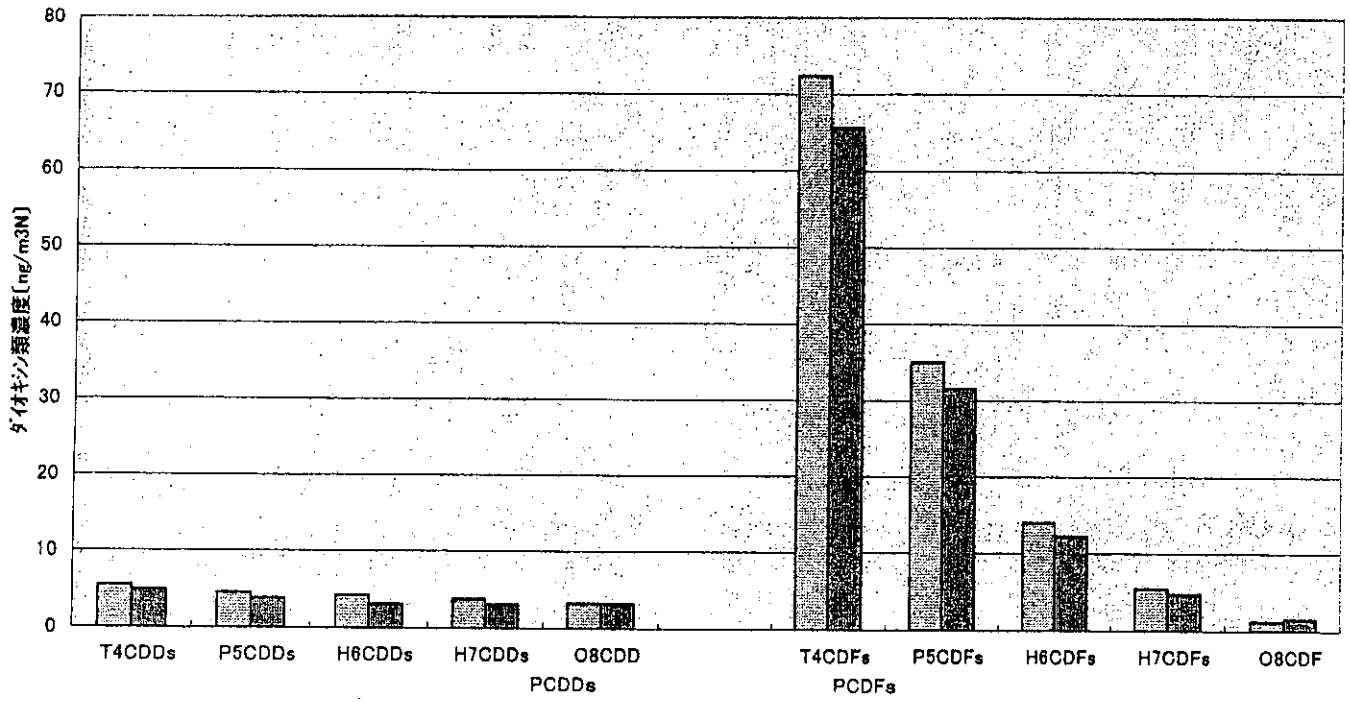


測定結果-5と6の比較

□測定結果-5 ■測定結果-6



測定結果-5と6の比較

□測定結果-5 ■測定結果-6

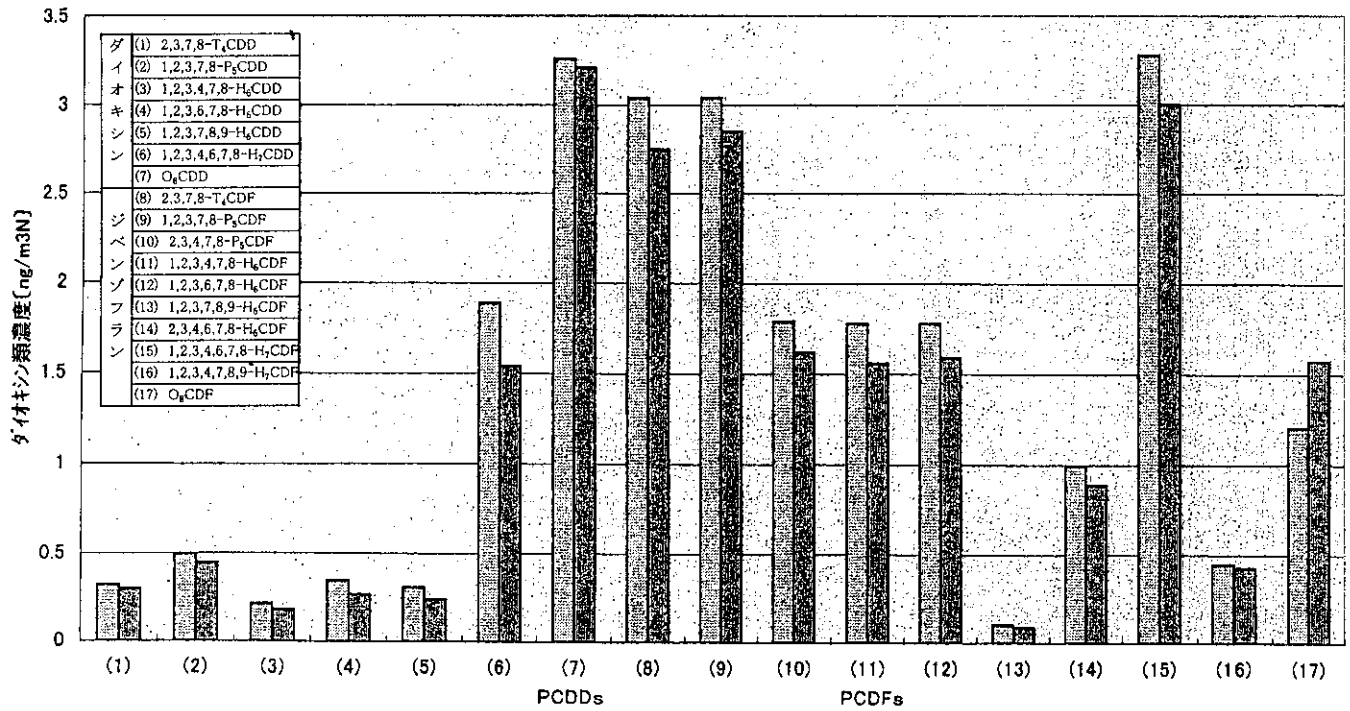


図5-10 排ガス中ダイオキシン類分析結果
同所同時サンプリング (HCl処理有,無)

第6章 イムノアッセイ法の検討

6-1 はじめに

コプラナPCBを含むダイオキシン類については、従来から指摘されていた発がん性等の有害性に加えて外因性内分泌攪乱物質（いわゆる環境ホルモン）としても注目されている。しかし公定法に規定されている高分解能ガスクロマトグラフ・質量分析法は、① 分析に高価で特殊な機器が必要である。② 分析技術者の教育・訓練が必要である。③ 前処理等が煩雑で結果を得るまで時間がかかる。（約1カ月）④ 分析のコストが高い。等の問題点が指摘されている。

近年、分析法として、測定対象物質（抗原）を特異的に認識する抗体を用いた酵素免疫法（Enzyme-Linked immune-sorbent assay : ELISA法、EIA法）が開発され汎用されるようになった。従来は、医学、食品、農薬分野での応用が主であったが、最近では環境分野においても、EIA法が活用されるようになってきた。一例をあげると本年度より開始された外因性内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）の一斉調査においても、女性ホルモンの1種である17βエストラジオールの測定方法として酵素免疫法がガスクロマトグラフ・質量分析法（GC/MS法）と並んで採用されている。

