

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²²⁾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²²⁾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。

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 RISC 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がある。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

ない。

(2) 廃棄物実試料を用いた実験的検討

第1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、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。

第2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。その結果、キット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て比較したところ、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分析値とその相関を見ると、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、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。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。

(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ろう。

参考文献

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

(4) 試料前処理方法の検討のための精製過程の各段階の試料によるEIA測定

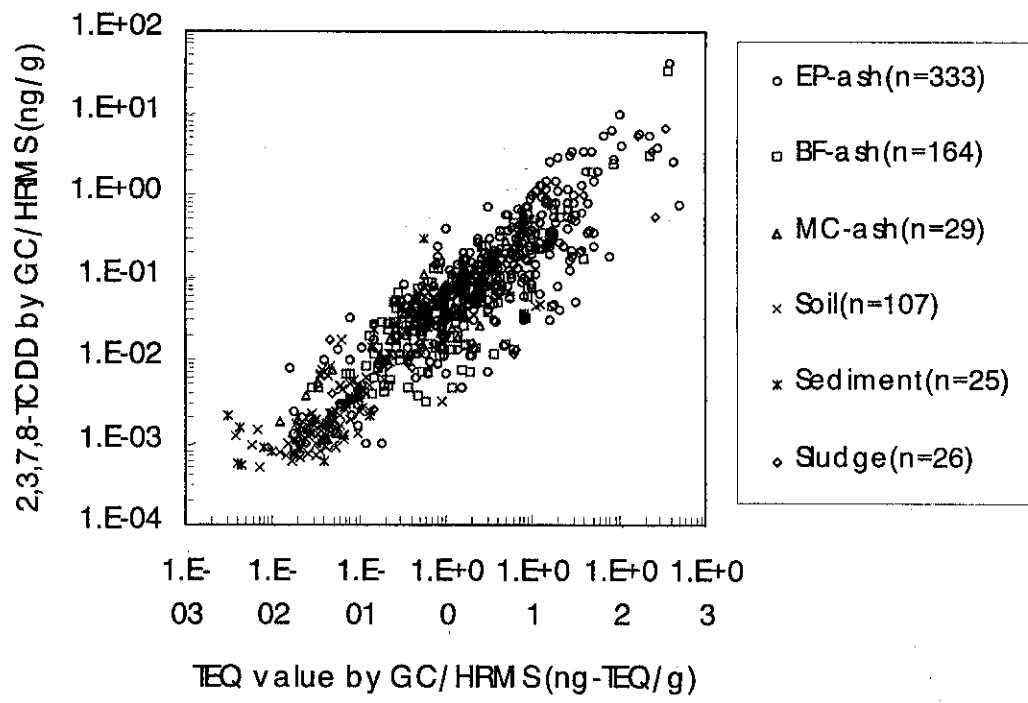
1) ダイオキシン類 (DXNs) は、平成11年7月にいわゆる特別措置法が成立し関係各省庁における対策が急がれているとともに、内分泌かく乱作用も懸念されており、管理と制御が極めて重要となっている物質群である。

現在、DXNsは長時間を要する試料前処理操作を経て高分解能質量分析計 (HRMS) による超微量分析が行われている。試料前処理操作では適宜、安定同位体標識化合物 (いわゆるサロゲート物質) が用いられ超微量分析における分析精度を担保している。

一方、イムノアッセイ法によるDXNsの測定は、その測定原理上、夾雑成分の影響を受け易くHRMSによる機器分析法に比べ正確さは劣ると考えられるが、その迅速性からスクリーニング法としての適用が期待されている。

昨年度までの検討から、DXNs測定法としてイムノアッセイ法の適用を検討しその有効性を見出した。また、従来のソックスレー抽出法に代わる迅速かつ簡便な試料前処理法として高速溶媒抽出法 (ASE法) の検討も併せて行った。その結果、これらを組み合わせることにより、DXNsを迅速簡便にスクリーニング可能であると示唆された。

本年度は、ASE法により得られたEP灰試料等の粗抽出液について簡便な精製方法を検討すると共に実試料への適用、評価を行い、DXNsスクリーニング法として確立することを目的とする。



Pretreatment : ASE

- 1: 硫酸処理
- 2: 硫酸シリカゲル
- 3: 硫酸シリカゲル+アルミナ
- 4: 硫酸シリカゲル+KOHシリカゲル

表 6 - 1 各精製工程別の測定値

Sample	硫酸処理	硫酸シリカゲル	硫酸シリカゲル+アルミナ	硫酸シリカゲル+KOHシリカゲル
	ng/g	ng/g	ng/g	ng/g
A(EP灰)	0.55	0.34	0.12	0.01
B(EP灰)	1.6	2.2	2.5	2.3
C(EP灰)	5.5	4.1	5.2	5.2
D(焼却灰)	0.12	0.096	0.2	0.059

