

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380073

研究課題名（和文） 食餌中 Cd の化学形態がマウス体内 Cd の動態と存在状態へ及ぼす影響

研究課題名（英文） Effect on distribution and chemical speciation of Cd of chemical forms of Cd in diet.

研究代表者

吉村 悦郎（YOSHIMURA ETSURO）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：10130303

研究成果の概要（和文）：

イネを、Cd を含む土耕で栽培し、1.7kg の Cd 含有米を得た。金属分析からはこのコメには Cd が 3.9 ppm 含まれていることが分った。Cd 米における Cd の化学形態を HPLC-ICP/MS で解析すると、高分子量画分に Cd に基づくピークが 4 個確認された。マウスへの投与実験から、Cd ならびに Cd-グルタチオン錯体では Cd 蓄積に変化が認められなかったが、Cd 米では肝と腎への Cd 蓄積が増加することが認められた。

研究成果の概要（英文）：

Rice plants were grown in soil culture that contained Cd and 1.7 kg of rice grains were obtained. In the grains Cd was found to be at a concentration of 3.9 ppm. HPLC-ICP/MS analysis was undertaken for the grain and revealed that 4 peaks were responsible for the chemical forms of Cd. From the feeding experiment against mouse, no difference in levels of Cd accumulation was found. However, a much greater accumulation was seen when Cd-containing rice grains were fed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2011 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2012 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：食品科学

キーワード：食品安全性、カドミウム

## 1. 研究開始当初の背景

Cd は重金属に分類される金属で、その中でも比較的溶解度が高いこと、土壌粒子に対する吸着性が低いこと、ならびに、多くの高等植物が高い耐性能を有することから、高等植物に高濃度存在する可能性が考えられる。し

たがって、このような植物体を食餌とする動物やヒトでは、Cd による健康被害を誘起する可能性が高い。

イネは Cd に対して比較的強い耐性を有し、そのためにコメに蓄積しやすい。わが国では、コメを主食とするために、コメからの Cd 蓄

積は深刻な問題である。食の安全という観点から、コーデックス委員会は精米に対して 0.2 mg/kg の値を国際基準として設けているが、この基準は無機 Cd の濃度という観点から得られたものであり、その化学形態に関しては不問に付されている。つまり、食餌における Cd の化学形態が実際の Cd 吸収にどのような影響を与えるかは全く知られていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、食餌中の Cd の化学形態が、動物個体における Cd の体内動態に及ぼす影響を解明する点にある。食糧中の Cd の化学形態を明らかにし、その動物個体に対する影響を正確に評価することは、食餌由来の Cd の毒性リスクを正確に見積もるための必要不可欠の工程である。このような過程を経ることにより、本研究は食の安全の確保に貢献することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) Cd 特異的に結合する物質の検出システムの開発

5, 10, 15, 20-Tetraphenyl-21H, 23H-porphine tetrasulfonic acid (TPPS) は 414 nm で吸収極大を示し Cd と結合することにより吸収波長を 434 nm に変化させることを見出し (図 1)、これを用いた Cd 結合物質の特異的な検出法の開発を行った。すなわち、Cd-TPPS 錯体を HPLC のポストカラム溶液とし、414 nm の吸収をモニターすることにより、Cd 結合物質の検出法の開発を目指した。

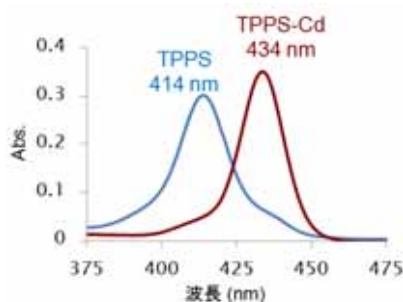


図 1 TPPS とその Cd 錯体の吸収スペクトル

### (2) Cd 含有米の作成

イネはポットを用いた土耕で栽培した。ポットに水を張り、水田とし、ここにイネ (トチオトメ) を栽培した。土の中には Cd を添加したもの (Cd 区) と添加しないもの (コントロール区) とした。栽培は通常の水田と同時期に、播種と植え付けを行い、天然光下で行った。種子を収穫後は、ICP 発光分析で Cd 含有量の測定を行った。20 ポットから約 1.7 kg の Cd 米を収穫した。

