

◆特集：公共工事で遭遇する土壤汚染問題への対応について◆

土壤中ダイオキシン類の簡易測定技術の開発

守屋 進*

1. はじめに

ダイオキシン類は、環境汚染物質の中でも社会的関心の高い非意図的生成物質であり、健康影響の未然防止の観点から対策が求められている。ダイオキシン類の土壤汚染については、「ダイオキシン類に係る土壤調査測定マニュアル」(環境庁水質保全局土壤農薬課、平成12年1月、以下、公定法という)によることが定められている。しかし、公定法は、土壤試料をソックスレー抽出法(16時間以上)で抽出後、多層シリカゲルカラムクロマトグラフ、活性炭カラムクロマトグラフで精製し、その後高分解能ガスクロマトグラフ・質量分析計で毒性を持つ全てのダイオキシン類異性を個別に定量し、毒性等価係数(2,3,7,8-TeCDD Toxicity Equivalency Factor)を乗じて、毒性等量の合計を求める方法であり、高価な分析装置と熟練した分析技術者が必要で、分析に時間を要する分析費用の高い方法である。

そのため、分析時間を短縮し迅速にダイオキシン類の毒性等価量が推定でき、土壤環境基準値を超えていないことを安全側で判定できる簡易測定法を開発した。ただし、簡易測定法は、公定法に代わるものではなく公定法の補完的な位置づけであり、スクリーニングやモニタリング等に適用するものである。

2. 実験方法

簡易測定法は、試料の前処理(抽出・精製)を迅速化した迅速前処理法と、測定法を簡便にした簡易分析法を目的や現場条件に応じて組合わせてダイオキシン類による土壤汚染の有無を迅速に判断する方法である。簡易測定法の適用性は、迅速

前処理法(抽出・精製)と簡易分析法を組合せた簡易測定法で測定した結果を同じ試料を公定法で測定した結果とを比較して評価した。

比較検討に用いた試料は、焼却炉周辺の土壤(関東地方)10試料、工場跡地土壤(四国地方)4試料、有機質を多く含む土壤(関東地方)にダイオキシン濃度既知の飛灰を添加して濃度調整した6試料の計20試料である。

2.1 迅速抽出法

土壤中のダイオキシン類の存在量は、 $\text{ng} \sim \mu\text{g}/\text{kg}$ (濃度)の極微量であり、その測定にあたっては、土壤から疎水性物質であるダイオキシン類を有機溶媒で抽出・濃縮する必要がある。迅速抽出法として高速溶媒抽出法と加熱流下抽出法を検討した。

2.1.1 高速溶媒抽出法

高速溶媒抽出法は、溶媒にアセトンかトルエンを用いる。含水試料はアセトンが適しているが、風乾した試料では妨害物質を排除する効率の良いトルエンを用いることができる。本研究では、迅速性の観点から土壤試料20gについてアセトン20mlで2回抽出を行った。

2.1.2 加熱流下抽出法

加熱流下抽出法は、エタノールを用いて水分を除去した試料に、常圧下においてカラム上部から加熱したトルエン等の抽出溶媒を一定の線速度、押し出し流れで通液し、ダイオキシン類等を抽出する方法である。常圧で抽出を行うため、カラムや装置に耐圧性が不要で、操作条件もより安全である。

2.2 迅速精製法

抽出操作に引き続き、ダイオキシン類の測定に正または負の影響を及ぼす物質(イオウなどの無機物や対象物質の測定の妨害となる有機化合物などの妨害物質)を除去する精製を行う。公定法で

Development of Simple and Easy Measurement Technologies of Dioxins in Soil

は、粗抽出試料を濃縮して多層シリカゲルクロマトグラフ処理または硫酸処理後、シリカゲルカラムクロマトグラフ処理で精製し、さらに、高分解能GC/MSで分析するためアルミナカラムを通過後、活性炭カラム処理を行う。

