

イムノアッセイ(PCBセンサー)による絶縁油中PCBのスクリーニング

愛媛事業所 今西 克也

1 はじめに

ポリ塩化ビフェニル(PCB)は、電気絶縁材等で使用されたが、1973年に製造・輸入が禁止された。その後、2001年に「ポリ塩化ビフェニル廃棄物の適正な処理の推進に関する特別措置法」が制定され、既に使用されていたPCBについては、無害化処理が進められている。しかし、2003年に、現在使用されている一部の重電機器中の絶縁油が微量のPCBで汚染されている可能性が報告された¹⁾。これら汚染が疑われる重電機器は、数百万台に達すると推定され、その適正な処理のためには機器中の絶縁油に含まれるPCB濃度を明確にし、汚染の有無を判定することが急務となった。

現在、無害化前の絶縁油中のPCBを測定する公定法は存在しないが、無害化に伴う処理済み油、洗浄油などの廃油試料、底質等の環境試料には公定法または準公定法が規定されており、それらを改良して利用しているのが現状である。測定は基本的に高分解能ガスクロマトグラフ 高分解能質量分析計(HRGC-HRMS)、電子捕獲型検出器付きガスクロマトグラフ(GC-ECD)が利用されているが、いずれも前処理及び測定に数日以上を要し、費用も高価である。したがって、微量のPCBの混入が疑われる膨大な試料を日常的に測定することは現実的に難があり、これま

でにない迅速、安価な簡易測定法が求められている。

一方、近年になって環境分析でも注目されており、ダイオキシン類の測定技術として公定法化された生物検定法は、機器分析に比べて操作が簡易に行える利点がある。PCBの測定を対象とした手法としては、イムノアッセイやイムノクロマトなどが検討されている²⁾。これら生物検定法は、測定の精確性にやや劣るものの、費用や迅速性に優れている。このため、膨大な試料数となる絶縁油中のPCB測定において、汚染が疑われる試料を見つけ出すために、スクリーニングという概念を利用するのが適している。欧州では食品中のダイオキシン類の検出法としてスクリーニングが採用³⁾されており、米国でもイムノアッセイを種々の化学物質のスクリーニングに適用する試みがEnvironmental Protection Agency(EPA)で検討されている⁴⁾。ここでは、今回我々が開発した迅速で多検体処理に最適なイムノアッセイによる絶縁油中PCBのスクリーニング方法(PCBセンサー)について紹介する。なお、本法は無害化前の絶縁油中のPCBを0.5 mg/kgのレベルでスクリーニング

可能な方法として設計した。

2 PCBセンサーの測定原理

本法は抗PCB抗体とPCB(抗原)との抗原抗体反応を利用してPCBを検出する。測定原理を図1に示す。まず、抗体とPCBを混合し、結合平衡状態とする。抗体とPCBの結合の割合は抗体濃度を一定としているので、PCB濃度に依存する。次に、この混合溶液を、PCB類似物(疑似抗原)を含む薄膜を装着した検出セルに送液する。混合溶液が検出セルを通過する時にPCBと結合していない抗体は疑似抗原と反応し、膜上に捕捉される。ちなみに、PCBが多量に含まれる場合、抗体は液中のPCBと反応するため、膜上の疑似抗原とはほとんど反応しない。このため、PCBと結合した抗体は膜を通過し、膜上に捕捉される抗体の量は減少す



図1 PCBセンサーの測定原理



図2 前処理方法の簡易操作フロー



図3 測定方法の簡易操作フロー

る。膜上に蓄積した抗体は予め金コロイド（赤紫色）で標識化していることから、膜の光吸収度を吸光光度計にて計測することでPCB濃度を算出する。具体的には、PCB濃度が低い場合、膜上に捕捉される抗体量が多くなり、赤色を呈するので、膜の光吸収度が大きくなる。逆に、PCB濃度が高い場合、膜は呈色せず光吸収度は小さくなる。

3 前処理方法

一般的にイムノアッセイ法では、抗原抗体反応に悪影響を及ぼす夾雑物の除去が必須であるが、スクリーニング法としての簡易性、迅速性を有効にするためには、絶縁油試料からPCBを抽出する操作の簡易化が重要となる。今回、我々は極めて単純な前処理方法を開発し、同時にキット化を図ることによって簡易かつ迅速な前処理を可能とした。前処理方法の簡易操作フローを図2に示す。

