

報 文

金コロイド標識抗カドミウム-エチレンジアミン四酢酸錯体
モノクローナル抗体を用いるイムノクロマトグラフィー
による米中カドミウムの簡易定量

佐々木和裕^①, 俵田 啓^②, 奥山 亮^③, 香山不二雄^④,
阿部 薫^⑤, 奥畑 博史^②, 丸山 幸直^③, 荒金 玉実^⑥,
宮坂 均^②, 藤川 敬^⑥, 大村 直也^①

金コロイド標識した抗カドミウム-エチレンジアミン四酢酸錯体 (Cd-EDTA) モノクローナル抗体を用いて、米中のカドミウムを簡便・迅速に定量できるイムノクロマトグラフィーを開発した。作製した抗 Cd-EDTA 抗体 (Nx2C3) の Cd-EDTA との平衡解離定数は 1.3×10^{-8} M であり、検討した他の金属の EDTA 錯体の平衡解離定数 (9.6×10^{-7} M 以上) とは 70 倍以上の違いがあった。米中のカドミウムを本イムノクロマトグラフィーによって測定するための前処理として、希塩酸によるカドミウムの抽出、並びにカラム処理による共雑金属の除去を検討した。その結果、イムノクロマトグラフィーの測定に影響しうる亜鉛、マンガン、マグネシウムなどの金属を排除しつつ、米中のカドミウムをほぼ完全に抽出・精製できることが分かった。また、構築したイムノクロマトグラフィーにおけるカドミウムの測定範囲は 0.01 mg L^{-1} から 0.1 mg L^{-1} であった。50 検体の玄米試料を上記前処理に施した後、本イムノクロマトグラフィーによってカドミウム濃度を測定した。本法で測定した米中のカドミウム含量は、硝酸分解による前処理と誘導結合プラズマ発光分析装置を用いた測定結果と良い相関 ($r = 0.94$) を示した。

1 緒 言

最近、食用米のカドミウム含量の規制値を 0.4 mg kg^{-1} とする新たな国際基準が決定されたが、日本では既に 0.4 mg kg^{-1} 以上の米は食用として流通しないような措置が採られている。ところが、2002 年に農林水産省が発表した全国の出荷前の米を対象とした調査では、調査された検体のうち約 0.3% に 0.4 mg kg^{-1} 以上のカドミウムが含まれていた^①。

規制値を超えるカドミウムを含む米の流通を防止するためには、米中のカドミウム濃度を簡便・迅速に判定できる分析法が必要とされている。現在、米中のカドミウム含量

は、誘導結合プラズマ発光分析装置 (ICP-AES) や原子吸光分析装置などの高価な装置で分析されている。また、これらの機器分析を行うための試料の調製操作も煩雑であるため、生産・流通の場で多数の検体を迅速に測定する用途には向いていない。

一方、医療分野などでは、物質の濃度を簡易に測定する手段として、生物の抗原抗体反応を用いたイムノアッセイ法が利用されている。中でも、イムノクロマトグラフィー法は、その取り扱いの容易さから妊娠判定や感染症の診断などに幅広く普及している。

著者らは、これまでにカドミウムのエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 錯体を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を報告している^②。本報では、玄米の簡便な前処理法並びに抗 Cd-EDTA 抗体を用いたイムノクロマトグラフィーによるカドミウムの簡易分析法を報告する。また、玄米中のカドミウム含量について、本簡易分析と機器分析を比較した結果についても報告する。

2 実 験

2.1 試 薬

1-(4-isothiocyanobenzyl)ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (Isothiocyanobenzyl-EDTA) は、同人化学

^① 財団法人電力中央研究所環境科学研究所: 270-1194 千葉県我孫子市我孫子 1646

^② 関西電力株式会社電力技術研究所環境技術研究センター: 619-0237 京都府相楽郡精華町光台 1-7 けいはんなプラザラボ棟 12 階

^③ 株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズつくば研究室: 305-0062 茨城県つくば市赤塚字牛ヶ測 586-9 池田理化ビル 2 階

^④ 自治医科大学地域医療学センター環境医学部門: 329-0498 栃木県下野市薬師寺 3311-1

^⑤ 独立行政法人農業環境技術研究所土壌環境研究領域: 305-8604 茨城県つくば市観音台 3-1-3

^⑥ 株式会社環境総合テクノス計測分析所: 576-0061 大阪府交野市東倉治 3-1-1

より購入した。ニワトリ卵由来のアルブミン (OVA) は、シグマアルドリッチジャパンより購入した。細胞融合に用いたポリエチレングリコール (重合度 1500) は日本ロシユより購入した。カドミウムと EDTA の錯体は塩化カドミウムと EDTA ナトリウム塩を混合して調製した。マグネシウム、マンガン、銅、亜鉛などの EDTA 錯体も塩化物の溶液を用いて調製した。

