で 1回分析したときの測定値の不確かさを示す。

4 試料前処理の簡略化による分析時間短縮化

(1)振とう抽出の最適所要時間

図 6 にコムギおよび焼成ダイズの振とう時間と ICP 測定値に対する各測定法のカラム回収率を示した。コムギおよびダイズの振とう時間を 10,15,20 分に短縮した際の回収率は、30 分

表2 コムギ玄麦中カドミウム濃度のイムノクロマト法測定値における併行相対標準偏差(3 反復)

平行相対標準偏差	イムノクロマト法測定値(mg/kg)			
	0.05-0.09	0.10-0.14	0.15-0.24	0.25以上
平均	4.3	4.8	7.7	5.6
最大	8.4	8.5	11.0	7.7
最小	1.1	2.7	3.9	2.8
検体数	30	7	4	5

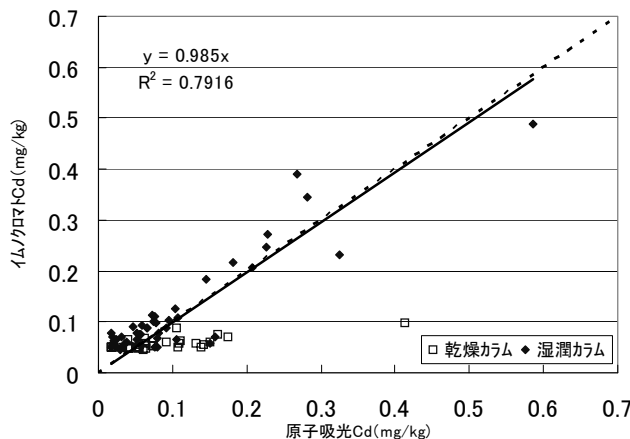


図4 コムギ玄麦中カドミウム濃度の原子吸光法測定値とイムノクロマト法測定値との関係(n=78,うち湿潤カラム n=46)

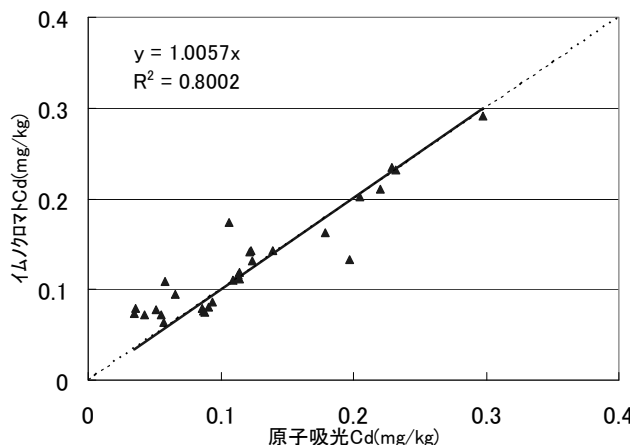


図5 ダイズ子実中カドミウム濃度の原子吸光法測定値とイムノクロマト法測定値との関係(n=29)

振とうした場合と比べ、やや変動はあるが平均値はほぼ同等で、有意差はなかった。従って、振とう時間を 10~20 分に短縮できる可能性が示唆されたが、多検体による確認が今後の課題として残った。

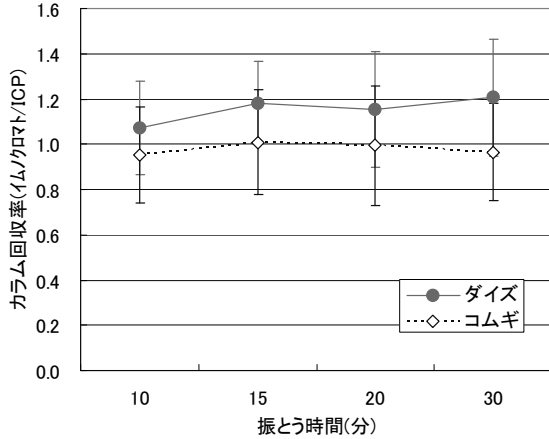


図6 コムギおよび焼成ダイズの振とう時間の違いによるカラム回収率(ICP測定値に対する抽出・精製液のイムノクロマト測定値の比)

