

13. 内分泌攪乱化学物質等の有害化学物質の簡易・迅速・自動分析技術に関する研究

担当機関 経済産業省 独立行政法人 産業技術総合研究所 環境管理研究部門 田尾博明

環境省 独立行政法人 国立環境研究所

循環型社会形成推進・廃棄物研究センター 大迫政浩

重点強化事項 計測・監視

研究期間 平成 12 年度～15 年度

平成予算総額 144,169 千円

研究の背景と目的

ダイオキシン類、PCB 類、有機スズ化合物などの内分泌攪乱作用が懸念される化学物質による環境汚染が近年、大きな社会問題となっている。化学物質による環境・健康リスクを削減するためには、汚染実態を的確に把握し、適切な対策技術や管理手法を施す必要がある。しかし現時点では、化学物質の分析に要する多大な労力・時間・コストが、早急な対策を施す上で大きな障害となっている。このため、本研究では簡易・迅速・自動分析技術を開発することにより、従来の分析法と比べて、分析に要する労力・時間・コストを 10 分の 1 以下にすることを目標とする。このため、1) 高速溶媒抽出/免疫測定法によるダイオキシン類のスクリーニング法、2) GC/ICP-MS 法による有機スズ及び PCB 類の迅速分析法、及び、3) 水晶振動子センサ法によるアルデヒド類の連続分析法を開発する。また、開発した分析法を大気、底質、廃棄物などの各種試料へ適用して実用性を評価する。

研究の成果

(1) 高速溶媒抽出/免疫測定法によるダイオキシン類のスクリーニング法の開発 (国立環境研究所)

ダイオキシン類に対するバイオ技術を用いた新しい簡易・迅速分析技術を確立するために、免疫測定法(抗原・抗体反応を利用した技術)を応用した 2 技術(1～3 年度目)及び Ah レセプター-PCR 法(ダイオキシン類の受容体である Ah レセプターへの結合性を利用した技術)を用いた 1 技術(4 年度目)の廃棄物試料への適用可能性を、複雑な性状をもつ廃棄物試料の前処理法(抽出・精製)の確立を含めて検討した。それぞれの技術の特徴を表 1-1 に示す。

まず、簡易・迅速なバイオ技術の特長を活かすための試料前処理技術について検討した。これまでの固体試料に対する 16 時間のトルエンでのソックスレー抽出に代わる方法として、30 分間の高速溶媒抽出法を用いることによって、同等の回収率を得ることができた。また、抽出試料の精製については、公定法を基に精製カラム充填剤の量を少なくし、ディスポーザブル化も可能とした方法を確立した。新たに確立した抽出から精製までの前処理法を図 1-1 に示す。

つぎに、各バイオ技術に基本的な応答特性として、標準試料による量反応関係、定量下限値、交差反応性(対象物質以外の類似物質に対する反応の程度)を把握した。その結果、時間分解蛍光免疫測定法においては、若干感度が劣り、2,3,7,8-TCDD 以外の 3 塩素化体に対しても交差反応性を示すことがわかったが、他の 2 技術については、十分な感度を有すること、交差反応性が毒性等価係数と相関があり、得られる測定値が毒性換算値(TEQ 値)と高い相関性を示す可能性を確認した。

そこで、実際の試料として一般廃棄物焼却施設のばいじん、焼却灰、排ガス、汚染土壌などの多くの試料について 3 技術を適用し、得られた結果を公定法である高分解能ガスクロマトグラフ質量分析 (HRGC-HRMS) の結果と比較検討した。公定法による TEQ 値と比較した結果のいくつかの例を図 1-2 に示す。いずれも、広い濃度範囲で良好な相関関係が認められた。前処理も含めた測定に要する時間もほぼ 1 日以内で可能であり、前処理とバイオ技術が一体となった新しい簡易・迅速分析技術を確立することができた。なお、3 年度目には免疫測定法に用いるための高感度・高選択性の新たな抗体の設計・作製を目指した研究も行ったが、十分な成果を得ることができなかった。

