

図1 ダイオキシン分析用自動前処理装置の機構

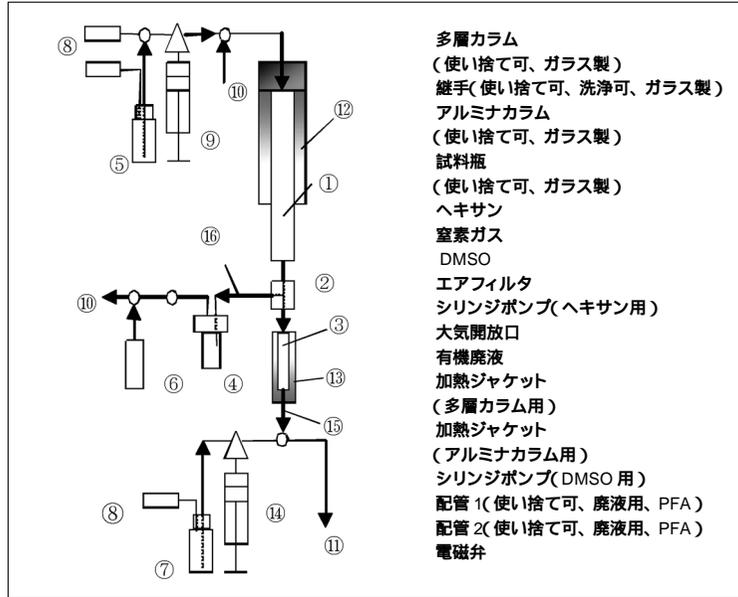
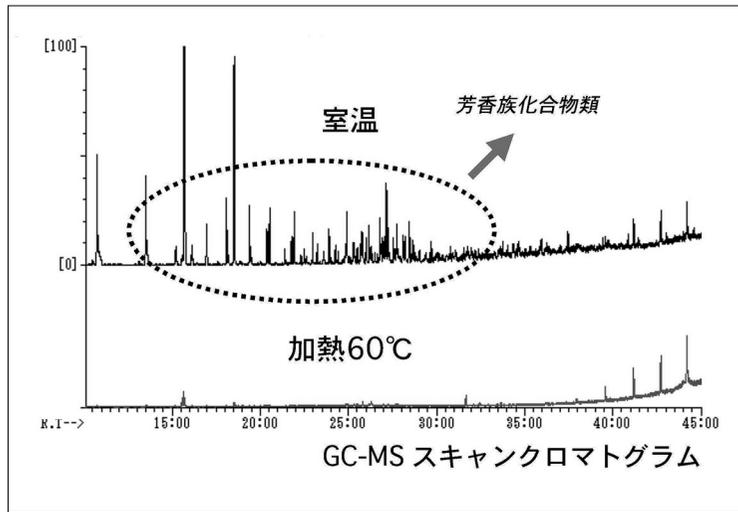


図2 加熱処理による精製効果



ダイオキシン分析用自動前処理装置 (生物検定法用)の開発

京都電子工業株式会社 研究開発本部 主任研究員 澤田石一之、片岡千和

はじめに

環境や生態系に対する内分泌攪乱物質の影響等諸問題が注目されて以来、内分泌攪乱物質の測定需要の高まりに呼応して、イムノアッセイやバイオアッセイ等の生物検定法がスクリーニング法として導入されてきた。イムノアッセイは抗原抗体反応を利用した測定系であり、臨床検査において歴史と実績を有する定量法、バイオアッセイはAh受容体を介するダイオキシン様作用を測定しようとする方法であり、それぞれダイオキシン類(PCDDs、PCDFs、Co-PCBs)に対する迅速、簡易なスクリーニング方法としてその有用性が期待されている。しかしながら、環境試料中に存在するダイオキシン類は夾雑物に対して非常に微量で検出が困難であることから、測定用

的にアルミナカラムへ展開されながら濃縮される。ダイオキシン類を吸着したアルミナカラムを加熱ジャケットで60°Cに加熱し、アルミナカラムの温度上昇後、ヘキサンを完全に除去するために試料瓶を経由して窒素ガスでDMSO溶液をリバーシ方向にシ

