

<ノート>

酵素免疫測定(ELISA)法による底質中ダイオキシン類の測定

The Determination of Dioxins in Sediments using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

臼杵 靖晃¹⁾、大野 良文¹⁾、飯田 佐貴子¹⁾、北村 和之²⁾、大石 和之³⁾、
伊佐野 隆⁴⁾、川西 龍一⁴⁾、小森 行也⁵⁾、鈴木 穰⁵⁾

1: 大塚製薬株式会社 大塚ライフサイエンス事業部 EDC 分析センター

2: 株式会社矢内原研究所

3: 積水化学工業株式会社 高機能プラスチックカンパニー メディカル事業部

4: 東洋建設株式会社 技術本部 環境エンジニアリング部 土壌環境室

5: 独立行政法人土木研究所 水循環研究グループ 水質チーム

Yasuteru Usuki¹⁾, Yoshifumi Ohno¹⁾, Sakiko Iida¹⁾, Kazuyuki Kitamura²⁾, Kazuyuki Oishi³⁾,
Takashi Isano⁴⁾, Ryuiti Kawanishi⁴⁾, Koya Komori⁵⁾, Yutaka Suzuki⁵⁾

1: Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

2: Yanaiharu Institute Inc.

3: Sekisui Chemical Co., Ltd.

4: Toyo Construction Co., Ltd.

5: Public Works Research Institute

Abstract

We collected the sediment from 25 points within about 1,000 m range of the River A in the urban area, and measured dioxins using HRGC/HRMS method as the official one and ELISA method as the simplified one. As the result of examining whether ELISA could be suitable to determine the contamination levels established by the manual for dioxins, which River Bureau Ministry of Land, Infrastructure and Transport has prepared, ELISA was considered applicable to validate the contamination levels of high concentration.

Key Words : dioxins, sediment, HRGC/HRMS, ELISA

1. はじめに

わが国におけるダイオキシン類対策については、ダイオキシン類対策特別措置法に基づく告示等により、大気、土壌、水質、底質に対してそれぞれ環境基準が定められている。現在、ダイオキシン類の測定には公定法として高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (HRGC/HRMS) が用いられている¹⁾。この方法は評価対象となる 29 種類のダイオキシン類の濃度を高感度かつ高精度に測定することが可能であるが、分析には時間とコストがかかるために、日常の自主的なモニタリングや汚染個所の確定調査等の目的に使用することは現実的には困難と考えられる。このような背景から多数の測定試料を迅速に、簡便に、しかも安価に測定できる方法として、免疫アッセイ法やバイオアッセイ法に代表される簡易測定法が注目されている。

簡易測定法の一つである ELISA 法は抗原抗体反応の特異性を利用した微量定量法である。タンパク性ホルモンなどの抗原性を有する物質と抗体との結合は非常に特異的であるので、これを利用してホルモンを測定しようとした試みは 1950 年代から始められた。1958 年 Berson と Yalow は放射性ヨードで標識したウシインスリンと、糖尿病患者血清中の抗インスリン抗体とを用いて、血清中のウシインスリンを測定することに成功し²⁾、翌年同様の方法によりヒトの血清中のインスリンを測定することに成功した³⁾。このように抗体を利用した微量測定法はほぼ半世紀という長い歴史を持ち、非常に

厳密な測定が必要とされる医療の分野において、例えば血糖をコントロールするインスリン等のヒト血中微量タンパク質の測定を行うことによって、様々な病気の診断や治療方針の決定に利用されている。このように医療の分野では ELISA 法はすでに確立された標準的な測定法であるという認識であるが、環境試料の測定という分野においては応用例が少ないのが現状である。

国土交通省河川局河川環境課では、河川、湖沼における底質のダイオキシン類対策を実施するに当たり、平成 15 年 6 月に「河川、湖沼等における底質ダイオキシン類対策マニュアル (案)」を策定した。これにより、河川、湖沼において基準値を超えるダイオキシン類汚染が半明した場合、汚染対策の一環として汚染範囲の確定作業の実施が必要となるが、公定法によるダイオキシン類の測定には多額の費用と時間を要することが問題となっている。「河川、湖沼等における底質ダイオキシン類対策マニュアル (案)」において簡易測定法の適用に関して言及しているが、ダイオキシン類の簡易測定法について具体的にまとめたマニュアル等は存在していなかった。このような状況を受け、国土交通省河川局河川環境課では、平成 16 年 7 月に「河川、湖沼底質中のダイオキシン類簡易測定マニュアル (案)」をまとめ、全国に周知することになり、この中でイムノアッセイ法を用いた簡易測定法も言及されている。

今回、我々は都市部を流れる河川 A の約 1,000m の区間の合計 25 点から底質を採取し、公定法として HRGC/HRMS 法を、簡易測定法として ELISA 法 (大塚製薬株式会社 エコアッセイ[®]ダイオキシン ELISA キット) を用いてそれぞれ底質中のダイオキシン類を測定し、上述の二つのマニュアルに定められた汚染範囲の確定作業に ELISA 法が使用できるか検討したので報告する。なお、本研究は大塚製薬(株)、(株) 矢内原研究所、積水化学工業 (株)、東洋建設 (株) と (独) 土木研究所が「共同研究」として行ったものである。