(2) GC/ICP-MS 法による有機スズ及び PCB 類の迅速分析法の開発 (産業技術総合研究所)

GC/ICP-MS 法はプラズマ(ICP)をイオン源とする高感度な元素検出法で、当所で独自に開発してきたものである。本研究では、まず、GC と ICP-MS とを接続するインターフェイスを改良して、分析感度をこれまで当研究で達成してきたものより、更に 10 倍の高感度化を実現した。装置の概念図を図 2-1 に示す。また、底質、生物試料、プラスチックなどに含まれる有機スズの簡便な抽出法を開発した(図 2-2 参照)。これらの抽出法は、ICP-MS の高い元素選択性のため有機物や硫黄化合物の干渉が殆どなく、従って抽出液のクリーンアップは不要であった。この結果、抽出から分析までの時間は、従来の 2 日間から約 3 時間に短縮され、しかも一般的に用いられる GC/MS に比べて感度は約 1000 倍向上した。分析精度は標準物質により確認した。また実試料に適用して、従来は分析が困難であった低濃度試料の分析を可能とすると共に、底質中でのメチル化が TBT の環境挙動や毒性に影響を及ぼす可能性を明らかにした。分析操作手順は経産省の標準化情報として、一般に公開し、分析方法の標準化を行った。また、ICP ではこれまで分析対象外とされていたハロゲン類に適用範囲を拡大することを試みた。塩素などのハロゲンはイオン化ポテンシャルが高いため、通常アルゴンプラズマ中ではイオン化効率が低い。このため、水素ガスをアルゴンガスに添加した混合ガスプラズマを利用することにより、ハロゲンのイオン化効率を 2 倍以上向上させた。これにより PCB やポリ臭素化ビフェニル(PBB)などを ICP 中で分解イオン化し、塩素イオンや臭素イオンを選択的に検出することにより、PCB や PBB の分析法を可能とした。この方法を実試料として、廃油中の PCB や PBB に適用した。有機スズの分析と同様に、優れた元素選択性のために、廃油のような試料でも、簡便な前処理(DMSO 抽出+ヘキサン逆抽出)で、分析が可能であった。これにより分析時間は 1/10 には短縮された。PCB、PBB に関しても GC/MS に比べ油分の干渉が 1/100 以下と優れていた。

(3)水晶振動子センサ法によるアルデヒド類の連続分析法の開発 (産業技術総合研究所)

近年高機能ガスセンサとして注目されている水晶振動子(QCM)を用い、選択的吸着機能を持つ鑄型重合ポリマーを検知膜としたアルデヒド類を選択的に検知するセンサを開発した。この検知原理は、水晶振動子の電極に選択的吸着機能を持つ鑄型重合ポリマーを表面に被覆し、アルデヒド類が選択的に吸着すると、基本発振周波数が減少する原理を利用している。本研究では、鑄型重合膜の合成条件や開発した鑄型重合膜を水晶振動子へ固定化する方法を検討し、簡易連続測定法を開発した。第 3-1 図に鑄型重合法による選択的吸着膜の合成および特長を示す。鑄型重合ポリマーは、測定対象物質である鑄型分子との相互作用により親和性を持つモノマーと、モノマーの橋渡しとなる架橋剤を混合し、重合後鑄型分子を取り除くことによってポリマーに鑄型分子の分子構造が写し取られ、これにより官能基の位置、立体構造などを識別す

