

セイの報告があった。これらは、目的の DNA に2つのプローブが近接して結合する。ルシフェラーゼが触媒する蛍光反応からのエネルギー転換の結果生じる発光は2つのプローブが両方とも同じ DNA 分子に結合した場合にのみ起こる。もう一つの方法は DNA プローブをポリリボアデニル酸でラベルする方法である。8000 分子までの AMP はプローブに結合することができ、このラベルはポリヌクレオチドホスホリラーゼとの反応によって ADP に変換され、続いてピルビン酸キナーゼによって ATP に変換される一連の反応で定量することができる。ホタルルシフェラーゼの反応は ATP の定量に用いている。

3.5. 写真によるアッセイ

写真と生体蛍光とを組み合わせたものは評判が良く増加している。ニトロセルロースフィルターにブロットニングしたタンパクはバイオルミネッセントイムノアッセイで写真にして可視化される。脳の切片において 20 μm の厚さの切片と 60 μm の厚さの凍結試薬を接触させて、代謝物（ATP, グルコース, 乳酸）を検出することができた。この切片は室温で暖め、感光フィルム上に置き、蛍光を検出する。定性および定量の両方が可能となるためこの技術は局在性や代謝の変動の研究に適用できる。

（4. 結語）

ルシフェラーゼおよびルシフェリンを用いた新しい生体蛍光アッセイは日常行う分析方法のように容認されているものもわずかにあるがさらに発展し続けるであろう。現在研究レベルから日常業務レベルに移り変わりそうなアッセイは D-ルシフェリン-O-phosphate や、固定化した微生物ルシフェラーゼと酸化還元酵素を用いたバイオルミネッセントイムノアッセイ、*lux* 遺伝子を組み込んだバクテリオファージを用いた微生物の検出系である。

Firefly Reaction



Marine Bacterial Reaction

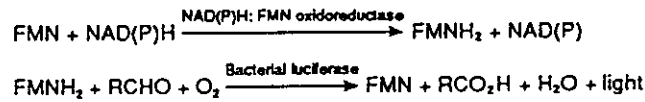


FIG. 1. Bioluminescent firefly luciferase and marine bacterial luciferase reactions.

TABLE 1

RAPID MICROBIOLOGICAL TESTS BASED ON BIOLUMINESCENT ATP ASSAYS	
	Reference
Susceptibility testing	(32)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(33)
Bacteria and fungi	(34)
<i>M. leprae</i>	(35)
Enterobacteriaceae	(36)
Bacteriuria	(37, 38)
Activated sludge	(39)
Detection of organisms	(40)
<i>Mycobacterium BCG</i>	(41)
<i>Staphylococcus aureus</i>	(42)
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	(43)
<i>Leptospira interrogans</i>	(44)
Food testing	(45)
Perishable food	(46-50)
Packaged goods and their containers	(51)
Shelf-life prediction	(52)
Vacuum-packed cooked cured meat	(53)
Beverages	(54)

TABLE 2

BIOLUMINESCENT ASSAYS FOR ENZYMES, SUBSTRATES, AND COFACTORS

	Reference
Enzymes	
Alcohol dehydrogenase	(55)
ATPase	(56, 57)
β -D-Galactosidase	(58)
Creatine kinase	(59-61)
Enolase	(62)
Isocitrate dehydrogenase	(63)
Phosphoenolpyruvate kinase	(64)
Substrates and cofactors	
L-Alanine	(65, 66)
Androgens	(67)
ATP	(68-70)
Bile acids	(71-73)
Creatine phosphate	(74)
Creatinine	(75)
Dehydroepiandrosterone sulfate	(76)
Estrogens	(77, 78)
Ethanol	(55, 79)
FAD	(80)
Free fatty acids	(81)
Glucose	(82, 83)
L-Glutamate	(84)
Glutathione	(85)
Lactate	(86)
myo-Inositol	(87)
NAD	(88)
NADH	(88)
Oxalate	(89, 90)
Pheromones	(91, 92)

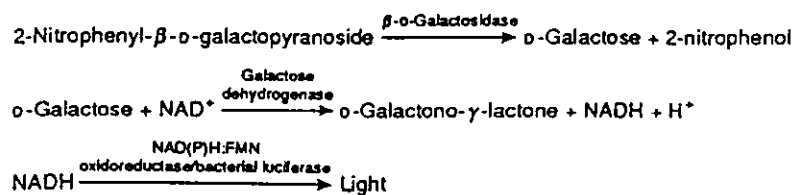


FIG. 2. Bioluminescent assay for β -galactosidase.

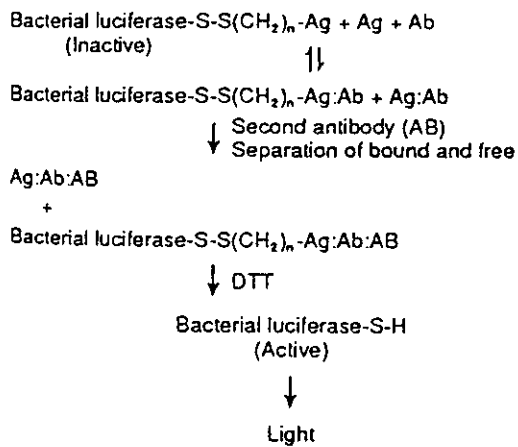


FIG. 3. Active center-based enzyme immunoassay (Ag, antigen; Ab, antibody).

