

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3933912号
(P3933912)

(45) 発行日 平成19年6月20日(2007.6.20)

(24) 登録日 平成19年3月30日(2007.3.30)

(51) Int.C1.

F 1

GO 1 N	33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53	G
GO 1 N	21/78	(2006.01)	GO 1 N	21/78	C
GO 1 N	33/00	(2006.01)	GO 1 N	33/00	D
GO 1 N	33/553	(2006.01)	GO 1 N	33/553	

請求項の数 6 (全 10 頁)

(21) 出願番号

特願2001-337337 (P2001-337337)

(22) 出願日

平成13年11月2日 (2001.11.2)

(65) 公開番号

特開2002-214231 (P2002-214231A)

(43) 公開日

平成14年7月31日 (2002.7.31)

審査請求日

平成16年7月15日 (2004.7.15)

(31) 優先権主張番号

特願2000-336122 (P2000-336122)

(32) 優先日

平成12年11月2日 (2000.11.2)

(33) 優先権主張国

日本国 (JP)

(73) 特許権者 000001812

株式会社サタケ

東京都千代田区外神田4丁目7番2号

(73) 特許権者 500230129

江頭 直義

広島県三次市南畠敷町103-8

(72) 発明者 江頭 直義

広島県三次市南畠敷町103-8

審査官 竹中 靖典

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】試料中のダイオキシン類の濃度を測定する方法及びその装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中のダイオキシン類の濃度を測定する方法であつて、
4', 5'-ジクロロフタロイル系からなるハプテンをルテニウム錯体と化学結合させて
ハプテン・ルテニウム錯体からなる抗原に形成する工程、

該ハプテン・ルテニウム錯体からなる抗原及びダイオキシン類を含有すると考えられる
試料を、電極上に固定した該ダイオキシン類に対する抗体と結合させ、競争的に抗原抗体
反応を生じさせる工程、

この反応生成物に前記電極から電圧を印加することにより前記ルテニウム錯体を酸化
 ·還元させて電解発光を生じさせる工程、及び

該電解発光による発光量を測定して前記抗原を定量することで、前記試料中のダイオキシン類の量を求める工程、
 を備えたことを特徴とする試料中のダイオキシン類の濃度を測定する方法。

【請求項 2】

前記ルテニウム錯体の電解発光は前記電極からの電荷を受けて2価から3価になる酸化
 反応と、トリメチルアミンを含むリン酸緩衝水溶液により3価から2価への還元反応とを
 利用してなる請求項1記載の試料中のダイオキシン類の濃度を測定する方法。

【請求項 3】

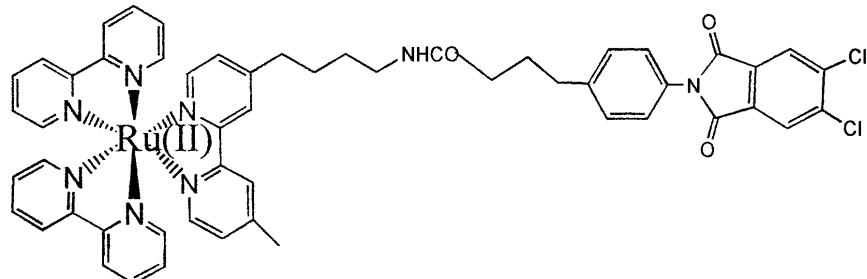
3%ジメチルスルホキシドを含むリン酸緩衝液で調製した測定液により、前記抗原を前
 記電極上に固定した抗体とインキュベートして抗原抗体反応を行う請求項1又は請求項2

