

生物検定法を利用したダイオキシン類の簡易迅速測定法の検討（ばいじん等）

—千葉県ダイオキシン類迅速測定研究会，平成14年度検討結果について—

半野 勝正，依田 彦太郎，原 雄，吉澤 正，田中 崇 1)，石渡 康尊，仁平 雅子

臼杵 靖晃 2)，飯田 佐貴子 2)，小林 康男 3)，植地 俊仁 3)，山本 司 4)，中村 昌文 4)

(千葉県環境研究センター，1)千葉支庁，2)大塚製薬株式会社，3)株式会社クボタ，4)株式会社日吉)

1 はじめに

ダイオキシン類対策特別措置法により，2002年12月からは焼却施設の排ガスに対して，より厳しい恒久基準が適用された。既設焼却炉に対しては改修・改造工事が行われ，老朽焼却炉は今後，解体工事が行われる予定である。ダイオキシン類の測定に関しては現在，高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計(HR-GC/MS)による測定法が公定法として認められているが，この方法は2百数種類の異性体を個々に分離定量し，TEFを掛け合わせてTEQを算出するため，分析に時間とコストがかかりすぎ，改修・解体工事の時間及びコストを膨らませている。今回，こうした問題に対応するため，生物を用いて，生物反応を測定することにより，生物作用量を分析し，毒性を判定する生物検定法を利用した簡易迅速測定を実施している民間3社（大塚製薬—ELISA法，クボタ—Ah-イムノアッセイ法，日吉—CALUX™-Assay(ケイラックス(R)アッセイ)法)と共同で研究会を作り(「千葉県ダイオキシン類迅速測定研究会」)，各種環境試料を用いてその適用性について検討を行っている。平成14年度は，ばいじん等について検討した。

2 検討課題と結果

2-1-1 検討課題1：精製方法の統一化について

ダイオキシン類分析の迅速化には，分析自体の迅速化とともに試料の精製方法等の前処理に係る迅速化も要求されてくる。精製方法の迅速化については，各社独自の方法によりある程度確立されてきているが，一方，調整済み多層カラム等のカートリッジ製品も多数市販されている。今回，図1に示した一連のスキームに従って分析を実施し，精製方法の迅速化・統一化が図れるか検討した。①②で用いた精製法にはSupelco製スペルクリン(4層式，10%AgNO₃-silica(1g)/silica(0.2g)/44%H₂SO₄-silica(3g)/silica(0.2g)。12ml PP tube)にSupelco製Carboxen 1016(200mg)を直列に連結して使用したものである。(図2)①の全工程と②の分画精製，③のソックスレー抽出までを千葉県環境センターが担当し，それ以外を各社で行った。試料は，埋立廃棄物，ばいじん，土壌，排ガス(4試料)で保管してあったトルエン粗抽出液を使用した。

各社の精製方法の概略は，(1)ELISA法(大塚製薬)：粗抽出液→硫酸処理→多層シリカゲルクロマトグラフィー→DIOXIN ELISA (2)Ah-イムノアッセイ法(クボタ)：粗抽出液→硫酸処理→多層シリカゲルクロマトグラフィー→Ah-イムノアッセイ分析 (3)CALUXアッセイ法(日吉)：粗抽出液→硫酸シリカゲル + XDS社製カーボン系カラム処理→CALUXアッセイ分析である。