2・2 試料

測定の対象とした米試料は、玄米粉末標準試料³⁾及び国内にて生産された玄米を用いた。玄米粉末標準試料を用いる際は、NIES CRM No.10-c (1.82 mg kg⁻¹) と NIES CRM No.10-a (0.023 mg kg⁻¹) を混合し、計算上のカドミウム含量が 0.16, 0.31, 0.40, 0.60 mg kg⁻¹ になるように調製した。

2・3 抗 Cd-EDTA モノクローナル抗体の作製

既報に従いマウスモノクローナル抗体を作製した⁴⁾。簡単には、Isothiocyanobenzyl-EDTA とスガシ貝ヘモシアニン (KLH) と 50 mM ホウ酸溶液 (pH 9.5) 中で混合し、EDTA と KLH の複合体を調製した。これを脱塩カラム (10DG, バイオラッド製) によって、100 mM の MES (2-morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate) 緩衝液 (pH 6.5) 中に置換し、最終的に 0.1 mM になるように塩化カドミウムを加え、Cd-EDTA をハプテンとし、KLH をキャリアタンパク質とする複合体を調製した。約 6 週齢の雌のマウスに約 200 µg の Cd-EDTA-KLH 複合体を腹腔注射し、初回免疫とした。以後約 2 週間おきに同様の方法で、4 回の追加免疫を行った。マウス脾臓細胞とミエローマ細胞 (NS0 株, 理化学研究所) のハイブリドーマの作製にはポリエチレングリコール法を用いた⁴⁾。

Cd-EDTA に結合する抗体を産するハイブリドーマの選抜は、既報に従い蛍光光度計 (KinExA3000, Sapidyne 製) を用いて行った⁵⁾。簡単には、Isothiocyanobenzyl-EDTA と卵白アルブミン (OVA) から、前記の免疫に用いた Cd-EDTA-KLH 複合体と同様に Cd-EDTA-OVA 複合体を調製し、アガロースビーズ (NHS-activated Sepharose, Amersham Biosciences) 上に固定化し、このビーズを抗体検出用の抗原担体とした。Cd-EDTA に結合する抗体の検出は、抗原担体に結合した抗体を、蛍光物質 Cy5[®] で標識された 2 次抗体 (ヤギ抗マウス IgG 抗体, ImmunoResearch Laboratories) によって蛍光標識した後、抗原担体の蛍光強度を蛍光光度計によって測定することによって行った。

得られたハイブリドーマの中で最も Cd-EDTA に対する平衡解離定数 (K_d) が小さい抗体を生産するハイブリドーマ (Nx2C3 株) を、産業総合技術研究所特許生物寄託

センターに寄託した (受託番号: FERM P-19703)。イムノクロマトグラフィーの測定に用いた抗体は、Nx2C3 株をヌードマウスの腹腔に移植し、2 週間後に得られた腹水からプロテイン G カラムによって精製した。

抗体と各種 EDTA 錯体の平衡解離定数は、抗体と各種 EDTA 錯体との結合を既報に従い蛍光光度計 (KinExA3000, Sapidyne 製) を用いて解析することによって決定した⁵⁾。

抗体への金コロイドの標識は Peak らの方法⁶⁾に従い、直径 40 nm の金コロイド (BB International 製) を用いて行った。標識後の抗体は、スクリュウキャップ付きガラスバイアル内で真空乾燥させた後、常温で保存した。

2・4 ICP-AES による金属濃度の測定

ICP-AES による金属濃度の分析は、リガク製 SPECTRO CIROS-120 (EOP) を用いて行った。試料の導入時間は 25 秒、分析時間は 24 秒で行った。測定は 3 回繰り返し、その平均を測定値とした。測定条件は、高周波出力を 1.4 kW とし、プラズマガス流量を 13.0 L/min (Ar)、キャリアーガス流量は 0.90 L/min (Ar) とした。測定対象元素と測定波長は、Cd (214.438 nm), Zn (213.856 nm), Mn (257.610 nm), Mg (279.553 nm), Fe (259.940 nm), Cu (324.754 nm) とした。

2・5 イムノクロマトグラフィーのための玄米の前処理法

2 g の玄米の粉末を 0.05 M の塩酸 20 mL 中に浸し、1 時間激しくかくはんした後、濾過を行い玄米の塩酸抽出液を得た。Akatsuka らの方法⁷⁾に基づき作製したキレートカラム (カドミウム吸着カラム, 環境総合テクノス製) を用いて、以下の方法でこの抽出液からカドミウムを分離した。0.1 M 塩酸によってカドミウム吸着カラムを平衡化し、玄米の塩酸抽出液 5 mL をカラムに供した。5 mL の 0.1 M 塩酸でカラムを洗浄した後、5 mL の 0.05 M の硝酸によってカドミウムの溶出操作を行い、得られた溶液をカラム抽出液とした。

