

イムノクロマトキットを利用した作物の Cd 濃度簡易測定手順書

目次

- 1 はじめに
- 2 イムノクロマトによるCd検出の原理の概要
- 3 イムノクロマトキットによる測定手順
- 4 イムノクロマト発色読み取り値からCd濃度の算出
- 5 イムノクロマト法の精度
- 6 具体的な測定手順例および留意点
 - 6-1 コメ、コムギ、ダイズ
 - 6-2 野菜（ハウレンソウ、サトイモ、ネギ、ナス）
- 7 謝辞
- 8 参考文献

1 はじめに

現状のカドミウム(Cd)分析法は、酸分解・有機溶媒抽出等煩雑な操作、ICP発光や原子吸光などの高額な精密分析機械、分析法に精通した人材等を必要とし、多くの時間と費用を要する。このため、実際の生産・流通現場において、多大な負担なく必要な検査体制を整備する上で、操作に熟練を要さず、かつ迅速に検査結果が得られる分析法の開発は重要である。

近年、免疫測定法の一つであるイムノクロマトグラフィーによるカドミウム測定キットが関西電力、電力中央研究所および住化分析センターにより開発され、市販されている。このキットは、試験紙タイプで、Cd-EDTA錯体とこれに特異的に反応する抗Cd-EDTA抗体による抗原抗体反応を利用し、発色値を専用の安価な機器で読みとり、カドミウム濃度を測定するもので、測定精度は機器分析に劣るが、簡易・迅速な測定が可能である。キットの取り扱いにそれほどの熟練は必要としないため、農業指導機関や農業者団体などが、現地近傍で出荷物のCd濃度を簡易判定するのに適していると考えられる。

農業環境技術研究所では、本キットを利用し、様々な作物について、国際基準付近の濃度帯に対応したCd濃度測定手法の開発および評価を行ってきた。本手順書では、その成果に基づき、イムノクロマトキットを用いた、コメ、コムギ、ダイズ、ハウレンソウ、サトイモおよび、ナスの可食部のCd濃度測定手順について説明する。

2 イムノクロマトによる Cd 検出の原理の概要

イムノクロマトによる Cd 検出の原理を図 1 に示した。Cd-EDTA をマウスに接種して作成

した抗 Cd- EDTA モノクローナル抗体が金コロイドで標識され、肉眼で観察できるようになっている。Cd を含む試料に EDTA と抗 Cd-EDTA 抗体を加えると、Cd-EDTA が抗 Cd-EDTA 抗体と結合した抗原-抗体複合体を生成する。試料中の Cd 量が多いと抗原-抗体複合体の量は多くなり、少ないと複合体の量は少なくなる。

イムノクロマトキットはニトロセルロース製のろ紙をプラスチックの枠で固定したもので、ろ紙上の測定ラインには抗原である Cd-EDTA が細い線状に固定してある。反応液をろ紙の一端に滴下すると、溶液はしみこんで毛管現象によって測定ライン方向に浸透していく。測定ラインに達すると抗原と結合していない抗体はライン上に固定された抗原と結合してライン上に捕捉されるが、すでに抗原-抗体複合体になっているものは測定ラインに捕捉されず素通りする。したがって、測定試料中に Cd が多いとすでに多くの抗体が抗原と結合し抗原-抗体複合体となっているので、測定ラインで捕捉される未反応の抗体量が少なく色が薄くなる。逆に試料中に Cd が少ないと補足される抗体の量が多く色（赤色）が濃くなる。その発色の濃淡を比色定量することでカドミウム濃度が測定できる。

3 イムノクロマトキットによる測定手順

作物体中の Cd は 0.1 mol L^{-1} 塩酸溶液でほぼ抽出できる。抽出液中には Cd 以外にイムノクロマト反応に影響をおよぼす程度の大量の重金属が含まれる可能性があるため、Cd 分離カラムにより Cd を選択的に捕捉し、これをカラムから溶出した精製液に対しイムノクロマトを実施して Cd 濃度を測定する。Cd 分離カラムによる共存重金属の除去とイムノクロマトにおける各重金属の反応性を図 2 に示す。抗 Cd 抗体に対し交差反応性を示す Cu、Mn、Zn などの重金属は、コムギやナスや抽出液中には Cd の 100-1000 倍濃度で存在する。抽出液を Cd 分離カラムにより精製することで、イムノクロマトに影響しないレベルまで除去することができる。