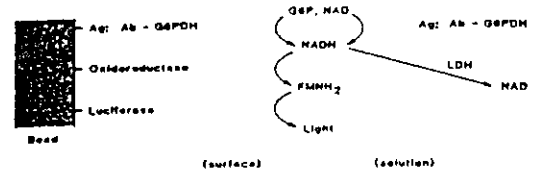


FIG. 4. Nonseparation bioluminescent enzyme channeling immunoassay (Ag, antigen; Ab, antibody, G6P, glucose 6-phosphate; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; LDH, lactate dehydrogenase).

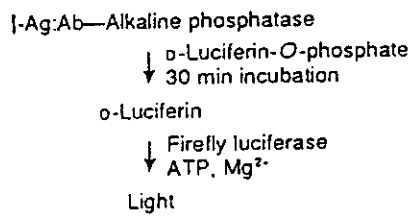


FIG. 5. Bioluminescent enzyme immunoassay using a D-luciferin-O-phosphate substrate.

Bioluminescent Immunoassay with a Protein A - Luciferase Fusion Protein

Eiry Kobatake, Tamotsu Iwai, Yoshihito Ikariyama, and Masuo Aizawa

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

(要旨)

プロテイン A とホタルルシフェラーゼを遺伝子レベルで融合させバイオルミネッセントイムノアッセイに用いた。ルシフェラーゼの構造遺伝子をプロテイン A の発現ベクターに組み込んで構築した融合遺伝子のベクター pMALU2 を大腸菌に導入した。その結果発現した融合タンパクは分子量 90 kDa を示し、ルシフェラーゼの活性と (プロテイン A が持つ) IgG の Fc 領域への結合能の両方を維持していた。この融合タンパクとヒト IgG を用いたバイオルミネッセントイムノアッセイを行った結果、 10^3 から 10^7 g/ml の範囲が検出できた。

(結論)

エンザイムイムノアッセイ (EIA) では、分析対象物またはそれに対応する抗体は試料中の対象物に対する高い選択性と検出感度を得るために標識酵素と共有結合させる。標識酵素は様々な方法で高感度定量に用いられるが、立体障害となったり酵素と抗体がランダムな位置で結合し合っていることによる酵素の失活がしばしば起こっていた。

抗体もしくは抗原への酵素標識は化学反応で結合させることで行っている。しかし、酵素が失活しやすく、複雑な複合体が形成される。そのため、抗原抗体反応が立体障害で妨げられたり、固相表面に非特異的に吸着して高感度のイムノアッセイが困難となる場合もあった。著者らはこれらの化学的なラベリングの欠点を克服する酵素標識法を開発した。

本研究では発光による高感度検出が可能となるホタルルシフェラーゼと IgG の Fc 領域に結合するタンパクであるプロテイン A とを遺伝子レベルで融合し、一定の位置に 1 : 1 で結合させることを試みた (図 1)。

ブドウ球菌のプロテイン A は哺乳動物の抗体の Fc 領域に結合することが知られている。Lindbladh らは、プロテイン A と微生物ルシフェラーゼの β サブユニットの融合タンパクを作成したが、もとの酵素より不安定であった。ホタルルシフェラーゼは塩基配列が全て明らかになっており、遺伝子レベルで融合させるのに適している。また、ホタルルシフェラーゼのアミノ酸配列の C 末端側は発光反応に重要で、N 末端側はそうでないことも明らかになっている。

ここではプロテイン A とルシフェラーゼの融合タンパク作成のストラテジーおよび、バイオルミネッセントイムノアッセイへの適用について述べる。

(結果・考察)

1. 発現プラスミドの構築

- ・ 図 2 → プロテイン A の C 末端領域とルシフェラーゼの N 末端領域を融合した。

2. 融合タンパクのキャラクタライゼーション

- ・ 図 3 → ウエスタンブロット分析

発現した融合タンパクのサイズは 91kDa (プロテイン A : 28 kDa, ルシフェラーゼ : 63 kDa)

- ・ 図 4 → 組換え大腸菌細胞溶解液の濃度と蛍光強度は比例関係
- ・ 図 5 → A : ルシフェラーゼ, B : プロテイン A - ルシフェラーゼ融合タンパクの蛍光反応

本来ルシフェラーゼには ATP 結合部位が 2 箇所あり、A において見られる蛍光の鋭いピークは ATP 結合部位のどちらか一方に ATP が結合したことにより生じる。B は弱く持続する蛍光のみ見られ、これは融合タンパクのフォールディングがルシフェラーゼの N 末端側 12 アミノ酸を削ったことにより ATP 結合部位が 1 箇所機能を失ったと考えられる。

3. 融合タンパクの IgG への結合

・ 図 6 → 固定化したヒト IgG への結合

融合タンパクはプロテイン A の抗体結合能と、ルシフェラーゼ活性の両方を示した。

予想ほどプロテイン A が抗体に結合していない → 抗体の Fc 領域の疎水性部分がプラスチックプレートに吸着した状態で固定化されたものが含まれているか、融合タンパクのプロテイン A は本来のプロテイン A より抗体との親和性が弱いかのどちらかによるものと考えられる。