2. ELISA 法の基本性能

2. 1 測定原理

ELISA 法の測定原理は競合反応によってダイオキシン類を測定するもので、次の 3 ステップの反応から成る。

第一反応はダイオキシン類に特異的に反応するウサギ抗ダイオキシンポリクローナル抗体の一定量を固相化した 96 ウェル抗体固相化プレートの各ウェルに、ダイオキシン標準液又は適切にクリーンアップを行ったサンプルと一定量のビオチン化ダイオキシンを加えて競合的に反応させる。

反応後プレートを洗浄して未反応物を取り除いた後、第二反応はパーオキシダーゼで標識したストレプトアビジン (酵素標識ストレプトアビジン) を加えて反応させる。

反応後同様にプレートを洗浄して未反応の酵素標識ストレプトアビジンを取り除いた後、第三反応は酵素反応基質液を加えて一定時間発色させた後、硫酸でこの反応を停止させ、各ウェルの吸光度を測定し、同時に測定した既知濃度のダイオキシン標準液 (2, 3, 7-trichlorodibenzo-*p*-dioxin) から作成した標準曲線により、サンプル中のダイオキシン類濃度を求めるものである。ELISA 法の測定結果は抗体に対するサンプル中のダイオキシン類の反応性とスタンダードに使用している 2, 3, 7-trichlorodibenzo-*p*-dioxin との反応性を比較するものである。したがって、ELISA 法における測定単位は 2, 3, 7-trichlorodibenzo-*p*-dioxin equivalent (DEQ) 値として求めることとした。

2. 2 ELISA 法の適用事例

(1) HRGC/HRMS 法との関連試験について

飛灰、焼却灰、土壌の各測定試料を HRGC/HRMS 法及び ELISA 法で測定し、両者で得られた測定値の間の相関関係を求めた⁴⁾。飛灰 (32 試料)、焼却灰 (26 試料) 及び土壌 (10 試料) を用いて場合の相関関係はいずれの測定試料の場合にも、両者の間には正の有意な相関関係が認められた。また、TEQ 値と DEQ 値の間にはほぼ 1:1 の関係があると考えられた。

(2) 焼却炉の改修への適用

半野らは改修作業に伴い発生した汚染堆積物を採取し、ELISA 法を利用した迅速測定法の適用可能性を検討した⁵⁾。その結果、ELISA 法の測定値は公定法の約 2 倍で汚染堆積物を含む灰・ばいじんはいずれも非常に良い相関関係を示しており、また、ELISA 法は試料採取後 3~4 日で分析から評価まで可能であり、作業環境の灰・ばいじんによる高濃度汚染地域特定の迅速化に非常に有効な手段と思われると報告している。一方、今後の課題として前処理方法の更なる簡易化・実用化等を挙げている。

(3) 排ガス中のダイオキシン類の測定への適用

濱田らは排ガス中ダイオキシン類の採取及び抽出操作の迅速化、簡便化を目的として開発された採取用フィルターであるダイオアナ®フィルタと本ELISA法を使用して、HRGC/HRMS法で得られた毒性等量との比較を行いそれらの有用性を検討した⁶⁾。その結果、排ガス中のダイオキシン類濃度について、HRGC/HRMS法によって得られたTEQ値とELISA法によって得られたDEQ値の相関関係は相関係数0.859 (n=48, p<0.01)と良好な相関関係が得られ、ELISA法は排ガス中ダイオキシン類の測定に有効であることが示されたと報告している。一方、今後の課題として精製法に関する検討が必要としている。

3. 試験方法

3.1 底質の採取方法

底質表層の採取地点は、河川Aの特定の約1,000mの区間の25地点とした。採取地点の間隔は河川の西側ではほぼ100mとしたが、過去のダイオキシン類測定結果から特に高濃度の汚染が認められる付近では10~20mの間隔とした。河川の東側では6箇所の採取地点を設けた (Fig. 5 参照)。

底質表層の採取方法は、船上よりエクスマンバージ採泥器を用いて底質表層を採取した。1回当たりのサンプリング量は最大0.003m³ (15cm×15cm×15cm)で、よく攪拌して均一にした後、分析法毎に分割し、ガラス瓶に保存した。