の試料調製(前処理)には数種のカラムクロマトグラフィーによる精製過程やエバポレータ等を用いた濃縮法が必要であり、依然として煩雑な操作を余儀なくされる。また、前処理条件の違いにより生物検定法の測定値が変動することからも、ダイオキシン類のスクリーニング法の開発には迅速かつ簡易な測定法に加え、適切な前処理技術の開発が急務である。

このため、当社では愛媛大学農学部本田克久客員教授らが開発した生物検定法用の前処理法(1)を組み込み、まず、飛灰・排ガス用のダイオキシン分析用自動前処理装置の開発を進めてきた。本装置は、試料粗抽出液の精製から濃縮および溶媒転溶を連続的に全自動で行うことが可能であり、微量分析で重要なクロスコンタミネーションの問題をなくす工夫もされている。

本装置を用いて調製した排ガス試料は、イムノアッセイ系へ適応できることが確認されており、ダイオキシン類の簡易測定の普及に貢献するものと期待される。

ダイオキシン分析用自動前処理装置 SPS-600の特徴と原理

開発した自動前処理装置は、多層シリカゲルからなる精製カラムと分離濃縮カラムを用いて粗抽出液を効率的に前処理し、生物検定法用の試料溶液ジメチルスルホキシド(DMSO)溶液を調製するシステムであり、精製カラム部を加熱処理することにより精製効率を大幅に高めている(2)。以下に、自動前処理装置の特徴を示す。

(1) 特徴(3)

JIS準拠の前処理方法

は処理されていないPAHや芳香族化合物は、加熱処理により化学修飾シリカゲルの化学反応性が向上し効率的に除去できることが確認されている(3)。

(4) 精度

排ガス試料と飛灰試料を用いた回収率と繰り返し精度の結果を表

ヘキサン転溶粗抽出液5mlを処理し、DMSO溶液1mlとして調製

九十分で処理が完了
PCDDs/PCDFs十七種類、non-ortho Co-PCBsを定量的に回収
加熱精製により有機物を低減、PAHや芳香族化合物を効率的に除去
完全自動化により人為的誤差を排除し、高い再現性を達成(RSD六%未満)

前処理済み試料を、簡単な操作でGC/MS分析用試料とすることが可能

(2) 機構

自動前処理装置の機構を図1に示す。粗抽出液(ヘキサン溶液)を多層カラムの最上段に添加し、使い捨て部品継手、アルミナカラム、試料瓶、配管(1)とともに装置にセットする。

多層カラムは加熱ジャケットにより60°Cに加熱され、カラム内部の温度上昇後、多層カラム上部からヘキサンをシリンジポンプで送液する。多層カラムにより精製された溶出液は、連続

に示した。

いずれも高い回収率と繰り返し精度を示しており、スパイク(13C)添加による濃度補正のない生物検定法用試料として、最も重要な安定した試料調製を行うことが可能となっている。

自動前処理装置で調製した排ガス試料のELISA系による評価

排ガス試料について、自動前処理装置で調製した試料と、生物検定法に多用される多層シリカゲルカラムにより精製した試料とを留意し、ELISA系で評価を行った。

特異性の異なる抗体を使用した二種類のELISAキットを用いて各試料の希釈試験を行ったところ、多層シリカゲルカラム処理では直線性が成立しない試料が見られたが、本装置調製試料ではGC/MS値とELISA値の間に良好な直線性が得られ(図3)、多層シリカゲルカラム処理ではマトリクス影響の排除が不十分であるが、本装置調製試料ではELISA系への適応に十分な精製度を有