このEIA法を環境分析の分野で有効に活用するには、次の条件を満たしていることが必要である。① 抗原-抗体反応を利用しているため、その特異性が高く、環境試料のように夾雑物の多い試料では、前処理法の簡易化の可能性など適している。② 分析装置などは、極めて小規模な吸光度計や蛍光光度計で十分であり、いわゆるオンサイトで、短時間、簡便に結果を得ることができる。③ 日本の現状では、上記の17βエストラジオールのみが化学物質のEIA法による定量法が公定法として採用されているだけであるが、米国の環境保護庁（EPA）では、以前からEIA法が、公定法として採用されていてその有用性の評価がされている。

我が国では、ダイオキシン類（ダイオキシン、ジベンゾフラン）、PCBについてもガスクロマトグラフィー質量分析（GC/MS）法による機器分析法が厚生省、環境庁のマニュアルにおいて採用されているが、上記の特徴を持つEIA法による定量法が、機器分析法を行う試料選定のための1次スクリーニングや、オンサイト分析等の測定目的により、期待されている。

6-2 酵素免疫測定法の概要

1. 測定原理

免疫測定法、いわゆるイムノアッセイ法とは、抗原抗体反応の高い特異性と検出感度を利用して、抗原または抗体を同定、定量する方法である。このうち酵素を標識として利用したものが、酵素免疫測定法（Enzymeimmunoassay:EIA）であり、ほかに、蛍光物質を標識とした蛍光イムノアッセイや放射性同位元素を標識とするラジオイムノアッセイ（Radioimmunoassay:RIA）があるが、後者は特に高感度である反面、放射性同位元素を用いるための一定の資格者と認可された施設がなければならないという欠点を有する。1)

一方、EIAは、簡単な分光光度計があれば、実施できるという利点に加え、近年の技術開発

の進歩によってRIAに匹敵する感度が得られるようになったことから、さらに多様な化学物質の分析への応用が試みられている。1),2)

なお、酵素免疫法をさらに高感度化する目的で、酵素反応により基質を発色させ吸光度を測定するのではなく酵素反応による蛍光発光を測定することによる方法が高感度化の点から注目を集めている。本年度の報告では特に標識酵素としてルシフェラーゼを利用した文献例を検索したので、それらを6-3にまとめた。

参考文献

- 1) 深井文雄 第13回環境化学研究会講演会予稿集, pp.1-6 (1994)
- 2) Schwalbe-Fehl, M. Int.J. Environ. Anal. Chem., Vol.26, No.3/4, pp.295-304 (1986)

2. 測定系開発までの流れ

1) PCB検出システムELISA系の開発

PCBの測定法としては、ガスクロマトグラフ・質量分析法等が環境庁告示の方法として示されている。またダイオキシン類の測定と同様に特に有害性の高いコプラナPCBについては、厚生省、環境庁のマニュアルで高分解能GC/MSが規定されている。しかし、この方法は、環境メディア（水質、土壌等）中、化学処理油中のPCBの測定をオンサイト（現場）で行うには装置等の点から問題点があり、簡便で迅速なPCBの定量法の開発が期待されている。

そこで、ELISAに着目し、PCBのELISA法による定量法の開発及び評価を行うこととした。開発目標として毒性の点からコプラナPCBをppbオーダーで検出できるELISA系確立を目指し、それに加えて、オンサイトでの簡易定量法のために、前処理の簡易化も検討することにした。

2) モノクローナル抗体によるELISA法開発の経緯

(1) モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の比較

ELISA法に使用する抗体は大別すると①ポリクローナル抗体と②モノクローナル抗体になるが、分析系としての一定の品質の抗体の安定的な供給の必要性またPCBの異性体を個別に定量する選択性を重視して、モノクローナル抗体を使用するELISAシステムの開発を行うこととした。

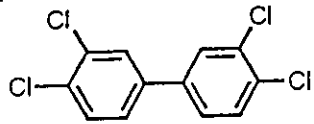
(2) ELISA法による測定対象物質の選択

既に市販のキットがある3塩化物以上のPCBについてはELISA法開発の意義が少ないため、ヒトに対して毒性の高いコプラナPCBを測定できるELISA系開発することとした。

(3) 測定対象のコプラナPCBの選択

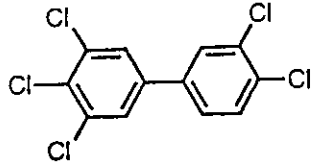
毒性（TEF値）等を参考にして、#77, #126, #169の3種類を選択した。それらの構造式を図6-1に示す。

PCB-#77



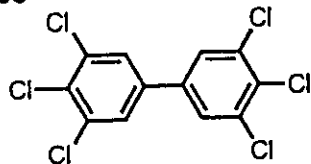
3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl

PCB-#126



3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl

PCB-#169



3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl

図6-1 コプラナPCBのうち抗体開発に選択した3種類の化合物の構造

(4) (3)で示した化合物のように低分子の化合物は、単独で動物（この場合は、マウス）に免疫しても、抗体を産生させることができないため、適当な高分子物質と結合させて、マウスに投与する。抗体価の上昇が確認されたら、マウス脾臓から抗体産生細胞を単離し、腫瘍細胞と融合させる。

(5) 融合細胞を培養し、個別にその培養上清液中に含まれる抗体についてその抗体価と特異性を測定する。

(6) 特異性で免疫した抗原に対して特異性の高い抗体を産生する細胞（モノクローン）を選択する。

(7) この細胞の培養上清をアフィニティカラムで精製し、精製した抗体により、PCBを測定系における検出限界、定量範囲等の検討を行う。

(8) この抗体を使用して実試料（環境試料）において、回収率、妨害物質の影響、抽出法など前処理法の検討、機器分析法との相関性を求める。

6-3 酵素免疫法の高感度化への試み

1) 酵素免疫法の特徴

免疫測定法では、測定対象とする環境化学物質に対する抗体を作製し、その抗原-抗体

複合体をなんらかの手段で検出し環境試料中に存在する化学物質を定量する。

微量物質を免疫測定法で検出するために放射性化学物質を使用したラジオイムノアッセイと抗体に酵素を標識したエンザイムイムノアッセイが汎用されている。

エンザイムイムノアッセイの特徴を特にラジオイムノアッセイと比較すると一般的に以下のとおりである。

(1) 高感度：酵素分子は微量でも酵素活性を検出できるため感度が高く、多くの酵素は、1分子で1分間あたり10⁵分子あるいはそれ以上の反応を起こすといわれている。このような酵素の増幅作用のため感度が高くラジオイムノアッセイに匹敵するほどの高感度が可能である。

(2) 測定機器の普及度：酵素活性の測定は恒温槽、分光光度計など広く普及している機器があればできる。なお後述するエンザイムイムノアッセイによる蛍光法では、蛍光光度計が必要である。一方、ラジオイムノアッセイでは放射性物質を扱える設備、施設は放射線障害防止法の適用を受けることから、施設、設備等のハード的な問題及び有資格者の配置等ソフト的な問題もあり、どこでも行えるわけではない。ただし、酵素分子数と酵素活性はさまざまな条件により妨害をうけることがあることから、常に比例するとは限らず、測定値の信頼性はラジオイムノアッセイが高い。

(3) ラジオイムノアッセイでは標識化学物質の抗体結合型(bound型、B型)と非結合型(free型、F型)との分離が必須であるが、エンザイムイムノアッセイでは、後に述べるように、B型とF型の酵素活性に著しい差異がある場合は、BF分離の操作が不必要となる可能性がある。抗体の酵素標識に使用する酵素としては、大腸菌由来の β -D-galactosidase、細菌由来のglucose-6-phosphate dehydrogenase、西洋わさび(horseradish)由来のperoxidaseなどがある。選択される酵素の条件としては、安定で失活しないこと、酵素活性の測定が容易なこと、安価に大量に入手できること等が挙げられる。