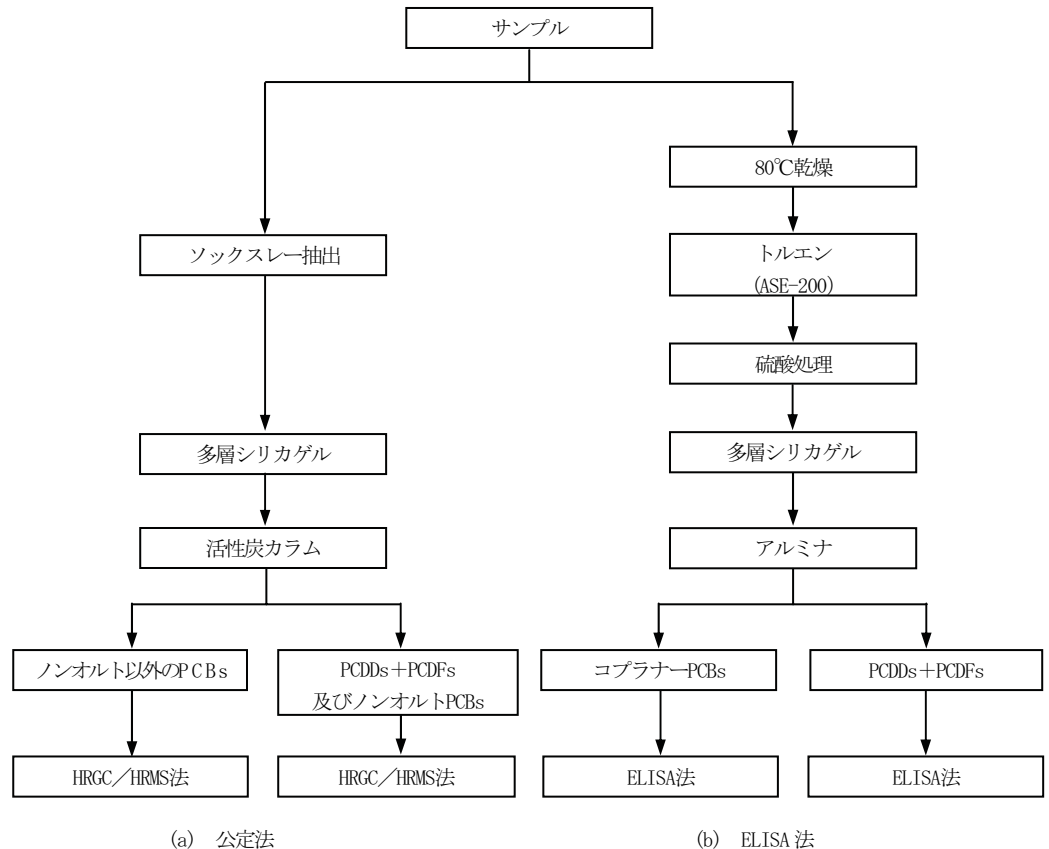
3.2 底質からのダイオキシン類の抽出・精製と測定

(1) 公定法による測定 (HRGC/HRMS法)

すべての採取地点 (25 地点) から得られた底質はダイオキシン類に係る底質調査測定マニュアル⁷⁾にしたがって測定を実施した (Fig. 1(a))。

(2) ELISA法による測定

ELISA法においても同様にすべての採取地点 (25 地点) から得られた底質を測定した。試料からのダイオキシン類の抽出法とクリーンアップ法は次のように行った (Fig. 1 (b))。すなわち、試料は汚染を受けないようによく洗浄したステンレス容器に入れ、80℃のオーブンで1時間乾燥後、2mmのふるいを通し、試料を均一化し、測定までデシケーターにて保管した。乾燥させた試料約10gを正確に秤量して採取し、高速溶媒抽出装置 (ASE-200) を用いてダイオキシン類を抽出した⁸⁾。抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、濃縮し、ヘキサンに転溶し、



(a) 公定法

(b) ELISA法

Fig.1 ダイオキシン類の抽出法とクリーンアップ法

た。この溶液を硫酸処理して多層シリカゲルクロマトグラフィーにてクリーンアップした。ここで試料をヘキサン溶液 6mL に定容した。

この内 3mL ヘキサン溶出液をそのままあらかじめコンディショニングしたアルミナカラム (和光純薬工業株式会社 プレセップ® 活性アルミナ DX) にアプライした。ヘキサン 40mL で洗浄後、5%(v/v) ジクロロメタン/ヘキサン混液 120mL でコプラナー-PCB 分画を溶出し、さらに 50%(v/v) ジクロロメタン/ヘキサン混液 160mL でポリ塩化ジベンゾダイオキシン類 (PCDDs) 分画とポリ塩化ジベンゾフラン類 (PCDFs) 分画を溶出した。二つの分画とも同様にそれぞれエバポレーターで濃縮し、濃縮液をガラス製スピッツ管に移し入れ、窒素下流下にて乾固させた。両スピッツ管にジメチルスルフォキシド (DMSO) 20 μ L を加えて、抽出したダイオキシン類を完全に溶解した。さらに、クエン酸緩衝液 100 μ L を加えて希釈し、これを ELISA 法の測定試料とした。

これらの測定試料は ELISA 法の測定方法にしたがって測定した⁹⁾ (Fig. 2)。まず、抗体固相化プレートの各ウェルを洗浄液で洗浄した後、各ウェルにダイオキシン標準液又は上記で調整した測定試料(サンプル)を 50 μ L、ビオチン化ダイオキシン 50 μ L、クエン酸緩衝液 50 μ L をそれぞれ加え、2~8°C で 18~24 時間反応させた。未反応物を取り除く目的でウェルを洗浄した後、酵素標識ストレプトアビジン 100 μ L を加え、20~30°C で 2 時間反応させた。同様に洗浄後、酵素反応基質液 100 μ L を加え、遮光して 20~30°C で 20 分反応させ、反応停止液 100 μ L を加え、各ウェルの吸光度を波長 450nm で測定した。ダイオキシン標準液の吸光度からスタンダードカーブを作成し、測定試料中のダイオキシン類濃度を計算によって読み取った。