迅速精製法として適用する簡易分析法に応じて粗抽出試料の精製工程の一部または全部を省略して簡易分析用の試料とした。

2.3 簡易分析法

公定法の高分解能GC/MSによる分析を、簡便な機器を用いた分析法と生物の特性を利用したイムノアッセイ法について検討した。

2.3.1 燃焼-電量滴定法

燃焼-電量滴定法は、ダイオキシン類が半・難有機ハロゲン化合物 (SNVOX) の一種であるので、有機塩素化合物の濃度を測定してダイオキシン類濃度を推定するものである。揮発性の有機塩素化合物をあらかじめ加熱して除去し、燃焼-電量滴定装置 (CC装置: TOX計) で残存したSNVOXを燃焼し、生成した塩化水素を溶解して電量滴定でSNVOXを測定する方法である。

2.3.2 四重極GC/MSによる代替物質測定

公定法の高分解能GC/MSによる分析法では、毒性を有するダイオキシン類異性体を個別に定量し、個別の異性体ごとに定められた毒性等価係数をそれぞれ乗じて毒性等量を算出している。この方法は、ダイオキシン類の異性体をすべて測定しないで公定法によるダイオキシン類の毒性等量値と相関の高い特定のダイオキシン異性体やダイオキシン類の同族体を代替指標として高分解能ガスクロマトグラフ・質量分析計より簡便な四重極GC/MSで分析する方法である。

四重極GC/MS法でダイオキシン類の指標異性体 (測定対象とし毒性等量と相関の高い異性体) として2,3,4,7,8-PeCDFまたはOCDD (8塩素化ジベンゾジオキシン) 測定する方法について検討した。四重極GC/MSによる簡易測定は、原理が簡易測定法のなかで公定法と近似しており、試料の精製もほぼ公定法に準じることが必要である。そのため、精製については、多層カラム+活性炭、3層カラム+活性炭、多層カラム、3層カラムの4

種類の精製を行った試料を用いた。

2.3.3 イムノアッセイ法

イムノアッセイ法は、ダイオキシン類に対する特異的抗体を利用する方法と、ダイオキシン類が細胞に毒性を発揮する場合、細胞のレセプターに結合することから、そのレセプターに結合する物質を免疫学的な手法で測定する方法の2種類の抗原抗体反応を応用した方法である。イムノアッセイ法は多数試料を少ない労力で処理するのに適した簡易測定法で、その特徴を活用して使用すると有用である。例えば、汚染範囲を正確に把握するためにイムノアッセイの多検体・迅速分析を生かして、サンプリング数を多くすること (サンプリング地点を密に設定するなど) も採用可能である。

(1) Ahバインディングイムノアッセイ法

ダイオキシン類の毒性発現は、細胞に存在するアリアル炭化水素受容体 (Ahレセプター) に結合する性質によるといわれている。ダイオキシン類の定量法にこの性質を利用した方法があり、アリアル炭化水素受容体バインディングイムノアッセイ (アリアル炭化水素受容体に結合する物質を酵素免疫法で検出する方法) について簡易測定法として検討した。

(2) ダイオキシン類を抗原とする抗原抗体反応を利用した方法

抗ダイオキシン類抗体を用いたイムノアッセイ法に分類される測定法である2,3,7,8-TeCDDの抗体を用いた酵素免疫法を簡易測定法として検討した。

3. 実験結果

3.1 簡易分析法

3.1.1 燃焼-電量滴定法

燃焼-電量滴定法 (CC装置: TOX計) によるSNVOXの測定は、3層カラム処理、多層カラム処理、多層カラム+活性炭処理および精製を行わない粗抽出試料の4種類の試料を用いた。

燃焼-電量滴定法によるSNVOXの測定結果と公定法によるTEQの相関関係の例を図-1に、精製法毎の相関を表-1に示す。この方法は粗抽出試料も測定可能であるが、迅速精製した試料はい

表-1 燃焼-電量滴定法の測定結果と公定法との相関 (R²) (高速溶媒抽出試料)