まず、発煙硫酸含浸シリカゲルを含む多層カラムに絶縁油試料を添加し、測定妨害成分の分解精製処理を行う。次に、*n*-ヘキサンにより多層カラムからPCBを溶出させ、溶出液にジメチルスルホキシド（DMSO）を一定量添加後、ロータリーエバポレーターを用いて*n*-ヘキサンを濃縮除去し、DMSOへの溶媒置換を行う。この時点では多層カラムで分解されない大部分の絶縁油層と

DMSOの層が分離しているので、イムノアッセイで使用するDMSO層のみを採取し、前処理を完了させる。これら前処理に要する時間は、わずか1検体約15分であるが、カラム工程で多検体を並行処理できるので、1日あたり60検体以上の前処理が可能である。

本法は複雑な操作は必要とせず、使用する設備類は汎用品で複雑な設定を必要としないことから高度な技術習得は不要である。設備類は全て移動可能な大きさや重さであること、試料量が少なく、カラムやフラスコも小型であることから省スペースでの作業が可能であり、可搬性もある。有機溶媒を極少量（*n*-ヘキサン：約10mL、DMSO：0.25mL）しか使用しないことも特徴である。また、発煙硫酸含浸シリカゲルはキットとしてガラス管に封入されており、液体の発煙硫酸を取り扱うことと比較すると分析精度面、安全面で

大きく向上している。

4 測定方法

測定方法の簡易操作フローを図3に示す。前処理方法と同様にキットを利用し、スクリーニング法としての簡易性、迅速性を有効にできるような方法を開発した。まず、前述の前処理を実施したDMSO抽出液と抗体溶液を混合し、PCBと抗体との結合平衡反応を室温にて1時間行う。次に、この混合溶液をシリンジに採取し、抗体捕捉膜を含む検出セルにシリンジポンプを用いて一定流速（8.5mL/min）で送液する。生理食塩水（生化学用緩衝液）により膜を洗浄した後、光透過率に影響する水分を除去するため遠心分離機の利用と風乾により膜を乾燥させる。最後に専用の携帯型吸光光度計により膜の光透過率を計測する。これら測定に要する時間は約2時間であるが、結合平衡反応と膜の乾燥を除く実工数は約10分に過ぎず、前処理と同様に多検体を並行処理できるので、1日あたり80検体以上の測定が可能である。

前処理と同様に、高度な技術習得は不要で、設備類の可搬性も高く、省スペースでの作業が可能である。特に携帯型の吸光光度計はハンディタイプであることが特徴であり、複雑な設定を必要としないことから、多検体の迅速分析で重要となる簡易性に優れている。

5 種々のPCB組成に対する交差反応性

日本で製造され、PCBが混入した絶縁油には4種類のPCB混合品（カネクロール300、400、500、600）が単独もしくは混合で含まれ

ている¹⁾。カネクロール標準品を各々添加した絶縁油を本法により前処理、測定した時の校正曲線を図4に示す。カネクロール各々の校正曲線はほぼ重なっており、カネクロール種による測定結果への影響は小さく、絶縁油に含まれるカネクロール種の組成比の依存性が低いため、スクリーニングとしての本法の適用性が高いことを示している。

6 測定精度

水試料を対象にして規定されているイムノアッセイの競合免疫測定方法通則⁵⁾に準じて、前処理を含む全測定操作における検出・定量限界を確認したところ、検出下限は0.2mg

/kg、定量下限は0.5mg/kg、検出上限は5mg/kg、定量上限は3mg/kgであった。また、図5に示すように、PCB濃度が0.01mg/kg以下から5mg/kgの絶縁油50検体を用いて、本法による測定値と最も精確度が高いとされているHRGC-HRMS法の測定値を比較した結果、相関は傾きが0.99、切片が0.069の直線に回帰でき、寄与率(r^2)は0.96と良好であった。以上の結果、本法は絶縁油中のPCB濃度を0.5mg/kgで判定するスクリーニング法として十分な精確度を有していると考えられた。

7 スクリーニング試験の概要 (図6)