4. バイオルミネッセントイムノアッセイ

・ 図 7 → 抗ヒト抗体 F(ab')₂ 断片を固定化しヒト IgG のサンドイッチイムノアッセイを行った。

・ 10⁻³ から 10⁻⁷ g/ml のヒト IgG が定量可能

・ 今回の実験で用いた抗ヒト抗体はヤギ由来のポリクローナル抗体であるが、本測定系では融合タンパクのヒト IgG が効率よく結合するには Fc 領域を外側に出した状態で捕獲されなければならない。→ 今後は Fab 領域に対するモノクローナル抗体を使う必要がある。

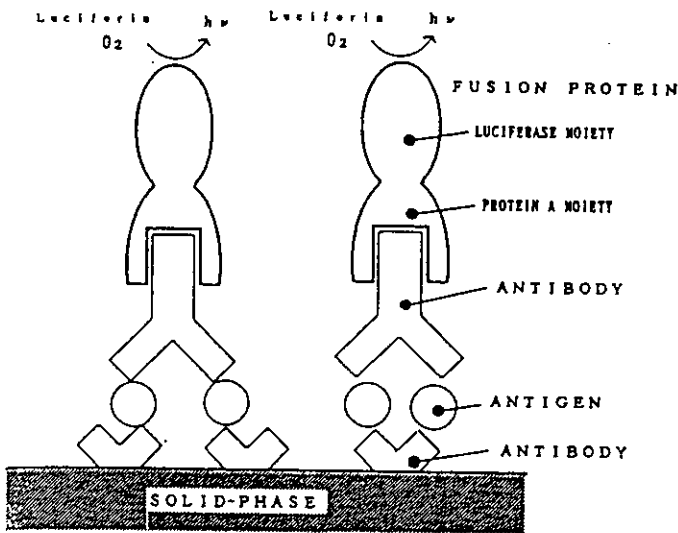


FIG. 1. The principle of the bioluminescent immunoassay with a protein A-luciferase fusion protein. The fusion protein binds to the Fc portion of an antibody with protein A moiety, and the bound luciferase activity is detected to determine the concentration of antigen.

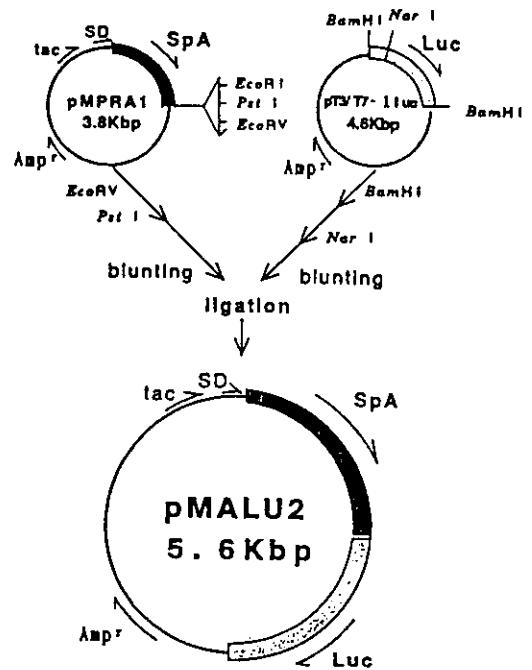


FIG. 2. Schematic drawing of plasmid pMALU2 construction. Boxes show the positions of the structural genes coding for protein A (SpA) and firefly luciferase (luc). The tac promoter (tac), Shine Dalgarno sequence (SD), and β -lactamase gene (AMP^r) are also indicated. The arrows indicate the orientation of genes.

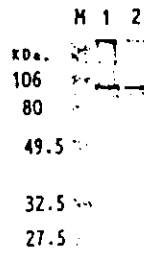


FIG. 3. Western blotting analysis of the fused protein. The samples were reduced by boiling in SDS buffer containing 5% mercaptoethanol and electrophoresed on an SDS-10.0% polyacrylamide gel, and transferred to a nitrocellulose membrane. M, Prestained standard samples (molecular weight is indicated in kDa at the left margin); 1, the crude supernatant of the cell-lysate (JM109/pMALU2); 2, the supernatant of the cell-lysate (JM109/pMALU2) after the purification by IgG-Sepharose.

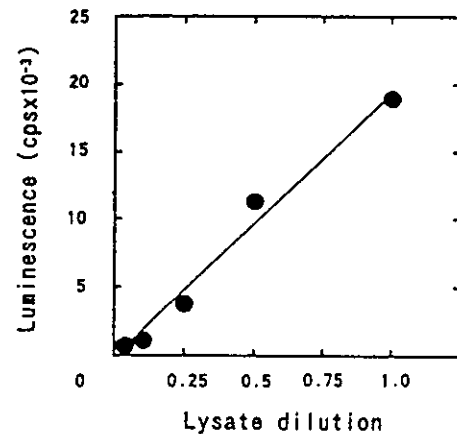


FIG. 4. Luminescence-dilution curve of the cell-lysate containing the protein A-luciferase fusion protein. Luminescent activity in cps was measured in a cuvette containing the reaction solution and each diluted lysate. The reaction was initiated by injecting the luciferin solution, and the resulting luminescence was monitored by a photon counting system.