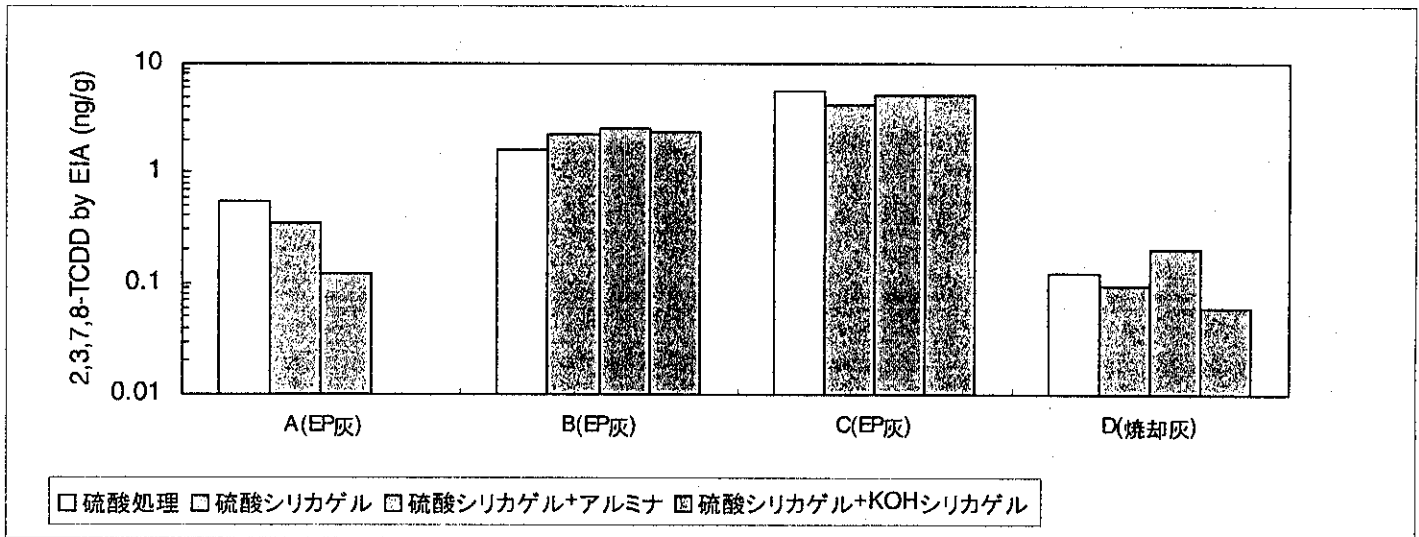


図 6 - 2 各精製工程別の E I A 測定値

1 : ASE+硫酸シリカゲル+EIA
 2 : ASE+GC/HRMS

Sample	1	2
	ng/g	ng-TEQ/g
A(EP灰)	0.34	0.66
B(EP灰)	2.2	14
C(EP灰)	4.1	30
D(焼却灰)	0.096	1.1

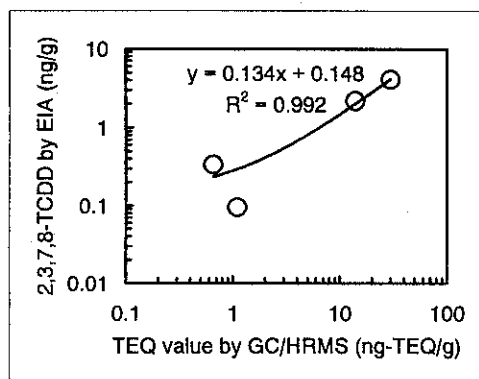


図 6 - 3 EIA値とGC/HRMSの測定値の比較

1 : ASE+硫酸シリカゲル+EIA
 2 : ASE+GC/HRMS

2,3,7,8-TCDD

Sample	1	2
	ng/g	ng/g
A(EP灰)	0.34	0.021
B(EP灰)	2.2	1.3
C(EP灰)	4.1	3.1
D(焼却灰)	0.096	0.016

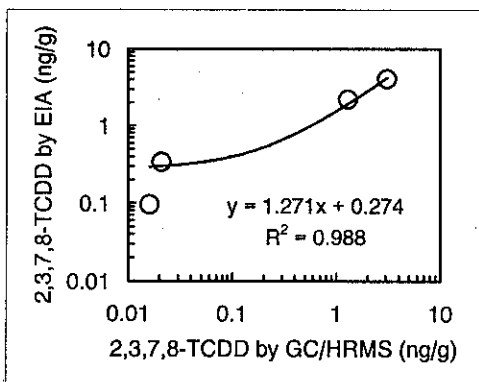


図 6 - 4 2,3,7,8-TCDDのEIA測定値とGC/HRMSの測定値

6-6 コプラナーPCBに選択特異性を持つ抗体の評価

(1) 鉱油およびトランス油中のPCBの測定

DMSOで10000倍に希釈した鉱油、アルカリ処理トランス油に、コプラナーPCB (PCB-#77, PCB-#126, PCB-#169) を最終濃度 1×10^{-6} Mになるように添加して、EIA法の試料とした。