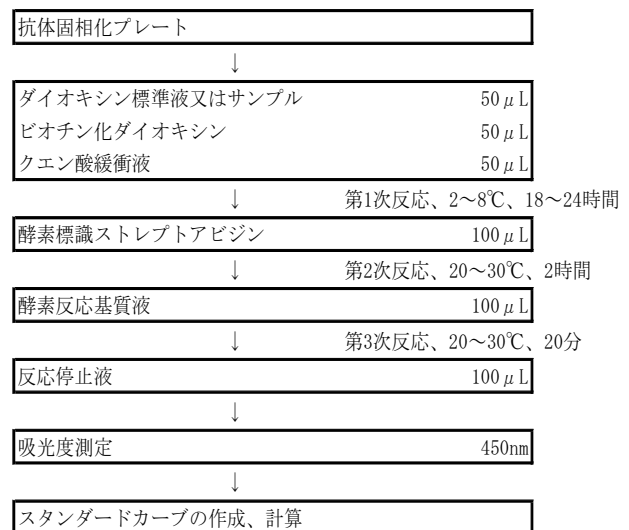


Fig. 2 ELISA測定法

4. 測定結果

4. 1 各測定法における測定値

HRGC/HRMS 法及び ELISA 法を用いて底質 25 例を測定して得られた PCDDs 分画と PCDFs 分画 (PCDDs+PCDFs 分画) の測定値及びコプラナー-PCB 分画の測定値をそれぞれ Table 1 に示した。

HRGC/HRMS 法では毒性等量 (TEQ) 値を示したが、ELISA 法の測定単位は DEQ 値を示している。

4. 2 ELISA 法で得られた DEQ 値の TEQ 値への変換

ELISA 法で求めた DEQ 値と HRGC/HRMS 法で得られた TEQ 値との間の関係を求めるために、Table 1 に示した両測定法の PCDDs+PCDFs 分画及びコプラナー-PCB 分画の二つの分画の間の相関関係を求めた。まず、PCDDs+PCDFs 分画の DEQ 値と TEQ 値との相関分析を行った結果を Fig. 3-1 及び Fig. 3-2 に示した。Fig. 3-1 ではすべての試料 (n = 25) を用いて相関分析を行った結果、回帰式 $y = 0.33x$ 、相関係数 $r = 0.250$ であった。Fig. 3-1 から判断して HRGC/HRMS での測定値が 1,000pg TEQ/g を超える試料の場合には、ELISA での測定値は低値を示す傾向にあり、また十分な相関関係がなく、二つの分画の関係を求めることは困難と思われた。その原因と

Table 1 底質中のダイオキシン類の測定結果

No.	検体名称	HRGC/HRMS法		ELISA法	
		PCDDs+PCDFs (pg TEQ/g)	コプラナー-PCB (pg TEQ/g)	PCDDs+PCDFs (pg DEQ/g)	コプラナー-PCB (pg DEQ/g)
1	st. 1_W	130	37	315	1628
2	st. 1_E	96	27	395	1435
3	st. 2_W	110	46	745	3778
4	st. 2_E	130	53	472	4101
5	st. 2-100_W	140	54	679	1929
6	st. 3_W	120	46	604	3784
7	st. 3-50_W	62	19	661	869
8	st. 4_W	180	63	1129	3210
9	st. 6_W	180	50	1391	3407
10	st. 6_E	130	40	896	1746
11	st. 8_W	220	64	219	1925
12	st. 8-40_W	410	46	646	3047
13	st. 9_W	780	25	4454	2298
14	st. 9-20_W	1400	50	871	2967
15	st. 9-30_W	7800	58	4155	3996
16	st. 9-40_W	19000	65	3480	2651
17	st. 10_W	6500	58	7256	2965
18	st. 10_E	62	22	1439	674
19	st. 10-10_W	4200	58	1569	1463
20	st. 10-30_W	810	43	1315	2105
21	st. 11_W	290	48	364	3103
22	st. 11_E	120	26	264	1672
23	st. 12_W	150	57	385	4196
24	st. 13_W	140	63	442	3733
25	st. 13_E	130	71	612	3778

してELISA法に使用している抗体はウサギに2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxinを免疫して得られた抗体であり、PCDFsに対しては毒性等価係数(TEF: Toxic Equivalency Factor)の1/10から1/100程度の反応性しか示さないこと、また、1000pg-TEQ/gを超える試料ではGC/MS法の測定結果からダイオキシン類に占めるPCDFsの比率が90%を超えていたことの二つの理由が考えられた。そこで、Fig. 3-2において、1,000pg TEQ/g以下の試料(n=20)を用いて相関分析を行った結果、回帰式 $y = 3.46x$ 、相関係数 $r = 0.635$ が得られた。この結果から判断して、PCDDs+PCDFs分画のDEQ値とTEQ値の関係は、DEQ値がTEQ値の3.5倍高いという結果が得られ、TEQ変換係数を3.5と設定した。