2・6 イムノクロマトグラフィー装置の構築

Fig. 1A に示す構造のイムノクロマトグラフィー装置を作製した。ディスペンサー (XYZ ハンドリングシステム, BioDot 製) を使用して 0.65 mg mL⁻¹ の Cd-EDTA-OVA を 0.75 µL cm⁻¹ の割合でニトロセルロース膜 (PRIMA, Schleicher & Schuell 製) に塗布し、50°C, 30 分間の乾燥によりこれを固定化し、テストラインとした。プラスチック製のバックリングシート (Adhesive Research 製) に、上記のニトロセルロース膜と 2 cm 長のサンプルパッド (グラスファイバー, Schleicher & Schuell 製) 及び吸収パッド (コットン 900, Schleicher & Schuell 製) を Fig. 1A に

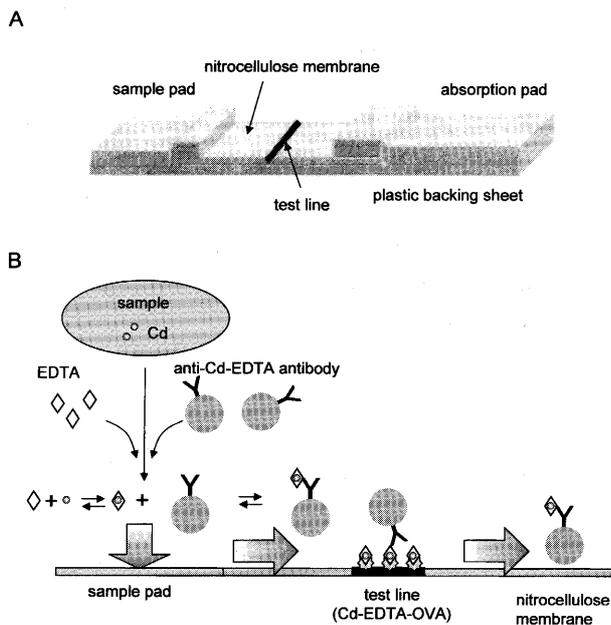


Fig. 1 Cadmium immunochromatography system

Panel A shows the physical layout of essential components while Panel B illustrates functionality. In Panel B, sample is mixed with EDTA and gold labeled anti-Cd-EDTA antibody. As the solution wicks past the test line, labeled antibody bound to Cd-EDTA cannot bind to immobilized Cd-EDTA-OVA.

示すようにはり付け, 5 mm 幅に切断してプラスチックケース (エンバイオテック製) に格納した。

このイムノクロマトグラフィー装置によるカドミウムの測定原理は以下のとおりである (Fig. 1B)。カドミウム (試料), EDTA 及び金コロイド標識した抗 Cd-EDTA 抗体 (Nx2C3 抗体) を混合し, 測定溶液とした。カドミウムと EDTA による錯体形成と, Nx2C3 抗体と Cd-EDTA の抗原抗体複合体の形成を平衡状態に近づけるために, この測定溶液を 10 分以上放置した。測定溶液をサンプルパッド上に滴下すると, 測定溶液は毛細管現象によりニトロセルロース膜中を浸透し, テストラインに到達する。抗原抗体複合体を形成していない抗体は, テストラインの Cd-EDTA-OVA に結合することによって捕捉されやすいが, 抗原抗体複合体はテストライン上の Cd-EDTA-OVA には結合しない。つまり, 試料中にカドミウムが多ければ, 抗原抗体複合体が多く形成されるため, テストラインに捕捉される抗体量は逆に少なくなる。今回の実験では, Nx2C3 抗体を金コロイドで標識しているため, テストラインに捕捉された抗体は赤色のバンドとして観察される。赤色のバンドは, 試料中にカドミウムが存在しない時に最も濃くなり, 試料中のカドミウム濃度の増大に伴い薄くなる。試料中にカドミウムが存在しないときに出現するバンドは, 肉眼でも容易に確認できるが, クロマトリーダー (Diascan 30-B,

大塚電子製) を用いてバンドの濃さを数値化することも可能である。

2.7 イムノクロマトグラフィー法によるカドミウム濃度の測定

上記のカドミウム吸着カラムから硝酸によって溶出された溶液 20 μ L を 380 μ L の 0.3 μ M EDTA 含 50 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) を加え混合した。あらかじめ真空乾燥させていた金コロイドで標識された抗 Cd-EDTA 抗体に, この混合液 100 μ L を加え混合し, 10 分以上放置した後, 75 μ L を上記のイムノクロマトグラフィー装置に供した。試料添加後, 40 分経過した後, クロマトリーダー (Diascan 30-B, 大塚電子製) を用いてテストライン上に現れるバンドの濃さを数値化した。クロマトリーダーは, メンブレン表面に発光ダイオード (LED) 光源から緑色光を照射し, その反射光をフォトダイオードで検出することで, テストラインの赤色バンドの濃さを反射強度として数値化することができる。