回収率は、表6-2に示すとおりであり、抗PCB-#77抗体では交差性も比較的良好であった。抗PCB-#126抗体では、回収率は抗PCB-#77より悪かった。抗PCB-#169抗体では、PCB-#126との交差が認められた。

今回の結果は、鉱物油、化学処理油とも希釈した試料であり、またコプラナーPCBの存在量も実試料とも異なるものである。また、法令との関連でいえば、コプラナーPCBではなく、トータルPCBとの関連の検討が必要である。

以上のように、かなり限定された試料条件であるが、今後は実試料により近い試料での測定可能性の検討が必要となる。

表6-3 PCBを添加したミネラル、アルカリ処理油中のPCB添加回収試験

測定系	添加PCB	添加回収率(%) (測定PCB(μ M)/添加PCB(μ M))	
		ミネラルオイル 添加PCB濃度(μ M)	処理後油 添加PCB濃度(μ M)
PCB-#77	PCB-#77	109.1	107.6
	PCB-#126	15.6	8
	PCB-#169	6.7	4.2
PCB-#126	PCB-#77	13.7	9.1
	PCB-#126	49.8	45.1
	PCB-#169	1.9	0.3
PCB-#169	PCB-#77	12.6	15.5
	PCB-#126	56.2	59.3
	PCB-#169	76.3	61.8

2. コプラナーPCBの個別異性体に特異的な抗体を使用した酵素免疫法による測定の位置付

ダイオキシン特別措置法ではダイオキシン類と同様にコプラナーPCBもTEFが定められ、TEQ換算の一部を占める。しかしながら、通常の焼却炉等の試料、水、土壌、大気等におけるコプラナーPCBが総TEQに占める比率は10%前後であり、その寄与率は大きくない。ただし、食品(魚類)の大都市沿岸域の試料では、コプラナーPCBの寄与率が高く、この媒体では、コプラナーPCBの酵素免疫法の適用が期待される。また、比較的高濃度の焼却炉関連の試料でも酵素免疫法の適用の余地がある。ただし、それぞれの前処理方法については、すべて今後の課題である。

6-7 蛍光イムノアッセイの原理に基づくDXNキットの評価

(1) はじめに

抗原抗体反応を利用した免疫測定法は、測定操作が迅速・簡便で高い特異性を持っていることから、環境試料中ダイオキシン類測定法の簡易化、迅速化を目的に実用化が期待されている。すでに、抗体に酵素を標識する酵素免疫測定法（EIA法）については、市販キットを用いた実践的な評価が行われてきた。その結果、EIA法はスクリーニング技術として適用可能性はあるものの、粗抽出液の段階では、TEQ値が低い試料の場合、ダイオキシン類濃度に依存しない正の干渉を受けることが問題として報告されている。

このような中で、今回、標識物質にEu（ユーロピウム）を用いた時間分解蛍光免疫測定法（Time-Resolved Fluoroimmunoassay：TR-FIA、ハイブリザイム社製）が新たに開発された。本法は、Euキレートの蛍光寿命が長いことを利用してバックグラウンドを軽減できるうえ、長波長蛍光の利用で共存物質の影響を受けにくい特徴を有しており、既存EIAキットが持つ問題点の解消が期待できる。そこで、TR-FIA法について、環境試料中ダイオキシン類の簡易測定法としての適用可能性を調査した。

(2) 検討内容

- 1) 検量線の作成（2, 3, 7, 8-TCDD）：定量可能範囲の検証・再現性
- 2) 交差反応性の確認：異性体11種類について調査
- 3) 実試料（粗抽出液）の測定：土壌および焼却灰
- 4) クリーンアップ効果の確認：硫酸処理、多層シリカゲルカラム処理

(3) 結果および考察

1) 検量線の直線範囲及び再現性

検量線を図6-5に示す。相関係数は0.961~0.996であった。直線範囲は0.05~0.4ng/well（標準液濃度5~40ng/ml、液量10 μ l）で、既存の市販EIAキットの約0.06~0.5ng/tube（同10 μ l）とほぼ同等であり、感度の優位性は認められなかった。

また、検量線用標準液の測定精度を表6-3-1に、ブランク液の繰り返しデータ（蛍光強度）の範囲（R）から求めた検量線ブランクの標準偏差（濃度）を表6-4-2に示す。単純繰り返し測定の併行精度は、5~40ng/mlの全濃度領域で変動係数CV=4~5%であった。

検量線の日間バラツキは、5~10ng/mlでCV=6~7%、20~40ng/mlでCV=10~20%と高濃度側でやや変動が大きい結果となった。検量線は、測定の都度作成することが原則であるが、相対誤差10~20%を許容すれば、少なくとも同一ロットのキットを短期間で使用する場合は、同一検量線（基準検量線）を使用することも可能である。