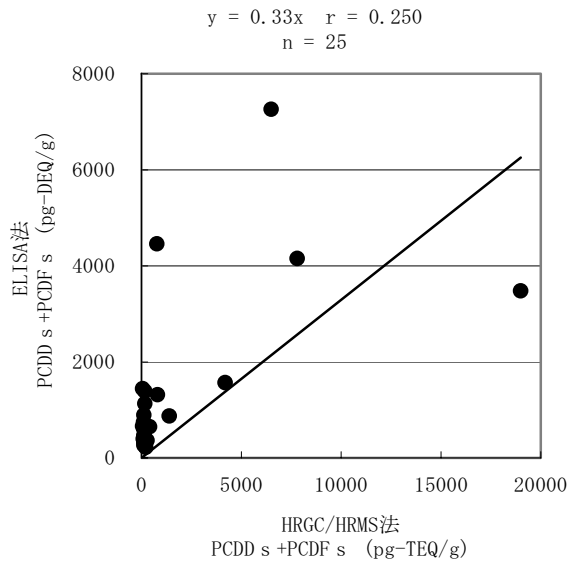


Fig. 3-1 DEQ値とTEQ値の相関分析(n=25)

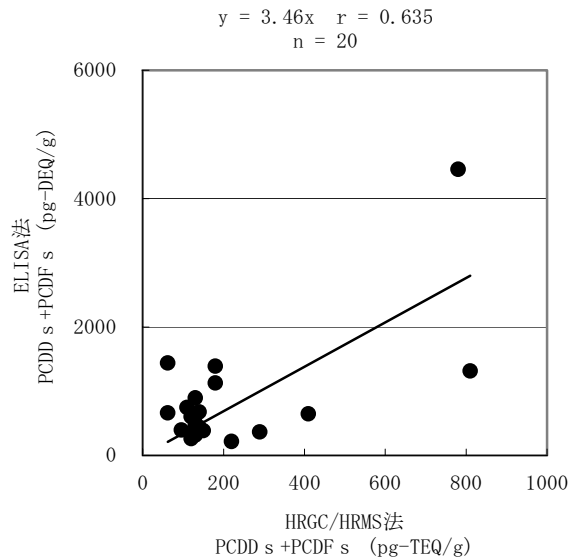


Fig. 3-2 DEQ値とTEQ値の相関分析(n=20)

次にコプラナー-PCB分画のDEQ値とTEQ値との相関分析を行った結果(Fig. 4)、回帰式 $y = 55.0x$ 、相関係数 $r = 0.620$ であった。この結果からコプラナー-PCB分画のDEQ値とTEQ値の関係は、DEQ値がTEQ値の55倍高いという結果が得られ、同様にTEQ換算係数を55と設定した。ELISA法を用いたダイオキシン類の測定原理はHRGC/HRMS法と異なるために、両測定法の間には十分な相関関係があるとは考えにくい、ELISA法を用いた測定法の目的はあくまでもスクリーニング法に限定することを前提にTEQ変換値(converted TEQ: C-TEQ)を求めた。すなわち、PCDDs+PCDFs分画及びコプラナー-PCB分画をTEQ換算係数3.5及び55でそれぞれ除してC-TEQ値へ変換し、その結果をTable 2に示した。

4. 3 詳細範囲汚染調査

平成15年に国土交通省河川局が定めた「河川、湖沼等における底質ダイオキシン類対策マニュアル(案)」においてELISA法等の簡易分析は「調査の効率的な実施及びその結果の迅速な把握のため、ダイオキシン類の簡易測定が可能な場合には、その適用を検討する。適用に当たっては、詳細範囲確定調査によって設定された汚染範囲内でスクリーニングを行う際に限る。境界の決定には公定法を用いる。」とされている。そこで今回HRGC/HRMS法及びELISA法で得られた測定結果を用いて汚染の状況を河川の平面図に測定方法毎に記載して比較した。

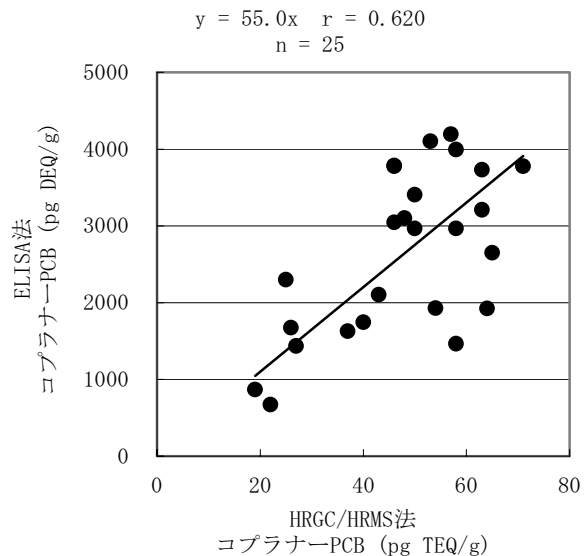


Fig. 4 DEQ値とTEQ値の相関分析(n=20)