### (3) コメ中 Cd 化学形態の解析

コメ試料から Cd 結合物質の抽出

粉末状のコメサンプル 2.0 g に 20 mL のバッファーを加え、スターラーで攪拌を行った。その後遠心で上清を 15 mL 回収し、0.45 μm フィルターで濾過したものをコメ抽出液とした。抽出バッファー・攪拌・遠心条件などについて検討を行った (表 1)。それぞれの抽出液について、Cd 濃度を ICP-AES で測定した。

HPLC-ICP/MS によるコメ中 Cd の化学形態の解析

カラムにはゲル濾過カラム (YMC Diol-120; 0.8 cm × 30 cm) を使用した。移動相には 0.2 M ギ酸アンモニウムを含んだ 50 mM トリス硝酸バッファー (pH 7.4) を用いた。検出は多波長の吸収を測定するために photodiode array detector (JASCO MD-2018 以下 PDA 検出器) を用いた。検出は UV-VIS 吸光分光器で 280 nm の吸収をモニタリングした。その後 ICP/MS 装置に接続し、<sup>114</sup>Cd の測定を行った。イオン化はアルゴンプラズマにより行い、四重極質量アナライザにより質量分析を行った。

### (4) マウス体内の Cd 分布

無機 Cd および Cd-GSH 錯体

投与実験と解剖; AIN93M 組成の粉末飼料を対照食とし、これに Cd 硫酸塩、またはグルタチオン錯体 (Cd-GSH の 1 : 2 錯体, Cd complex と記す) を Cd 濃度として、0.05 または 3 mg/kg 添加した特注飼料を用いた (オリエンタル酵母工業)。ICR 系雄性マウス (5w 齢、SPF) を 5 群 (1 群 12 匹) に分け、対照食で 1 週間予備飼育した後、Cd 含有食を 1 または 4 週間、粉末給餌用のローデンカフェを用いて与えた。以下、投与群は、[投与化合物-餌中 Cd 濃度] (例えば、CdSO<sub>4</sub>-0.05 群) で略記する。水は滅菌水道水を与えた。摂食期間終了時に 1 群 6 匹をセボフレン吸入麻酔下で下大静脈より採血し、頸椎脱臼、等張液で肝臓を還流後、肝臓および腎臓を摘出し、-80 °C のフリーザーに保管した。スケジュールを図 2 に示した。

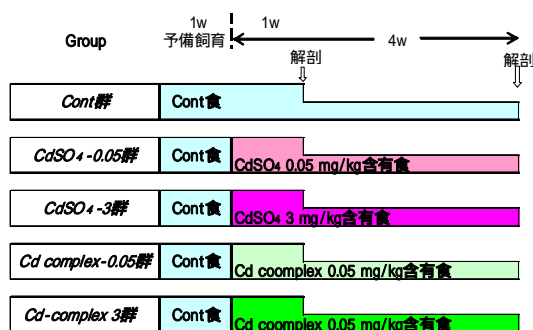


図 2 無機 Cd ならびに Cd-GSH 錯体投与マウスの飼育スケジュール

Cd 含有米

米を含む餌は、AIN93M 組成のコーンスターチの代わりに米粉を 38.5% 添加して作成した。

Control米飼料 (Cd含量 0.2ppm以下) を対照食 (Cont米) とし、Cd米 (Cd含量約 1.5ppm)、Cont米+CdNO<sub>3</sub> (最終Cd含量約 1.5ppm)、Cont米+Cd+Zn+Cu (最終Cd含量約 1.5ppm)、およびCdSO<sub>4</sub> (AIN93M組成飼料+CdSO<sub>4</sub> (最終Cd含量約 1.5ppm)) を作製した (オリエンタル酵母工業)。ICR系雄性マウス (5w齢、SPF) を6群 (1群6匹) に分け、1週間AIN93M飼料で予備飼育した後、Cd米等を4週間、粉末給餌用のローデンカフェを用いて与えた。なお1群はCdSO<sub>4</sub>を4週間与え、引き続き4週間、Cont (AIN93M組成飼料 (Cd濃度 0.1ppm以下)) を摂食させた。水は滅菌水道水を自由摂取させた。摂食期間終了時にマウスをセボフレン吸入麻酔下で下大静脈より採血し、頸椎脱臼にて安楽死させたのち、等張液で肝臓を還流後、肝臓および腎臓を摘出し、-80のフリーザーに保管した。保管した臓器は解凍後、硝酸+過酸化水素にてマイクロウェーブ分解を行い、ICP-MS (ELAN DRC II) にて臓器中Cd濃度を測定した。投与実験のスケジュール模式図は図3に示した通りである。以下各群をそれぞれCont米群、Cd米群、Cont米+CdNO<sub>3</sub>群、Cont米+Cd+Zn+Cu群、CdSO<sub>4</sub>群、およびCdSO<sub>4</sub> Cont群とする。