測定項目	粗抽出	多層+活性炭	多層のみ	3層のみ
SNVOX	0.3215	0.3156	0.5153	0.3306

表-2 四重極GC/MS法の測定結果と公定法との相関 (R²) (高速溶媒抽出試料)

測定項目	多層+活性炭	3層+活性炭	多層のみ	3層のみ
2,3,4,7,8-PeCDFの測定	0.7556	0.9199	0.7725	0.8554
OCDDの測定	0.2478	0.5435	0.2225	0.5100

ずれも公定法との相関は低かった。したがって、簡易測定法として極めて迅速に結果を得たいときなどには、精製工程を省略できるので好適と思われるが、毒性等量との相関は高くないので極めて限られた目的（緊急におおよその値が必要な場合）での適用以外の用途は少ないと思われる。

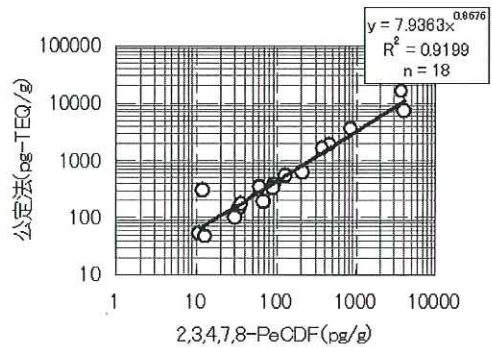
3.1.2 四重極GC/MSによる代替物質測定

高速溶媒抽出法で抽出した試料の精製法を替えた場合の四重極GC/MSで測定した結果と公定法の測定結果との相関関係の例を図-2に、精製法毎の相関を表-2に示す。多層シリカ+活性炭精製した試料以外の試料は、公定法と良好な相関が得られた。また、指標異性体としては、2,3,4,7,8-PeCDFの方がOCDDより良好な相関を示した。この結果から土壌試料においては、シリカゲルカラム処理またはシリカゲルカラム処理+活性炭の試料を四重極GC/MSで2,3,4,7,8-PeCDF濃度を測定し毒性等量を推定することが可能である。

加熱流下抽出法で抽出した試料の精製法を替えた場合の四重極GC/MSによる測定結果と公定法の測定結果との相関関係の例を図-3に、精製法

毎の相関を表-3に示す。加熱流下抽出法による抽出試料では、いずれの精製方法の試料でも公定法による高分解能GC/MSとの良好な相関が得られた。

すなわち、迅速抽出法として高速溶媒抽出または加熱流下抽出した試料について四重極GC/MSによる2,3,4,7,8-PeCDFを指標異性体として測定する方法は土壌中のダイオキシン類の簡易測定法として適用性があることが明らかとなった。



四重極 GC/MS 2,3,4,7,8-PeCDF (3層+活性炭)

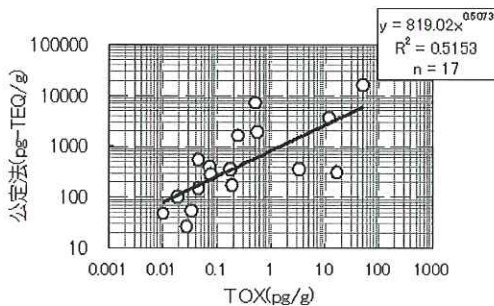
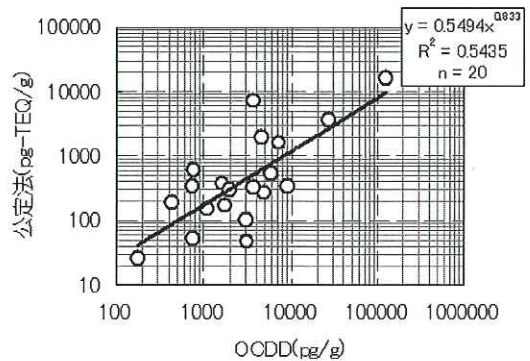


図-1 燃焼-電量滴定法 (多層のみ) と公定法の相関 (高速溶媒抽出試料)



四重極 GC/MS OCDD (3層+活性炭)