記載の試料中のダイオキシン類の濃度を測定する方法。

【請求項 4】

前記ハプテン・ルテニウム錯体からなる抗原は、下記一般式で表される請求項 1 記載の試料中のダイオキシン類の濃度を測定する方法。

【化 7】



10

【請求項 5】

前記ダイオキシン類は、ポリ塩化ジベンゾ - p - ダイオキシンである請求項 1 記載の試料中のダイオキシン類の濃度を測定する方法。

【請求項 6】

前記ダイオキシン類は、2, 3, 7, 8 - 四塩化ダイオキシンである請求項 1 記載の試料中のダイオキシン類の濃度を測定する方法。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明は、試料中のダイオキシン類の濃度を測定する方法及びその装置に関するもので、特に、一般廃棄物や産業廃棄物の焼却処理で発生する猛毒の2, 3, 7, 8 - 四塩化ダイオキシン($T_4 CDD$)を含むポリ塩化ジベンゾ - p - ダイオキシン($PCDD_S$)並びに同様に猛毒のポリ塩化ジベンゾフラン($PCDF_S$)を高感度、高選択的に測定するためのダイオキシン類の濃度を測定する方法及びその装置に関するものである。

30

【0002】

【従来の技術】

近年、廃棄物を焼却処理した場合に高濃度のダイオキシンが発生し、社会問題化している。焼却時の排気ガス中に含まれるダイオキシン類の濃度は、ダイオキシンが猛毒であるために、ダイオキシン及びその同族体や異性体、並びにポリ塩化ジベンゾフランの同族体や異性体の総量で $0.1\text{ng}/\text{Nm}^3$ 以下にすることが義務づけられることになった。しかし、ダイオキシンが猛毒であるために、通常の分析方法では検出できないほどの低い濃度が問題になることや、ダストやミストその他多種多様な夾雑物が数多く含まれるために、直接正確にダイオキシン類を検出・定量するには煩雑な前処理や特殊な分析装置が必要である。

【0003】

代表的なダイオキシン類の定量・分析法として、ソックスレー抽出器を用いて、トルエンやエチレングリコールなどの溶剤で72時間の溶剤抽出後、クリーンアップ、濃縮処理を経て、ガスクロマトグラフィー・質量分析計で分析する方法がある。この方法は、濃縮処理など分析に要する工程が煩雑なため、分析結果ができるまでに2~3週間かかり、また、分析費用も高くなる。

40

【0004】

特開平11-326222号公報では、試料の濃縮操作を不要とすることが可能で、かつ比較的安価な装置を用いて、間接的なダイオキシン類の定量方法を提供するもので、その構成として、ハロゲンを含む有機溶媒に、8-オキシキノリン類の金属錯体とダイオキシン類を測定しようとする試料を混和させ、これに励起光を照射して蛍光強度を測定することで、試

50

料中に含まれるダイオキシン類と濃度相関性のあるハロフェノール類を定量し、このハロフェノール類の濃度からダイオキシンの濃度を推定するダイオキシン類の測定方法が開示されている。

【0005】

しかしながら、このものは、1 测定対象液が蛍光性錯体と相互作用するものとしてハロフェノールと競合する成分の影響を予め調べておく必要がある。2 ハロフェノール濃度とダイオキシン濃度との相関を予め調べておく必要があり、ダイオキシンの種類の要因で変動する可能性が大きいと考えられる。といった点で、間接的にダイオキシン濃度を推定するのでかなり精度が劣る手法と考えられる。また、蛍光法は感度が高いが共存物質の影響を受けやすく、励起光がどうしても観測系に入り込むために期待するほど感度が得られない場合もある。