検出下限は、検量線用ブランク値の標準偏差の3倍（ $3\sigma_{BL}$ ）とした時、試料液濃度で2.5ng/mlであった。

2,3,7,8-TCDD(pg/well)	0	50	100	200	400
平均カウント数	112229	90275	73220	49624	26705
STDEV	12400	6310	7110	5760	4920

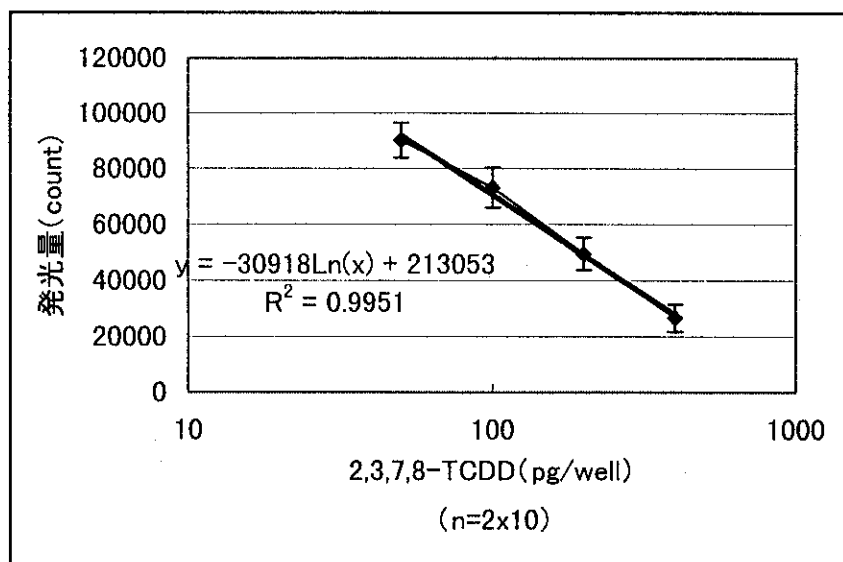


表 6-3-1 標準液の測定精度

標準液濃度 ng/ml	併行精度 CV(%)	日間 精度 CV(%)	室内再現精度 CV(%)
5	4.2	6.4	7.1
10	4.6	6.4	9.7
20	4.2	11.2	11.6
40	4.7	18.1	18.4

表6-3-2 分散分析表(一例)

(標準 10ng/ml)

変動要因	変動	自由度	分散	観測された分散比	P-値	F 境界値	期待値
日間(含ロット間)	905309694	9	100589966	8.96	0.001	3.02	$\sigma_E^2 + n\sigma_{\text{日間}}^2$
誤差	112313655	10	11231365.5				σ_E^2
合計	1017623349	19					

併行精度	: $\sqrt{V_E} = 3350$	CV=4.6%
日間精度	: $\sqrt{(V_{\text{日間}} - V_E)/n} = 6700$	CV=6.4%
室内再現精度	: $\sqrt{(\sigma_E^2/2 + \sigma_{\text{日間}}^2)} = 7110$	CV=9.7%

2) 交差反応性

本キットにおける 2, 3, 7, 8-TCDD 以外の異性体との交差反応性を調べるため、1, 2, 3, 4-TCDD, 1, 2, 3, 4-TCDF, 1, 3, 6, 8-TCDD, 2, 3, 7, 8-TCDF, 2, 4, 6, 8-TCDF, 1, 2, 3, 7, 8-PCDF, 1, 2, 3, 7, 8-PCDF, 2, 3, 4, 7, 8-PCDF, 1, 2, 3, 6, 7, 8-HCDF, 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HCDD および 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HCDF の 11 種類の異性体について 5~100ng/ml (50~1000pg/well) の濃度で各ダイオキシン類異性体の検量線を作成した。交差反応率を表 6-4 に示すが、調査した 11 種類の中では、2, 3, 7, 8-TCDF が 67%、2, 3, 4, 7, 8-PCDF が 14% の交差反応性を示した。他の異性体については 100ng/ml の濃度においても抗体と殆ど結合していなかった。

GC/MS 測定において、排ガス試料のサンプリングスパイクに用いられている 1, 2, 3, 4-TCDD や 1, 2, 3, 4-TCDF 等が本キットの抗体と結合しないことから、これらサンプリングスパイクを含む粗抽出液で本キットによるスクリーニング測定を行い、GC/MS 測定が必要なサンプルについては同じ粗抽出液から前処理を行うことが可能と考えられた。