測定の基本フローは以下のとおりである（図 1、3 参照）。

1. 作物体を粉砕（コメ、コムギ、ダイズ）または磨さい（ハウレンソウ、サトイモ、ナス）する。
2. 0.1 mol L^{-1} 塩酸溶液により作物体中の Cd を抽出（抽出率 A 倍）して静置する。
3. 上澄み液をろ過する。
4. ろ液を、Cd 分離カラム（キットに付属）で精製する。
5. 精製液を、展開液（キットに付属）で希釈する（希釈率 B 倍）。標準液も同様に展開液で希釈する。
6. キットの説明書に従い、イムノクロマトを実施。
7. クロマトリーダーで発色値を読む。

各作物の Cd の国際基準値に応じ、適切な抽出倍率（A）と希釈倍率（B）を選ぶ（図 2 下表参照）。

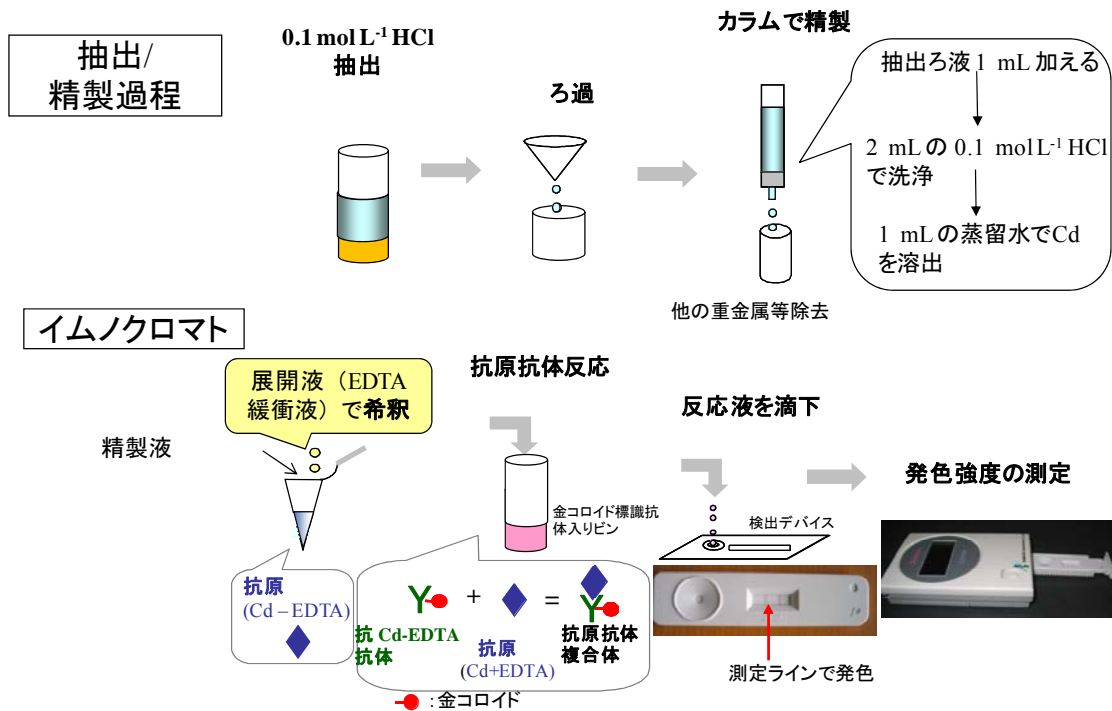


図 1 イムノクロマトによる Cd 測定手順と測定原理

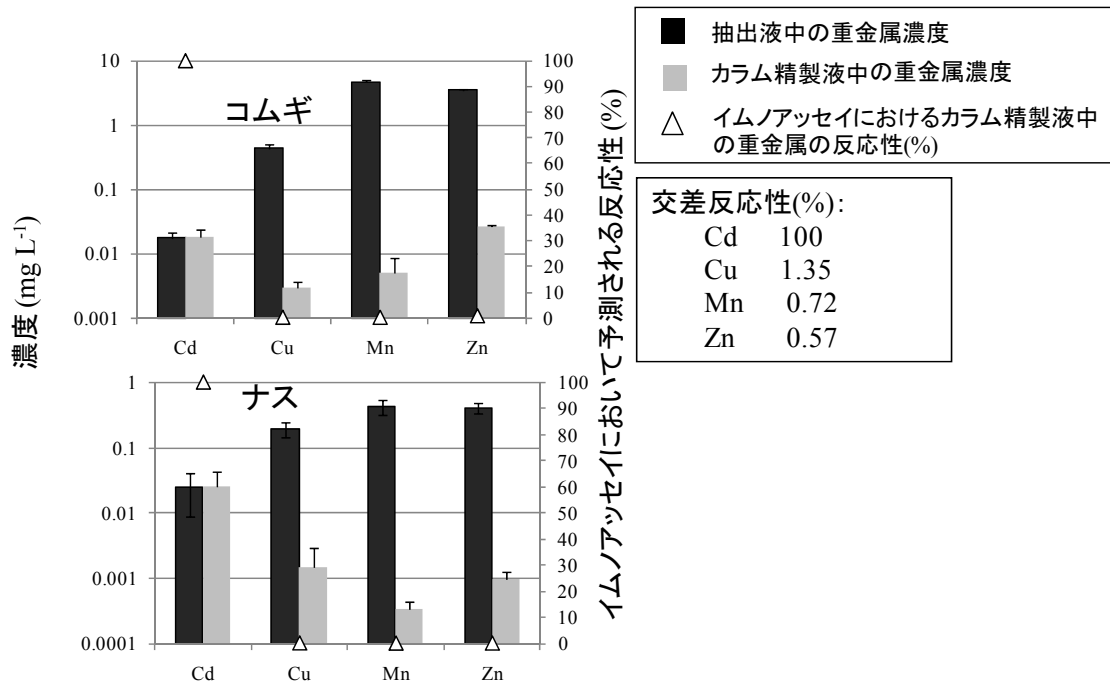


図 2 Cd 分離カラムによる共存重金属の除去とイムノクロマトにおける各重金属の反応性

0.1 mol L⁻¹塩酸A倍抽出→濾過→Cd分離カラム処理→緩衝液B倍希釈
→イムノクロマト

コメ、コムギ、ハウレンソウ、ナスなど

追加的前処理

ダイズ: 焼成135℃3時間後抽出
または抽出後濾過促進剤添加濾過
サトイモ: 抽出液を90℃で湯煎約30分
または抽出液をメンブレンフィルター処理など

抽出希釈倍率の設定

	抽出倍率A	希釈倍率B	A×B	時間
コメ	10	20	200	2-3
コムギ	10	10	100	2-3
ダイズ	10	20	200	2-5