エンザイムイムノアッセイが可能のためには、酵素と対象化学物質との結合物は、標識された化学物質も抗体と結合する。すなわち、抗原性を失わない。標識後も酵素は酵素反応を起こす。すなわち、酵素活性を失わないものでなければならない。標識時にはこれらのことをまず確認する。化学物質結合酵素自体のF型の酵素活性と、抗測定対象化学物質抗体と反応後のB型での酵素活性が著しく異なっていた場合は、上記(3)に示したB型とF型の分離を必要としない均一系エンザイムイムノアッセイが可能である。エンザイムイムノアッセイ系のシステム対象測定物質が高分子物質であればサンドイッチ式のエンザイムイムノアッセイ法が可能であるが、環境化学物質では測定対象化学物質が低分子であるのでこの方式は使えない。サンドイッチ式では抗原を抗体と標識抗体ではさむ形になるので、抗原は、2箇所以上の抗体との結合部位を持っていないと行かない。環境中の測定対象化学物質は一般に分子量が数百程度の1価抗原であり、サンドイッチ方式ではアッセイできない。

環境化学物質については通常、競合法でエンザイムイムノアッセイを行い、先に述べた放射能を利用するラジオイムノアッセイのほか酵素を利用した発色反応が汎用されるが、酵素を利

用した蛍光発光法がその感度の点から注目されている。

エンザイムイムノアッセイ法の酵素反応の検出を発色反応から蛍光反応にすると一般的に感度が100倍に増加し、RIAに匹敵する定量下限が得られるようになる。それらの詳細について文献検索を行ったのでそれらを2)にまとめる。

2) ルシフェラーゼを用いたEIAの高感度化に関する文献調査

(1) 目的

ダイオキシン、PCBなどの環境負荷化学物質による環境汚染問題が社会的関心を集めている。通常、工業製品、環境、食品、畜水産物、生体などの試料中の化学物質を測定するにはGC, HPLC, GC/MS, LC/MSなどの分析機器が用いられている。これらの分析機器は微量測定が可能であるが、高価な機器設備が必要であり、前処理作業が繁雑で分析に日数がかかるため経費が高くなるという問題がある。

このため、高感度でかつ迅速、低コストの分析手法の開発が求められ、免疫化学測定法が注目されている。その中で主流となっている酵素免疫測定法（EIA, ELISA）は臨床検査の分野や、残留農薬の測定に応用されている。ダイオキシン分析においても検査キットが市販されており、機器分析に比べ測定の正確さではやや劣るが、サンプル中のダイオキシンの有無の判定に活用し、検査の効率化やコスト削減に利用できると考えられる。

現在市販されているEIAキットの測定系では、用いる酵素の反応が発色反応であり比色定量による検出を行っているが、蛍光反応を用いた場合、放射性ラベルを使用したRIAに匹敵する高感度の検出が可能になると期待される。蛍光酵素としてホタルや海中微生物由来のルシフェラーゼが以前から注目されてきたが、EIAへの応用は酵素の性質上困難な点が多く成功している報告はわずかである。そのため、ルシフェラーゼを利用した高感度EIAの開発は分析技術の拡大に貢献できると思われる。

本調査では、ルシフェラーゼをEIAに使用した研究に関する文献について調査を行った。

(2) 調査方法

文献情報データベースとしてMEDLINEを用い、key word を“luciferase”として1965-1997年までの文献を検索した。

検索結果から、ルシフェラーゼの構造、性質、酵素反応機構、固定化、酵素標識に関する文献を選択した。

ただし1988年以降は分子生物学分野でのルシフェラーゼの応用が急激に増加していたため、さらにTitle word に“luciferase”を含む文献を絞り込みその中から有用と思われるものを選択した。

(3) 調査結果

入手した文献の一覧表を別紙表1に示す。

主に1980年代にルシフェラーゼを化学的に抗原に標識したEIAの報告が見られ、1990年代では遺伝子工学的手法で融合タンパク（ルシフェラーゼ/プロテインA or G、ルシフェラーゼ/ビオチンカルボキシキャリアタンパク）を作成し、抗体の特定部分と特異的に結合させる方法が増加している。このように、近年標識化の技術が向上しつつあり、ルシフェラーゼを利用することも容易になっている。今後、EIA法の高感度化を図るためにルシフェラーゼの応用は十分に価値があると思われる。

3) Biochem. Biophys. Res. Commun., 96, (1), 440-446 (1980)

4) Anal. Biochem., 122, 385-393 (1982)

5) Anal. Biochem., 149, 309-315 (1985)

6) Anal. Biochem., 175, 14-21 (1988)

7) Anal. Biochem., 208, 300-305 (1993)

8) Anal. Biochem., 243, 176-180 (1996)

3) 国内外における免疫測定法の適用状況

免疫測定法は、臨床分野及び食品分野において、臨床検査や残留農薬の検出に国内外で従来から利用されているが、環境分野への適用は近年になってからのことである。

米国EPAにおける酵素免疫法の採用状況については、昨年度の報告で、概要を記載した。

我が国における環境分野への酵素免疫法の適用は、平成10年度において外因性内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）の一斉モニタリングの測定方法として、17βエストラジオール（女性ホルモンの一種）の測定法としてGC/MS法と並んで採用されている。

なお、この酵素免疫法は臨床検査用として市販されている17βエストラジオール測定用キットを環境試料用に使用しているものである。

4) 廃棄物試料への適用上の課題（文献レビュー）

(1) 基本的な応答特性

EIAは、極めて特異的な抗原抗体反応に基づいているため、通常分析法で必須の煩雑な前処理操作が不要という特徴があるが、環境中の化学物質を対象とする場合、試料液を中性付近の水溶液、もしくは適用可能なレベルの親水性溶媒にしなければならず、疎水性の有機溶媒等で抽出されたものについては、適当な前処理等が必要となる。1)

また、実際の試料中には、抗原抗体反応に干渉する物質が混入している場合があり、特に正の干渉を引き起こす物質との反応は、交差反応と呼ばれている。

大迫らは、EIAの基本特性として、応答の濃度依存性、複合系における応答特性及び温度、pH、共存塩類などの外部条件の影響に関する実験的検討を行い、次のような結果を得ている。まず、応答の濃度依存性と抗原抗体反応の動力学式がMichaelis-Menten式でほぼ表せることを示し、複

合系における応答特性も、これを拡張して、(I)式を導き、これから得られる理論曲線と実測値が良く一致したことを報告している。9) 10)。

$$\alpha = \sum K_i C_i / (1 + \sum K_i C_i) \quad (\alpha = (OD_n - OD) / OD_n) \cdots (I)$$

α ; 吸光度変化率

K ; 抗体の感度あるいは交差反応性を示す指標

OD_n ; ネガティブコントロールの吸光度

また、EIAは、pH4~10、温度20~40℃、及び数%の塩類の濃度までは大きな影響を受けず、実際の外部環境条件下での測定を想定した場合、オンサイトで使用できる可能性が高いとしている。

参考文献

- 9) 大迫政浩ほか 第6回廃棄物学会研究発表回講演論文集、pp. 726-728 (1995)
- 10) 田中勝ほか 最終処分場のリスク管理のための監視及び修復技術の総合化に関する研究、p.5-6 (1995)