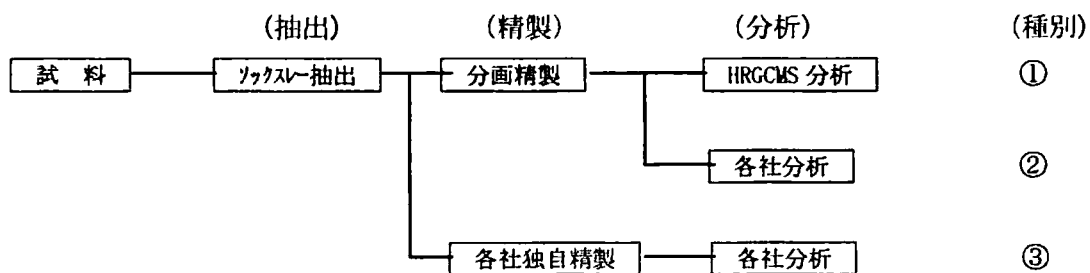


図1 分析スキーム

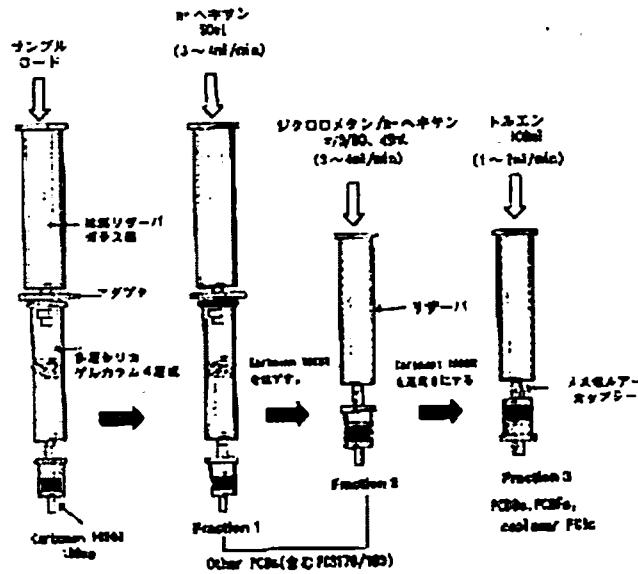


図2 分析試料の精製方法の統一化について (案)

2-1-2 検討課題1：結果

各社独自精製-分析値③/統一精製法-GC/MS 分析値①を1とした場合の統一精製法-分析値②/統一精製法-GC/MS 分析値を図3～図5に示す。

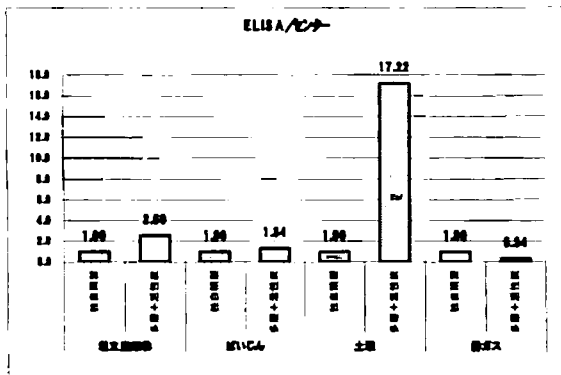


図3 ELISA法

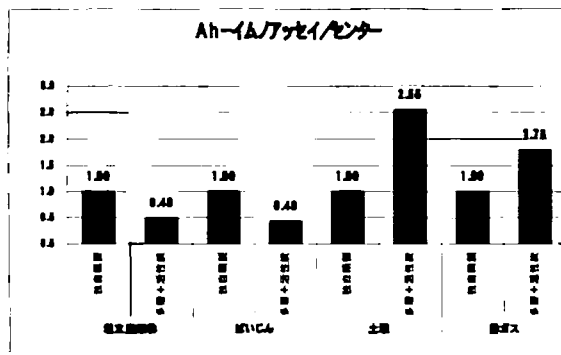


図4 Ah-イムノアッセイ法

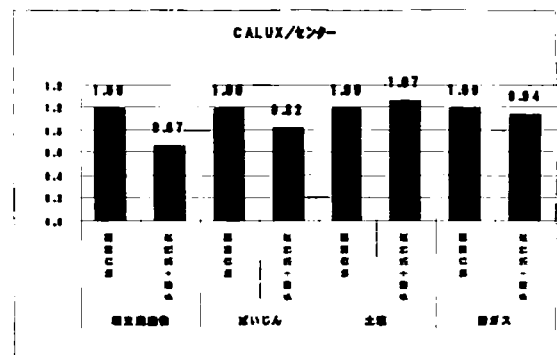


図5 CALUX-アッセイ法

(1) ELISA法は、埋立廃棄物・ばいじん・土壌において統一精製法で精製した方が高めに出了。特に、土壌は、独自精製法より17倍も高く出ている。排ガスは逆に約1/3の値であった。

(2) Ah-イムノアッセイ法は、埋立廃棄物・ばいじんが統一精製法で約半分の分析値であったが、土壌・排ガスでは、逆に2倍程度高めに出的。

(3) CALUXアッセイ法は、埋立廃棄物・ばいじんでは統一精製法がやや低めだが、概ね独自精製と同程度の検出値であった。

このように特に、ELISA法やAh-イムノアッセイ法において、統一精製法にばらつきが見られたのは、各方法に特有の交差反応性があり、特に活性炭由来の多環芳香族に対しても反応して