Fig. 5 には HRGC/HRMS 法及び ELISA 法による測定結果を用いて河川 A の汚染状況をまとめたものである。各汚染のレベルを 150pg TEQ/g 以下、150pg TEQ/g を超えて 300pg TEQ/g 以下、300pg TEQ/g を超えて 450pg TEQ/g 以下、450pg TEQ/g を超えて 600pg TEQ/g 以下及び 600pg TEQ/g を越えるの 5 段階に分けて表示した。なお、ELISA 法では測定結果として C-TEQ を用いたが、ELISA 法①は HRGC/HRMS 法及び ELISA 法の全測定結果 (25 試料) を用いて相関分析を行い C-TEQ を求め、その結果から汚染状況を求めたものである。なお、採取地点は兩岸から 10m の地点であるが、両川岸から採取地点までは同一濃度とした。また、採取地点と隣接する採取地点の間の濃度は両採取地点間の濃度勾配に従うと仮定して下流方向には 10m、河川の横方向には 5m 毎に計算して求めてそれぞれ表示した。最初に HRGC/HRMS 法と ELISA 法①を比較した。st. 1 の W の採取場所での汚染状況は HRGC/HRMS 法で 160pg TEQ/g であり、底質の環境基準の 150pg TEQ/g を超えていたが、ELISA 法では 120pg C-TEQ/g で環境基準以下と判断された。st. 3-50 W では HRGC/HRMS 法での測定結果は 150pg TEQ/g 以下であったが、ELISA 法では 150pg C-TEQ/g を超えていた。st. 8 の W の採取場所での汚染状況は HRGC/HRMS 法で 280pg TEQ/g であり、底質の環境基準の 150pg TEQ/g を超えていたが、ELISA 法では 100 pg C-TEQ/g で環境基準以下と判断された。

st. 9W から st. 10-30W までの間は HRGC/HRMS 法での測定結果から 600pg TEQ/g をこえる汚染が見られる。しかし、これらの高濃度の汚染のあった採取地点の西側の採取地点である st. 10 E 及び st. 11 E では 84pg TEQ/g と 150pg TEQ/g であり、汚染は認められなかった。ELISA 法でも st. 9W から st. 10-10 W の間で高濃度の汚染が認められた。一方、HRGC/HRMS 法で汚染の認められなかった採取地点 st. 10E において ELISA 法では 420pg C-TEQ/g で汚染のある採取地点と判断できた。

これまでの結果をまとめると、汚染範囲確定調査のためには公定法である HRGC/HRMS 法を基準として、各測定法で得られた測定値から求めた汚染範囲比較した場合、HRGC/HRMS 法で環境基準を超えているにも拘わらず、対象とする測定法での測定結果が環境基準以下となる割合である偽陰性率が、ELISA 法で 8% (25 試料中 2 試料) であった。逆に HRGC/HRMS 法で環境基準以下であるにも拘わらず、対象とする測定法での測定結果が環境基準を超える割合である偽陽性率は ELISA 法では 8% (25 試料中 2 試料) であった。

しかし、各測定法で得られた汚染範囲を比較すると st. 1 付近よりも上流側で、また st. 13 付近よりも下流側で汚染が減少すると考えられる。さらに汚染状況を比較するといずれの測定法も st. 9-20 から st. 10-10 付近までが最も高濃度な汚染状況であった。

次に実際の詳細範囲確定調査においては 25 ポイントの採取地点の底質を最初に ELISA 法で測定し、その測定結果から両測定法の関係を求めるために HRGC/HRMS 法の試料を最低 5 試料選び測定することとなると考えられる。ELISA 法で得られた測定結果は PCDDs+PCDFs 分画中とコプラナー-PCB 分画中のそれぞれのダイオキシン類測定結果 (DEQ 値) があるが、ELISA 法で使用している抗体の特性を考慮する必要がある。この ELISA 法に使用している抗体の PCDDs+PCDFs 分画に対する反応性とコプラナー-PCB 分画に対する反応性をそれぞれ TEF と比較した場合には、PCDDs+PCDFs 分画では 1~1/100 程度であるが、コプラナー-PCB 分画では 100~1/10 程度である。このようにコプラナー-PCB に対する交差反応性は高く、本 ELISA 法はコプラナー-PCB をより反映した結果となり、まったく未知試料を検討する場合にはコプラナー-PCB 分画を用いた検討が良いと思われる。また、試料を選択する場合には一般的には、まず ELISA 法で得られた測定値の最大値及び最小値を選択し、さらに、両者の中間的な測定値 (中間値) をそれぞれ示す試料を選択することになる。さらに、最大値と中間値及び最小値と中間値の中間的な測定値を示す試料を選択することになるとと思われる。このようにして選択した 5 試料を