表 6 - 4 交差反応性の確認

No.	測定値 (Counts)		PCDDs/ PCDFs	交差反応率 (%)	範囲(R) (Counts)	Rの換算濃度 (ng/ml)
	n=1	2,3,7,8- TCDD				
1	133946	2,3,7,8- TCDF		67	19801	4.6
2	128780	1,2,3,4- TCDD		N.D.	632	0.1
3	103073	1,3,6,8- TCDD		N.D.	3224	0.8
4	116005	1,2,3,4- TCDF		N.D.	708	0.2
5	114977	2,4,6,8- TCDF		N.D.	1588	0.4
6	121209	1,2,3,7,8- PCDD		N.D.	1684	0.4
7	116487	1,2,3,7,8- PCDF		N.D.	3216	0.7
8	88280	2,3,4,7,8- PCDF		14	225	0.1
9	102188	1,2,3,6,7,8- HCDF		N.D.	4606	1.1
10	100496	1,2,3,4,6,7,8- HCDD		N.D.	1432	0.4
		1,2,3,4,6,7,8- HCDF		N.D.		—

$$R_{Ave.} = 0.88$$

$$\sigma = R_{Ave.} / d_2 = 0.78$$

$$(d_2 = 1.128, n = 2)$$

N.D. : <5%

検出下限 $3\sigma_{BL} = 0.25 \text{ ng/ml}$

3) 実試料の GC/MS による測定値との比較

実試料への適用可能性を確認するため、土壌試料 4 検体、灰試料 2 検体の粗抽出液を用いて TR-FIA 測定を行い、GC/MS 測定値と比較した。結果を表 6 - 6 に示す。

TR-FIA データは、GC/MS 値と比較して約 2 ~ 1000 倍高い値が得られ、本法においても EIA 法と同様に、粗抽出液の段階ではダイオキシン類濃度に依存しない正の干渉を受けることが明らかとなった。干渉物質を除去するための前処理法と組み合わせて測定することが必要である。

表6-6 定量値の試料濃度依存性

試料	前処理区分	試料濃度 (g/ml)	DXN濃度(ng- TEQ/ml) GC/MS計算値	試料液濃度 (ng/ml)	試料中濃度 (ng-TEQ/g)	
土壌③ [0.12ng-TEQ/g] (汚泥)	ソックスレー	10	1.2	> 40	—	
		2	0.24	37.2	19	
		1	0.12	31.2	31	
		0.1	0.012	15.6	156	
		0.01	0.0012	< 2.5		
	硫酸処理	10	1.2	11.2	1.1	
		2	0.24	12.9	6.5	
		1	0.12	5.9	5.9	
		0.1	0.012	< 2.5		
	硫酸+多層	10	1.2	< 2.5	< 0.25	
	焼却灰② [28ng-TEQ/g]	ソックスレー	0.4	11.2	22.3	56
			0.08	2.24	12.3	154
			0.04	1.12	8.9	223
0.004			0.112	< 2.5		
硫酸処理		0.4	11.2	8.2	21	
		0.08	2.24	(4.7)	(59)	
		0.04	1.12	< 2.5		
多層カラム		0.4	11.2	9.4	24	
		0.08	2.24	5.5	69	
		0.04	1.12	< 2.5		
硫酸+多層		0.4	11.2	6.0	15	
		0.08	2.24	< 2.5		

検出下限: 2.5 ng/ml/試料液
 定量下限: 5 ng/ml/試料液,
 ()内は定量下限未満のデータ

4) クリーンアップ処理効果

土壌および灰試料の測定において、粗抽出液を用いた測定では正の干渉を受けることがわかったため、硫酸処理および多層シリカゲルカラムによるクリーンアップ効果を調査した結果を表6-7に示す。

表6-7 クリーンアップ効果

試料		ソックスレー (ng-TEQ/g)	硫酸処理 (ng-TEQ/g)	多層カラム (ng-TEQ/g)	硫酸+多層 (ng-TEQ/g)
土壌① 〔0.003ng-TEQ/g〕 (居住地広場)	測定値	2.2	1.6	(0.3)	< 0.25
	GC/MS値との比(倍)	720	540	(100)	< 80
土壌② 〔0.022ng-TEQ/g〕 (焼却炉周辺)	測定値	5.3	(0.39)	< 0.25	< 0.25
	GC/MS値との比(倍)	240	(18)	< 11	< 11
土壌③ 〔0.12ng-TEQ/g〕 (汚泥)	測定値	69	4.5	—	< 0.25
	GC/MS値との比(倍)	570	37	—	< 2
土壌④ 〔2.6ng-TEQ/g〕 (処理土壌)	測定値	12	< 2.5	< 2.5	< 2.5
	GC/MS値との比(倍)	4.6	< 1	< 1	< 1
焼却灰① 〔0.060ng-TEQ/g〕 (新設炉)	測定値	78	< 0.6	< 0.6	< 0.6
	GC/MS値との比(倍)	1300	< 10	< 10	< 10
焼却灰② 〔28ng-TEQ/g〕	測定値	144	21	46	15
	GC/MS値との比(倍)	5.1	0.75	1.6	0.53

検出下限: 2.5 ng/ml/試料液

定量下限: 5 ng/ml/試料液, ()内は定量下限未満のデータ

測定に供した試料濃度を粗抽出液濃度に合わせたため、クリーンアップにより夾雑物の影響が減少した試料では試料供試量が不足し、定量下限ないし検出下限以下のデータとなった。従って、クリーンアップ効果を定量的に把握するまでには至らなかったが、概略以下の知見を得た。