(2) 各種影響因子

上述のように、外部環境条件を想定した程度のpH、温度、数%の塩類濃度については、EIAにとって影響因子とはなりにくいことが分かるが、環境試料からの目的化学物質の抽出溶媒、その抽出物に含まれる目的化学物質の類似構造物質による交差反応が、EIAにとって特に重要な因子となることが考えられる。これらの詳細については、個々の物質に対するEIAについて検討する必要がある。

6-4 前処理の簡易化に関する検討

1) 抽出方法の簡易化

(1) はじめに

ダイオキシン類のEIAでは、農薬などその他の化学物質に対するEIAとは異なり、試料の抽出あるいは精製操作と、標準物質の取り扱い等の点から、現場での適用は考えられていない。そのため、現在のところ、試料の抽出あるいはそれを精製するには、精密分析と同等の操作及び時間を要している。しかし、ダイオキシン類EIAをスクリーニング法として用いるには、現場においての適用を将来的に検討する場合も含め、その迅速簡易な検出法という特徴にかなった抽出法の迅速簡易化を図る必要がある。ダイオキシン類の抽出における迅速化の方法としては、超音波抽出 (UE) 11)、12) や、超臨界流体抽出13-18)、マイクロ波による抽出 (MWE) 19)、20)、高速溶媒抽出 (ASE) 21-24) などがあり、ほかにも超臨界支援抽出 (SALE) 25) や亜臨界水による抽出26) がある。特に、ASEに関しては、PAHsを含む半揮発性物質、有機リン系殺虫剤、有機塩素系殺虫剤、塩素化除草剤、PCBsについて、米国EPAの定める土壌からの抽出法METHOD 3445として承認されている27)。いずれもソックスレー抽出と比較し、良好な結果が得られている。

ここでは、抽出方法の簡略化の一手法としてASEに着目し、EIAとの組み合わせ、という観点からの検討を行った。すなわち、ASE法による抽出とEIAによる測定というASE-EIAスクリーニング技術の確立を目的として、土壌および廃棄物試料からASE法によりダイオキシン類を抽出し、GC/MS分析により、ソックスレー法との比較を行った。

(2) 実験的検討

ASEはDIONEX ASE-200 (DIONEX社) で、抽出セルは、33mlを用いた。ASE法とソックスレー法の比較を、土壌3試料、湖の底質リファレンス値を有する標準試料DX-1 (Environmental Canada National Water Research Institute) 1試料および飛灰6試料を用い、GC/MS分析結果に基づいて行った。ASE法は基本的に高菅らの条件2)に基づいて検討した(表6-1)。まず、条件I(抽出溶媒;アセトン(残留農薬試験用)、温度 150℃、圧力 2000 psi、static;5分間×2回)では、土壌(表6-2)と標準試料(表6-3)については良好な結果が得られた。抽出効率でも各同族体・異性体の抽出パターンもほとんど同じであり、土壌および標準試料について本条件でソックスレーに匹敵する抽出が可能であることが確認できた。これは、高菅らの検討結果2)と一致していた。また、抽出パターンが同じということは、交差反応が応答の意味を左右するEIAへの適用を考慮するうえで重要であり、ASEによる抽出液はEIAへの適用が可能と考えられた。一方、飛灰については、アセトンでは、ほとんど抽出されないことがわかり、条件II(抽出溶媒;トルエン、温度 150℃、圧力 2000 psi、static;15分間×2回)で、抽出前に塩酸処理を行った場合と行わない場合について検討を行った。結果を図6-2に示した。これらは、ASE、ソックスレーともに1回のみの実験で、繰り返しを行っていないため、再現性についての議論はできないが、トルエン溶媒の方がASEによる抽出効率が良いことがわかり、飛灰については、トルエン溶媒を基本として検討を進めている。

また、それらASE抽出した試料についてEIA測定を行い、ソックスレー抽出によるGC/MS分析値と比較し、ASE-EIAダイオキシン類スクリーニング技術としての検討を行った。詳細は、5で述べる。

表6-1 ASE抽出条件

	ASE 抽出条件 I	ASE 抽出条件 II
Sample Size	約15g	約10~20g
Solvent	Acetone	Toluene
Temperature	150℃	180℃
Pressure	2000psi	2000psi
Time	5min static × 2cycle	15min static × 2cycle

表6-2 土壤試料からのASEによるダイオキシン類抽出のGC/MS測定結果(pg-TEQ/g)

試料	R			S			T		
	Soxhlet (n=1)	ASE avg. (n=3)	cv(%)	Soxhlet (n=1)	ASE avg. (n=3)	cv(%)	Soxhlet (n=1)	ASE avg. (n=3)	cv(%)
2378T ₄ CDD	5.2	3.7	11.8	0	0		0	0.61	4.3
12378P ₅ CDD	12	9.6	5.7	0.95	1.2	8.3	1.8	1.7	3.3
123478H ₆ CDD	2.5	2.0	5.0	0	4.3E-02	173.2	0.47	0.49	8.4
123678H ₆ CDD	3.2	3.2	7.9	0	0.24	18.2	0.81	0.78	13.7
123789H ₆ CDD	3.2	2.7	6.4	0.21	0.34	8.6	0.82	0.73	11.7
1234678H ₇ CDD	2.1	2.1	7.4	0.1	0.15	13.3	0.72	0.73	6.3
O ₈ CDD	0.34	0.31	9.2	0.21	0.27	3.7	0.35	0.43	8.2
Total PCDDs	29	24	6.5	1.5	2.2	12	5.0	5.5	7.3
2378T ₄ CDF	2.8	2.3	10.8	0.088	0.11	13.8	0.25	0.27	4.2
12378P ₅ CDF	1.6	1.4	7.1	0.057	0.075	30.1	0.22	0.23	2.5
23478P ₅ CDF	23	21	10.1	0.53	0.69	40.2	3.8	3.3	8.8
123478H ₆ CDF	4.6	4.7	6.5	0	0.17	35.8	0.91	0.90	5.6
123678H ₆ CDF	5.1	4.7	7.4	0	0.27	34.6	0.99	1.0	6.3
123789H ₆ CDF	0.37	0.30	3.9	0	0		0	0	
234678H ₆ CDF	7.9	7.9	6.0	0.31	0.40	30.3	1.9	1.7	3.5
1234678H ₇ CDF	1.9	2.0	7.5	0.084	0.11	24.6	0.45	0.48	5.5
1234789H ₇ CDF	0.2	0.19	5.3	0	1.5E-02	31.5	0.073	7.6E-02	3.3
O ₈ CDF	0.082	7.3E-02	6.9	0.0075	8.9E-03	10.9	0.033	0.036	4.8
Total PCDFs	48	44	8.2	1.1	1.9	34.4	8.6	8.0	5.1
PCDDs+PCDFs	77	68	8.2	2.5	4.1	22.3	14	13	4.3

表 6 - 3 標準試料のGC/MS測定結果(pg/g)

	DX-1		
	reference value	ASE	
		実測濃度	TEQ
2378T ₄ CDD	263±53	270	270
Total T ₄ CDD	416±121	470	
12378P ₅ CDD	22±8	25	12
Total T ₅ CDD	226±143	340	
123478H ₆ CDD	23±7	27	2.7
123678H ₆ CDD	77±27	88	8.8
123789H ₆ CDD	53±24	49	4.9
Total T ₆ CDD	669±185	790	
1234678H ₇ CDD	634±182	850	8.5
Total T ₇ CDD	1251±361	1600	
O ₈ CDD	3932±933	5500	5.5
Total PCDDs	6490±1309	8700	310
2378T ₄ CDF	89±44	39	3.9
Total T ₄ CDF	659±259	690	
12378P ₅ CDF	39±14	40	2
23478P ₅ CDF	62±32	56	28
Total T ₅ CDF	790±489	920	
123478H ₆ CDF	714±276	1800	180
123678H ₆ CDF	116±37	130	13
123789H ₆ CDF	28±42	<7	0
234678H ₆ CDF	57±36	71	7.1
Total T ₆ CDF	1800±809	1900	
1234678H ₇ CDF	2397±796	2800	28
1234789H ₇ CDF	137±62	160	1.6
Total T ₇ CDF	3576±1165	3700	
O ₈ CDF	7122±2406	7000	7
Total PCDFs	13676±3777	14000	270
PCDDs+PCDFs	20042±4706	23000	580