図-2 四重極GC/MS法と公定法の相関 (高速溶媒抽出試料)

表-3 四重極GC/MS法の測定結果と公定法との相関 (R²) (加熱流下抽出試料)

測定項目	多層+活性炭	3層+活性炭	多層のみ	3層のみ
2,3,4,7,8-PeCDFの測定	0.6734	0.8876	0.9577	0.9471
OCDDの測定	0.3529	0.5295	0.5610	0.6081

表-4 Ahバインディングイムノアッセイ法の測定結果と公定法との相関 (R²)

抽出法	多層+活性炭	多層のみ	3層のみ
高速溶媒抽出	0.7281	0.5127	0.6019
加熱流下抽出	0.5982	0.7268	0.6296

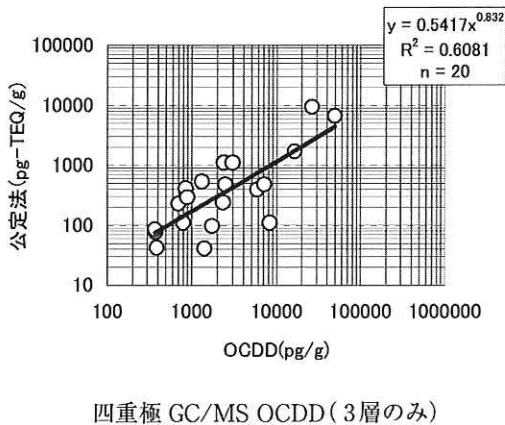
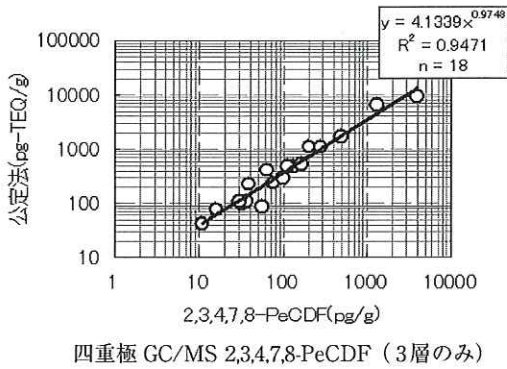


図-3 四重極GC/MS法 (3層のみ) と公定法の相関 (加熱流下抽出試料)

3.1.3 イムノアッセイ法

(1) Ahバインディングイムノアッセイ法

ダイオキシン類がアリール炭化水素受容体に結合することを利用したアリール炭化水素受容体バインディングイムノアッセイ法 (Ahバインディングイムノアッセイ) の試料は、3層シリカゲルカラム、多層シリカゲルカラム、多層シリカ+活性炭の3種類の精製を行った試料について測定を

行った。高速溶媒抽出または加熱流下抽出法による抽出の後、多層カラム+活性炭処理、多層カラムのみ、3層カラムのみの3種類の精製を行った試料の測定結果と公定法の測定結果との相関関係の例を図-4に、精製法毎の相関を表-4に示す。

高速溶媒抽出法、加熱流下抽出法のそれぞれの試料について、いずれも3層または多層シリカゲル処理で精製した試料で毒性等量と良い相関が得

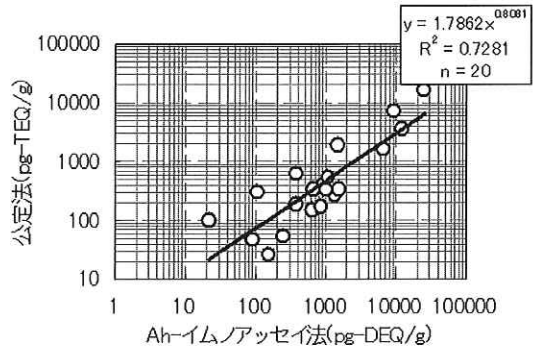


図-4 Ahバインディングイムノアッセイ法 (多層+活性炭) と公定法の相関 (高速溶媒抽出試料)