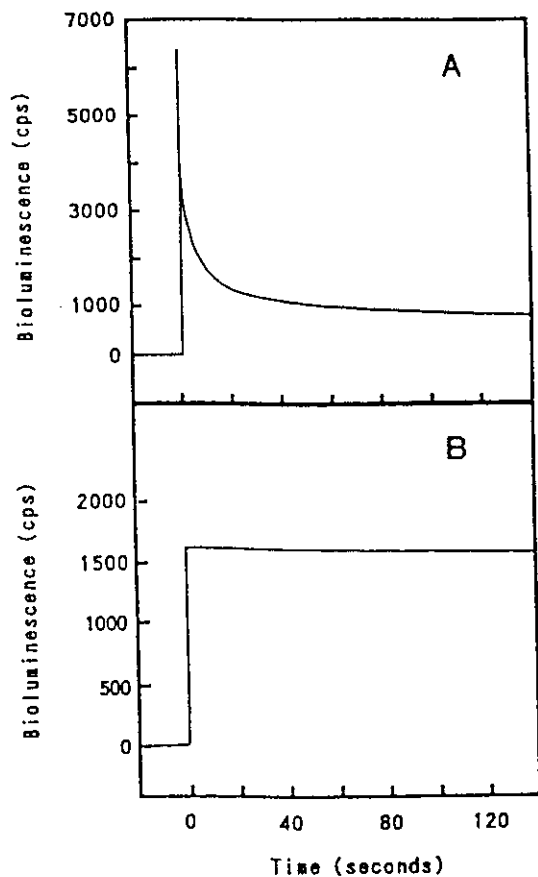


FIG. 5. Time course of luminescence. The luminescent pattern of the luciferase expressed in JM109/pT3/T7-1 luc (A), and the fused protein expressed in JM 109/pMALU2 (B). Cells of logarithmic phase were lysed and the luminescence of each supernatant was determined as described under Materials and Methods. Luciferin solution was injected, and luminescence was monitored instantly.

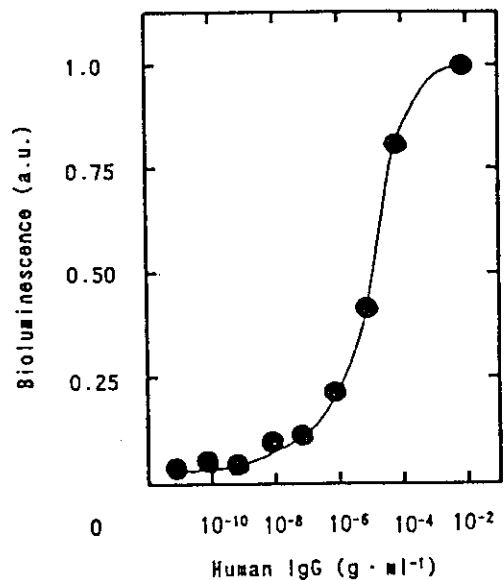


FIG. 6. Dependence of the change in luminescence on human IgG concentration. Human IgG of different concentrations were adsorbed to plastic cuvettes, and any remaining active sites for nonspecific binding were blocked with 1% skim milk. After washing, luciferase bound to the solid-phase surface via protein A-IgG binding was determined by injection of 0.1 mM luciferase as described under Materials and Methods.

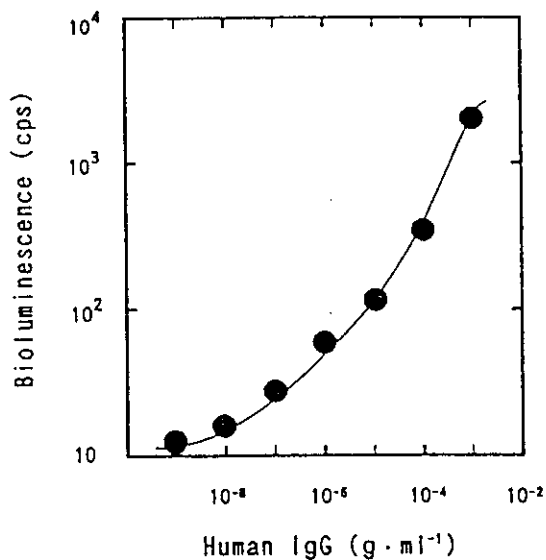


FIG. 7. Sandwich immunoassay for human IgG. The plastic cuvette was coated with $F(ab')_2$ fragment of anti-human IgG antibody and incubated with a given concentration of human IgG, which was followed by binding reaction between the fused protein and the Fc portion of the human IgG. After thorough washing, the activity of luciferase bound to the solid-phase was determined in the presence of 0.1 mM luciferin. The details are described under Materials and Methods.

第7章 まとめ

7-1 結果の概要

1. 有害廃棄物の体系的な試験方法の確立

平成10年度は、廃棄物の有害性・危険性の評価方法の調査、事故事例の解析等を行うとともに、揮発性化合物、重金属、残留性有機化合物の分析方法についての検討を行った。結果は下記の通りである。

1) 有害廃棄物の取り扱いにおける有害性・危険性の評価方法

有害廃棄物の取り扱いにおける有害性・危険性の評価方法をまとめるに当たり、有害物発生のながれ、廃棄物の種類、有害性、消防法の危険物、既存の有害性の評価方法についての整理、廃棄物取り扱いにおける事故例についてのデータ解析、廃棄物の有害性評価方法に関する文献検索を行った。事故事例の解析からは、廃棄物取り扱いにおいて硫化水素、廃油、可燃性ガス、混触による事故が多く発生していることが判り、廃棄物処理における事故発生を防止するという観点からの有害性、危険性評価方法を考える場合には、硫化水素、廃油、可燃性ガス、混触といったキーワードにポイントを絞って検討したら良いのではないかと考えられた。