3 結 果

3.1 抗 Cd-EDTA モノクローナル抗体の作製

Cd-EDTA をキャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートをマウスに免疫した。このマウスの脾臓細胞からハイブリドーマを調製し, Cd-EDTA に特異的に結合するモノクローナル抗体を産する細胞株を選抜し, その細胞株が産する抗体 (Nx2C3) と, 既報の抗 Cd-EDTA 抗体 (So26G8) について各種 EDTA 錯体に対する結合性を調べた (Table 1)。両抗体の Cd-EDTA に対する平衡解離定数 (K_d) を比較すると, Nx2C3 抗体が 1.3×10^{-8} M, So26G8 抗体が 5.9×10^{-7} M であり, Nx2C3 抗体のほうが Cd-EDTA に対して約 50 倍強い親和性を示すことが分かった。また, 両抗体について各種金属の EDTA 錯体との交差反応性を調べたところ, 両抗体とも調べた金属 (亜鉛, マンガン, 銅, カルシウム, マグネシウム, 鉄) の範囲では Cd-EDTA に対して 1.5% 以下であった。以上から, 以後の実験には, カドミウムに対してより強い親和性を示す Nx2C3 抗体を用いることにした。

3.2 玄米の前処理法の検討

玄米中のカドミウム含量を簡易測定するための玄米の前処理方法を検討した。1 M の塩酸による玄米からのカドミウム抽出が既に報告されている⁸⁾が, 本報告では, より低濃度の塩酸 (0.05 M) を用いて玄米からのカドミウムの抽出を検討した。玄米粉末標準試料を用いて濃度の異なる粉末玄米を 4 種調製し, 塩酸による抽出処理を施し ($n = 10$), ICP-AES にて抽出液中のカドミウム濃度を測定した。また, 同様に各玄米を硝酸分解し, そのカドミウム濃度を

Table 1 Comparison of equilibrium dissociation constants and cross reactivities toward EDTA-metal complexes between Nx2C3 and So26G8 antibodies

EDTA complex	Nx2C3		So26G8	
	K_d/M	cross-reactivity, %	K_d/M	cross-reactivity, %
Cd(II)-EDTA	1.3×10^{-8}	100	5.9×10^{-7}	100
Cu(II)-EDTA	9.6×10^{-7}	1.4	8.1×10^{-5}	0.73
Mn(II)-EDTA	1.8×10^{-6}	0.72	4.6×10^{-5}	1.3
Zn(II)-EDTA	2.3×10^{-6}	0.57	9.5×10^{-5}	0.62
Fe(III)-EDTA	4.2×10^{-5}	0.031	1.7×10^{-3}	0.034
Mg(II)-EDTA	2.4×10^{-4}	0.0055	5.9×10^{-3}	0.01
Ca(II)-EDTA	$>1 \times 10^{-3}$	<0.002	4.8×10^{-3}	0.012
metal free EDTA	$>5 \times 10^{-3}$	<0.0003	3.5×10^{-2}	0.0017

K_d : equilibrium dissociation constant

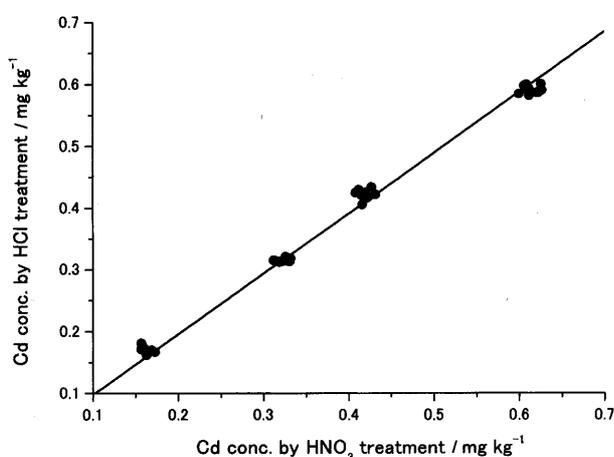


Fig. 2 Extraction of cadmium from the standard brown rice

Extractions were carried out with HCl (Y axis) or HNO_3 (X axis). Each Cd concentration was determined by ICP-AES. The solid line is the ideal case (slope of 1).

ICP-AESにて測定し、上記の塩酸抽出法によって得られた抽出液中のカドミウム濃度と比較した (Fig. 2). 両処理液中のカドミウム濃度の相関係数 (r) が、0.99 以上であることから、両処理法には良い相関が認められ (Fig. 2), t 検定では有意水準 = 5% で両者の間に有意な差は認められなかった。よって、上記の塩酸抽出法によって玄米中のカドミウムをほぼ完全に抽出できることが分かった。

次に、塩酸によって玄米からカドミウムとともに抽出される亜鉛、マンガン、鉄、マグネシウム、銅の濃度を ICP-AESにて調べた (Table 2). この結果から、塩酸抽出液には、亜鉛、マンガン、マグネシウムの3種の金属が平均でそれぞれ、2.0, 2.9, 112 mg kg^{-1} 含まれることが分かった。Nx2C3抗体は、Cd-EDTAに対して良好な結合特異性を示すが (Table 1), Nx2C3抗体とCd-EDTAとの結合を妨害する可能性のある金属の共存は望ましくない