ハウレンソウ	5	20	100	2
サトイモ	5	10	50	2-2.5
ナス・ネギ	5	5	25	2

図3 イムノクロマトにおける各作物の前処理（抽出・精製など）
（ダイズ子実の国際基準値はないが、0.5 mg kg⁻¹の場合の数値）

4 イムノクロマト発色読み取り値から Cd 濃度の算出

作物体からの抽出・精製液および Cd 標準液の Cd 濃度とクロマトリーダー読みとり値の関係を図4に示す。Cd 濃度に対する発色の読み取り値は抗原抗体反応に一般的であるシグモイド曲線となるが、中央部分は Cd 濃度の対数値と読みとり値間に良好な直線関係が認められる（コメ：0.01~0.06 mg L⁻¹、コムギ：0.005~0.03 mg L⁻¹、ナス：0.0025~0.015 mg L⁻¹）。

そこで、一般的な表計算ソフトで計算できる指数式検量線を用い、発色読み取り値から、抽出・精製液の Cd 濃度を算出し、作物体あたりの濃度に換算する。

検量線式： $C = b \cdot e^{a \cdot I}$ C: 抽出・精製液中の Cd 濃度、I: 発色読み取り値

標準液3濃度につきイムノクロマトを2連で行い、係数 a、b を求める。

展開液で希釈した液に対する検出キットの Cd 定量範囲は、0.0005~0.003 mg L⁻¹ (0.5~3 μg L⁻¹) である。国際基準値相当の Cd を含む作物から抽出精製し、展開液で希釈した後の液の Cd 濃度が、上記範囲に入るよう、適切な抽出倍率と希釈倍率を選ぶ必要がある。図3下表の「抽出倍率 A」と「希釈倍率 B」にはその推奨値を示してある。