2) 廃棄物に係わる揮発性有機化合物の分析方法

揮発性有機化合物の分析方法について文献調査を行った結果、1) 開放経路Fourier変換赤外分光法 (FTIR) を用いた廃棄物処理施設、産業現場などの測定に関するもの、2) 混合廃棄物、処理施設の評価解析に関するもの、3) 汚染物質決定のための方法、測定方法の評価、測定方法の提案に関するもの、4) 危険性評価に用いる野外スクリーニング法に関するもの、が抽出された。

更に、廃棄物処分場や事業所跡地土壌中の揮発性有機化合物調査方法の一つであるフィンガープリント法について、サンプリング技術、分析技術の評価を行った。この結果、テトラクロロエチレンやトリクロロエチレンについて敷地の平面図に等濃度図の形で表示することによって、汚染の範囲、境界および汚染流塊の方向を決定することができた。この方法の特徴から、公定法や詳細分析を行う際のサンプリングの絞り込みには有効な手法であると考えられた。

3) 廃棄物に係わる重金属の分析方法

重金属の分析方法について、廃棄物、水質、土壌等に関する各種法令の基準値、公定法（環告13号）に規定される分析方法について調査し、法令毎の基準値の比較、前処理操作フロー、機器分析方法等について詳細にまとめた。又、JICST及び近年出版された科学技術情報誌等の文献調査を行い、分析方法の簡易化、迅速化の観点から参考となると

思われる文献をピックアップした。

更に、産業廃棄物中の金属を迅速に分析する方法としてエネルギー分散型蛍光X線分析装置を用い、焼却灰、鉍さい、ダスト、シュレッダーダストの各試料について簡単な試料調製（粉碎、成形）でどの程度まで分析精度を確保できるかの確認検討を行った。この結果、シュレッダーダストを除けば、試料中濃度が約0.01%以上の金属元素は化学分析値と良く一致することが判った。このことから、操作、構造が簡単でコンパクトなエネルギー分散型蛍光X線分析装置を用いることによって、廃棄物処理現場での簡易迅速分析が実現できる可能性があることが判った。

4) 廃棄物に係わる残留性有機化合物の分析方法

残留性有機化合物の分析方法について、本年度は飛灰中の環境ホルモンの分析方法についての検討を行った。PCB、PBB、アルキルフェノール類、芳香族化合物、ビスフェノールA、クロロフェノール類、17 β -エストラジオールを分析対象として、国内の焼却炉で採取した飛灰の分析を行った結果、PCBのみが検出された。今回の分析方法では飛灰内部に含有されている環境ホルモンは十分に抽出されなかった可能性もあるため、抽出方法についてさらに詳細な検討が必要である。

2. ダイオキシン類測定新マニュアルの検討

ダイオキシン類の測定については、平成9年2月に「ダイオキシン類測定標準法」が改訂されたが、その後、環境庁からも有害大気汚染物質調査マニュアルをはじめ種類の媒体の調査マニュアルが出されている。また、これらのマニュアルのみでは対応が困難な試料への対処や、ダイオキシン類と共にCo-PCBについても国際的に議論され排出実態の調査及び対策が必要となってきた。本研究ではこの新マニュアルの検討に関して、ダイオキシン類測定分析の新たな知見を得るための検証を行うことを主眼としている。

昨年度の報告においては、欧米および国内の分析方法の文献調査並びに参画各社の分析方法を比較検討した。また、マニュアルに関する測定法の検証としてはGC-MS分析の精度評価と、飛灰試料の分析所間精度の評価を行ったが、結果は良好で分析所間精度評価の結果、概ね20%以内であった。さらに排ガスについてもサンプリングの再現性（二重測定）の精度が確認された。今後参画分析機関からのデータの収集が必要である。

本年度は「廃棄物処理におけるダイオキシン類標準測定分析マニュアル」の検証として実際の運用面で生じた問題点の列挙とその対策案と評価を行った。

実際の運用面で生じた、あるいはその可能性がある問題点の列挙として、以下の点を挙げた。

◆試料採取時の問題

- ①ろ紙捕集部の温度コントロール；実際には排ガス温度と吸引速度、雰囲気温度等により 120℃程度の保温が困難となる可能性がある。したがって可能な限り二次生成を避けるためには冷却捕集が望ましい。
- ②配管にテフロンを多く使用した場合には、ダイオキシン類が低濃度で低ダスト下であるバグフィルター出口の採取では、ガラス配管と比較し、相対的に低くなる（テフロン部に吸着）可能性があった。
- ③低濃度レベルのダイオキシン類採取においては、トラベルブランクの管理と、試料採取時および試料採取後の保管と輸送時における注意事項を追加する必要がある。
- ④採取方法や吸着剤の比較データ；XAD-2 と同等品を比較した結果、大部分がドレン部に捕集される冷却採取法を採用していれば、ほぼ大差のない結果が得られた。