Table 2 Metal concentrations in brown rice extract and column eluate

Metal	HCl extract/ mg L^{-1}	Column eluate/ mg L^{-1}	Recovery, %
Mn	2.85 ± 0.18	<0.001	<0.1
Zn	1.96 ± 0.15	0.029 ± 0.015	1.5 ± 0.4
Cd	0.037 ± 0.02	0.039 ± 0.016	105 ± 7.1
Mg	112 ± 6.8	0.050 ± 0.082	<0.1
Fe	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.012	122 ± 7.8
Cu	0.25 ± 0.01	<0.005	<20

め、カドミウム吸着カラムを用いて玄米の塩酸抽出液から、カドミウム以外の金属を除去することを試みた。

ここで用いたカドミウム吸着カラムは、塩酸存在下でカドミウムを特異的に吸着し、硝酸存在下ではカドミウムを脱離する性質を持つものである⁷⁾. 玄米の塩酸抽出液をこのカラムで処理し、最終的に硝酸によって溶出された溶液中の金属 (カドミウム、亜鉛、マンガン、鉄、マグネシウム、銅) の濃度と、カラムに導入する前の塩酸抽出液中の金属の濃度を ICP-AESを用いて測定し、比較した (Table 2). その結果、塩酸抽出液と硝酸抽出液中のカドミウム濃度から計算したカドミウムの回収率は $105 \pm 7.1\%$ であった。このことから、塩酸抽出液中のほぼすべてのカドミウムがカラムに吸着し、また、そのカドミウムのほぼすべてが硝酸によって溶出されたことが分かった (Table 2). 一方、硝酸抽出液中のマンガンと銅の濃度は ICP-AESの検出下限濃度 (それぞれ、 0.001 mg L^{-1} と 0.005 mg L^{-1}) 以下であり、亜鉛とマグネシウムはそれぞれ 0.03 mg L^{-1} と 0.05 mg L^{-1} であった。以上より、カドミウム吸着カラムによって、塩酸抽出液中のカドミウムを損なうことなく、マンガンとマグネシウムを2000分の1程度に、亜鉛を60分の1以下に、銅を50分の1以下に除去できることが分かった (Table 2). ただし、鉄については、回収率が $122 \pm 7.8\%$ であり、本カラム処理では除去できないことが分かった (Table 2).

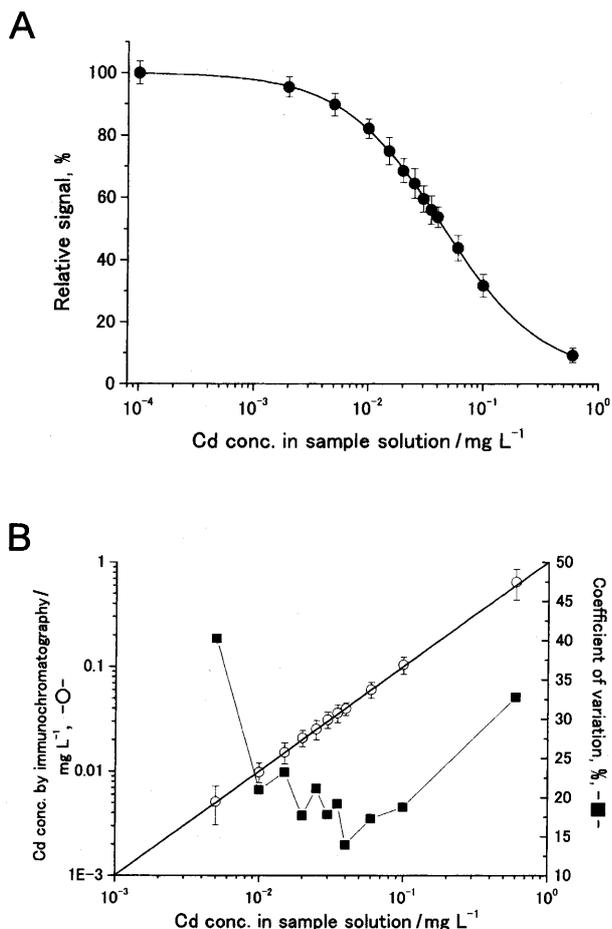


Fig. 3 Cadmium assay by immunochromatography

Color intensity of the test line of the immunochromatography devise was measured by chromatoreader. In panel A, an X axis is the concentrations of Cd in the sample solution and the Y axis is the measured signal normalized to the zero Cd response. The solid line is a standard curve was determined by the best fitting sigmoid curve. In panel B, each estimated Cd concentration (○) was determined from the signal using the standard curve from panel A. Each coefficient of variation (CV) (■) was calculated from standard deviation of the estimated Cd concentrations.