【0006】

ところで、特開平11-79719号公報では、活性炭やシリカゲル等の吸着材に代わり、気体の可逆的吸脱着方法が開示されている。これによると、分子状窒素を吸收放出することの可能なルテニウム錯体を溶かした溶液に一対の電極を接触させるとともに、該電極電位を制御することによって窒素ガスを吸脱着するので、1 常温、常圧において、熱を用いずに気体の吸脱着を制御すること、2 気体吸脱着制御を電位操作のみによって行うこと、3 気体吸脱着を可逆的に、かつ繰り返して行えること、が可能になるものである。しかしながら、この発明では、分子状窒素を吸收放出することの可能なルテニウム錯体を溶かした溶液を利用するのであるが、プラナー構造を有するダイオキシン及びその同族体や異性体、並びにポリ塩化ジベンゾフランの同族体や異性体を吸脱着できるか否かは未解明の部分があった。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は上記問題点にかんがみ、ルテニウム錯体を利用するとダイオキシン類の吸着の選択性が高いことを見い出し、さらに、電解発光を利用した新規な測定系で高感度分析をするものであり、化学発光に必要な過酸化水素などの試薬を必要とせず、装置が小型化でき、高感度化が容易であるダイオキシン類の濃度を測定する方法及びその装置を提供することを技術的課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者は前記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明によれば、試料中のダイオキシン類の濃度を測定する方法であって、4', 5' -ジクロロフタロイル系からなるハプテンをルテニウム錯体と化学結合させてハプテン・ルテニウム錯体からなる抗原に形成する工程、該ハプテン・ルテニウム錯体からなる抗原及びダイオキシン類を含有すると考えられる試料を、電極上に固定した該ダイオキシン類に対する抗体と結合させ、競争的に抗原抗体反応を生じさせる工程、この反応生成物に前記電極から電圧を印加させることにより前記ルテニウム錯体を酸化・還元させて電解発光を生じさせる工程、及び該電解発光による発光量を測定して前記抗原を定量することで、前記試料中のダイオキシン類の量を求める工程、を備える、という技術的手段を講じた。

【0010】

ダイオキシン類の作用としては、平面構造を有する化学物質（ダイオキシン、ジベンゾフラン及びコプラナーP C Bなど）が細胞内に取り込まれると、細胞質内でA h受容体とよばれるタンパク質と高い親和性を示して結合することが知られている。このダイオキシン類の性質を利用して、ダイオキシンの構造の一部を模した外来の低分子を形成し、この低分子が高分子と結合したときに特異的抗体の形成を起こすハプテンとしての特性を利用するのである。具体的には、4', 5' -ジクロロフタロイル系からなるハプテンを、酸化・還元するだけで電解発光反応を開始できるルテニウム錯体と化学結合させてハプテン

10

20

30

40

50

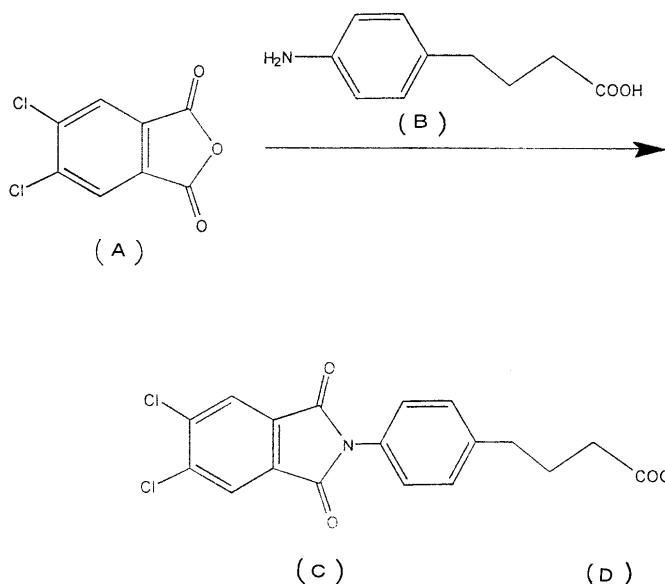
・ルテニウム錯体からなる抗原に形成し、この抗原を電極上に固定した抗体とインキュベートして抗原抗体反応を行い、この反応生成物に前記電極からの電圧を印加させることにより電解発光を生じさせるのである。つまり、この電解発光の発光強度又は発光消失を観測することにより前記抗原を定量するとともに、ダイオキシン類の濃度の測定が可能となるのである。これにより、化学発光に必要な過酸化水素などの試薬を必要とせず、装置が小型化でき、高感度化が容易となる。