ることが可能となる。鑄型がアルデヒド類の場合、選択的にアルデヒド類を吸着するが、他の物質の場合はほとんど吸着しないことを明らかにした。膜量に関する検討を行った結果、検知膜量 30000ng 程度で、被覆量あたりの周波数変化量が大きく、安定した発振をすることを明らかにした。今回の実験ではモノマーとして、メタクリル酸、メタクリル酸メチル、メタクリル酸エチル、メタクリル酸イソブチルを用いて比較検討を行い、鑄型を持つポリマーでは、これら四種類のすべてが濃度の増大に伴い、吸着による質量増加を明らかにした。異なる種類のモノマーを用いて感度に及ぼす影響を検討したが、メタクリル酸イソブチルを用いた場合に吸着量が最大になったことから、比較的大きな置換基を持つモノマーを使用することにより、感度向上が図れることを明らかにした。

次に、新たな簡易測定法として、薬剤と QCM を利用した手法を開発した。これは、トリクロロエチレン(TCE)などの揮発性有機塩素化合物の場合は、酸化剤として酸化鉛と硫酸をシリカゲルに担持したものを使用し、トルエンやベンゼンなどは五酸化ヨウ素と硫酸をシリカゲルに担持したものを使用する。ここで、TCE が専用の酸化剤によって、HCl を発生させ、その HCl と水晶振動子の銅電極を直接反応させることによって、またトルエンも専用の酸化剤によって、I₂ を発生させ、その I₂ と水晶振動子の銀電極を直接反応させることによって、重量変化を発振周波数変化に変換するものである(図 3-2)。この手法によって、測定の簡便性、簡易性の特長があり、また、新たに検知膜などを水晶振動子に成膜するためのコストが減少し、湿度の影響も少ないため、特別な補正回路等を組み込む必要がなくなるなどのメリットもある。

トルエンの検量線(図 3-3)を求めた結果、環境基準レベル(トルエン：約 70ppb)を十分測定可能であることを明らかにした。

研究のまとめ

本研究においては、この 4 年間に、GC/ICP-MS 装置の改良による高感度化、底質、生物試料、プラスチック中の有機スズの簡便な抽出方法の開発と標準化、廃油中の有機スズ化合物や PCB などの高感度迅速分析法の開発を行った。これにより、従来の分析時間を 1/10 以下とし、分析感度を 1000 倍向上させた。また水晶振動子センサに関しては、トリクロロエチレン等の有機塩素化合物、ベンゼン、トルエン、アルデヒド等のセンサを開発した。トリクロロエチレンやトルエンなどのセンサとして、水晶振動子電極との反応を利用した新たな水晶振動子センサを開発し、実環境へ適用して、GC/MS 法との相関を明らかにした。また、アルデヒドに関しては、鑄型重合法を用いることによりアルデヒドの選択的な吸着膜を合成し、センサ開発を行った。更に、免疫測定法を応用した 2 技術及び Ah レセプター-PCR 法を用いた 1 技術の廃棄物試料への適用可能性を検討した。それぞれの技術の基本的な応答特性として、量反応関係、定量下限値、交差反応性を把握し、十分な感度や毒性等価係数との相関性を確認した。つぎに、複雑な性状を有する廃棄物試料に適用するための試料前処理法として、高速溶媒抽出/簡易精製法を考案し、十分な効果を有することを確認した。多くの試料について 3 技術を適用し得られた結果を、公定法である HRGC-HRMS 分析結果と比較検討し、良好な相関を広い濃度範囲で認め、前処理とバイオ技術が一体となった新しい簡易・迅速分析技術を確立することができた。更に、従来の酵素免疫測定法に比較して極めて高感度な Ah レセプター-PCR 法を用いるダイオキシン類の高感度分析法の開発と廃棄物試料への適用可能性を評価することにした。