◆分析全般に渡る要求事項と許容範囲の具体的な明文化

◆分析に使用する GC カラムの 2 種以上の併用 クロスチェック結果からばらつきの大
きい成分についての対処方法として最終結果確定に至る二重チェックシステム案

◆特に低濃度試料の測定精度実質的な限界の明確化

- ①排ガスでは現行のマニュアルで扱える TEQ レベルは概ね 0.01ng-TEQ/m³N 程度までであり、さらに最新の施設や実験施設ではさらに各塩化物の定量下限値を下げる必要がある。
- ②試料採取量に限界がある場合には、濃縮倍率を上げることである程度対応可能である。また長期間の連続モニタリング法の開発も必要である。

3. ダイオキシン類高感度・簡易迅速分析の検討

ダイオキシン類の高感度でしかも迅速な分析法について検討した。結果は、下記の通りである。

1) ダイオキシン類簡易分析法の検討

公定法（厚生省マニュアル）とは異なる簡易分析法を確立することにより、大幅なコストダウン、短納期の達成を目指す。平成 10 年度は、(1) 代替成分簡便分析法 (2) 全有機ハロゲン化合物(TOX)の指標項目としての有効性 (3) TEQ と特定異性体との相関性およびその応用について検討した。

- (1) 代替成分としてモノクロロベンゼンを選定し、市販の充填済み活性炭カラムによる吸脱着試験を行い FID-GC 分析を試みた。その結果、最大 300ml/min でも吸脱着可能な系を確立したが、より低濃度への対応が今後の課題である。
- (2) TOX のうち難揮発性の NVOX について代替指標性を検討した結果、焼却炉排ガスおよび灰ともに NVOX とダイオキシン類合計濃度との間に相関関係が得られた。また、

排ガスにおいては、PRTR 技術検討会報告書資料に示された関係式とほぼ一致する結果となった。

- (3) TEQ と関連性を 17 異性体で検討した結果、1,2,3,6,7,8-H₆CDF および 2,3,4,7,8-P₆CDF の相関係数は、0.983 および 0.919 と高い値を示した。また、O₈CDD と TEQ の相関性に着目し、土壌試料における分析レベルおよび前処理工程の簡略化を検討した結果、硫酸処理/ECD 分析で TEQ を推定できる可能性が示唆された。今後、データ蓄積による精度アップが必要である。

2) ダイオキシン類分析における簡易前処理法の検討

簡易分析法のうち、現有設備を用いて比較的簡単に試せると共に早期に実用化が可能な手段として、公定法（厚生省マニュアル）の前処理・抽出フローの簡略化に目標を絞り検討する。

平成 10 年度は、抽出工程において試料の秤量から粗抽出液調製まで一括処理する方法（還流抽出法）を検討したが、回収率は 50%以下で満足すべき結果は得られなかった。今後、溶媒の種類、操作方法等を見直し、回収率の向上を図る必要がある。また、クリーンアップ工程において、AgNO₃/シリカゲル粉末および H₂SO₄/シリカゲル粉末での振とう処理後の検液を直接アルミナミニカラム精製に供する方法について検討した結果、85%の回収率が得られた。所要時間は 4 時間以内、n-ヘキサンおよびジクロロメタン使用量はそれぞれ約 35ml/検体および約 5ml/検体と、従来法に比べて大幅な簡易化が図れた。

3) 排水中のダイオキシン類高感度簡易分析法の検討

液/液抽出改良法及び固相抽出法を用いて、排水中のダイオキシン類を高感度で、しかも容易に抽出可能な方法について検討する。平成 10 年度は、まず液/液抽出改良法としてグラファイトカーボン添加量 0.05g/L、振とう 30 分、ソックスレー抽出 16 時間の条件で、実液での回収率検討を行った結果、ほぼ良好な結果が得られ、実試料にも適用可能であることが判った。また、固相抽出法については、(1) C18 ディスク (2) ポリウレタンフォーム(PUFP) (3) XAD-2 樹脂について検討した。

- (1) ガラス繊維ろ紙 4 枚と C18 逆相ディスク (Empore Disk Fast Flow タイプ) 2 枚を加压式ろ過装置にセットしたものを水道に直結することにより、30 時間で 1000L を処理可能な系を見いだした。引き続き多試料について検討予定である。
- (2) PUFP の溶存態ダイオキシン類の吸着特性を検討したところ、PUFP 1 段では 60~80%の吸着能力であったが、段数を増やすことで 2~3L/min の通水速度でも十分な吸着が得られることを確認した。今後は、懸濁物質のろ過と PUFP の段数を増やしたサンプリングシステム全体の性能評価が課題となる。

(3) XAD-2 樹脂からの溶媒抽出法として、ソックスレー抽出, 超音波抽出, 高速溶媒抽出を比較検討した結果、いずれの抽出法も良好な回収率が得られた。中でもソックスレー抽出、およびアセトン抽出液とした高速溶媒抽出が良好であった。

4) 不完全燃焼排出粒子中の化学汚染物質の連続モニタリング手法に関する研究

各種発生源から排出される粒子状物質に含まれる汚染化学物質の濃度を直接モニターすることが可能な簡易手法の確立及びその実用化を検討する。平成10年度は、電気伝導度検出器及びガス試料濃縮器等を組み合わせることにより、排ガス中の総有機ハロゲン化合物を直接モニター可能な装置を作成した。この装置を希釈標準混合ガスへ適用した結果、良好な検出感度や再現性を示すことを認めた。一方、粒子状物質中の多環芳香族炭化水素類の直接モニター用PAS-2000 (PAS : photoelectric aerosol sensors) で沿道空気の測定を試みた結果、屋外での一週間の長期測定に適用し得ることなどを認めた。