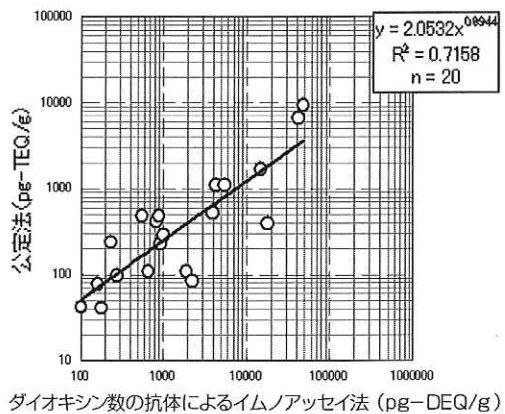


図-5 ダイオキシン類の抗体によるイムノアッセイ法 (多層のみ) と公定法の相関 (加熱流下抽出試料)

表-5 ダイオキシン類の抗体によるイムノアッセイ法の測定結果と公定法との相関 (R²)

多層+活性炭	多層のみ	3層のみ
0.6468	0.7158	0.6783

られたので、アリアル炭化水素受容体バインディングイムノアッセイは、土壤中のダイオキシン類の簡易測定法として適用可能であると判断される。

(2) ダイオキシン類を抗原とする抗原抗体反応を利用した方法

ダイオキシン類を抗原とする抗原抗体反応を利用した方法を、加熱流下抽出法で抽出後、多層シリカ+活性炭、多層シリカ、3層シリカの3種類の精製した試料の測定結果と公定法の測定結果との相関関係の例を図-5に、精製法毎の相関を表-5に示す。

活性炭による精製を行っていない試料のイムノアッセイの結果と公定法との相関は良好であったが、活性炭処理試料では公定法との相関はかえって低くなった。ダイオキシン類を抗原とする抗原抗体反応を利用した方法の結果は、加熱流下抽出の試料について良好な相関が得られた。

したがって、ダイオキシン類を抗原とする抗原抗体反応を利用した方法を簡易測定法として採用する場合は、調査対象土壌試料のダイオキシン類の毒性等量とダイオキシン類を抗原とする抗原抗体反応を利用した方法の測定値との換算係数をあらかじめ求めておくことと毒性等量の推定精度を高くすることができる。

4. まとめ

迅速前処理法（抽出法と精製法）と簡易分析法の組み合わせにより土壤中のダイオキシン類の有

無を迅速かつ簡便に測定することが可能であることが明らかとなった。表-6に現場状況による迅速前処理法（抽出、精製）と簡易分析法の組合せを示す。

(1) 個別簡易分析法

1) 燃焼-電量滴定法によるSNVOX測定

燃焼-電量滴定法によるSNVOXの結果と公定法によるTEQの結果の相関から、精製操作を行っていない粗抽出試料でも測定可能であるという特徴があるものの相関はそれほど高くなかった。しかしながら、前処理操作は高速溶媒抽出後、精製操作を行わずに、直接、燃焼-電量滴定装置で分析することが可能であるため、この方法は極めて短時間に土壤環境基準値（1,000pg-TEQ/g）以上であるか否かを判断するのに適用できる。

2) 四重極GC/MSによる2,3,4,7,8-PeCDF測定

四重極GC/MSによるダイオキシン類の指標異性体の測定結果と公定法による毒性等量を比較検討した結果、指標異性体として2,3,4,7,8-PeCDFが適当であり、また、試料の精製法としては、3層シリカまたは多層シリカを通過させた試料を用いることが可能である。なお、抽出は高速溶媒抽出法、加熱流下抽出法いずれでも良好な相関が得られた。

3) Ahバインディングイムノアッセイ法

ダイオキシン類がアリアル炭化水素受容体に結合することを利用した方法は、抽出方法の差異（高速溶媒抽出、加熱流下抽出）のいずれも、また、精製方法の異なる段階の試料のいずれも公定