Table 2 TEQ値とC-TEQ値との比較

No.	検体名称	HRGC/HRMS法	ELISA法
		(pg TEQ/g)	(pg C-TEQ/g)
1	st. 1_W	160	120
2	st. 1_E	120	140
3	st. 2_W	160	280
4	st. 2_E	180	210
5	st. 2-100_W	190	230
6	st. 3_W	170	240
7	st. 3-50_W	81	210
8	st. 4_W	240	380
9	st. 6_W	230	460
10	st. 6_E	170	290
11	st. 8_W	280	100
12	st. 8-40_W	460	240
13	st. 9_W	810	1300
14	st. 9-20_W	1500	300
15	st. 9-30_W	7800	1300
16	st. 9-40_W	19000	1000
17	st. 10_W	6500	2100
18	st. 10_E	84	420
19	st. 10-10_W	4300	480
20	st. 10-30_W	850	410
21	st. 11_W	340	160
22	st. 11_E	150	110
23	st. 12_W	210	190
24	st. 13_W	210	190
25	st. 13_E	200	240

用いて変換係数を求めた結果、PCDDs+PCDFs 分画及びコプラナーPCB 分画の変換係数はそれぞれ5.8と61であり、25試料を用いた場合の変換係数(3.5、55)とほぼ一致した結果であった。このように求めたC-TEQを用いて汚染状況をみたものがELISA法②である。ELISA法①と同様にHRGC/HRMS法と測定結果が異なるのがみられるが、高濃度の汚染状況の確認の目的にはこの方法であっても使用できると考えられた。

5. 考察

平成15年に国土交通省河川局は「河川、湖沼等における底質ダイオキシン類対策マニュアル(案)」において初めてELISA法の使用可能性に言及した。さらにその解説において、「簡易分析法は、迅速に行うことができ、測定単価が安価な方法であることが利点として挙げられ、今後の技術開発の動向によっては有効に使うことができる。ただし、概略範囲調査においては、汚染範囲の境界を決定する際に公定法を用いることとし、詳細範囲確定調査においては、汚染範囲内でスクリーニングを行う際に使用することができる。また、簡易分析を使用する際には、公定法と簡易法の分析を5試料以上について行い、公定法と簡易分析の関係(差、分散等)をあらかじめ把握することが必要である。」としている。実際に今回はHRGC/HRMS法及びELISA法を用いて底質試料を測定し、詳細範囲確定調査に使用できるか検討した。詳細範囲確定調査のためには公定法であるHRGC/HRMS法を基準として、ELISA法で得られた測定値との乖離が問題となる。ここではELISA法の偽陰性率と偽陽性率を検討した。その結果、偽陰性率が8%(25試料中2試料)、偽陽性率も8%(25試料中2試料)であった。このようにELISA法では偽陰性率と偽陽性率はともに低く、汚染範囲の確定及び汚染状況の把握に使用できると考えられた。さらに、公定法による測定は結果の報告までに1~2ヶ月程度の時間が必要であることや測定費用が高額等の理由により、多数の検体を測定することは困難である。一方、ELISA法の最大の特長は多数の測定試料を短時間で、簡便に、安価にダイオキシン類を測定することが可能である。詳細範囲確定調査においては、多数の試料を簡便に安価に測定することが求められるが、このスクリーニングの目的にはELISA法はまさに合目的であると考えられる^{5, 6)}。

また、実際の詳細範囲確定調査においては25ポイントの採取地点の底質を最初にELISA法で測定し、その測定結果から両測定法の間係数を求めるためにHRGC/HRMS法の試料を最低5試料選び測定することとなる。このような場合にもELISA法は高濃度の汚染状況の確認には使用できると考えられた。

一方、ELISA法の測定原理はダイオキシン類と抗体との反応性を利用して測定するものである。HRGC/HRMS法ではTEFの定められたダイオキシン類の重量を正確に測定し、さらにTEFを掛け合わせて毒性等量を求めている。このように両者の測定原理はまったく異なるために、簡易測定法と公定法でそれぞれ得られた測定値を、定量的に、また条件を区切って議論する必要があ