3.3 イムノクロマトグラフィーによる塩化カドミウム溶液の測定

試料中のカドミウム濃度によってテストライン上に出現するバンドの濃さが変化するイムノクロマトグラフィー装置を作製した (Fig. 1). クロマトリーダーを用いてバンドの濃さ (テストラインの発色の強さ) を数値化することで, カドミウム濃度とバンドの濃さの関係を調べた (Fig. 3A). 塩化カドミウム溶液を用いて, イムノクロマトグラフィーを行った結果, カドミウム濃度が 0.01 mg kg^{-1} から 0.1 mg kg^{-1} の範囲では, バンドの濃さとカドミウム濃度間に直線関係が見られた (Fig. 3A). この結果を基に検量線を作成し, クロマトリーダーによって数値化

したバンドの濃さをカドミウム濃度に換算し, 測定濃度ごとに標準偏差を求めた ($n = 20$) (Fig. 3B). 更に, イムノクロマトグラフィーの測定精度を評価するために, 測定したカドミウム濃度ごとに標準偏差から変動係数 (CV) を計算した (Fig. 3B). その結果, カドミウム濃度が $0.01 \sim 0.1 \text{ mg kg}^{-1}$ の範囲では CV の値はおおむね 20% 以下であった (Fig. 3B). この区間で CV が最大の値を示したのはカドミウム濃度が 0.015 mg kg^{-1} のときの 23.2% であり, 最も小さな値を示したのはカドミウム濃度が 0.04 mg kg^{-1} のときの 13.9% であった (Fig. 3B). このことから, 以下のイムノクロマトグラフィーでは, 規制値である 0.4 mg kg^{-1} 前後のカドミウムを含む玄米に由来する測定試料のカドミウム濃度が $0.01 \sim 0.1 \text{ mg kg}^{-1}$ までの範囲に収まるように試料の希釈率を定めてカドミウム濃度の定量を行った.

3.4 玄米中カドミウム濃度の測定

50 検体の玄米を用いて上記の塩酸抽出とカラムによる簡易前処理とイムノクロマトグラフィー装置について検証を行った.

簡易前処理の検証は, 硝酸分解処理との比較によって行った. 同じ玄米を簡易前処理と硝酸分解処理にそれぞれ供した後, ICP-AES によってそれぞれのカドミウム濃度を測定し, それらを玄米中のカドミウム含量に換算して比較した (Fig. 4A). 簡易前処理法と硝酸分解法によって決定されたカドミウム含量の相関係数 (r) は 0.99 以上であり, この結果から, 簡易前処理法が実際の玄米試料に適用できることが分かった.

次に, イムノクロマトグラフィーを用いて, 簡易前処理後の玄米抽出液中のカドミウム濃度の測定を行った. イムノクロマトグラフィーの結果は, 上記硝酸分解に処した試料の ICP-AES による測定結果との比較によって評価した. それぞれの方法で得られた測定値を玄米中のカドミウム含量に換算して比較した結果, 相関係数 (r) は 0.94 であり, 回帰直線の傾きは 1.1 であることから, 両者の間には良い相関が認められた (Fig. 4B).

以上から, 本報告における簡易前処理法とイムノクロマトグラフィーにより, 玄米のカドミウム含量を測定できることが分かった.

4 考 察

4.1 カドミウムを分離するための前処理の必要性

本イムノクロマトグラフィーでは, 抗原抗体複合体を形成する Nx2C3 抗体の割合の増加によって, テストライン上に現れるバンドの濃さが低減する (Fig. 1B). そのため, カドミウム以外の金属が試料中に存在し, その金属の EDTA 錯体に Nx2C3 抗体が結合すると, イムノクロマト