①土壤中干渉物質の影響は、硫酸処理によって1/2～1/10に、多層シリカゲルカラムでは1/20以下に低減できた。土壤の精製効果については、硫酸処理より多層シリカゲルカラムの方が良好な傾向を示した。

②焼却灰については、硫酸処理と多層シリカゲルカラムの効果は同程度であったが、いずれも、試料によって精製効果が大きく異なる傾向が見られた。さらにデータ数を増加させて精製挙動を把握する必要がある。

③本キットにおいて、正の干渉を及ぼしている夾雑物の非特異的吸着現象は、試料液の希釈倍率との間で比例関係が成立しない場合があり、試料供試量の変動によって測定値が変動する現象が認められた(表6-8)。

④土壤および焼却灰とも、硫酸処理や多層シリカゲルカラム処理だけでは不純物の妨害を十分に除去できない試料もあることから、さらなるクリーンアップ処理の強化やイムノアッセイ系自体に組み込まれている妨害成分の除去プロセスの最適化を検討して行くことが、今後の課題として挙げられる。イムノアッセイ操作における洗浄条件の最適化を新たな課題として検討して行くことは、イムノアッセイ系の原点である、抗原抗体反応という特異性をより生かすことにつながると期待される。

表6-8 定量値の試料濃度依存性

試料	前処理区分	試料濃度 (g/ml)	DXN濃度(ng- TEQ/ml) GC/MS計算値	試料液濃度 (ng/ml)	試料中濃度 (ng-TEQ/g)	
土壤③ [0.12ng-TEQ/g] (汚泥)	ソックスレー	10	1.2	> 40	—	
		2	0.24	37.2	19	
		1	0.12	31.2	31	
		0.1	0.012	15.6	156	
		0.01	0.0012	< 2.5		
	硫酸処理	10	1.2	11.2	1.1	
		2	0.24	12.9	6.5	
		1	0.12	5.9	5.9	
		0.1	0.012	< 2.5		
	硫酸+多層	10	1.2	< 2.5	< 0.25	
	焼却灰② [28ng-TEQ/g]	ソックスレー	0.4	11.2	22.3	56
			0.08	2.24	12.3	154
			0.04	1.12	8.9	223
			0.004	0.112	< 2.5	
硫酸処理		0.4	11.2	8.2	21	
		0.08	2.24	(4.7)	(59)	
		0.04	1.12	< 2.5		
多層カラム		0.4	11.2	9.4	24	
		0.08	2.24	5.5	69	
		0.04	1.12	< 2.5		
硫酸+多層		0.4	11.2	6.0	15	
		0.08	2.24	< 2.5		

検出下限: 2.5 ng/ml/試料液

定量下限: 5 ng/ml/試料液, ()内は定量下限未満のデータ

6-8 焼却灰試料中のダイオキシン類の簡易スクリーニング法の提案

イムノアッセイは臨床化学分野で比較的多く使用されており、廃棄物・環境分野での適用は、近年になってからである。その理由のひとつとして、試料の前処理の問題がある。臨床検体の場合は、試料は血清、尿等であり、物理化学的には一定の性状、組成を有するものである。一方、廃棄物・環境試料は、物理化学的には様々な形態、性質を有している。さらに臨床検体の場合は、測定対象物質の多くが試料中に可溶化された状態であるのに対し、廃棄物・環境試料中の測定対象物質の多くは脂溶性物質であり、媒体中より液-液抽出や固相抽出で分離しなければならない。したがって最終的な測定対象物質は有機溶媒中に存在している、しかし、イムノアッセイの抗原抗体反応は、基本的には水溶液中（緩衝溶液中）における反応であるため、試料に対しての何らかの対策が必要である。

このように、廃棄物試料の前処理であるダイオキシン類の抽出及びクリーンアップ操作に対して、妥当な精度を維持した状態で簡易・迅速化を図ることが、イムノアッセイ法の元々の優位性を活かすためには不可欠である。

以上のような観点から、本研究によって得られた種々の知見を総合し、3 ng-TEQ/gの基準が決められた焼却灰中のダイオキシン類含有量のスクリーニングが、現段階で実試料に適用できる可能性が高いケースと考えられた。その方法は、図-6に示すように、高速溶媒抽出(ASE)法による抽出、硫酸シリカゲルの簡易カラムによるクリーンアップと免疫測定法を組み合わせや試験系であり、免疫測定法には酵素免疫測定法(ELISA)、時間分解蛍光免疫測定法(TR-FIA)のいずれも適用可能である。本試験系により、使用機器等に多検体同時測定(10検体程度)の工夫がなされれば、従来の公定法に比較して、測定時間は正味で1/8程度に短縮できる。その内訳は、A社のケースの試算であるが、ソックスレー抽出16時間に対してASEが数十分、濃縮・溶媒転換・クリーンアップについて公定法が約20時間に対して簡易法が約8時間、GC-MS分析及びデータ処理の約50時間に対して簡易法が数時間となった。また、大型の設備や広いスペースを必要としないため、移動実験車などへの搭載によりオンサイト分析も可能になると考えられる。