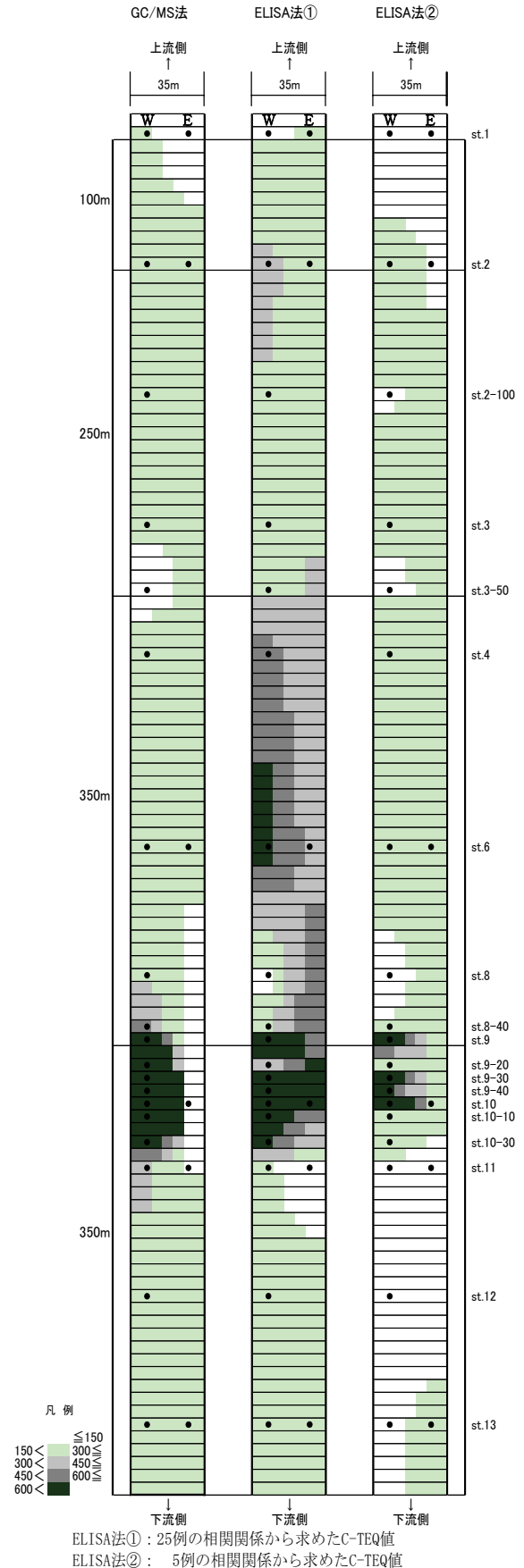


Fig. 5 測定法による汚染状況の比較

る。ELISA 法を用いてこれまで相関関係を分析した測定試料は比較的コプラナーPCB の構成比率が低い、焼却灰等の検体であった。このような場合には、アルミナカラムを用いてコプラナーPCB と PCDD s + PCDF s 分画に分ける必要はなく、また、TEQ と C-TEQ の関係はほぼ 1 : 1~2 の関係であった。今回検討した測定試料はコプラナーPCB の含量が高い底質であった。このような場合には ELISA 法に使用している抗体のコプラナーPCB に対する反応性は非常に強いために、アルミナカラムを用いてコプラナーPCB と PCDD s + PCDF s 分画に分けて、それぞれの分画を測定する必要がある。したがって、簡易測定法を用いてダイオキシン類を測定しようとする場合には、各簡易測定法の特長を測定前によく調査し、どのような利用法が可能であるかを正確に把握することが必要である⁴⁾。

6. まとめ

今回我々は都市部を流れる河川 A の約 1,000m の区間の合計 25 点から底質を採取し、公定法として HRGC/HRMS 法を、簡易測定法として ELISA 法を用いてそれぞれ底質中のダイオキシン類を測定した。「河川、湖沼等における底質ダイオキシン類対策マニュアル (案)」及び「河川、湖沼底質中のダイオキシン類簡易測定マニュアル (案)」の二つのマニュアルに定められた汚染範囲の確定作業に ELISA 法が使用できるか検討した結果、ELISA 法は高濃度の汚染状況の確認には使用できると考えられた。

参考文献

- 1) 国土交通省：河川、湖沼等における底質ダイオキシン類対策マニュアル (平成 15 年 6 月)
- 2) S. A. Berson, R. S. Yalow, *Adv. in Biol. and Med. Physics.*, **6**, 350 (1958)
- 3) R. S. Yalow, S. A. Berson, *Nature*, **184**, 1948 (1959)
- 4) 臼杵 靖晃：ダイオキシン類測定における酵素免疫測定法の応用, *環境と測定技術*, vol 30, No. 9, 14-23 (2003)
- 5) 半野勝正, 依田彦太郎, 原雄, 小嶋卓, 向後公隆, 島田和幸, 小平司, 臼杵靖晃, 小林康男, 植地俊仁：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* 766-768, (2002)
- 6) 濱田典明, 本田克久, 臼杵靖晃, 大村泰治：ELISA による排ガス中ダイオキシン類測定の有効性, *第 12 回環境化学討論会講演要旨集*, 340-341 (2002)
- 7) 環境省：ダイオキシン類に係る底質調査測定マニュアル (平成 12 年 3 月)
- 8) 坂田一登, 松本宏和, 岡本巧誠, 谷岡洋平, 藤本昇：高速溶媒抽出法と免疫測定法を組み合わせた迅速ダイオキシン分析技術, *環境資源対策*, vol. 37, No. 9, 979-983 (2001)
- 9) Ken-ichi Iwamoto, Ikuo Kato, Xinmin Yu, Shingo Nagasawa, Tuskasa Kodaira, Etsuo Oishi, Kazuyuki Kitamura, Yasuteru Usuki, Yoshifumi Ohno and Noboru Yanaihara：Application of immunoassay to microquantitation of environmental endocrine disruptors—dioxin-specific immunoassay, *Biomedical Research*, **25** (1), 9-15 (2004)

(受付 2005. 4.27)

(受理 2005. 7.22)