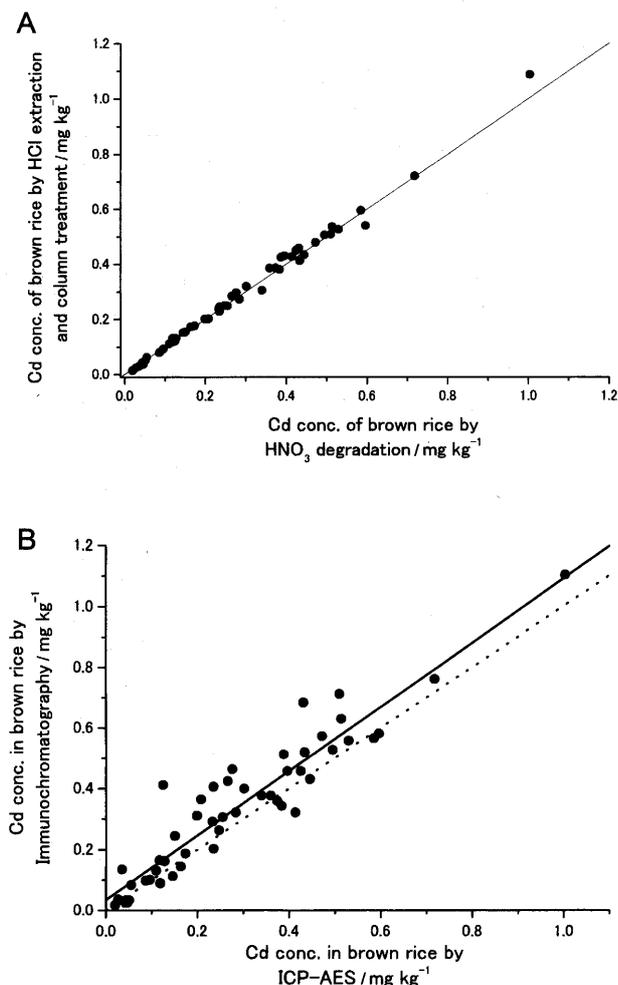


Fig. 4 Cadmium assay with brown rice

Fifty randomly selected brown rice samples were split and extracted with both HCl and HNO₃. HCl extracts were introduced into the column to prepare the samples for the immunochromatography assay. In panel A, estimated Cd concentration of both column eluate and HNO₃ extracts were determined by ICP-AES. The solid line is the ideal case (slope of 1). Panel B shows estimated Cd concentration from the immunochromatography with the column eluate versus the ICP-AES of nitrate extract. The dashed line is the ideal case (slope of 1) and the solid line is the best fit to the data.

グラフィーの結果から推定されるカドミウム濃度は、実際のカドミウム濃度よりも高くなる恐れがある。よって、試料中にカドミウム以外の金属が、イムノクロマトグラフィーの結果に影響するほどの濃度で存在する場合は、その金属を試料中から除外する必要がある。

以下に、マグネシウムを例にカドミウム以外の金属がテストライン上に現れるバンドの濃さに影響する濃度について考察した。Nx2C3抗体のMg-EDTAに対する K_d は 2.4×10^{-4} Mであり、これはCd-EDTAに対する K_d

(1.3×10^{-8} M)の約 2×10^4 倍である (Table 1)。このことは、Nx2C3抗体が 1.3×10^{-8} M (Cd-EDTAに対する K_d)以下の濃度で存在する結合平衡状態を仮定した場合、Mg-EDTAがCd-EDTAの 2×10^4 倍の濃度で共存すると両錯体に結合するNx2C3抗体の割合がほぼ等しくなることを示す。

テストライン上に現れるバンドの濃さが直線的に変化するカドミウム濃度の範囲は、 0.01 mg kg^{-1} (8.9×10^{-8} M)から 0.1 mg kg^{-1} (8.9×10^{-3} M)の間である (Fig. 3B)。この範囲の下限濃度である 0.01 mg kg^{-1} (8.9×10^{-8} M)のカドミウムが抽出液中に存在すると仮定した場合、抽出液中のマグネシウムの平均濃度は 110 mg L^{-1} (4.6×10^{-3} M)である (Table 2)から、抽出液中のマグネシウムはカドミウムに対して、モル比で約 5.2×10^5 倍存在していることになる。よって、この条件では、Nx2C3抗体はCd-EDTAよりもMg-EDTAにより多く結合することが予想される。このことは、抽出液中のマグネシウムがバンドの濃さに十分影響しうる濃度で存在していることを示す。

亜鉛とマンガンと銅についても、抽出液中の濃度 (Table 2)並びに、それぞれのEDTA錯体とNx2C3抗体との K_d (Table 1)から、マグネシウム同様にバンドの濃さに影響することが予想された。よって、抗体とCd-EDTAの結合のみをイムノクロマトグラフィーに反映させるには、イムノクロマトグラフィーを行う前に、試料中からマグネシウム、マンガン、亜鉛、銅の4種の金属を抽出液から除去する必要があると考えられた。

一方、Fe-EDTAとCd-EDTAの K_d の比は約 3.2×10^3 倍であるが (Table 1)、抽出液中の鉄濃度は 0.12 mg kg^{-1} (2.1×10^{-6} M)であり (Table 2)、抽出液中のカドミウム濃度を 0.01 mg kg^{-1} (8.9×10^{-8} M)と仮定した場合のカドミウムとのモル比は約24倍であり、 K_d の比に比べて10分の1以下である。よって、抽出液中の鉄はテストライン上に出現するバンドの濃さに対してほとんど影響を与えないと予想される。このことから、カラム処理によって試料から鉄を除くことができなくても (Table 2)、カドミウム濃度の測定には問題が生じないと考えられた。

4.2 簡易測定法としての評価

本報告に記載した簡易前処理法とイムノクロマトグラフィーによって玄米中のカドミウムを簡易かつ迅速に測定できる見通しが得られた。一方、欧州ではこのような簡易測定法が実際に使用されている。例えば、欧州委員会では、食品中のダイオキシン汚染の有無を判定するための一次スクリーニングの手段として簡易測定法を利用することを認めている⁹⁾。欧州委員会の指針では、汚染試料の見落としを防ぐ安全策として、簡易測定法によって決定された濃度

が, 規制値に 0.6 から 0.7 の係数 (安全係数) を掛けた値よりも大きければ, 汚染の疑いがある試料として機器分析による 2 次検査を行い, 汚染の有無を確定することを定めている⁹⁾.