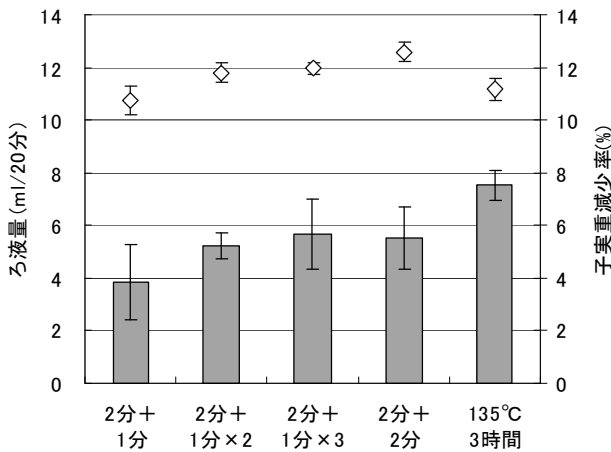


図7 ダイズ子実の電子レンジ処理時間の違いによるろ液量と子実減少率

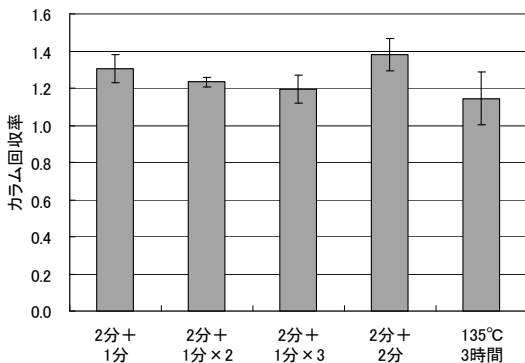


図8 ダイズ子実の電子レンジ処理時間の違いによるカラム回収率(ICP測定値に対するイムノクロマト測定値比)

(2)家庭用電子レンジを用いたダイズ子実焼成処理

電子レンジでの焼成には、褐色封筒を用いた場合に焼成ムラが著しかった一方、純白袋を用いた場合ではムラが少なく均一に焼成されていたため、純白袋が適した。純白袋を用いた場合のろ液量と子実重減少率を図7に示した。純白袋でも、2分+2分焼成では焼成ムラが多かった。2分+1分焼成では子実重減少率とろ液量が少なく、焼成不足であった。

また、各処理のカラム精製液のICP測定値に対するイムノクロマト測定値の回収率を図8に示した。カラム回収率は、どの処理も135°C/3時間の焼成処理と同程度であったことから、電子レンジでの焼成処理時間は、焼成ムラが少なく、ろ液量を比較的多く得ることができる2分+1分を2または3回反復するのが最適と考えられた。この場合、焼成時間は恒温乾燥器の180分に対して15.5分となり、焼成からカラム精製にかかる時間が35%まで短縮した(表1)。

電子レンジ焼成は、乾熱恒温機がなくても可能である一方、一度に処理できる検体数が少なく、焼成中に振とうなどの操作が入るため、多検体処理には向かなかった。

表3 ダイズ子実中カドミウム濃度のイムノクロマト法測定値における併行相対標準偏差(3反復)

平行相対標準偏差	イムノクロマト法測定値 (mg/kg)			
	0.05-0.09	0.10-0.19	0.15-0.29	0.30以上
平均	3.3	3.8	4.4	4.5
最大	10.6	11.7	11.2	13.7
最小	1.2	0.0	0.2	0.0
検体数	14	23	7	8

(3)ダイズ子実抽出液精製時のカラム洗浄液の減量

ダイズ子実抽出液精製時のカラム洗浄液を2mLまたは3mLとした時の、精製液中カドミウム濃度の原子吸光度法分析値とイムノクロマト法測定値との関係を図9に示した。精製カラム洗浄量は、2mL、3mLに関わらず $y=1.1x$ であり、決定係数 R^2 は0.90であった。従って、カラム洗浄用の0.1M-塩酸は2mLで充分と考えられた。