表 1-1 本研究で適用可能性の検討対象としたバイオ技術

バイオ技術名	測定法の概要
時間分解蛍光免疫測定法 (TRFIA)	抗ダイオキシン類抗体に対するダイオキシン類の結合の程度を、トレーサーとしての蛍光物質であるヨーロッパウムを標識したダイオキシン化合物との競合反応を利用して定量する。(Hybrizyme 社 DELFIA TCDD Test Kit を採用し、共同研究)
酵素免疫測定法 (ERISA)	抗ダイオキシン類抗体に対するダイオキシン類の結合の程度を、発色性の酵素を標識した二次抗体との競合反応を利用して、吸光度法により定量する。(株)タクマ/東洋紡績(株)製の Dioxin ELISA Kit を採用し、共同研究)
Ah レセプター PCR 法	ダイオキシン類と結合した Ah レセプター (Aryl hydrocarbon receptor) の量の程度を、活性化された Ah レセプターと結合した DRE プローブ (DRE を含んだ DNA 断片) を PCR (Polymerase Chain Reaction) 法で増幅し、蛍光でモニタリングしながら定量する方法。(Hybrizyme 社 AhRC PCR Test Kit を採用し、共同研究)

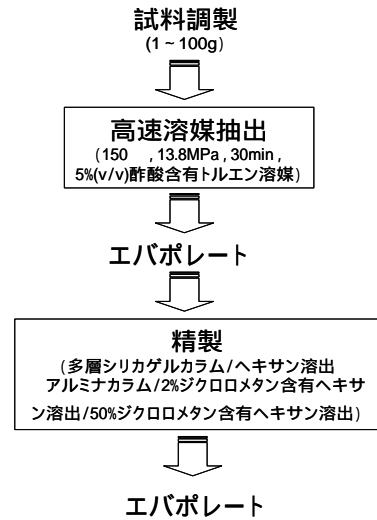
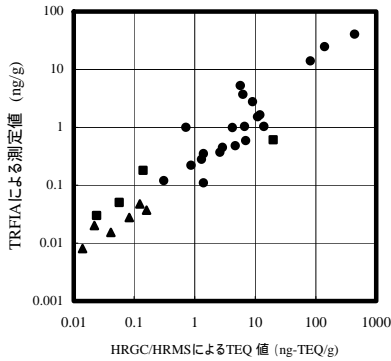


図 1-1 本研究において確立した廃棄物試料の前処理法



時間分解蛍光免疫測定法 (TRFIA) と HRGC/HRMS (TEQ) による測定値の関係 (● は焼却飛灰、■ は焼却灰 (底灰)、▲ は汚染土壌の試料を表す。)

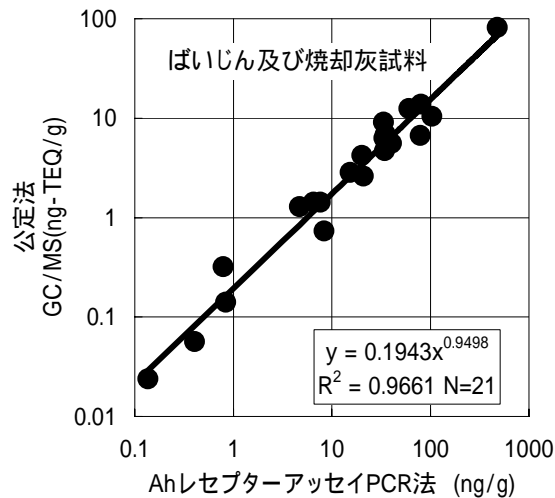
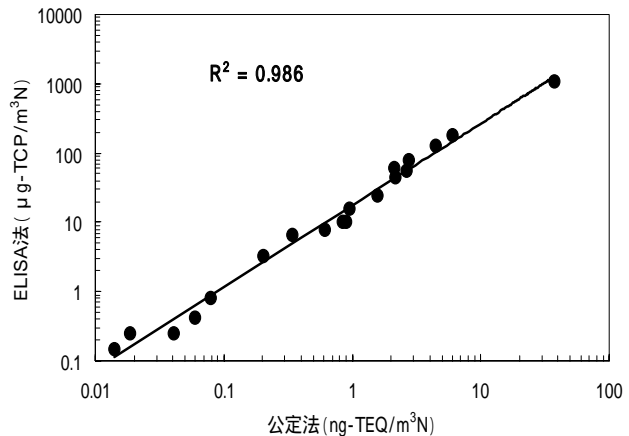