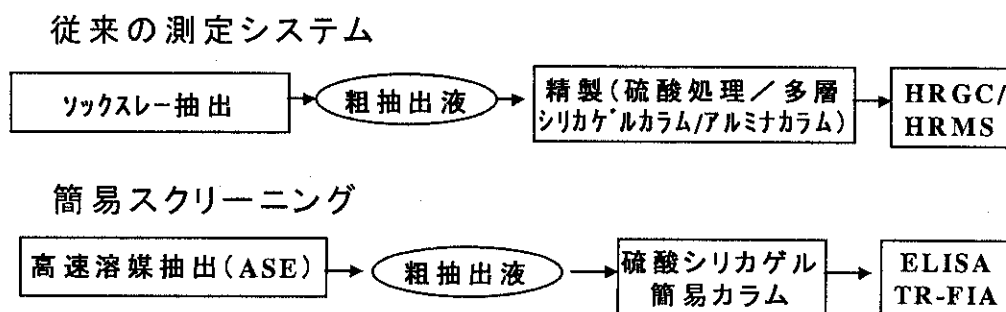


図6-6 焼却灰中のDXNsの簡易スクリーニング法の提案イメージ

有害性廃棄物の分析手法の総合化・簡素化に関する研究

総合報告書（平成9～11年度）

7-1 有害廃棄物の体系的な試験方法の検討

7-1-1 目的

廃油・汚泥等の複雑な混合系である有害廃棄物の体系的な試験方法の確立を目標にして、廃棄物の管理に容易に用いる事が出来る迅速で簡便な分析方法を確立する事を目指し、

- 1) 各種有害性物質の既存分析方法及び改良方法について体系的に整備する。
- 2) 廃棄物取り扱いにおける事故防止の観点からの廃棄物の分析方法を体系的に整理する。
- 3) 既存あるいは新規分析技術の中で実験にて検証又は技術改善が必要なものについては技術検討を行い実証する。

を計画して、分析方法の文献調査、事故事例の調査解析、及び重金属、揮発性有機化合物、残留性有機化合物、反応性化合物を対象とした分析方法の迅速化、簡素化の観点からの技術検討と実用性の評価を行い、廃棄物の管理に有効と考えられる新しい或いは改善された迅速分析方法の提題とまとめを行なう事を目的とした。