4. 排ガスサンプリングの検討

現在、排ガス試料中のダイオキシン類は「ダイオキシン類標準測定マニュアル」の通り、4種の試料を酸処理・溶媒抽出後、各種クリーンアップ処理した試料をGC/MS法により分析している。この分析法では、前処理工程に人手がかかることから、排ガス試料を固体試料のみにする簡易なサンプリング機器を含む測定方法について検討し、試験した。

H10年度の研究では、試作部分 [プルーブー円筒ろ紙 (120℃) - 水冷コンデンサー - XAD-2 樹脂] + 既存部分 [ドレンポット - XAD-2 樹脂 - インピンジャー] からなる、高ダスト濃度用サンプリング装置 (図5-2) による実機ごみ焼却炉での試験により、下記の事項が明らかになった。

- 1) バグフィルター入口側で高ダスト濃度用サンプリング装置による測定分析試験を行った結果、2~11%のPCDDs/PCDFsがXAD-2樹脂を通り抜けて、既存部分で補集された。従って、試作部分だけのサンプリングでは問題があることが判明した。
- 2) 高ダスト濃度用サンプリング装置による排ガス試料のダイオキシン類分析の結果、同族体分布が変化した試料があることから、試作部分の [プルーブー円筒ろ紙 (120℃)] 間で“de novo synthesis”が起こっている可能性がある。従って、簡易なサンプリング装置には冷却プルーブ方式が適していると思われる。
- 3) 同所同時サンプリングした2組の排ガス試料について、前処理の抽出工程における塩酸処理有り無しとの比較試験を行った結果、両者の差は10%以下であり、塩酸処理無しでもダイオキシン類を十分抽出出来る可能性を示した。

5. イムノアッセイ法の検討

環境分析分野に、イムノアッセイ法を適用する場合、その簡易性、迅速性を活用するには、前処理法(抽出法・精製法)についても、その目的(スクリーニングか、比較的精密分析か)によっても異なるが、簡易化、迅速化の検討を行う必要がある。

また、測定法の開発の場合は、「① 特異性の高い抗体を選択する。② 感度(検出下限をより下げるため、検出法を酵素標識法以外に検討する。)」ことができる。

このグループでは、ダイオキシン市販E I Aキットについては、前処理法の改良を検討し、廃棄物試料(飛灰)では、A S E (高速溶媒抽出)法が適用可能との感触を得ている。

また、コプラナP C Bの測定系評価では、コプラナP C B異性体のうち、比較的TEF(毒性等価係数)の大きい3異性体に特異的なモノクローナル抗体を産生する細胞株を分離できたので、今後、実試料の検討を行う。また、感度を上げるために、酵素標識抗体でも、可視部の発色によらずに蛍光による検出を行う方法があり、その関連の文献調査を行った。

7-2 平成11年度研究計画

1. 有害廃棄物の体系的な試験方法の確立

平成10年度調査結果に基づき、廃棄物の有害性評価および取り扱い時の危険性評価の観点から体系的に整理する。又、揮発性有機化合物、残留性有機化合物、重金属、中毒性および可燃性ガスについて、分析手法の簡素化、概略的把握のための総合指標の観点から技術検討を行い新しい分析方法あるいは改善された分析方法を提案する。

具体的実施事項は下記の通りである。

1) 調査結果のまとめ

平成10年度分担して行った有害物質の分析方法の調査結果をベースに、①標準分析手法、簡素化、総合指標の観点からのまとめ、②廃棄物取り扱い時の危険性評価の観点からのまとめ、を行う。

2) 技術検討

- (1) 揮発性有機化合物の分析手法の検討を行う。
- (2) 難分解性有機化合物の分析手法の検討を行う。
- (3) 環境中重金属の簡易モニタリング法の検討を行う。
- (4) 中毒性および可燃性ガスに関わる有害物として硫化水素をとりあげ、廃棄物から発生する硫化水素あるいは廃棄物中の硫黄の迅速定量方法についての検討を行う。

2. ダイオキシン類測定新マニュアルの検討

1) 「廃棄物処理におけるダイオキシン類標準測定分析マニュアル」の検証と問題点の列挙および精度管理方法の検討を含めたマニュアル化

- ①実際の運用面で生じた問題点を列挙し、内容を見直す。
- ②特に低濃度試料の測定精度について限界を明確にする。
- ③毒性等量 (TEQ) の算出方法による差異を把握する。
- ④精度管理の徹底について内容を充実したマニュアル化。

2) 「廃棄物処理におけるダイオキシン類及びコプラナーPCB標準測定分析マニュアル」(案)の検証と問題点の列挙

- ①1)、2)を含め、飛灰等(可能であれば排ガスも)を対象とした、少なくとも6機関以上によるクロスチェックを行い、さらに新たな知見を得る。
- ②分析項目はダイオキシン類およびコプラナーPCB(14異性体)とする。
- ③特に再現性(二重測定)やトラベル/操作ブランクも含めた国際標準的な精度管理方法の確立も必要となる。