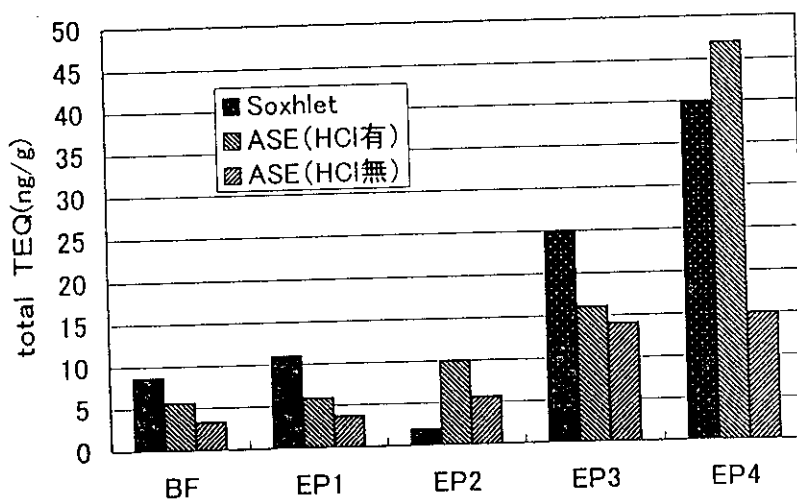


図 6 - 2 トルエンによるASE抽出結果

2) 抽出試料の精製方法の簡易化

EIAでは、試料を精製した方が精度が上がるのが分かっており、(詳細は6-5)、ソックスレーあるいはASE等により抽出された粗抽出試料を精製する方法についても、簡易化を図る必要がある。現在のところ、旧マニュアル29)で示されている方法で、粗抽出から一段階精製した試料、すなわち硫酸処理を行った試料についてのEIA測定値は、GC/MS分析によるTEQ値とほぼ同オーダーの値が得られることが分かっており、硫酸処理の簡易化について、今後検討していきたい。

3) おわりに

スクリーニングを目的とする場合には、必ずしもソックスレー抽出と同等の回収率は、必要ではないが、操作の迅速簡略化、妥当な回収率と再現性、オンサイトでの分析可能性などの点から、目的に応じた抽出方法の検討が必要である。

また、前処理としては、抽出液の精製にどの程度の操作が必要になるかが問題となり、様々な共存物質が応答にどの程度の影響を与えるかを明確にした上で、適切な精製操作を行う必要がある。簡易化の観点からは、粗抽出液をそのままEIAの測定に供することが望まれるが、後述するように、粗抽出液に共存する色素成分が、2,3,7,8-TCDDのEIA測定に正の干渉をもたらす場合があり、その影響を除去するための最低限の精製方法についても検討しなければならない。

参考文献

- 1 1) Beard, A. et al, J.Chromatogr., Vol.589,No.1/2,pp.265-270 (1992)
- 1 2) Shushan, B. et al Chemosphere, Vol.14,No.6/7,pp.843-846 (1985)
- 1 3) van Bavel, B. et al, Organohalogen Compounds, Vol.27,pp.243-246 (1996)
- 1 4) van der Velde, E. et al, Organohalogen Compounds, Vol.27,pp.247-252 (1996)
- 1 5) Windal, I. et al, Organohalogen Compounds, Vol.27,pp.unknown (1996)
- 1 6) Lindertrom, G. et al, Organohalogen Compounds, Vol.23,pp.27-34 (1995)
- 1 7) Rerup, L.W. et al, Organohalogen Compounds, Vol.23,pp.145-149 (1995)
- 1 8) Onuska, F.I. et al HRC, Vol.16,No.7,pp.407-412 (1993)
- 1 9) Chiu, C. et al, Organohalogen Compounds, Vol.27,pp.333-338 (1996)
- 2 0) Schlabach, M. et al, Organohalogen Compounds, Vol.23,pp.105-108 (1995)
- 2 1) Richter, B.E. et al, Chemosphere, Vol.34,No.5/7,pp.975-987 (1997)
- 2 2) 高菅卓三ほか 第6回環境化学討論会講演要旨集, pp.107-108 (1997)
- 2 3) Wagenaar, H. et al, Organohalogen Compounds, Vol.27,pp.265-268 (1996)
- 2 4) Knowles, B.D. et al, Organohalogen Compounds, Vol.23,pp.13-18 (1995)
- 2 5) Friedrich, C. et al, Organohalogen Compounds, Vol.27,pp.344-347 (1996)
- 2 6) Borgen, A.R. et al, Organohalogen Compounds, Vol.27,unknown (1996)
- 2 7) EPA Method 3545 Accelerated Solvent Extraction (1995)

6-5 ダイオキシン類分析のための抗体開発及び評価に関する検討

1) 2,3,7,8-TCDDに選択特異性を持つ抗体の評価

(1) 2,3,7,8-TCDDに選択特異性を持つ抗体とそのキットについて

昨年度の段階では、2,3,7,8-TCDDに対して開発された抗体で、市販されているなど検討が可能なEIAキットは3種類あり、それらはDIOXIN RIS c TEST (キットA)、EnviroGard Dioxin Test Kit (キットB)、High Performance Dioxin/Furan Immunoassay Kit (キットC)であった。また、EIAではないが、これに新たに、時間分解蛍光免疫測定法としてHybrizyme DELFIAシリーズが市販される予定となっている。

その他、入手可能なものとして、TCDD Test Kitがあり、これらの適用可能性については、来年度の検討課題としたい。なお、キットAについては常温保存で、消費期限は製造後約1年であるが、キットB及びCでは、4~10℃保存で、製造後約半年となっている。操作性については3種のキットでは大差はないが、検量線用の標準品として、キットAでは、2,3,7-TricDDを、BとCでは、2,3,7,8-TCDDである。また、抽出溶媒をEIA用に溶媒転換する際、キットAでは、DMSOに、BとCではメタノールに再溶解することが大きな違いといえる。

検出下限値は、チューブ内の2,3,7,8-TCDD (換算) 濃度として、キットAでは、6.25ppb、キットBで1ppb、キットCで0.1ppbとなっており、検量線が直線性を示す範囲 (OD値で約0.2~0.8の間) になるよう、測定試料を希釈または濃縮するなど調整しなければならない。

(2) 廃棄物実試料を用いた実験的検討

昨年度報告したように、キットA、Bについて、EP灰や排ガスからのダイオキシン類抽出試料を用いて、干渉物質やGC/MS分析との比較などの検討を行った(28)。その結果、ダイオキシン類を高濃度含むEP灰試料については、粗抽出液と精製試料液とで有意差がみられず (図6-3)、粗抽出液での測定が可能であることが示された。しかし、GC/MS分析値との比較において、EIA値は、2,3,7,8-TCDD値に対してよりもTEQ値と相関がみられ、交差反応の影響がかなり顕著であることが示された。また、高濃度域の試料では相関係数 (r^2) が0.97 (キットA)、0.98 (キットB) という良好なものであったが、低濃度域ではEIA値が極端に高く、ダイオキシン類の存在量に依存しない正の干渉が考えられ、それは低濃度域でのみ顕在化することが考えられた。(図6-4、図6-5)