図7-1-1に廃棄物処理の流れと研究検討項目の関係を示す。

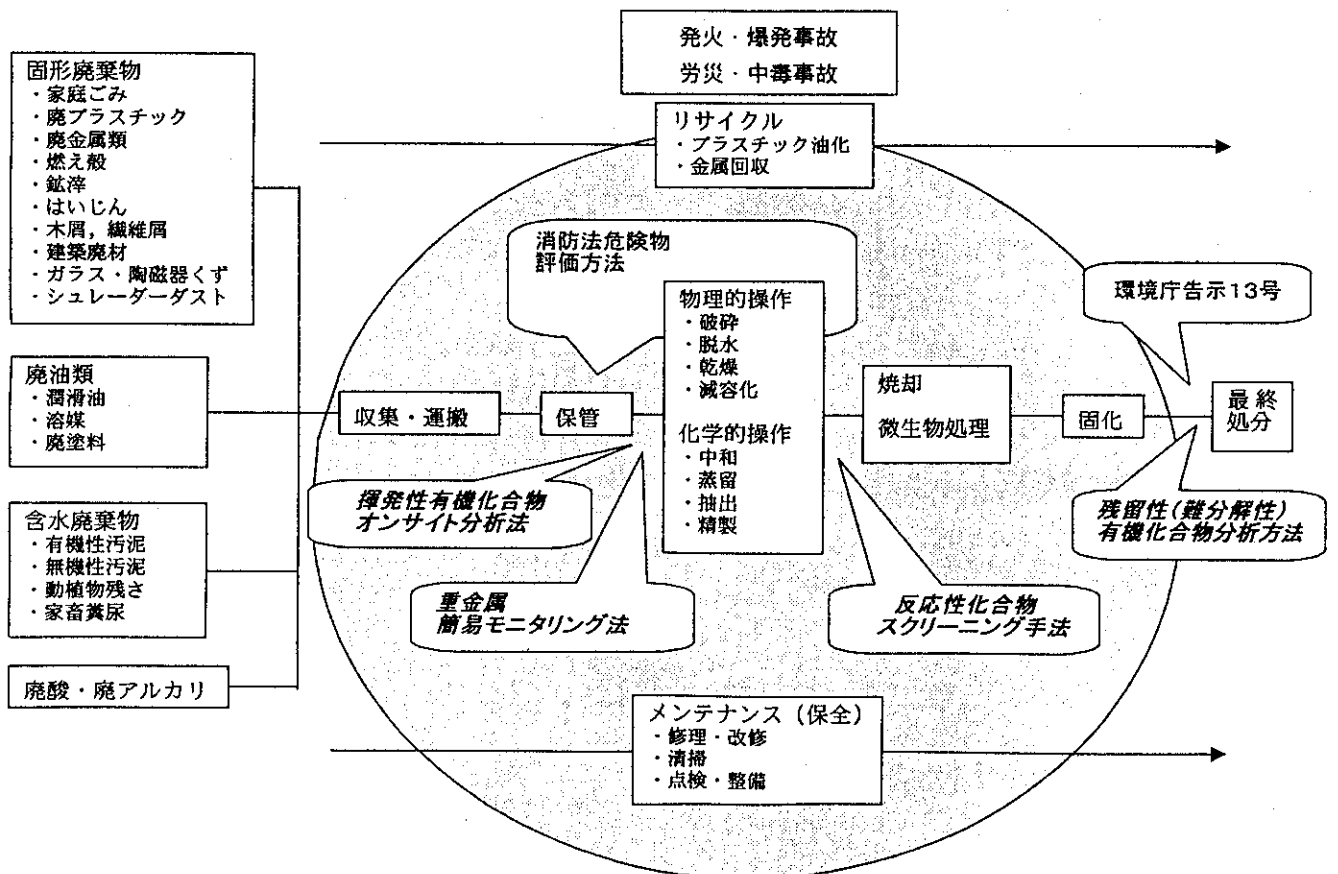


図7-1-1 廃棄物処理の流れと研究検討項目の関係

7-1-2 灰試料中金属成分の定量及び廃棄物取扱いにおける有害性・危険性評価方法の検討

1. はじめに

廃棄物の管理に容易に用いることの出来る簡易迅速分析方法の開発を目的に、焼却灰中の金属成分分析法を検討すると共に、廃棄物の有害性・危険性の評価方法の調査と事故事例の解析を行い、事故事例が多かった硫化水素ガスによる中毒に関連して廃棄物中硫黄の迅速分析法と混触反応性硫化物の危険性評価法の検討を行った。

2. 蛍光X線分析法による灰中の金属成分の定量（平成9年度）

蛍光X線分析法による金属類の分析方法は試料の分解処理を必要とせず、同時に多元素の分析が行なえるため、多くの試料を迅速に分析する有効な手法と期待される。又、近年、ファンダメンタルパラメーター法（FP法）による迅速なデータ処理が可能になって来ている。FP法は測定条件と物理定数（ファンダメンタルパラメーター）を用いて吸収効果・励起効果を考慮した蛍光X線強度を理論的に計算し、理論値と実測値を対比して、両者の差がなくなるように補正して金属元素の含有量を求める方法である。試料に含有される元素間相互の吸収励起効果が補正される事になるので、試料の複雑な組成に合わせた標準物質で検量線を作成しなくても原理的に定量が可能となる方法である。この方法が廃棄物分析に適用できれば非常に有効な方法となり得ると考え検討を行なった。

蛍光X線分析装置（理学電気工業 RIX-3100）を使用し、標準灰試料及び18種灰試料についてFP法で分析し、化学分析法（ICP-AES、原子吸光法）と比較した結果、標準灰試料では保証値記載の16種金属の内Co, Hg, Tl, As, は蛍光X線スペクトルでピークは検出されなかったが、0.5g/kg以上の金属については保証値とかなり良好な一致が見られ、ばらつきも小さい結果が得られた。標準灰試料による蛍光X線分析法分析結果と保証値との比較を図7-1-2に、標準灰試料の蛍光X線分析スペクトルを図7-1-3に示す。

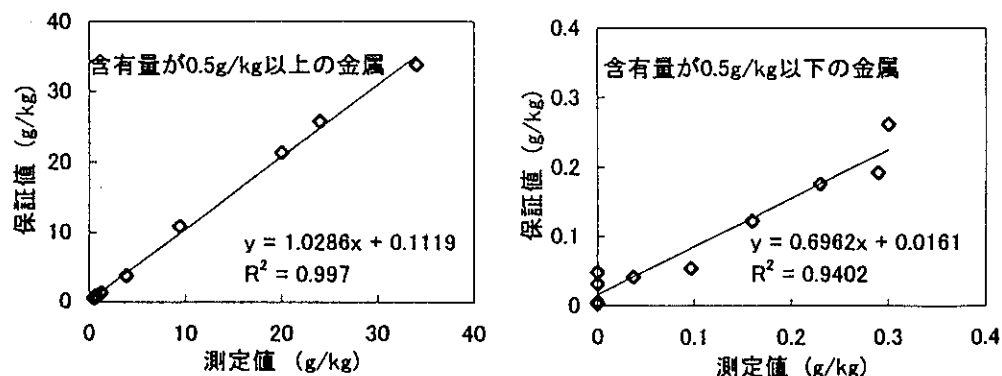


図7-1-2 標準灰試料の蛍光X線分析法分析結果と保証値の比較