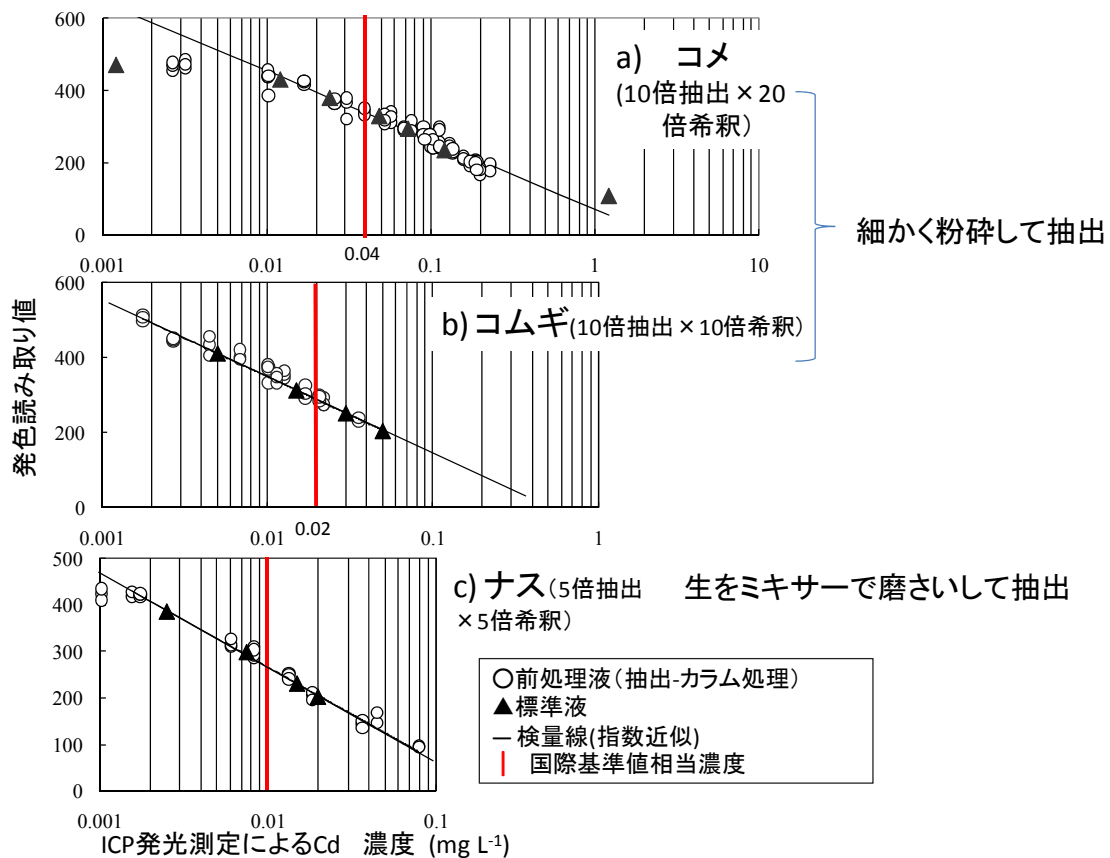


図4 イムノクロマト発色読み取り値と作物抽出・精製液の ICP 発光測定による Cd 濃度の関係

5 イムノクロマト法の精度

13 機関・研究室の参加により、国際的なガイドライン (AOAC) に従い、コメ、コムギ、ダイズ試料について、イムノクロマトによる Cd 測定の妥当性に関する室間共同試験を実施した。その結果、室間再現相対標準偏差の平均は 20.8 % (16.7~27.6 %)、併行 (繰り返し) 相対標準偏差の平均は 11.9 % (9.6~14.2 %)、付与値 (ICP-MS 分析値) に対する回収率の平均は 102.6 % (87.7~125.1 %) であった。(室間共同試験のガイドラインなどについては、文献 11) 食糧その科学と技術 を参照。)