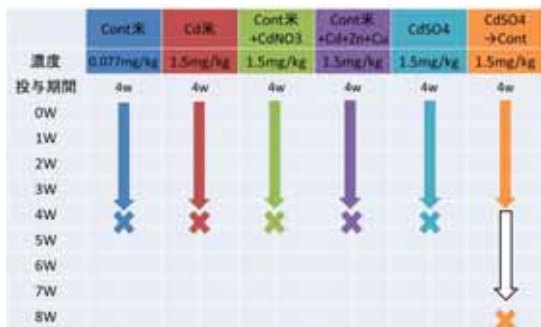


図3 Cd含有米投与マウスの飼育スケジュール

#### 4. 研究成果

##### (1) Cd特異的に結合する物質の検出システムの開発

新規なCdキレーター分析法を開発したので、その有用性を調べるためにウマ血漿中のグルタチオン分析に適用した。

ウマ無菌保存血は日本生物材料センターから購入したものを遠心 (10000×G, 30 min, 4°C) し、全血から血球成分を除去した。これを0.45 μmフィルターで濾過したものを液体窒素で凍結し、ウマ血漿サンプルとして使用した。サンプルの保存は-80°Cで行った。

ウマ血漿のHPLC分析は、TCEPによる還元処理を行った場合と未処理の場合をそれぞれ行った。

GSHとGSSG終濃度それぞれ1mMの標準サンプルのHPLCクロマトグラムを図4で示した。本法はCdキレート能を指標としているのでGSHのほかにもGSSGも検出された。ただし、GSSGはGSHに比べてキレート能が弱いためGSSGのピークはGSHの8%程度しかなかった。

TCEP処理を行っていないウマ血漿サンプルのHPLCクロマトグラムからウマ血漿中のGSH濃度は2.3±0.1 mMであった。また、TCEPにより還元処理をしたウマ血漿サンプルのクロマトグラムではウマ血漿のGSHピーク面積は未処理の場合より8.4%増加した。すなわち、ウマ血漿中グルタチオンは還元型が92%を占めている計算となる。TCEP未処理の結果との差からウマ血漿中GSSGの濃度を算出すると、GSSG濃度は100±10 μMであった。

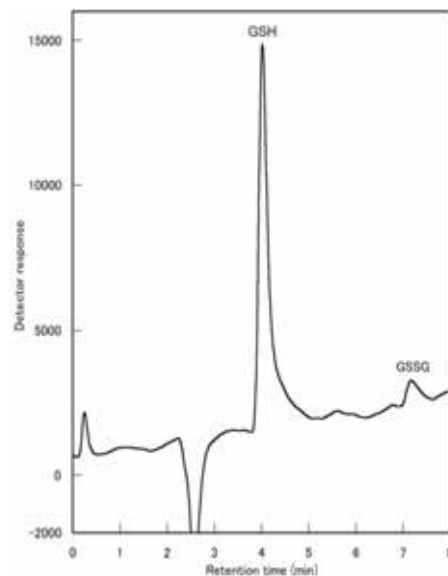


図4 TPPS法によるGSHとGSSGの同時分析

##### (2) Cd含有米の作成

ICP-AESによる金属分析結果は図5に示した。Cd汚染米のCd, Cu, Zn, Fe濃度は全てコントロール米より高かった。Cd汚染米のCd濃度はコントロール米の20倍となる3.88 ppmであった。この数値は、日本食品衛生法の基準値である1 ppmと比較して約4倍大きな値であった。また、Cd含有米ではCd以外にもCu, Zn, Feの濃度が高かった。