【0011】

【発明の実施の形態】

本発明において、ダイオキシンハプテン部位2(図1参照)とルテニウム錯体3(図1参照)とが化学結合して電解発光試薬となる抗原1(図1参照)の生成を説明する。まず、
10 ダイオキシンハプテンの合成として、例えば、以下のような結合が考えられる。

【化1】



【0012】

上記【化1】の左辺には、例えば、2,3-ジベンゾダイオキシンの構造の一部を有するフタル酸エステル：4,5-ジクロロフタル酸無水物(A)が存在し、これに、抗体と結合する際のスペーサとなる4-(p-アミノフェニル)ブタン酸(B)を反応させる。

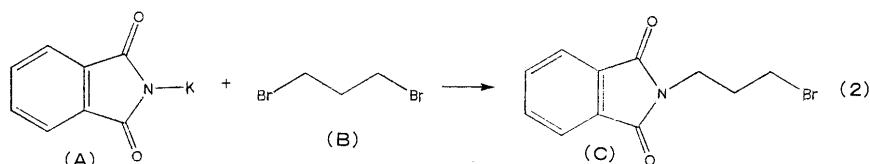
すると、N-(4',5'-ジクロロフタロイル)-4-(p-アミノフェニル)ブタン酸(C)が生成される。この(C)の部分はハプテン部位であり、(D)の部分のカルボキシル基によりルテニウム錯体を結合させるのである。

【0013】

一方、ルテニウム錯体3の側でも抗体と結合する際のスペーサを設ける必要があり、この合成を以下の【化2】から【化6】を参照して説明する。

【0014】

【化2】



上記(2)の左辺では、フタルイミドカリウム(A)と1,3-ジブロモプロパン(B)とを反応させ、抗体と結合する際のスペーサとなる1-(N-フタロイルアミノ)-3-ブロモプロパン(C)を生成する。

10

20

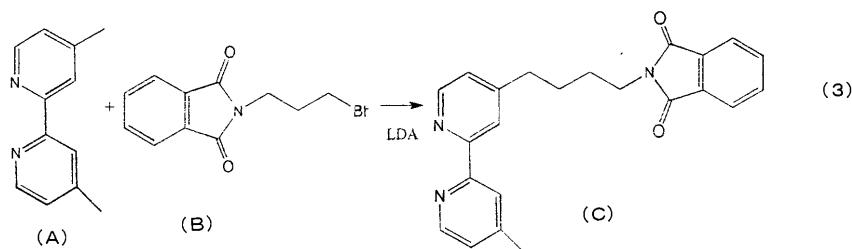
30

40

50

【0015】

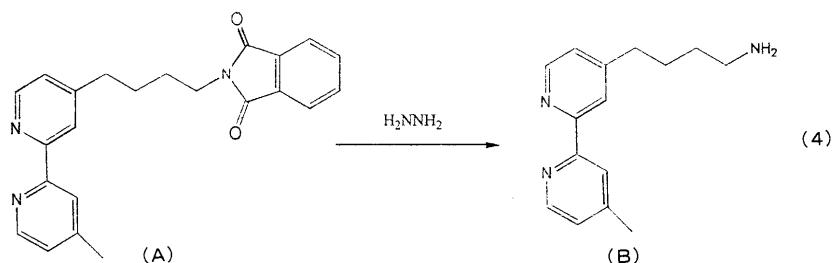
【化3】



次に、上記(3)の左辺では、4,4'-ジメチル-2,2'-ビピリジン(A)と上記【化2】
により生成した1-(N-フタロイルアミノ)-3-ブロモプロパン(B)とを反応させ、4-(4-(N
-フタロイルアミノ)ブチル)-4'-メチル-2,2'-ビピリジン(C)が生成される。