イムノクロマトは、農協、普及所などで、Cd 濃度のレベルを素早く手軽に知るための利用のほか、基準値を超える疑いが高く精密分析に回すべきサンプルとそうでないサンプルを選別する初期スクリーニングへの利用が想定される。室間再現相対標準偏差が約 20 % であることから、1 試料につき 1 回測定する場合は、イムノクロマト測定値が正規分布に従い、回収率が 100 % の場合には、自主管理基準値を基準値の 75 % とすれば片側 5% の危険率で、72 % とすれば片側 2.5 % の危険率で、基準値を超える試料の判別が可能と考えられる。

自主管理基準値を高めを設定すると、基準値を超えた試料を見逃す確率が高まる。逆に、自主管理基準値を低めに設定すると、基準値を超えた試料を見逃す確率は減るが、実際は

基準値より低いのに基準値以上と判定されてしまう確率が高まる。また、基準値付近の濃度の試料がほとんどであるような母集団の場合は、実際は基準値以下でも基準値以上と判定されてしまう可能性が高くなる。そこで、スクリーニングへの利用に当たっては、目的や母集団の構成などを勘案して、自主管理基準値を妥当に設定する必要がある。

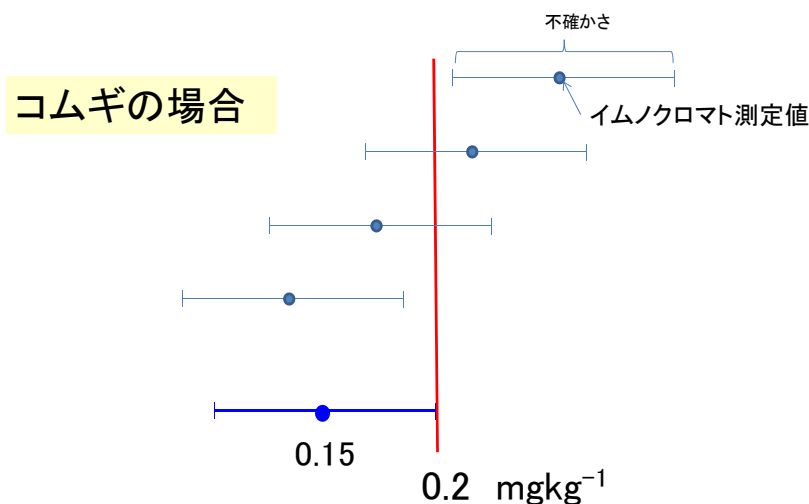


図5 イムノクロマト測定値と基準値の関係（基準値を 0.2 mg kg^{-1} と仮定した場合）
 室間再現標準偏差 20% のとき、イムノクロマト測定値が 0.15 mg kg^{-1} 以下なら
 片側危険率 5% で規制値以下と考えられる。

6 具体的な測定手順例及び留意点

作物別の具体的な測定手順例及び留意点についてそれぞれ以下に示す。

6-1 コメ、コムギ、ダイズ

(1) 作物体の粉砕

○コメ、コムギ、ダイズは卓上ミルなどで粉砕する。

コムギの玄麦は外皮の Cd 濃度が高いため、篩別式の粉砕器では篩を通らない部分（篩の上に残った試料）も全て粉砕・回収する必要がある。

(2) 作物からの Cd 抽出

○粉砕試料を 2 g 秤量する。

ダイズは、アルミカップなどに秤量し、 $135\text{-}150 \text{ }^{\circ}\text{C}$ で 2-3 時間きつね色になるまで焼成すると以後のろ過やカラム処理がうまくいく。（また、豆の状態で焼成や電子レンジ処理をしてから粉砕・秤量以降の操作をする方法も有効である。詳しくは、文献 12）東北農業研究成果情報参照。）

○容器に粉砕試料を入れ 0.1 mol L^{-1} 塩酸溶液 20 mL を加え、振とうする。

コメ： 1 分（手振とう可）。コムギ・ダイズ： 30 分。

(3) ろ過

○10-20 分静置後、上澄み液を 10 mL 程度、No.2 のろ紙でろ過する。

ダイズは、焼成しないでろ過促進剤（住化分析センター）を利用してろ過することもできる。

(4) Cd 分離カラムによる精製

○キットに付属の Cd 分離カラムで Cd を選択的に分離する。

詳しくはキットの説明書を参照のこと。

(操作：参考)