しまうからではないかと推測される。このような理由から、今後の検討には、統一した精製方法で行うのは効率的ではなく、各方法に適した各社独自の精製法で検討することとした。

2-2-1 検討課題2：塩酸処理の必要性について

公定法分析では、焼却灰試料の前処理として塩酸処理が義務づけられているが、この工程は、半日～1日程度多くかかる。そのため、現在行われている生物検定法の多くは、分析時間の短縮化のため、塩酸処理をせずに高圧液体抽出装置(ダイネクス社 ASE 等)により風乾後の灰試料をそのまま抽出にかける場合が多い。ばいじん・焼却灰試料においては、その生成過程の違いによる構成鉱物の

組成により、塩酸処理の有無によりダイオキシン類の分析値(TEQ 値)に2～3倍近く差が出るケースもまま見られることから、各種生物検定法による迅速測定においても確認しておく必要がある。今回は、ばいじん・焼却灰、解体工事現場汚染堆積物(17試料)について、塩酸処理の有無による生物検定法の適用性を検討してみた。検討方法は、同一試料を配布し、千葉県環境研究センターが公定法→GC/MS 分析を、民間3社がそれぞれ独自精製法→アッセイ分析を担当した。(図6)

各方法の分析フロー

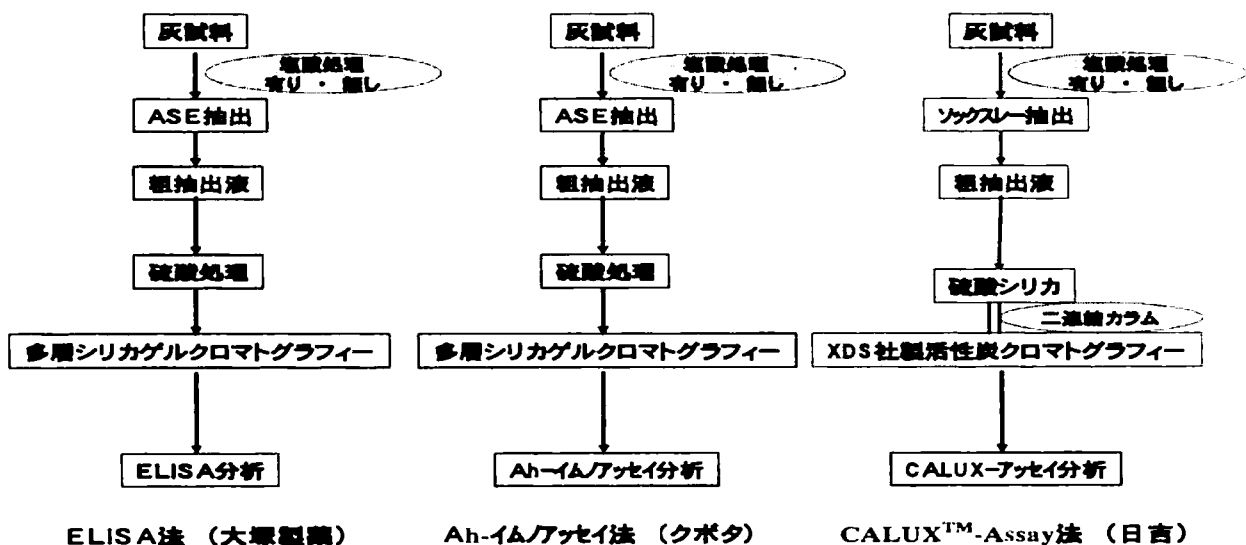


図6 生物検定各法の独自精製フロー図

2-2-2 検討課題2：結果

塩酸処理の必要性について、塩酸処理あり、なしでの各測定値の相関図を下記に示す。迅速測定値/公定法測定値(TEQ 値) = 相関倍数と定義すると、塩酸処理した場合、ELISA 法で1(1)、Ah-イム/アッセイ法で13(5)、CALUXTM-Assay(ケイラックス(R)アッセイ)法で3.5(1.7)となり(()内数字は塩酸処理なしの場合。)、塩酸処理の効果のみた結果を表1に示す。塩酸処理を施すことにより、3ng-TEQ/gの基準値に対して極めて正確に判定可能となるこ

とがわかる。特に、3ng-TEQ/g を超える試料を3ng-TEQ/g 以下と過小評価することはなくなり、測定の安全性を考慮した場合、灰試料の前処理には、塩酸処理を施すことが必要であることがわかった。しかし、現行の塩酸処理は時間を要し(半日～1日)、前処理の迅速化を阻害するものである。今後は、塩酸処理の簡易化又は塩酸処理に代わる代替前処理方法の開発が必要である。(図7、表1)