本年度は、このEIAに影響する正の干渉要素の解明のため、GC/MS分析値で0.022~13 (ng-TEQ/g) の濃度のEP灰6試料を用い、試料の精製過程の各段階、すなわち、①ソックスレーによる粗抽出→②硫酸処理→③シリカゲルカラム処理→④アルミナカラム処理の4種類の試料についてEIA測定を行い比較した。使用したキットは、上記のキットAとキットBである。

キットAでは5試料について、キットBでは、6試料について、それぞれの検出下限値 (キットA ; 2,3,7,8-TCDD換算濃度で、62.5pg/tube、キットB ; 2,3,7,8-TCDDで、100pg/tube) からの濃縮率を設定してEIA測定を行った。結果をGC/MS分析値とともに表6-4に示した。キッ

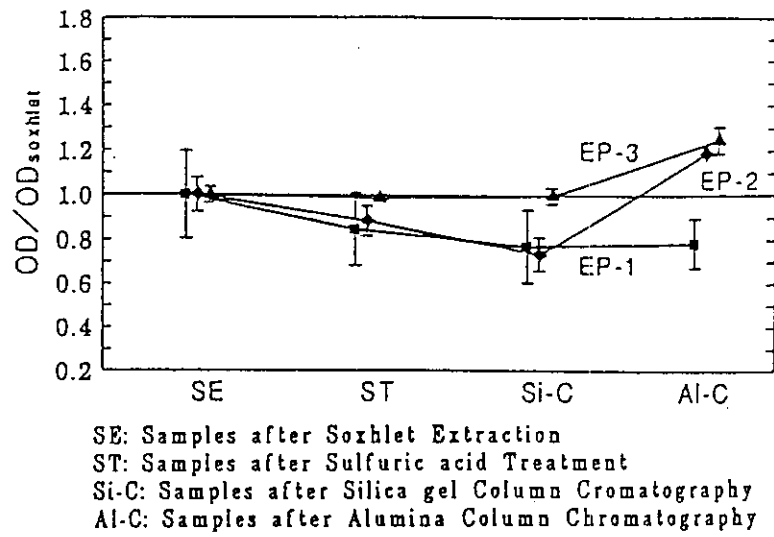


図6-3 精製各段階におけるEIA測定データの比較

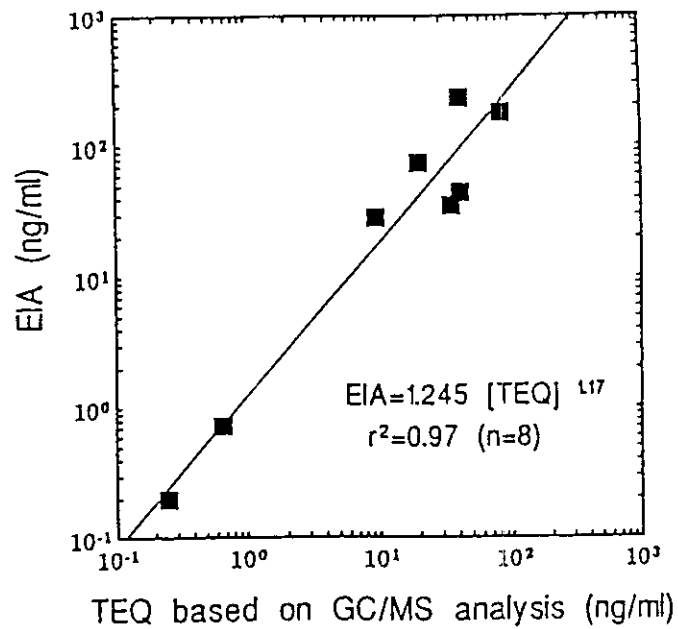


図6-4 GC/MS分析によるTEQ値とキットAのEIA測定結果

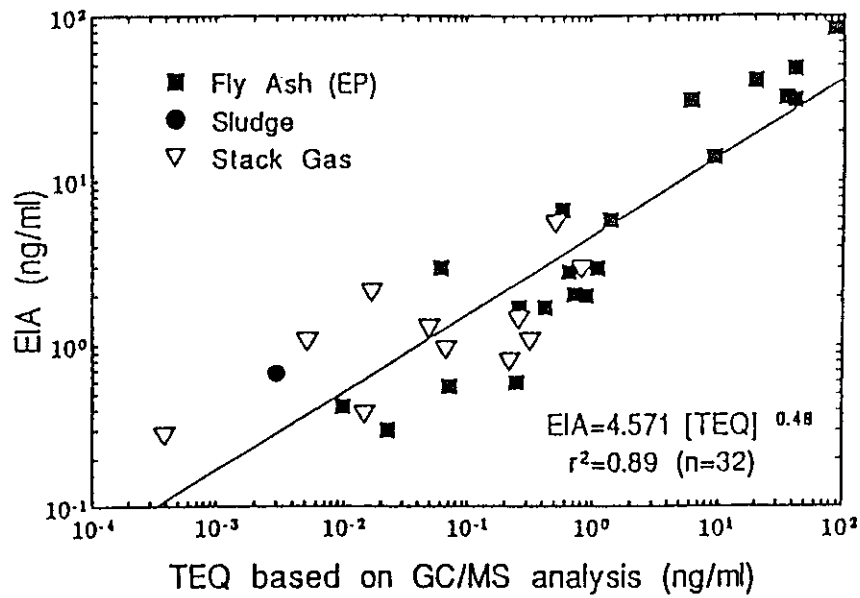


図 6-5 GC/MS分析によるTEQ値とキットBのEIA測定結果

表 6-4 精製過程の各段階のEIA測定結果

Sample	GC/MS (ng-TEQ/)	EIA(ng/g)	
		KIT A	KIT B
U-①	0.022	0.53	0.33
-②		0.57	0.20
-③		0.11	0.033
-④		0.22	0.088
V-①	0.12	8.9	1.4
-②		0.60	0.12
-③		0.60	0.17
-④		0.22	0.43
W-①	0.16	14	0.92
-②		1.0	0.068
-③		0.28	0.022
-④		0.44	0.80
X-①	0.82	untested	1.6
-②			0.19
-③			0.21
-④			2.4
Y-①	1.4	16	2.6
-②		1.9	0.34
-③		0.48	0.25
-④		1.6	2.5
Z-①	13	59	13
-②		15	1.6
-③		10	1.1
-④		13	15

①ソックスレー抽出, ②硫酸処理液
③シカゲルカラム処理液, ④アルミナカラム処理液

トAでは、粗抽出液の測定値が、高い値を示しても、1段階精製したものからは、GC/MS分析値とほぼ同オーダーの値が得られることが分かった。

粗抽出液のEIA値を1として、各段階の測定値を基準化したものを、図6-6に示したが、この結果より硫酸処理で除かれる色素成分がEIAに正の干渉をもたらす要素であることが示唆された。そして、これらの影響は、特に低濃度域で顕著になることが分かった。一方キットBでは、粗抽出液と精製試料がほぼ同じ値を示し、精製過程の途中段階では、低い値を示す結果となった。各試料は、粗抽出液と最終精製液がトルエン溶媒で、硫酸処理液とシリカゲル処理液はn-ヘキサン溶媒であることから、微量の残留溶媒が抗体に影響を及ぼしたことも考えられるが、詳細については検討が必要である。