- ・ろ液 1mL を Cd 分離カラムに流入させ自然流下。(試料ろ液ごとにピペットチップは取り替える。) 自然落下し終わったら、付属の押し出し器で軽くカラム樹脂内の液を押し出す。流出液は捨てる
- ・洗浄液 2mL をカラムに流入
自然落下し終わったら、付属の押し出し器で軽くカラム樹脂内の液を押し出す。流出液は捨てる。
- ・溶出液 (蒸留水) 1 mL をカラムに流入
自然落下し終わったら、ピストンでカラム樹脂内の液を押し出し、回収容器で 1 mL になるよう測りながら回収する。(1 mL に満たない場合、蒸留水定容する。回収後十分攪拌する。)

(5) 展開液で希釈

○カラム精製液をキット付属の展開液 (EDTA を含む緩衝液) で希釈し、よく混合する。

検量線作成用 Cd の標準液も同様に処理する。

検液ごとにピペットチップは取り替える。

希釈倍率は、図 3 の表を参照する。たとえば 20 倍希釈の場合、20 μL の精製液に 380 μL の展開液を加える。

○Cd 標準液の濃度は作物により適切な濃度を用いる。

表 1 コメなどに用いる標準液 Cd 濃度

作物	標準液 Cd 濃度 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
コメ	10、30、60
コムギ	5、15、30
(ダイズ)	(10、30、60)

(ダイズ子実の国際基準値は無いが、0.5 mg kg^{-1} の場合の数値)

(6) イムノクロマト

キットの説明書に従いイムノクロマトを行う。イムノクロマトによる発色は、10 $^{\circ}\text{C}$ 以下の低温や 30 $^{\circ}\text{C}$ 以上の高温条件下では発色に影響が現れるため、検出操作は通常の空調設備のある室内で行う。また、ロットにより発色が微妙に異なるため、一連の測定は同一ロットのキットを用いて行う。

(操作：参考)

- ・(5)の混合液から 100 μL を採取し、金コロイド標識抗体入りビン (キットに付属) に入れ、良く混合する。検液ごとにピペットチップは取り替える。注) 金コロイド標識抗体がはがれてビンのふたに付着していることがあるので、注意。検液を入れる前にビンの底で机を軽くたたくようにするとよい。
- ・このうち 75 μL をイムノクロマト検出デバイスに滴下する。検液ごとにピペットチップは取り替える

(7) 発色の測定

発色が安定したら (30 分後：キットの取説参照) に測定ラインの発色強度をクロマトリーダーで測定する。

(8) Cd 濃度の算出

4に示したように、Cd 標準液の発色読みとり値から検量線(指数式)を作成し、試料液(抽出・精製液)の Cd 濃度を算出し、作物体当たりの濃度に換算する。

6-2 野菜(ホウレンソウ、サトイモ、ネギ、ナス)

(1) 作物体の磨さい

- 生の野菜を家庭用のミキサーなどで磨さいし、ジュース状にする。試料のみでは磨さいしづらい場合は、試料と同じ重量の水を加え、磨さいする。

(2) 野菜からの Cd 抽出

- 磨さい物に、溶液中の塩酸濃度が 0.1 mol L^{-1} となるように塩酸溶液と蒸留水を加え、最終的に試料の 5 倍量となるように良く混和する。表 2 参照。
- 野菜は 90% 以上水分のため、水分を考慮して、全量が試料(磨さい時に加えた水を差し引いた量)の 5 倍(w/v)となるように加える。(試料:塩酸溶液=1:4、試料に同量の水を加えて磨さいした場合(試料+水):塩酸溶液=1:2)

表 2 野菜類の抽出操作の例

	磨さい試料の秤量(g)	塩酸溶液等の添加量
そのまま試料を磨さいした場合	10	40mL(0.5 molL ⁻¹ HCl 10 mL+蒸留水 30 mL)
同量の水を加えて磨さいした場合	20	30mL(0.5 molL ⁻¹ HCl 10 mL+蒸留水 20 mL)

(3) ろ過

- 10-20分静置後、上澄み液を 10 mL 程度、No2 のろ紙でろ過する。
サトイモは微粒子がろ紙を通過してしまうので、以後のカラム処理を良好に行うために微粒子を除くための処理が必要である。上澄みを採り 90°C で約 30 分(液が透明に近くなるまで)湯煎した後、ろ過する、または遠心分離後ディスクフィルター(0.2~0.45 μm)でろ過するなどが有効である。