【0016】

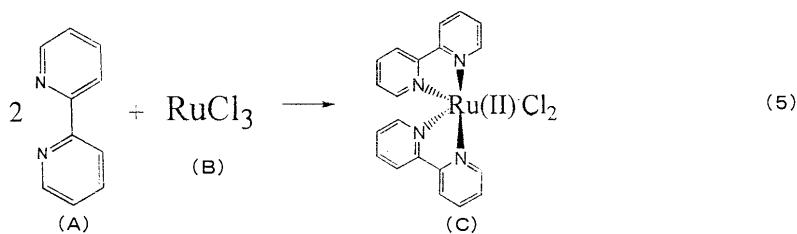
【化4】



さらに、上記(4)の左辺では、4-(4-(N-フタロイルアミノ)ブチル)-4'-メチル-2,2'-
ビピリジン(A)がヒドラジンH₂NNH₂により還元され、右辺の4-(4-アミノブチル)-4'-
メチル-2,2'-ビピリジン(B)のようになる。

【0017】

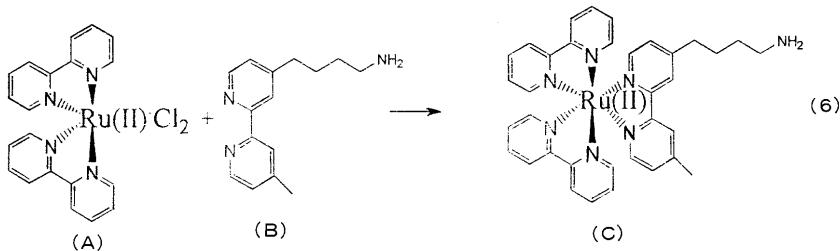
【化5】



そして、上記(5)の左辺では、2,2'-ビピリジン(A)に三塩化ルテニウムを反応させると、ジクロロビス(2,2'-ビピリジン)ルテニウム(C)となる。

【0018】

【化6】



最終的には、(5)のジクロロビス(2,2'-ビピリジン)ルテニウム(A)と、(4)の4-(4-アミノブチル)-4'-メチル-2,2'-ビピリジン(B)とを反応させると、抗体と結合する際、スペーサーを有するビス(2,2'-ビピリジル){4-(4-アミノブチル)-4'-メチル-2,2'-ビピリジン}ルテニウム錯体(C)が生成される。

10

20

30

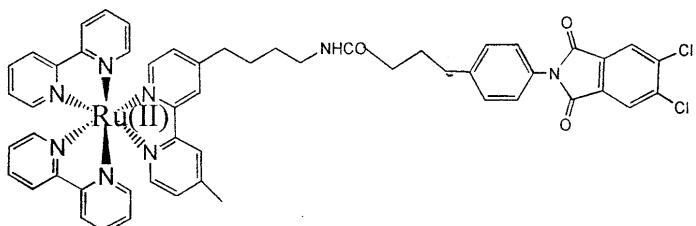
40

50

【0019】

次に、スペーサを有する【化1】のN-(4',5'-ジクロロフタロイル)-4-(p-アミノフェニル)ブタン酸と、スペーサを有する【化6】のビス(2,2'-ビピリジル){4-(4-アミノブチル)-4'-メチル-2,2'-ビピリジン}ルテニウム錯体とを反応させ、ダイオキシン類のハプテンとルテニウム錯体とが化学結合した電解発光試薬としての抗原1が生成される。

【化7】



10

このとき、{4-(4-アミノブチル)-4'-メチル-2,2'-ビピリジン}ルテニウム錯体を定量することができれば、ダイオキシン類のハプテン部位も定量することができる。

【0020】

図1はダイオキシン20とルテニウム錯体3とが結合した抗原1のダイオキシンハプテン部位2間で競争的にダイオキシン抗体4に結合している様子を表す模式図である。これを参照して抗原抗体反応を説明する。ダイオキシン20の構造の一部を模したダイオキシンハプテン部位2は、ルテニウム錯体3と化学結合させて抗原1に形成し(上記【化1】から【化7】参照)、この抗原1が電解発光試薬となるのである。抗原1とダイオキシン20は、電極5上に固定した抗体4とともにインキュベートして抗原抗体反応を行うが、この抗原抗体反応は化学結合ではなく、水素結合を含めた弱い相互作用によるものである。しかし、抗体4では相互作用の場所がたくさんあるので、ダイオキシンハプテン部位2の認識能が高く、ダイオキシンハプテン部位2とダイオキシン20が強く結合することになる。イメージとしては、図1のように抗体4中にダイオキシンハプテン部位2及びダイオキシン20と同じ形の溝4'があり、そこにすっぽりあさまっている状態である。