スクリーニングとは、検体中に被測定物質がある基準濃度未満あるいは基準濃度以上含まれるかどうかを検定する迅速な測定法である。検定には被測定物質に関して定められた基準濃度に対して、スクリーニングを行う濃度(検定濃度)を設定し、検定濃度以上を陽性、未満を陰性と定義して判定を行う。一般的に、陽性試料を誤って陰性と判定する危険率を下げるために、検定濃度は基準濃度より低濃度に設定される場合が多い。つまり、安全倍率を乗じた検定濃度でスクリーニング判定することで、基準濃度以上の被測定物質を含む可能性のある検体を検出できる確率が高くなる。身近な例としては健康診断における血液検査や狂牛病の検査で適用されており、精密な定量法では費用並びに時間的な制約から現実的に実施が困難である膨大な量の試料の中から存在確率が少ない陽性試料を見つけ出す簡易測定として用いるのが大変有効となる。したがって、今回対象とした絶縁油中に含まれる微量PCBの汚染判定に非常に適した概念である。なお、スクリーニングにおいて検定濃度以上と判定された検体は、その判定を確定する精密な分析と組み合わせ用いられる場合も多い。現段階では基準濃度を超えるPCB汚染絶縁油を管理する際には濃度の届け出が必要なことから、本法にてスクリーニングし、陽性判定された試料については従来から実施されている前述の機器分析法によって定量することが望ましい。