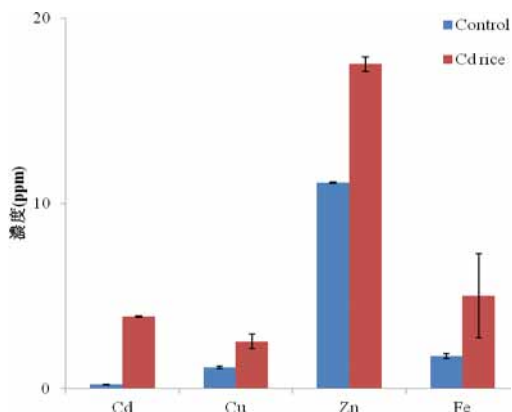


図5 Cd含有米の金属分析

(3) コメ中Cdの化学形態の解析

それぞれの抽出方法の詳細と、Cdの抽出率の結果を表1に示す。抽出法が他と比較して約2倍のCd抽出率が得られた。そのため以降の実験では抽出法を用いることとした。

表1 Cdキレーター抽出法の比較

	抽出法	抽出法	抽出法
バッファ	100 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50 mM MHEPES, pH 7.0	50 mM Tris-HCl, pH 7.5	50 mM Tris-HNO <sub>3</sub> 0.1% SDS, pH 7.4
攪拌条件	25 °C, 2時間	4 °C, 10時間	4 °C, 18時間
遠心条件	4 °C, 20000 G, 20min	4 °C, 20000 G, 60min	4 °C, 10000 G, 10min
Cd抽出率	22.5 %	18.4%	43.5%

図6にCd米抽出液のHPLC-ICP/MSクロマトグラムを示した。RT 6 minにUV280 nmとCd両方のシャープなピークが得られた。またRT 8-9 minにおいてもCd濃度のピークが検出されたが、こちらは280 nmのピークとは多少ずれていた。RT 10.5 minにもCdのピークが得られたが、この時点では280 nmの吸光が全般的に高くなっていた。

以上の結果から、コメ中でCdは複数の化学形態をとっていることが示唆された。

(4) マウス体内のCd分布

無機CdおよびCd-GSH錯体

2 体重、摂餌量、臓器重量

飼育期間を通じて、肉眼的な変化や行動異常はいずれの群でも認められなかった。体重の増加抑制は認められず、CdSO<sub>4</sub>-3群とCd comple 0.05群は、投与2週目以降はCont群より体重が増加する傾向があった。摂餌量は、

正確に把握は出来ないが、飼育期間を通して4~5g/day/mouseであった。肝臓および腎臓重量は、Cd投与による変化は認められなかった。

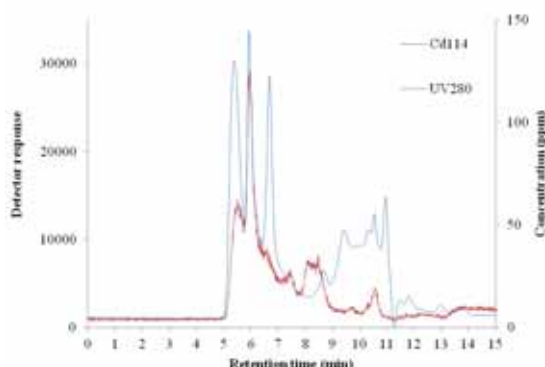


図6 Cd米抽出液のHPLC-ICP/MS分析

Cd含有餌摂食により肝臓および腎臓のCd濃度はCont群と比較して増加した(図7)。Cd濃度は、0.05 mg/kg群<3 mg/kg群、1w群<4w群、肝臓<腎臓であり、CdSO<sub>4</sub>とCd complexの差は認められなかった。なお、図中の\*は対応する対照群と比較した場合の有意差を示しており、CdSO<sub>4</sub>-0.05の1w摂食群を除き、全群で有意に増加した。

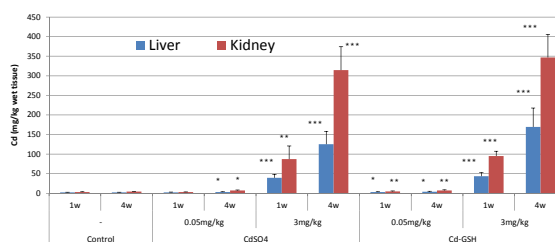


図7 無機CdあるいはCd-GSH錯体を食餌として与えたときのマウス肝ならびに腎のCd含量

Cd含有米

飼育期間を通じて、肉眼的な変化や行動異常はいずれの群でも認められなかった。体重の増加抑制は認められなかった。摂餌量は、正確に把握は出来ないが、飼育期間を通して4g/day/mouseであった。肝臓および腎臓重量は、Cd投与による変化は認められなかった。