図 1-2 各バイオ技術を用いた測定値と公定法 (HRGC/HRMS) による測定値との関係

GCとICP-MSを結ぶインターフェイスの開発

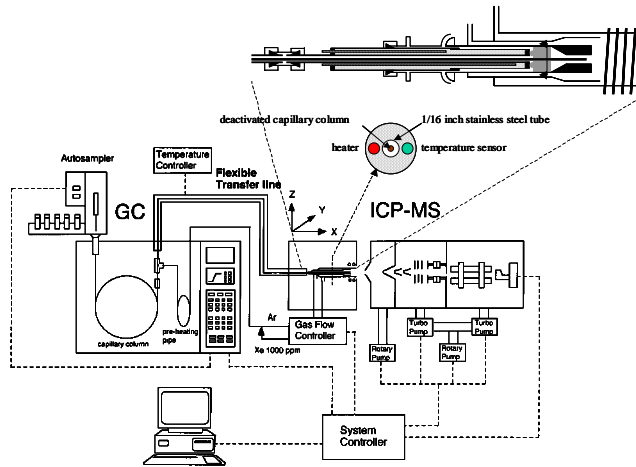


図 2-1 GC と ICP-MS とを接続する
インターフェイス概念図

生物試料中の有機スズ化合物の抽出 / 誘導体化法

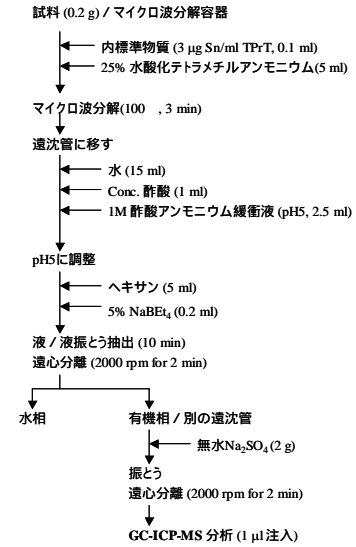


図 2-2 底質、生物試料、プラスチックなどに
含まれる有機スズの簡便な抽出法

表 2-1 検出限界の比較

technique	detection limit* (pg)	ref***
GC-FPD	0.2	4
GC-AAS	25	11
GC-MS	0.5 - 1	13
GC-MIP-AES	0.4	18
GC-MIP-AES	1	17
GC-MIP-AES	0.05**	12
GC-MIP-AES	0.15	14
GC-ICP-MS	0.3 - 0.8	23
GC-ICP-MS	0.052 - 0.17	22
GC-ICP-MS	0.015 - 0.021**	21
GC-ICP-MS	0.05	20
GC-ICP-MS	0.0007 - 0.0016**	this method
GC-ICP-MS	0.0038-0.17	this method
LC-ICP-MS	8 - 9	7
LC-ICP-MS	20 - 40	5

* method detection limit
** instrumental detection limit
*** H. Tao et al., Anal. Chem., 71, 4208-4215(1999)