次に、4で検討したASEによる抽出との組み合わせにおけるEIAの検討結果についてであるが、アセトンを用いた条件で、飛灰については、抽出前に2N塩酸処理して風乾させた場合と未処理の場合についてASE抽出し、その粗抽出液でEIAを行った。土壌と標準試料については、ASEによる粗抽出液とそれを硫酸処理した液とでEIA測定を行い比較した。EIA測定結果は、ソックスレー抽出によるGC/MS分析値とともに表6-5に示し、その相関を図6-7に示した。これらを見ると、ASE抽出によるEIA測定値は、ソックスレー抽出によるGC/MS分析値に比べ高い値を示した。しかもGC/MS分析によって確認した抽出効率は、土壌および標準試料については、前述のとおりであったが、飛灰については、ソックスレーよりもかなり低い効率しか得られていなかった。図6-7の相関から、スクリーニング技術としては、ASEによる抽出とEIAによる検出という組み合わせの適用は、考えられることが分かったが、EIA測定値が高くなることについての検討と、飛灰における抽出効率の向上についての検討が必要と考えられた。また、土壌と標準試料のEIA測定結果から、色素成分が、EIAにかなりの影響を及ぼしていることが分かった。これは、飛灰についてもいえることで、EIA測定値が、全体的に高い値となったことは、アセトンという溶媒によりEIAで交差反応を起こしうる低塩素化ダイオキシン類が、抽出されたことと、EIA測定の際の溶媒転換と濃縮操作を考慮し、色素成分は完全に除去する必要があることが分かった。

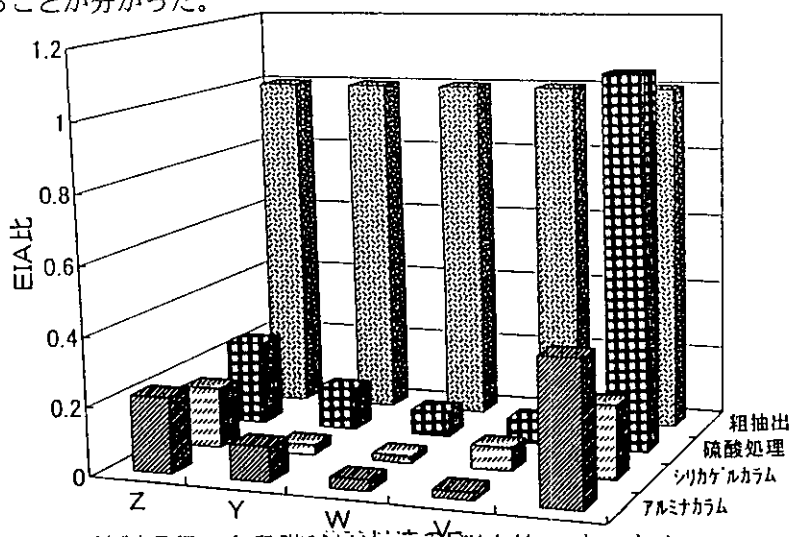


図6-6 精製過程の各段階試料液のEIA測定値 (キットA)

表6-5 ASE抽出液のEIA測定結果

No.	種類	Soxhlet GC/MS (ng-TEQ/g)	ASE		EIA 測定値 (ng/g)
			採取量 (g)	色素	
R	土壌	0.077	18.04	+++	>2.8
R-硫	土壌	0.077		-	0.43
T	土壌	0.014	20.08	+++	>2.5
T-硫	土壌	0.014		-	0.44
DX-1	底質	0.58	16.01	++++	>3.1
//-硫	底質	0.58		-	1.2
塩-L	EP灰	8.7	11.09	+	29
L	EP灰	8.7	10.03	+/-	1.3
塩-M	EP灰	0.059	11.13	++	1.1
M	EP灰	0.059	10.12	+	0.79
塩-N	EP灰	11	11.25	+	21
N	EP灰	11	10.01	+/-	58
塩-O	EP灰	1.9	11.5	+++	7.6
O	EP灰	1.9	10.02	++	2.2
塩-P	EP灰	25	11.61	+/-	37
P	EP灰	25	10.04	+/-	47
塩-Q	EP灰	40	11.28	+	60
Q	EP灰	40	10	+/-	76

色素：-：透明，+-：ほぼ透明，+：やや色素有り，
++：薄い着色，+++：着色，++++：濃い着色

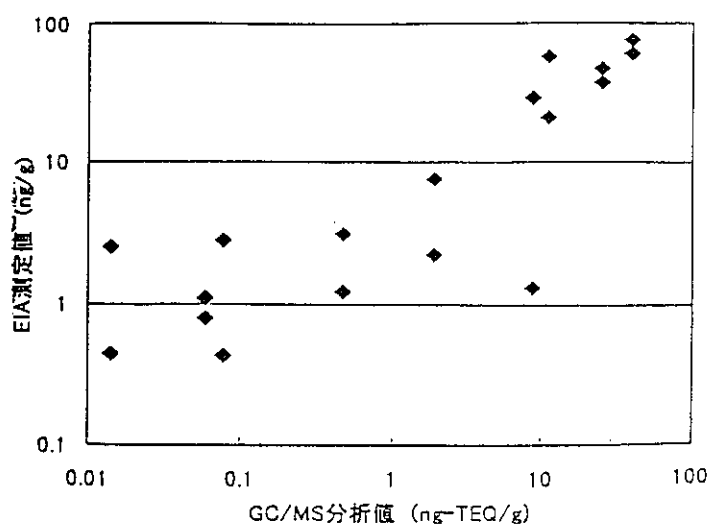


図6-7 GC/MS分析値とEIAの相関

(3) 評価

2,3,7,8-TCDDに選択的特異性をもつとされている市販キットを用いて、実際の廃棄物試料への適用可能性を検討した。その結果、粗抽出液中の色素成分の交差反応が、EIAの応答に正の干渉をもたらしており、低濃度域では、この影響が無視できないことから、粗抽出液を硫酸処理する必要性が確認された。

粗抽出液の硫酸処理後の試料液では、EIAの応答と、TEQ値はほぼ良好な対応を示し、この点では、スクリーニングの目的で適用可能と考えられるが、今後は、他の様々なマトリックスを持つ実試料に対してもデータの集積が必要である。また、EIAの迅速・簡易性を活かすための抽出および精製方法の迅速・簡略化が必要であり、スクリーニングを目的とした場合でも、現在のソックスレー抽出に比較して、妥当性のある精度と回収回収率を維持する必要がある。

最終的な適用可能性は、以上のような種々の観点から検討した上で、判断されることになる。

28) 坂井るり子ほか 廃棄物学会論文誌、Vol.8, No.7, pp311-320 (1997)

2) コプラナ - PCBに選択特異性を持つ抗体の評価

(1) 抗コプラナ PCB 抗体の評価

抗体の特異性及び測定系の検出感度を融合細胞（ハイブリドーマ）の細胞培養上清を用いて求めた。

a. 検出感度

融合細胞（ハイブリドーマ）の培養上清の抗体を使用して、それぞれに特異的な抗原（コプラナ PCB）に対する検出感度を求めた。ビオチン化 PCB を用いた競合法での検出感度は、40ppb~400ppbであった。

b. 特異性

PCB-#77 を感作した群より PCB-#77 特異的クローンが、分離できた。また PCB-#77 を感作した群より PCB-#126 特異的クローンが分離できた。なお、PCB-#126 を感作した群からは、PCB-#126 特異的クローンは分離できなかった。PCB-#169 を感作した群より、PCB-#77 と PCB-#126 に交差がみられるものの PCB-#169 に特異なクローンが分離できた。なお、いずれの抗体もビフェニル、モノクロロビフェニルとの交差性はみられなかった。なお、PCB-#169 由来クローン抗体はトリクロロビフェニルとの交差性は認められなかった。