(4) カラムによる精製

キットに付属のカラムで Cd を選択的に分離する。

(5) 展開液で希釈

- カラム精製液をキット付属の展開液(EDTAを含む緩衝液)で希釈する。検量線作成用 Cd の標準液も同様に処理する。
希釈倍率は、図 2 の表を参照する。たとえば 5 倍希釈の場合、80 μL の精製液に 320 μL の展開液を加える。

- Cd 標準液は作物により適切な濃度を用いる。

表 3 野菜に用いる標準液 Cd 濃度

作物	標準液 Cd 濃度(μg L ⁻¹)
ホウレンソウ	10、30、60
サトイモ	5、15、30
ナス、ネギ	2.5、7.5、15

(6) イムノクロマト

キットの説明書に従いイムノクロマトを行う。6-1(6) 参照。

(7) 発色の測定

6-1(7) 参照。

(8) Cd 濃度の算出

6-1(8) 参照。

7 謝辞

今回紹介した手順及び研究成果の多くは、「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」の「農産物中カドミウムの収穫前段階の効率的モニタリング手法の確立」及び農林水産省委託プロジェクト研究「生産・流通・加工工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（農産物におけるヒ素およびCdのリスク低減技術の開発）」の成果に基づくものである。

本手順書作成に当たり、岩手農業研究センター、埼玉農業総合研究センター、住化分析センター、関西電力および農研機構・食品総合研究所に、ご協力、ご助言をいただいた。

8 参考文献

- 1) 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、*日本土壌肥科学雑誌*、77(6)、679-682
- 2) 俵田啓、佐々木和裕、大村直也、松本伯夫、斉木博 (2003) 抗カドミウム-EDTAモノクローナル抗体の作成と結合特性の評価、*BUNSEKI KAGAKU (分析化学)*、52、583~587
- 3) 佐々木和裕、俵田啓、奥山亮、香山不二雄、阿部薫、奥畑博史、丸山幸直、荒金玉実、宮坂均、藤川敬、大村直也 (2007) イムノクロマトグラフィーによる米中カドミウム濃度の簡易測定、*BUNSEKI KAGAKU (分析化学)*、56(1)
- 4) 佐々木和裕、俵田啓、荒金玉実、奥山亮、丸山幸直、奥畑博史、香山不二雄、阿部薫、宮坂均、藤川敬、Thomas R. GLASS、大村直也 (2008) イムノクロマトグラフィーによる玄米中のカドミウムのスクリーニング、*BUNSEKI KAGAKU (分析化学)*、57(2)、105-112
- 5) Kaoru Abe, Yasuhiro Sakurai, Akira Okuyama, Kazuhiro Sasaki and Kei Tawarada (2009) Simplified method for determining cadmium concentrations in rice foliage and soil by using a biosensor kit with immunochromatography、*Journal of the Science of Food and Agriculture*、89、1097-1100
- 6) 荒尾知人、牧野知之、村上正治、石川覚、阿部薫(2010) カドミウム汚染農耕地土壌対策技術の開発、*農業技術*、65(5)、205-222

- 7) Kaoru ABE、 Katsuo NAKAMURA 、 Tomohito ARAO、 Yasuhiro SAKURAI、 Ayumi NAKANO、 Chieko SUGINUMA、 Kei TAWARADA and Kazuhiro SASAKI、
Immuno-chromatography for the Rapid Determination of Cadmium Concentrations in
Wheat Grain and Eggplant、 *Journal of the Science of Food and Agriculture* (in press)
- 8) コーデックスの基準値 (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/codex.html
- 9) カドミウムの実態調査など、農林水産省
http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/kome/k_cd/cyosa/index.html
- 10) 農産物におけるヒ素およびカドミウムのリスク低減技術の開発 (2009)、(独)農業環境技術
研究所 http://www.niaes.affrc.go.jp/project/seisan_koutei/ac/index.html
- 11) (独)農業・食品産業技術研究機構 食品総合研究所(2008)、食糧その科学と技術、46
http://nfri.naro.affrc.go.jp/guidance/kankobutu/kanko_sou46.html
- 12) 中野亜弓、高橋彩子、阿部薫(2011)イムノクロマト法を用いたコムギ及びダイズのカド
ミウム濃度簡易測定法、平成 22 年度 東北農業研究成果情報 (印刷中)

土壌環境研究領域 阿部薫