表-6 現場状況による迅速前処理法（抽出、精製）と簡易分析法の組合せ

	迅速抽出法	迅速精製法	簡易分析法
検体数が少なく迅速性が要求される時	高速溶媒抽出 加熱流下抽出	不要	燃焼-電量適定法
検体数が10検体程度のとき（迅速性とコストのいずれも重視するとき）	高速溶媒抽出 加熱流下抽出	多層シリカゲルカラム+活性炭	四重極GC/MS
検体数が多いとき（20検体以上）	高速溶媒抽出 加熱流下抽出	多層シリカゲルカラム（+活性炭）	イムノアッセイ法

法の毒性等量と比較的良好な相関を示した。したがって土壌の簡易測定法としてAhバインディングイムノアッセイ法は適用可能であると判断される。ただし、簡易測定の結果から公定法の毒性等量を推定するための回帰式は測定数量を増やして精度を上げる必要がある。

4) ダイオキシン類を抗原とする抗原抗体反応を利用した方法

ダイオキシン類を抗原とする抗原抗体反応を利用した方法のうちの一つについて検討した。したがって、この検討結果は、ダイオキシン類がダイオキシン類を抗原とする抗原抗体反応を利用した方法の一般的な評価ではない。すなわち、抗原とするダイオキシン類の種類によって、抗体の特異性が異なることから、公定法のダイオキシン類の毒性等量との相関や異性体組成比の影響の受け方が異なるので注意が必要である。

(2) 簡易測定法に適した迅速前処理法（抽出、精製）の組み合わせ

1) 抽出法は、高度な高速溶媒抽出法、加熱流下抽出法ともに、公定法のソックスレー抽出法に比べて抽出時間を大幅に短縮ができることから、簡易測定法に適している。

2) 精製法は、高度な精製操作を行ったほうが公定法との相関が必ずしも良くはならないという結果が得られた。したがって、個々の簡易分析法に適した精製法で十分である。

(3) 現場の状況による簡易測定の選定

1) 検体数が少なく迅速性が要求されるとき

検体数は少ないが結果を迅速に求めたいときは、燃焼—電量滴定法でSNVOXを測定するのが、迅速性の点で優れている。CC装置（TOX計）を用いた測定法は精製を行わないことによる時間短縮効果から、結果が速やかに得られる。ただし、公定法との相関には優れないため十分に留意する必要がある。

2) 検体数が10検体程度するとき（迅速性とコストのいずれも重視するとき）

10検体程度の土壌試料の簡易測定では四重極GC/MSが適している。ある程度の迅速性が必要な場合は、抽出法を迅速化し高速溶媒抽出法また

は加熱流下抽出法を選択する必要があるが、それほど迅速性が求められないときは公定法の検体と同じラインに乗せて前処理できる。前処理法は多層シリカ処理を行った試料で良く、活性炭カラムによる精製工程までは要求されない。

測定は、2,3,4,7,8-PeCDFを指標異性体として定量し回帰式から公定法の毒性等量を求める。

3) 検体数が多いとき（20検体以上）

検体数が同時に概ね20検体以上の場合、機器分析法では、SNVOXをCC装置や四重極GC/MSで測定する場合でも、検体数に比例して1検体の必要処理時間に検体数を乗じた時間が全検体の必要時間となり、個別の測定時間は短縮されているが検体総数の総測定時間は長時間必要である。

イムノアッセイ法では、96穴のマイクロテストプレートを用いる測定法のため、検体数が増加しても測定時間に要する時間はそれほど増加しない。また、最終的な定量も吸光光度計や蛍光光度計による短時間の測定なので要する時間の増加も多くはない。検量線等に要する時間、費用は検体数に関わらず一定なので1検体あたりの単価から見ても検体数の多い場合は生物検定法を選択すると有利である。

謝 辞

本研究の実施にあたり、加熱流下抽出法についてご指導を賜りました横浜国立大学大学院環境情報研究院の浦野紘平教授ならびに加藤みか客員助教教授に深甚なる謝意を表します。

守屋 進*



独立行政法人土木研究所材料地盤研究グループ新材料チーム主任研究員
Susumu MORIYA