図6-5~7にコプラナ PCB の標準曲線を示した。20%阻害を抗原濃度の検出限界値とした場合、各測定系の本条件下における検出限界値は、PCB-#77 測定系では、 $8.08 \times 10^{-8} \text{ M}$ (23.0ppbに相当、アッセイ系あたりの検出限界値：0.59ng)、PCB-#126 測定系では、 $2.10 \times 10^{-8} \text{ M}$ (6.85ppbに相当、アッセイ系あたりの検出限界値：0.17ng)、PCB-#169 測定系では、 $1.22 \times 10^{-8} \text{ M}$ (4.40ppbに相当、アッセイ系あたりの検出限界値：0.11ng)であった。

PCB を測定対象とする実試料(廃油、環境試料等)中には、測定対象とする PCB 以外の異性体が共存していると推定されるため、抗体の特異性の評価では、異性体個別の交差反応性の比較だけではなく、実試料での PCB 異性体共存下における目的 PCB の測定が求められるという状況を反映したかたちで、抗体の特異性を評価した。

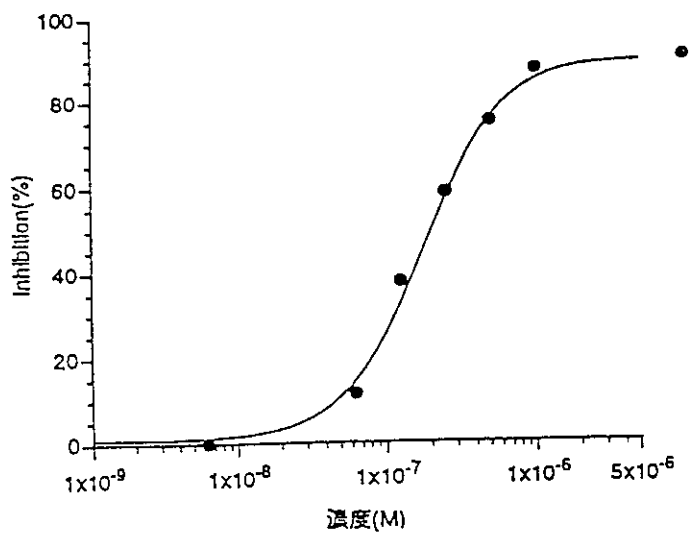


図6-8 検量線-PCB-#77の定量

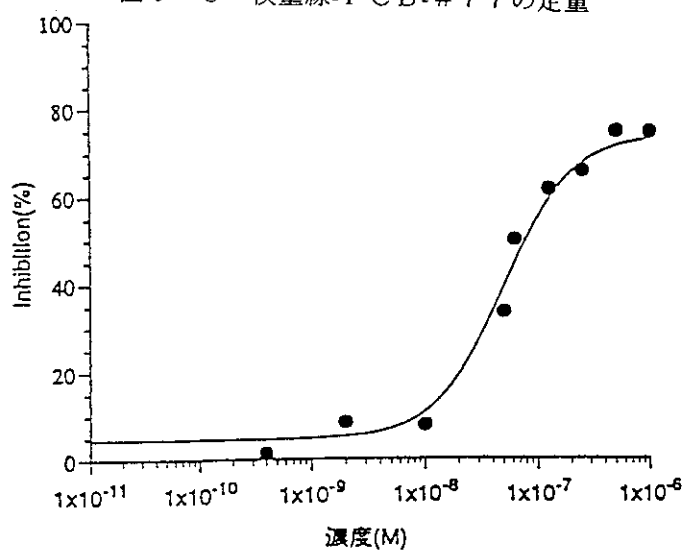


図6-9 検量線-PCB-#126の定量

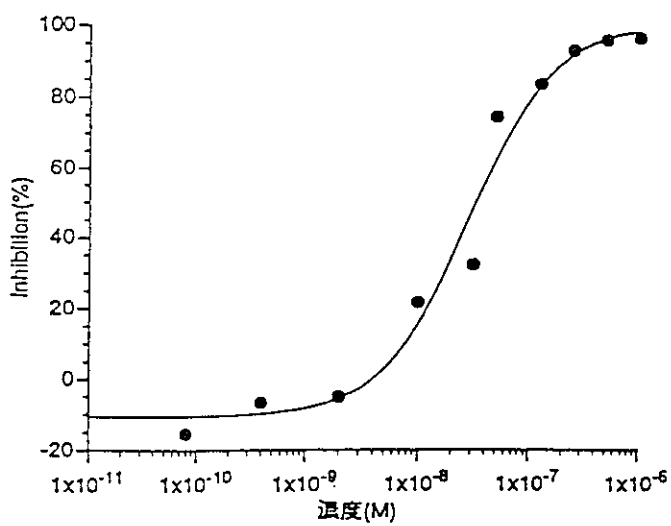


図6-10 検量線-PCB-#169の定量

c 抗PCB-#77抗体(8-5B-12B)の特異性評価

抗PCB-#77抗体(8-5B-12B)については、図6-11に示すように、交差反応性が予想されるPCB異性体の混合物との交差反応性をみた。

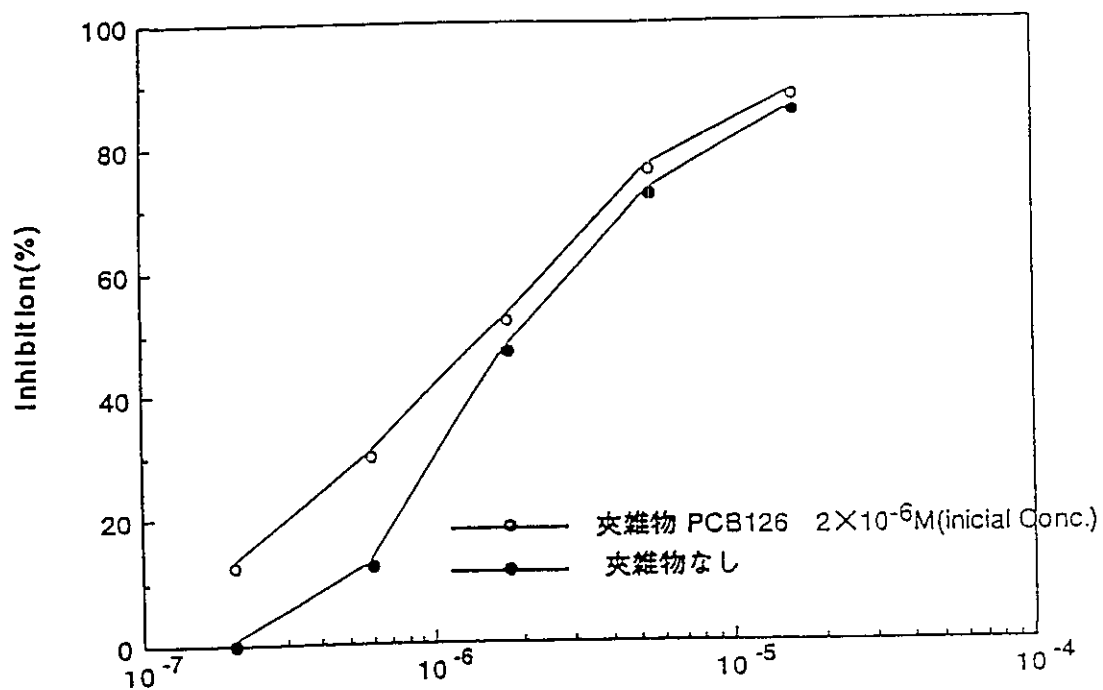


図6-11 夾雑PCB存在下でのPCB-#77の測定

この結果から、PCB-#126との交差反応性が、認められるもののPCB-#77に特異な抗体であると判断された。