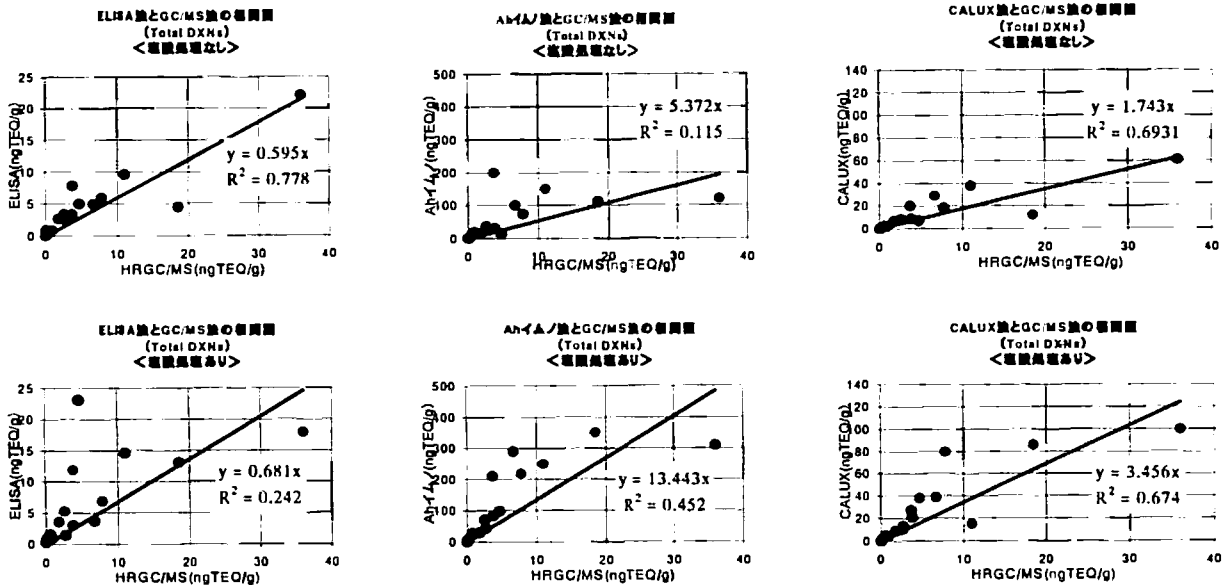


図7 塩酸処理の必要性について

結果と考察：スクリーングツールとしての評価-1

灰試料に対する精度判定表

			Assay (ng-TEQ/g)		Total
			>3.0 ngTEQ/g		
GC/MS (ng-TEQ/g)	> 3.0 ngTEQ/g	Yes	(A)	(C)	8
		No	(B)	(D)	
Total		-	-	17	

各種イムノアッセイ法・バイオアッセイ法がスクリーングツールとして使用可能となるには、公定法分析をせずとも、基準値判定ができることが、条件である。すなわち、③、④の判定が、高い確率で行えることが必要である。

①	Sensitivity $A/(A+C) \times 100$	GCMSによる測定結果が基準値オーバーであった試料のうち、各種アッセイ法で基準値オーバーであると判断できた割合
②	Specificity $D/(B+D) \times 100$	GCMSによる測定結果が基準値以下であった試料のうち、各種アッセイ法で基準値以下であると判断できた割合
③	Positive Predictive Value $A/(A+B) \times 100$	各種アッセイ法で基準値オーバーと判断した試料のうち、GCMSでも基準値オーバーであった試料の割合
④	Negative Predictive Value $D/(C+D) \times 100$	各種アッセイ法で基準値以下と判断した試料のうち、GCMSでも基準値以下であった試料の割合

表1 塩酸処理の効果について

相関倍率=1				相関倍率=5				相関倍率=1.7									
塩酸処理なし		GCMS		ELISA		塩酸処理なし		GCMS		Ah-Im/		塩酸処理なし		GCMS		CALUX	
				基準値以下	基準値超					基準値以下	基準値超					基準値以下	基準値超
GCMS	<3.0ng	9	8	1	GCMS	<3.0ng	9	5	4	GCMS	<3.0ng	9	6	3			
	3.0ng<	8	0	8		3.0ng<	8	1	7		3.0ng<	8	0	8			
相関倍率=1				相関倍率=13				相関倍率=3.5									
塩酸処理あり		GCMS		ELISA		塩酸処理あり		GCMS		Ah-Im/		塩酸処理あり		GCMS		CALUX	
				基準値以下	基準値超					基準値以下	基準値超					基準値以下	基準値超
GCMS	<3.0ng	9	7	2	GCMS	<3.0ng	9	7	2	GCMS	<3.0ng	9	8	1			
	3.0ng<	8	0	8		3.0ng<	8	0	8		3.0ng<	8	0	8			