日本国内においては, 簡易測定法による食品の安全検査に関する指針は存在しないが, 仮に上記の欧州委員会の事例をカドミウム汚染米のスクリーニングに当てはめて考えると, 米中カドミウム濃度の規制値は 0.4 mg kg^{-1} なので, 汚染を疑わなければならない測定値は, 安全係数を 0.6 とすれば, 0.24 mg kg^{-1} 以上, 安全係数を 0.7 とすれば 0.28 mg kg^{-1} 以上となる.

今回分析した玄米 50 検体のうち, 機器分析 (ICP-AES) によりカドミウム含量が 0.4 mg kg^{-1} 以上と測定された試料は 14 検体あった. このうち 13 検体は本方法でも 0.4 mg kg^{-1} 以上と測定され, 残りの 1 検体も 0.32 mg kg^{-1} と高めに測定された (Fig. 4B). よって, 汚染の疑いのある濃度を 0.28 以上 (安全係数 0.7) とすれば, 本法により今回の汚染試料すべてを検出できたことになる. よって, 今回の実験では, 安全係数に 0.7 を採用し, 測定濃度が 0.28 mg kg^{-1} 以上の試料を汚染の疑いがあるとすれば, す

べての汚染試料を見落とすことなく検出できたことになる.

文 献

- 1) 農林水産省ホームページ 食品中のカドミウムに関する情報, < <http://www.maff.go.jp/cd/index.html> >.
- 2) 俵田 啓, 佐々木和裕, 大村直也, 松本伯夫, 齊木 博: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **52**, 583 (2003).
- 3) 独立行政法人国立環境研究所標準試料 NIES CRM No. 10-a, c (玄米粉末).
- 4) 多田伸彦: モノクローナル抗体作製マニュアル, (1995) (学際企画).
- 5) K. Sasaki, T. R. Glass, N. Ohmura: *Anal. Chem.*, **77**, 1933 (2005).
- 6) S. H. Peak, S. H. Lee, J. H. Cho, Y. S. Kim: *Methods*, **22**, 53 (2000).
- 7) K. Akatsuka, Y. Yoshida, N. Nobuyama, S. Hoshi, S. Nakamura, T. Kato: *Anal. Sci.*, **14**, 529 (1998).
- 8) 中島秀治: 農業および園芸, **75**, 1314 (2000).
- 9) Commission directive 2002/69/EC ANNEX II 7, Laying down the sample methods and the methods of analysis for the official control of dioxins and the determination of dioxin-like PCBs in foodstuffs (2002).

Rapid Determination of Cadmium in Rice by Immunochromatography Using Anti-(Cd-EDTA) Antibody Labeled with Gold Particle

Kazuhiro SASAKI¹, Kei TAWARADA², Akira OKUYAMA³, Fujio KAYAMA⁴,
Kaoru ABE⁵, Hiroshi OKUHATA², Yukinao MARUYAMA³, Tamami ARAKANE⁶,
Hitoshi MIYASAKA², Takashi FUJIKAWA⁶ and Naoya OHMURA¹

¹ Central research institute of electric power industry, 1646, Abiko, Abiko-shi, Chiba 270-1194

² The Kansai Electric Power Co., Inc., 1-7, Hidaridai, Seikacho, Sourakugun, Kyoto 619-0237

³ EnBioTec Laboratories Co., Ltd., 586-9, Ushigafuchi, Akatsuka, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0062

⁴ Jichi Medical School, 3311-1, Yakushiji, Shimotsuke-shi, Tochigi 329-0498

⁵ National Institute for Agro-Environmental Sciences, 3-1-3, Kannondai, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8604

⁶ The General Environmental Technos Co., Ltd., 3-1-1, Higashikurachi Katano-shi, Osaka 576-0061

(Received 2 August 2006, Accepted 17 October 2006)

A simple and rapid immunochromatography (IC) system for the detection of Cd in rice has been developed. The produced anti-Cd-EDTA antibody exhibited the equilibrium dissociation constant (K_d) for Cd-EDTA at 1.3×10^{-8} M, which was almost 100-fold tighter than K_d for the other tested EDTA-metal complex. Cadmium in rice was extracted by HCl, and the extract was introduced into a column to remove co-existing metals (such as zinc, manganese and magnesium) while retaining cadmium. After a pretreatment, IC could detect cadmium in the range from 0.01 to 0.1 mg L⁻¹. Fifty brown rice samples were tested with the column treatment and the IC assay. The estimated cadmium concentrations from the assay were evaluated by a comparison with the results of a nitrate treatment and ICP-AES analysis for the samples. Two measurements were highly correlated, with a correlation coefficient of 0.94.

Keywords : cadmium ; immunochromatography ; immunoassay ; brown rice ; Cd-EDTA.