3 臓器内Cd濃度

表2に各群のマウス肝臓中Cd濃度を示した。Cd米群はCont米群に比較し、肝臓中Cd濃度が著しく増加した。一方、Cont米に同程度のCdを添加したCont米を摂食したCont米+ CdNO<sub>3</sub>群とCont米+ Cd+ Zn+ Cu群ではCont米群に比較し、肝臓中Cd濃度が著しく



増加したが、Cd米群に比して低く1/2以下である。CdSO4群のCd濃度はCd米群の6割程度であった。Contに切り替えると濃度は半減した。

表2 肝臓内Cd濃度  
(臓器kg湿重量あたりのCd mg)

	Cont米 0.077mg/kg 4w	Cd米 1.5mg/kg 4w	Cont米 +CdNO3 1.5mg/kg 4w	Cont米 +Cd+Zn+Cu 1.5mg/kg 4w	CdSO4 1.5mg/kg 4w	CdSO4 →Cont 1.5mg/kg 4w+4w
1	4.33	276.62	77.94	35.75	62.52	30.66
2	4.35	145.14	60.76	84.97	128.88	41.80
3	3.80	99.10	91.31	64.80	131.54	45.03
4	2.25	143.24	48.07	67.19	74.25	60.38
5	4.05	252.43	62.22	74.38	106.85	92.32
6	2.68	177.66	86.28	42.62	93.20	45.16
Mean	<b>3.58</b>	<b>168.40</b>	<b>71.10</b>	<b>61.62</b>	<b>99.54</b>	<b>52.56</b>
S.D.	0.90	72.86	16.74	18.87	28.24	21.67
R.S.D.	25.03	43.26	23.55	30.62	28.37	41.24

表3に腎臓中Cd濃度を示した。肝臓と同様に、腎臓中Cd濃度はCd米群が最もCd濃度が高く、同程度のCdを添加したCont米 + CdNO<sub>3</sub>群とCont米 + Cd + Zn + Cu群は約1/2、CdSO4群は73%であった。腎臓Cd濃度はContに切り替えて4週間経過しても2割程度しか減少しなかった。

表3 腎臓内Cd濃度  
(臓器kg湿重量あたりのCd mg)

	Cont米 0.077mg/kg 4w	Cd米 1.5mg/kg 4w	Cont米 +CdNO3 1.5mg/kg 4w	Cont米 +Cd+Zn+Cu 1.5mg/kg 4w	CdSO4 1.5mg/kg 4w	CdSO4 →Cont 1.5mg/kg 4w+4w
1	4.76	288.86	153.54	125.48	101.96	79.91
2	18.59	243.39	105.16	182.66	301.21	193.17
3	4.78	290.40	84.77	120.11	139.02	187.67
4	3.59	187.10	189.23	143.07	162.90	209.42
5	4.01	335.65	73.75	135.18	202.83	200.26
6	7.61	303.72	154.38	111.25	254.85	154.67
Mean	<b>7.23</b>	<b>265.14</b>	<b>126.80</b>	<b>136.29</b>	<b>193.79</b>	<b>170.85</b>
S.D.	5.74	54.19	45.65	25.31	74.48	48.30
R.S.D.	79.49	20.44	36.00	18.57	38.43	28.27

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計2件)

陳嘉上、井村祐己、小川進也、吉村悦郎、HPLCポストカラム法を利用したカドミウムキレーターの高感度分析システムの開発とウマ血漿中グルタチオン分析への適用、分析化学討論会、2012年5月19日

松川岳久、篠原厚子、松永俊朗、千葉百子、横山和仁、吉村悦郎、食餌中Cdの化学形態とCdの体内分布 マウスを用いた検討、微

量元素学会、2011年7月1日

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉村悦郎 (Yoshimura Etsuro)  
東京大学・農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：10130303

### (2) 研究分担者

篠原厚子 (Shinohara Atsuko)  
清泉女子大・付置研究所・教授  
研究者番号：90157850

松川岳久 (Matsukawa Takehisa)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号：60453586

松永俊朗 (Matsunaga Toshiro)  
農業食品産業技術研究機構・中央農研センター・チーム長  
研究者番号：20355647

深見元宏 (Fukami Motohiro)  
宇都宮大学・農学部・教授  
研究者番号：50114624

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：