20

【0021】

次に、抗原抗体反応の作用を詳細に説明する。まず、図1に示すように、金電極5に抗体4を化学結合により固定する。この固定方法については、まず、金電極5を硫酸などで酸処理し、表面を清浄にし、3,3'-ジチオジプロパン酸溶液(HOOCCH₂CH₂S-SCH₂CH₂COOH)(10 mM)に金電極5を30分間浸漬し、金電極5表面に3,3'-ジチオジプロパン酸を化学吸着(3,3'-ジオチジプロパン酸のイオウ原子Sと金原子Auの相互作用による化学結合)させる。そして、金電極5を取り出し、メタノールなどのアルコールで洗浄する。さらに、金電極5表面に固定化された3,3'-ジチオジプロパン酸のカルボン酸を反応活性にするための金電極を(ヒドロキシスクシンイミド30mg + 水溶性カルボジイミド(1-ethyl-3-dimethylaminopropyl carbodiimide hydrochloride)50mg)含むジオキサン90%水溶液20mlに15分間浸漬する。そして、活性化された3,3'-ジチオジプロパン酸を有する金電極5を抗体4溶液に室温で1~10分間浸漬し、抗体4のアミノ基NH₂との反応によりアミド結合-CO-NH-を形成させる。これにより、金電極5上に抗体4が固定されることになる。このあと、この金電極5をリン酸緩衝液で洗浄し、化学結合していない抗体4を取り除くのである。

30

【0022】

一方、3%DMSO(ジメチルスルホキシド)を含むリン酸緩衝液で調製した測定液には、一定量のダイオキシンハプテン部位2とルテニウム錯体3とを化学結合した抗原1を添加する。DMSOはダイオキシンを十分に溶解させるために使用するのである。3%のDMSOを含む0.2M濃度のリン酸緩衝液(PH=7.0)で調製した測定液をサンプルを分析するために使用すると、少量のDMSOを加えるだけで、ダイオキシンをppbレベルまで溶解することが可能となる。そして、この測定液に抗体4を固定化した金電極5を

40

50

浸漬し、10分間インキュベートして抗原抗体反応を行う。この後、測定液から金電極5を取り出し、リン酸緩衝液(PH7.0)により軽く洗う。

【0023】

そして、図2はダイオキシンハプテン部位2とルテニウム錯体3が化学結合した抗原1の電解発光を示す作用図であるが、図2に示すように、電極5(陽極)と、陰極として、例えば、ステンレス製の電極(図示せず)と、参照電極として、例えば、銀電極又は塩化銀電極(図示せず)とを、例えば、トリメチルアミン(TMA)、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、トリブチルアミン、アミノ酸としてのプロリン又はその他有機酸としてのシュウ酸のような第3級アミンによる還元剤を含むリン酸緩衝液に浸けるのである。そして、温度が15～30度で、時間が20秒～2分間の間、電極5に0.9～1.3Vの電圧を印加させると、電解発光が生じ、この発光強度を観測することにより前記抗原を定量するとともに、ダイオキシン類の濃度の測定が可能となるのである。10

【0024】

上記の手順はダイオキシンの種類及び濃度に関連して導かれるものであるが、抗原1の濃度としては、例えば、20μg/Lが好ましい。そのデータをプロットして作成した検量線を図4に示す。