結果と考察：スクリーニングツールとしての評価-2

各アッセイ法のスクリーニングツールとしての評価（灰試料，n=17）

塩酸処理なし			塩酸処理あり			塩酸処理なし		
①	Sensitivity $A/(A+C) \times 100$	100	①	Sensitivity $A/(A+C) \times 100$	87.5	①	Sensitivity $A/(A+C) \times 100$	100
②	Specificity $D/(B+D) \times 100$	88.9	②	Specificity $D/(B+D) \times 100$	55.6	②	Specificity $D/(B+D) \times 100$	66.7
③	Positive Predictive Value $A/(A+B) \times 100$	88.9	③	Positive Predictive Value $A/(A+B) \times 100$	63.6	③	Positive Predictive Value $A/(A+B) \times 100$	72.7
④	Negative Predictive Value $D/(C+D) \times 100$	100	④	Negative Predictive Value $D/(C+D) \times 100$	83.3	④	Negative Predictive Value $D/(C+D) \times 100$	100
塩酸処理あり			塩酸処理あり			塩酸処理あり		
①	Sensitivity $A/(A+C) \times 100$	100	①	Sensitivity $A/(A+C) \times 100$	100	①	Sensitivity $A/(A+C) \times 100$	100
②	Specificity $D/(B+D) \times 100$	77.8	②	Specificity $D/(B+D) \times 100$	77.8	②	Specificity $D/(B+D) \times 100$	88.9
③	Positive Predictive Value $A/(A+B) \times 100$	80	③	Positive Predictive Value $A/(A+B) \times 100$	80	③	Positive Predictive Value $A/(A+B) \times 100$	88.9
④	Negative Predictive Value $D/(C+D) \times 100$	100	④	Negative Predictive Value $D/(C+D) \times 100$	100	④	Negative Predictive Value $D/(C+D) \times 100$	100

ELISA法（大塚製薬）

Ah-イムアッセイ法（クボタ）

CALUX™-アッセイ法（日吉）

1. ELISA法の場合、塩酸処理の有無に関係なく、スクリーニングツールとして使用可能であった。
2. Ah-イムアッセイ法の場合、塩酸処理を施すと、スクリーニングツールとして使用可能であった。
3. CALUX™-アッセイ法の場合、塩酸処理の有無に関係なく、スクリーニングツールとして使用可能であるが、塩酸処理を施すと、より精度は向上する。
4. いずれの方法も、塩酸処理を施すことにより、スクリーニングツールとしての判定精度が向上した。

4 まとめ

以上の結果をまとめると、以下のとおりとなる。

- ① 生物検定法各法それぞれに特有の交差反応性があることから、試料精製法の統一化はせず、各方法に適した各社独自の精製法で検討することとした。
- ② 生物検定法各法で灰・ばいじん等試料を迅速測定する場合には、塩酸処理が必須である。
- ③ 相関倍数は、ELISA法：1、Ah-イムアッセイ法：13、CALUX™-Assay（ケイラックス(R)アッセイ）法：3.5を用いる。 ※相関倍数の変動係数の許容範囲については、現在検討中。
- ④ 塩酸処理は、測定の迅速化を阻害するため、今後は、塩酸処理の簡易化又は代替の前処理方法の開発が必要である。

5 参考文献

- 1) 半野勝正ら：イムノアッセイ法を利用した改修工事作業環境のダイオキシン類迅速測定について、第13回廃棄物学会研究発表会講演論文集、pp766-768 (2002)
- 2) 半野勝正ら：バイオアッセイ法を利用したダイオキシン類の簡易迅速測定法の検討、第12回環境化学討論会講演要旨集、pp334-335 (2003)
- 3) 半野勝正ら：ばいじん等の化学組成・鉱物組成と塩酸処理によるダイオキシン類分析値の変化について、第14回廃棄物学会研究発表会講演論文集、pp872-874 (2003)