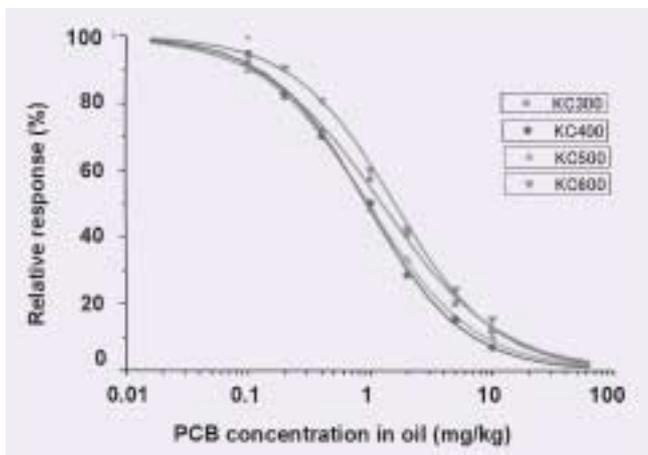


図4 4種類のPCB混合品の校正曲線

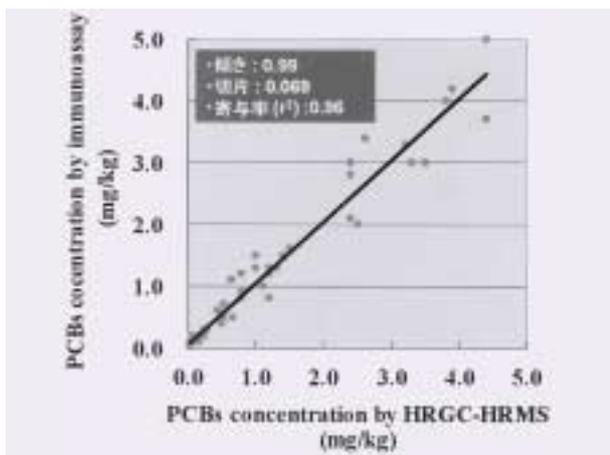


図5 HRGC-HRMSと本法の測定値の相関

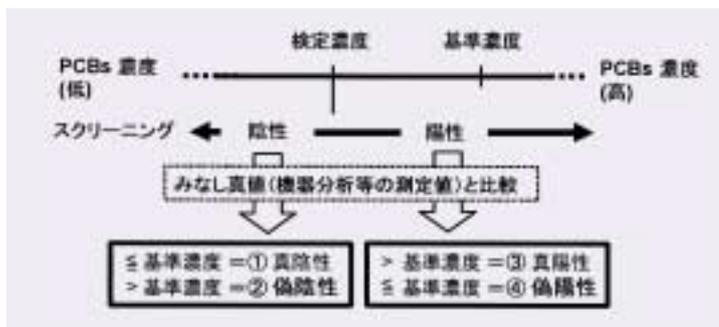


図6 スクリーニング試験の概念図

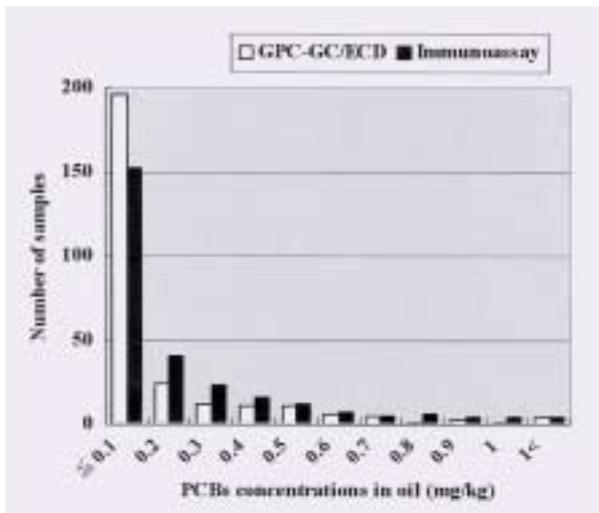


図7 GPC-GC/ECD法と本法の濃度分布（使用済み絶縁油：274検体）

8 スクリーニング試験の実施例

使用済みの絶縁油試料274検体を用いて本法によるスクリーニング試験を行い、その性能を評価した1例を紹介する。評価にあたってはHRGC-HRMS法との測定値の相関が高いことが報告されているGPC-GC/ECD⁶⁾法により測定したPCB濃度をみなし真値として本法の測定結果と比較した。図7にそれぞれの方法において算出されたPCB濃度分布を示す。2手法とも0.2mg/kg未満の試料が50%以上を占め、濃度が高い試料の割合が減少するという同様な濃度分布を示した。スクリーニング法は、一般的に陰性と判定された試料が精密な方法で測定されたみなし真値では基準濃度を超えて陽性となる偽陰性と、陽性と判定された試料がみなし真値では陰性となる偽陽性との発生確率で評価される。ここでは、基準濃度を0.5mg/kgに設定し、種々の検定濃度における偽陰性率並びに偽陽性率を算出した結果を表1に示す。なお、GPC-GC/ECD法で基準濃度を超える試料（真陽性）は20検体、それ以下

表1 様々な検定濃度における偽陽性及び偽陰性の発生数と発生率 基準濃度：0.5mg/kg

	検定濃度			
	0.5 mg/kg	0.4 mg/kg	0.3 mg/kg	0.2 mg/kg
偽陽性	12(9.1%)	23(15%)	39(24%)	61(40%)
偽陰性	1(5%)	1(5%)	0(0%)	0(0%)

左：発生数 右()内：発生率

（真陰性）は254検体であった。安全倍率をかけて検定濃度を0.3mg/kg以下に設定すると偽陰性は発生せず、判定精度としては申し

分ないが、0.3mg/kgでは偽陽性が39検体（偽陽性率：24%、全検体に対する偽陽性の割合：14%）発生しているが、全試料を精密な方法で測定する費用と時間を考慮すればスクリーニングする価値は大きい。一方、検定濃度を0.4～0.5mg/kgに設定すると偽陰性は1検体（偽陰性率：5%、全検体に対する偽陰性の割合：0.4%）発生するが、良好な判定精度の範囲に収まっており、0.4mg/kgでは偽陽性が23検体（偽陽性率：15%、全検体に対する偽陽性の割合：8%）と減少し、経済的なメリットは向上する。以上の結果から、今回評価した274試料では、検定濃度を0.3～0.5mg/kgと設定した時に、経済的なメリットも含めた良好なスクリーニング性能を有していることを確認できた。なお、偽陰性率並びに偽陽性率は測定手法の精度だけでなく、試料の濃度分布、特に基準濃度付近の試料の割合に大きな影響を受ける。したがって、本法を適用するには事前に測定対象とする母集団が把握できれば経済的なメリットも考

慮した判定濃度の設定を行い、効率的なスクリーニングが可能となる。

9 おわりに

前述のように、膨大な検体数について微量PCBによる絶縁油の汚染判定を行うにあたって、スクリーニングという概念を用いた本法は、これまでにない迅速・安価な簡易法として非常に有効であり、スクリーニングの結果、陽性と判定された試料については、別途、機器分析による精密測定を行うというスキームが、今後世の中で、より一層認識・活用されていくことが期待される。

文 献

- 1) 低濃度PCB汚染物対策検討委員会原因究明ワーキンググループ：低濃度PCB汚染物に関する原因究明調査報告書概要，(2005)。
- 2) 滝上ら：ぶんせき，502，(2003)。
- 3) Commission directive: 2002/69/EC, ANNEX II, 7, (2002)。
- 4) US EPA method 4020, (2003)。
- 5) JIS K 0461, (2006)。
- 6) 大村直也ら：分析化学，55(5), (2006)。



今西 克也
(いまにし かつや)
愛媛事業所