【0025】

電解発光に必要な材料としては、ルテニウム錯体3と還元剤としてのトリメチルアミン(TMA)6を含むリン酸緩衝水溶液である。ルテニウム錯体3は、金電極5による酸化を受けて2価から3価になって活性反応となる。ルテニウム錯体3は、このとき、トリメチルアミン(TMA)6により反応し、酸化してトリメチルアミン酸化物(TMA_{0x})7が得られ、トリメチルアミン(TMA)6のルテニウム錯体3による活性反応が減少する際(このとき電荷は3価から2価に減少)、発光する。リン酸緩衝溶液は最適な発光条件にするのに重要である。特に、電気分解に必要な導電性を与え、pH値を(pH7.0)に制御することで電気分解の環境を整える。ルテニウム錯体3は、金電極5上に固定化された抗体4に水溶液のダイオキシン濃度に依存して結合するが、ダイオキシン濃度が高い時はルテニウム錯体3の結合量は少なくなる。その後、ダイオキシン溶液中の妨害物質(電解発光を引き起こすもの)の影響を極力除くために、ルテニウム錯体3が結合した金電極5を軽く洗い、続いて別に用意したトリメチルアミン6(TMA)を含むリン酸緩衝水溶液に入れ、電解発光を観測するのである。2030

【0026】

電解発光を観測するためには、図3に示すような集光レンズ8、ミラー9、光学フィルター10及び測定センサ11のような検出装置を設置するのが好ましい。測定センサ11により検出される発光強度、発光時間をモニタリングすることにより、サンプル中のルテニウム錯体が定量され、さらに、このルテニウム錯体の定量とダイオキシンハプテン部位の定量とが関連付けられているので、ダイオキシンの定量が可能となる。なお、図4のような検量線を予め記憶し、発光強度によりダイオキシンの定量が可能となるようなパソコンなどの演算装置(図示せず)を設けることが望ましい。

【0027】

さらに詳細に説明すると、試料中のダイオキシンに抗原1が含まれた第1の測定液を加え、この測定液に抗体4が固定化された電極(陽極)5を浸漬し、電極5上に固定化された抗体4と、ダイオキシン20と、抗原1との間で抗原抗体反応を引き起こさせる。そうすると、試料中のダイオキシンと抗原1は抗体4との間で競争的に抗原抗体反応が起こる。試料中のダイオキシン濃度が高ければ、ダイオキシンと抗体4との反応割合が高くなり、抗原1と抗体4との反応割合は低くなる。その結果、発光強度は弱くなる。一方、試料中のダイオキシン濃度が低ければ、ダイオキシンと抗体4との反応割合が低くなり、抗原1と抗体4との反応割合が高くなる。40

【0028】

本発明は以下の実施例により詳細に説明されるが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。50

【0029】

実施例

本発明の実施例として、試料中のダイオキシン濃度と発光強度との関係（検量線）を示したグラフを図4に示す。

測定液として、濃度が $0.02, 0.06, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 3.0 \mu\text{g/L}$ の2,3,7,8-テトラクロロ-p-ジベンゾダイオキシンが含まれ、3%DMSO（ジメチルスルホキシド）を含む0.2M濃度のリン酸緩衝液で調製したものを準備した。そして、その測定液に、上述の方法により準備した濃度が $20 \mu\text{g/L}$ の抗原1と濃度が 1mmol/L のトリメチルアミンとを混合した。

上述の方法により準備した、抗体（EWVATITGGGTYTYPDSVRGC）4を固定化した金電極（陽極）5、ステンレス製電極（陰極）及び参照電極（銀／塩化銀）を抗原の含まれる測定液に浸漬し、室温で2分間インキュベートした。室温で電極に 1.1V の電圧を1分間印加して得られた電解発光の発光量を、図3に示す検出装置で検出した。10

その検出結果を図4上にプロットしてグラフに示す。図4のデータは電解発光による発光強度がはっきりと示されており、本発明の方法及び装置によりダイオキシン濃度が極めて低い（例えば、 0.01 から 0.1ppb ）であっても認識できることができ、また、ダイオキシン類の濃度の測定の高感度化が容易であり、高感度化が相当向上したものである。