3) 廃棄物処理場周辺環境媒体のダイオキシン類の環境調査方法(案)の確立 環境庁の各種媒体のダイオキシン類調査マニュアルを参考とする。

4) 廃油、汚泥等の複雑な混合物の廃棄物試料におけるダイオキシン類分析方法のマニュアル化

3. ダイオキシン類高感度・簡易迅速分析の検討

1) ダイオキシン類簡易分析法の検討

(1) 代替成分（クロルベンゼン、TOX等）、特定異性体による簡易分析法の検討

- ①クロルベンゼン類の簡便サンプリング法について追加的な検討を行なった後、実ガスサンプルへ適用して、相関データを採取し、簡易分析法としての適用性を評価する。
- ②対象試料を、これまで検討してきた排ガスおよび灰から、土壌・水試料に広げ、全有機ハロゲン分析（TOX）を適用し、ダイオキシン類濃度との相関性を調査する。あわせて、GC-ECD法による分析法も適用する。
- ③焼却炉における特定異性体（P₅CDFあるいはH₆CDFその他）とTEQの相関データの詳細解析、また特定異性体あるいは同族体を分析する簡易分析法の可能性を検討する。

(2) 固体試料の簡易解析法の検討

これまで検討してきたLCGC/MS、ECDによる簡易分析法、さらに低濃度の水田土壌、都市土壌の試料に適用し、HRGC/MSによるTEQ値と比較する。両者の相関関係と回帰分析の検定を行ない、手法をマニュアル化する。

(3) 新規分析法に関する再調査とまとめ

2) ダイオキシン類分析における簡易前処理法の検討

(1) 抽出行程

平成10年度研究で得た知見を基に、抽出方法を再検討する。方法として、試料（塩酸未処理）を蒸留フラスコに秤量し、直接その中に有機溶媒および塩酸を加える。この蒸留フラスコをソックスレー抽出装置のマントルヒーターに設置したのち、冷却管を接続して加熱し、試料中のダイオキシン類を抽出する。その後、ろ過、洗浄、濃縮し、粗抽出液とする。 a. 水溶性溶媒の選定 b. 抽出操作 c. 洗浄方法 d. その他

(2) 信頼性の確認

焼却灰、飛灰および土壌について、従来の方法と本研究で確立した方法とのクロスチェックを行い、信頼性を確認し、誤差が大きい場合は、抽出方法を再検討する。なお、従来の方法での分析は、公正さを保つために第3者分析機関に依頼する。

3) 排水中のダイオキシン類高感度簡易分析法の検討

(1) 各種固相抽出剤の実試料への適用試験

平成10年度研究で得た知見を基に、ろ紙4層+C18逆相ディスク、ポリウレタンフォーム、XAD樹脂等の各種固相抽出剤の実試料への適用試験を行い、問題点を

抽出する。

(2) 現場サンプリングが可能な固相抽出法の検討

S S 分別用ろ過剤の検討、吸着剤の検討ならびにサンプリング装置の検討

4. 排ガスサンプリングの検討

(1) 低ダスト濃度用サンプリング装置*による下記試験を実施する。

- ① 廃棄物燃焼炉又は実機ごみ焼却炉においてバグフィルター入口・出口側で試作サンプリング装置による排ガス中ダイオキシン類を採取する。
- ② 排ガス試料は試作部分と既存部分を別々にして、それぞれダイオキシン類分析を行う。
- ③ 既存排ガス採取装置でえられた試料中にダイオキシン類が全体の 5%以下しか検出されなければ、試作サンプリング装置だけで十分であることが立証されたことになる。

(2) 前処理操作の効率化検討

上記の低ダスト濃度用作サンプリング装置による採取に際し、同所同時サンプリングにより各々 2 組の排ガス試料を得る。この 2 組の排ガス試料について、前処理の抽出工程における塩酸処理有り（厚生省法）と無し（高速溶媒抽出法）の比較試験を行って、塩酸処理無しでもダイオキシン類を十分抽出出来ることを立証する。

*低ダスト濃度用サンプリング装置： Cooled Probe Method

[排ガス]－試作部分 [水冷プローブ－ダストチューブ－XAD-2樹脂]＋

既存部分 [ドレンポット－XAD-2樹脂－インピンジャー－真空ポンプ等]

5. イムノアッセイ法の検討

1) 新規の検出方法によるダイオキシン・イムノアッセイ市販キット評価

新規入手キット：時間分解蛍光免疫測定法に基づく TCDD キット

(HYBRIZYME社製、2, 3, 7, 8 - TCDD, 2, 3, 7, 8 - TCDFに特異的)

- ・検出限界：2.4 ppb 2, 3, 7, 8 - TCDD in methanol
- ・特徴：標識物質 E u (ヨーロッパウム：ユウロピウム、希土類元素) のキレート蛍光寿命が長いことを利用して、妨害物質の影響を受けにくい。
- ・原理：TCDDの E u 標識体と試料中の TCDD との競合により、E u 標識体の量をキレート剤を添加後、励起光 (350nm)、蛍光波長 (615nm) で測定する。

2) イムノアッセイ系のための前処理法の検討

簡易化、迅速化への対応

- ・廃棄物試料 (飛灰等) の場合の前処理法の改良：抽出・精製法の比較検討

3) PCBイノムアッセイ系の評価

- ・基礎的な評価：特異性等
- ・実試料を測定する場合の評価
- ・前処理の検討：環境試料（土壌、水質）、化学処理油