図5 バイオセンサー値とGC-MS値との相関

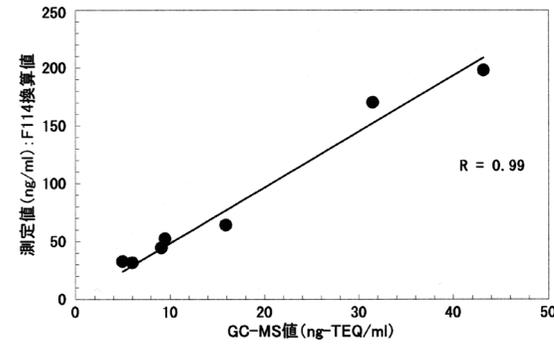


図4 ELISA値とGC-MS値との相関

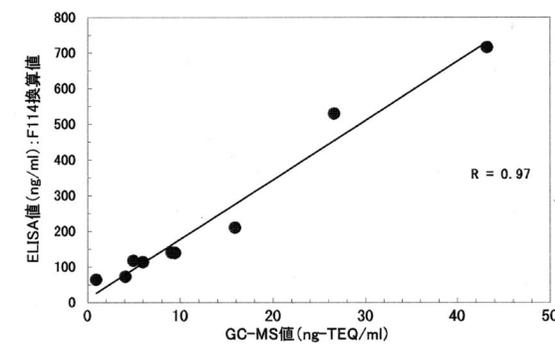
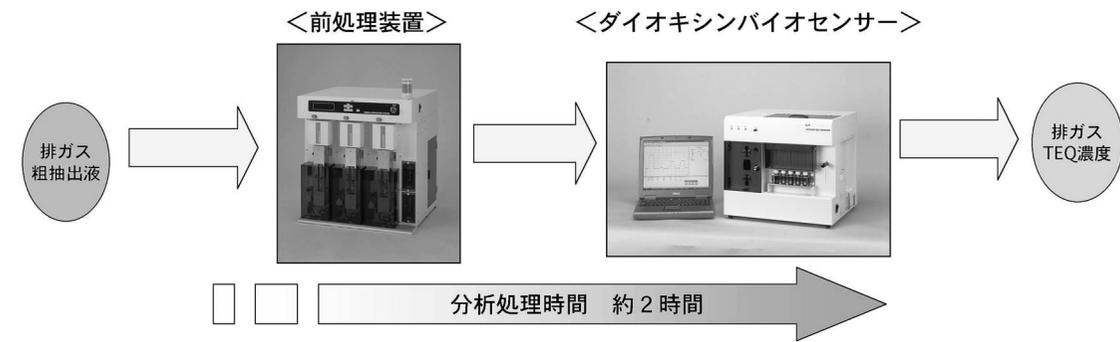


図6 ダイオキシン簡易分析システム



本方式は従来のイムノアッセイに比べ検出感度や迅速性に優れていることから、本方式を基にさらに精度の高いバイオセンサーとしての製品化を進め、自動前処理装置と組み合わせたダイオキシン簡易測定システムの構築を目指している。

図5に示すように、自動前処理装置とバイオセンサー(イムノアッセイ)の組み合わせ(図6)により得られた排ガス試料測定値とGCMS値の間に、ELISA系と同様に良好な相関(R=0.99)が見られ、自動前処理装置で調製した排ガス試料は、市販のELISA系のみならず、土壤中ダイオキシン類への適応も目指し、本自動前処理装置の精製条件の改良を進めてお

今後の展望

ダイオキシン分析用自動前処理装置により、イムノアッセイに適合できる試料を短時間で容易に調製できることを確認した。本装置の高い精製効率は、PAH等の影響が問題とされるバイオアッセイに対して有効であることが期待される。

- 「生物の持つ機能を利用した環境中化学物質の高感度検出・計測技術の開発」の一環として研究開発が進められている。
- 参考文献
- (1) 藤田寛之他：第十二回環境化学討論会講演要旨集、三栄堂、二〇〇三年
 - (2) Fujita H., et al.: Organohalogen Compounds, in Press
 - (3) Kishino J., et al.: Organohalogen Compounds, in Press
 - (4) 高木陽子他：YAKUGAKU ZASSHI 123, suppl.1, 84-85, 2003
 - (5) 大村直也他：環境管理、二〇〇三年三月号、一五〇〜一五六ページ
 - (6) Glass T. R., et al.: Biosensors & Bioelectronics, in Press, 2004