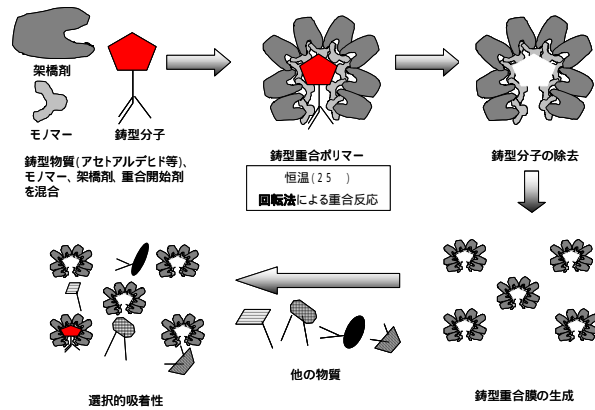


図 3-1 鋳型重合法による選択的吸着膜の合成および特徴

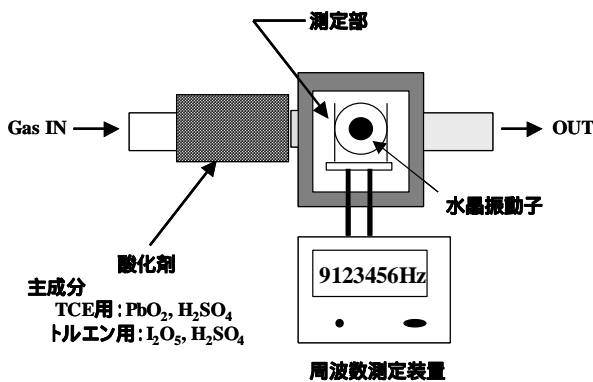


図 3-2 酸化剤と QCM による簡易測定法構成図

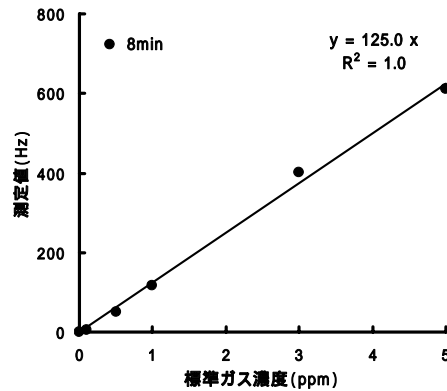


図 3-3 トルエンガス濃度と発振周波数変化量
との関係 (0-5ppm)

研究発表

発表題名	掲載法 / 学会等	発表年月	発表者
(誌上発表)			
・ Sensitivity improvement in the detection of trichloroethylene by applying oxidizing agents to the quartz crystal microbalance method	Chem. Lett., 32, 1128-1129 (2003)	2003	野田和俊, 他
・ 工業用水・工場排水中の有機すず化合物測定方法 - GC/ICP-MS 法	TR K 0007:2003	2003.4	田尾博明,
・ Preparation of a sensor device with specific recognition sites for acetaldehyde by molecular imprinting technique	Sensors and Actuators B, 86, 20-25 (2002)	2003	K. Hirayama, et al.
・ 焼却灰及び土壌中のダイオキシン類のイムノアッセイによるモニタリング	安全工学, 41, 309-316(2002)	2002.3	坂田一登, 他
・ Rapid determination of dioxins in municipal wasteincineration ash and contaminated soil using time-resolved fluoroimmunoassay	Organohalogen compounds, 54, 51-54	2001.9	M. Osako, et al.
・ A quantitative extraction method for the determination of trace amounts of both butyl- and phenyltin compounds in sediments by GC/ICP-MS	Analyst, 125, 1757-1763	2000.9	R.Babu Rajendran, et al.
(口頭発表)			
・ 複合分析法による環境水中の微量元素のスペシエーション	平成 15 年度日本分光学会春季講演会、東京	2003.5	田尾博明
・ The Simple Monitoring Method of Benzene Using Quartz Crystal Microbalance Type Sensor	SICE Annual Conference 2003, Fukui, MAI-4-2	2003.8	野田和俊, 他
・ ベンゼンの簡易測定法の開発	平成 15 年度資源・素材関係学協会合同秋季大会、宇部市	2003.9	野田和俊, 他
・ QCM 型センサによるアセトアルデヒド類の簡易検出法の開発	平成 14 年電気学会全国大会	2002.3	長縄竜一, 他
・ Determination of organohalogen compounds by GC/ICP-MS	IUPAC Inter. Cong. on Anal. Sci. 2001(ICAS2001), 東京	2001.8	田尾博明, 他
・ GC-ICP-MS and LC-ICP-MS for Elemental Speciation	PACIFICHEM2000, ハワイ	2000.12	田尾博明, 他
他 30 件			