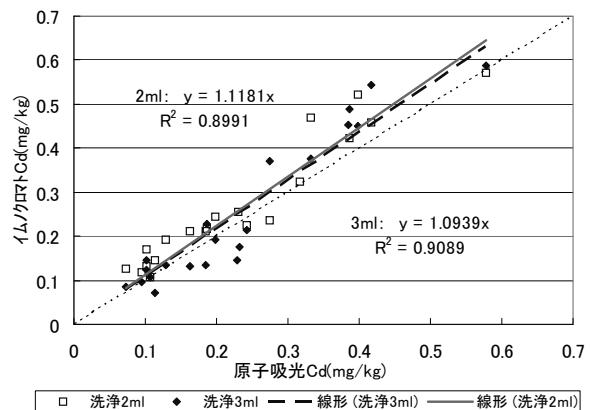


図9 精製カラム洗浄量の違いがダイズ子実中カドミウム濃度のイムノクロマト測定値に与える影響(n=22)

以上のことから、イムノクロマト法によるコムギ玄麦およびダイズ子実中カドミウム測定は、多くの検体について迅速に行うことが可能であることが確認された。

その利用法としては、スクリーニング検査用として(1)直前の立毛検査による高濃度圃場の仕分け、(2)機器分析による定量の必要性のある高濃度ロットの抽出等が考えられた。簡易なスクリーニング検査の導入により、より広範囲での検査が可能となり、抽出された高濃度検体のみを依頼検査することで検査費を大幅に減らすことが可能となる。

なお、野菜類へのイムノクロマト法の適用化は埼玉農業総合研究センターがホウレンソウ、ナス、サトイモについて実施し、引用文献⁷⁾⁸⁾に本研究結果とともに集約されている。

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「生産・流通・加工過程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発」(AC-1373)により実施したものである。

摘 要

コメのカドミウム濃度測定について適用法が確立されているイムノクロマト法について、コムギ玄麦およびダイズ子実中カドミウム濃度測定への適用性を明らかにした。

コムギは、コメと同様、全粒粉砕の他は特に前処理を追加することなくイムノクロマト測定が可能であり、原子吸光光度法測定値に対するイムノクロマト法測定値の一次回帰式は $y=0.99x$ ($R^2=0.79$) であった。

ダイズは、以下の操作を加えることにより適用が可能であった。すなわち、恒温乾燥機または電子レンジで焼成することにより、希塩酸抽出時に固液分離し、ろ過が容易となった。原子吸光光度法測定値に対するイムノクロマト法測定値の一次回帰式は $y=1.0x$ ($R^2=0.80$) であった。

この他、振とう抽出の短縮やカラム洗浄液の減量(ダイズ)などの操作の改善により、試料の前処理時間を短縮できた。

従って、市販キットを用いたイムノクロマト法によるカドミウム測定は、コムギ玄麦およびダイズ子実に対しても適用性があり、スクリーニング検査法として利用性が高いと考えられた。

引用文献

- 1)コーデックス委員会が策定した国際基準値(平成 18 年 7 月現在)。農林水産省。
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_cd/kizyunti/index.html
- 2)食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件について(平成 22 年 4 月 8 日)。厚生労働省。
- 3)食品中のカドミウムの規格基準の一部改正について(平成 21

年 10 月 19 日)。薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会報告書。

- 4)阿部薫, 石川覚, 櫻井泰弘, 奥山 亮, 佐々木和裕, 俵田啓 (2006) カドミウム検出用イムノクロマトキットによる玄米中カドミウム濃度簡易測定を試み, 日本土壤肥料学雑誌, 77(6), 679-682
- 5)宮坂, 俵田他(2005). 簡易迅速なカドミウム測定用イムノクロマトキットの開発, 資源環境対策 5 月号:73-78.
- 6)食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドライン(平成 19 年 11 月)。厚生労働省。
- 7)独立行政法人農業環境技術研究所(2011), 農作物の重金属(カドミウム, ヒ素)簡易分析マニュアル集:2, 6-7.
- 8) Kaoru Abe, Katsuo Nakamura, Tomohito Arao, Yasuhiro Sakurai, Ayumi Nakano, Chieko Suginuma, Kei Tawarada, Kazuhiro Sasaki (2011) Immunochromatography for the rapid determination of cadmium concentrations in wheat grain and eggplant, JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD AND AGRICULTURE, 91(8), 1392-1397