問い合わせ先
京都電子工業株式会社
環境機器部ダイオキシンプロジェクト
TEL: 03-3233-7336
FAX: 03-3233-0537
Eメール: tokyo@kem.co.jp
URL: http://www.kyoto-kem.com

ダイオキシン類簡易測定の実現を目指したトータルシステム

当社では、ダイオキシン類をはじめとした種々の内分泌攪乱物質の抗体とイムノアッセイ系の開発を行っており、開発抗体の評価には、電力中央研究所の大村らが開発したフローセルを用いる方式(6) (本法は Kinetic Exclusion Assay: KEXA を測定原理とするフロー式バイオセンサーである Endo-BioSensor™) を利用する方法である)を採用している。

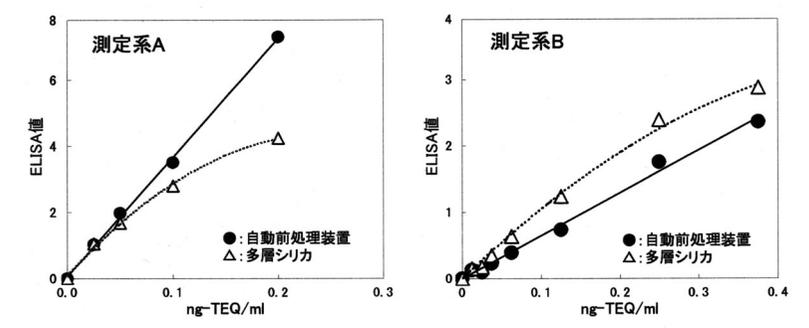
また、当社で開発した2,3,4,7,8-PeCDF (ニタ) に高い反応性を示す抗ダイオキシンモノクローナル抗体(4)を用いたELISA系を構築し、本装置で調製した排ガス試料七検体についてELISA値とGCMS値を比較したところ、良好な相関(R=0.97)を示した(図4)。

これらの結果から、排ガス試料において、自動前処理装置によりELISA系に適した試料調製が可能であることが示された。

表 排ガス・飛灰試料調製時の回収率と繰り返し精度

	排ガス試料(n=3)		Recovery internal-STD	飛灰(n=3)		Recovery internal-STD
	Conc.(pg/ml)	RSD(%)		Conc.(pg/ml)	RSD(%)	
2,3,7,8-TeCDD	80	2	92	88	2	90
1,2,3,7,8-PeCDD	390	4	95	1,100	0.5	94
1,2,3,4,7,8-HxCDD	290	5	94	1,600	2	100
1,2,3,6,7,8-HxCDD	420	6	96	3,400	2	99
1,2,3,7,8,9-HxCDD	340	6	92	2,900	0.4	100
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	1,700	3	88	26,000	0.3	92
OCDD	1,700	2	84	37,000	1	95
2,3,7,8-TeCDF	570	5	91	360	3	90
1,2,3,7,8-PeCDF	910	0.8	92	940	0.4	91
2,3,4,7,8-PeCDF	890	3	91	1,300	0.4	91
1,2,3,4,7,8-HxCDF	810	0.7	93	2,000	3	93
1,2,3,6,7,8-HxCDF	720	1	85	2,000	0.9	85
1,2,3,7,8,9-HxCDF	49	6	101	190	3	98
2,3,4,6,7,8-HxCDF	700	0.6	89	3,000	2	91
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	1,700	3	82	9,700	0.5	83
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	190	3	86	1,300	3	86
OCDF	530	3	82	5,400	2	86
3,4,4',5'-TeCB(#81)	440	0.6	72	220	0.9	71
3,3',4,4'-TeCB(#77)	1,300	0.7	73	660	3	76
3,3',4,4',5'-PeCB(#126)	710	1	71	760	4	69
3,3',4,4',5,5'-HxCB(#169)	167	3	72	360	3	71

図3 各測定系による希釈曲線



SA系のみならず、バイオセンサーを利用したイムノアッセイにも適応できることが明らかとなった。自動前処理装置とバイオセンサーを組み合わせることににより、排ガス試料粗抽出液をセットしてから二時間以内でダイオキシン濃度測定ができる、ダイオキシン簡