【0030】

【発明の効果】

以上のように本発明によれば、試料中のダイオキシン類の濃度を測定する方法であって、4'，5' - ジクロロフタロイル系からなるハプテンをルテニウム錯体と化学結合させてハプテン・ルテニウム錯体からなる抗原に形成する工程、該ハプテン・ルテニウム錯体からなる抗原及びダイオキシン類を含有すると考えられる試料を、電極上に固定した該ダイオキシン類に対する抗体と結合させ、競争的に抗原抗体反応を生じさせる工程、この反応生成物に前記電極から電圧を印加することにより前記ルテニウム錯体を酸化・還元させて電解発光を生じさせる工程、及び該電解発光による発光量を測定して前記抗原を定量する工程を備えたので、化学発光に必要な過酸化水素などの試薬を必要とせず、装置が小型化でき、高感度化が容易となり、高感度化が相当向上したものとなった。20

【図面の簡単な説明】

【図1】ダイオキシンと電解発光試薬のダイオキシンハプテン部位間で競争的にダイオキシン抗体に結合している様子を示す模式図である。30

【図2】ハプテン部位の電解発光の様子を示す模式図である。

【図3】電解発光を観測するための検出装置を示す概略図である。

【図4】ダイオキシン濃度と発光強度との関係（検量線）を示すグラフである。

【符号の説明】

- 1 抗原
- 2 ダイオキシンハプテン部位
- 3 ルテニウム錯体
- 4 抗体
- 5 金電極
- 6 トリメチルアミン
- 7 トリメチルアミン酸化物
- 8 集光レンズ
- 9 ミラー
- 10 光学フィルター
- 11 測定センサ
- 20 ダイオキシン

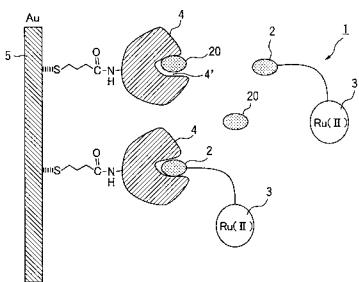
10

20

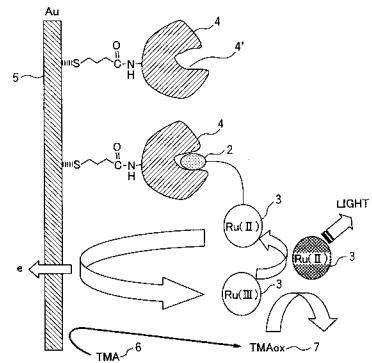
30

40

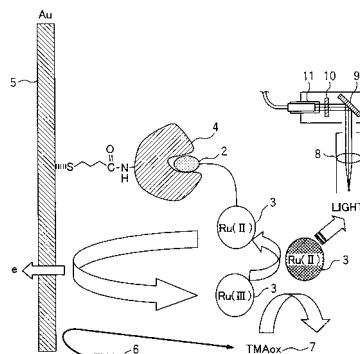
【図1】



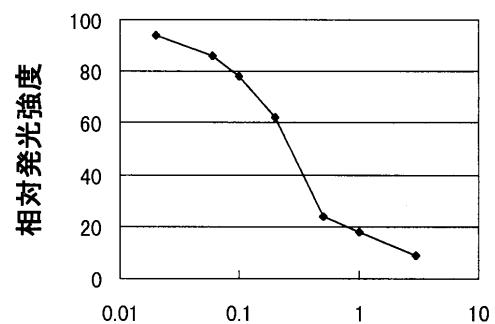
【図2】



【図3】



【図4】



2, 3, 7, 8-テトラクロロダイオキシン濃度 / $\mu\text{g/L}$

フロントページの続き

(56)参考文献 特開平11-075841(JP,A)

特開平07-248330(JP,A)

LARRY H. et,al , MONOCRONAL ANTIBODIES FOR DIOXIN: ANTIBODY CHARACTERIZATION AND ASSAY DEVELOPMENT , Toxicology , 1987年 , 45 , 229-243

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53

G01N 21/78

G01N 33/00

G01N 33/553