

< 研究発表 >

生物検定法によるダイオキシン類簡易測定のための国の取り組み

- ケイラックス[®] (CALUX[®])アッセイを中心に -

中村 昌文、半田 洋士、村田 弘司

株式会社 日吉 (〒523-8555 滋賀県近江八幡市北之庄町 908 番地 E-mail:m.nakamura@hiyoshi-es.co.jp)

概要

平成 16 年 12 月ダイオキシン法施行規則の一部が改正され、平成 17 年 9 月環境省告示第 92 号の公布によって、従来法に加えて、生物検定法が公定法として認定された。廃棄物焼却炉からの排出ガス(焼却能力 2t/時未満限定)ばいじん及び燃え殻に含まれるダイオキシン類の測定に生物検定法による測定を用いることが可能となった。さらに、公募の中で指定された技術に対して、マニュアルの作成や精度管理などの充実化が図られた。

さらに平成 18 年 7 月には、土壌及び底質における汚染地の対策範囲を推定するためのスクリーニング法等としての適用可能性が認められ報告書が作成された。今後、マニュアル等に反映するなど検討を進めていくとされている。ここでは、平成 15 年 5 月環境省「ダイオキシン類簡易測定法検討会」設置から現在に至るまでの取り組みについての詳細内容を、これまでこれらの取り組みに積極的に参加してきた技術の一つであるケイラックス(CLAUX)アッセイの開発検証を紹介する。

キーワード:ダイオキシン類、生物検定法、ケイラックス法、土壌、底質

1. はじめに

環境省では、ダイオキシン類対策特別措置法第 33 条の規定に基づき作成された「ダイオキシン類の排出の削減のための国の計画」による各種施策の結果、平成 15 年のダイオキシン類の推定排出量は、平成 9 年比で 95%削減され、削減目標が達成された。

しかしながら、ダイオキシン類は環境中では分解しにくく、一度排出されたダイオキシン類は環境中に蓄積していくことなどから、長期的にそのリスクを管理していくことが必要である。さらに、ダイオキシン類は、ストックホルム条約(POPs 条約)でも継続的に放出を最小限にするべき物質とされている。

また、従来の高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計(HR-GC/HRMS法)による公定法では、分析に多大な費用・時間がかかるため、効果的・効率的な測定やモニタリングを推進するには、より迅速で低廉な分析法、いわゆる簡易測定法の導入が求められ、その特性に応じた適切な分野へ積極的に導入するとともにその開発を推進している。

本発表では、このダイオキシン類に係る簡易測定法の導入経過とその内容、その後の政策とともに平成 17 年環境省告示第 92 号にて認定された測定技術の一つであるケイラックス(CLAUX)アッセイの開発検証を紹介する。

2. 簡易測定法導入の経過

環境省では、ダイオキシン類の簡易測定法の適用可能性に係る技術的検討を行うため、専門家からなる「ダイオキシン類簡易測定法検討会」を平成 15 年 5 月に設置し、検討結果は、平成 16 年 5 月に「ダイオキシン類簡易測定法検討会報告書」¹⁾として取りまとめ公表された。

検討会の検討結果を踏まえ、環境省では平成 16 年 7 月 1 日に「ダイオキシン類の測定における簡易測定法導入のあり方」²⁾について中央環境審議会に諮問し、同年 11 月 12 日に答申が出された。

中央環境審議会答申を踏まえ、平成 16 年 12 月 27 日に法施行規則の一部を改正し、焼却能力 1 時間当たり 2t 未満の廃棄物焼却炉の設置者が行う排出ガスの測定と、廃棄物焼却炉に係るばいじん等の処理の基準の検定および設置者の測定を対象とし、従来の方法に加えて、大臣の定める生物検定法を用いることができることとした。

その環境大臣が定める方法としては、平成 16 年 12 月 27 日に技術公募を行った。書類審査及び応募機関における分析試験を行い、それらの結果を基に「ダイオキシン類簡易測定法技術評価検討会」において検討・評価を行った。評価項目としては、現行公定法(HRGC/HRMS法)との相関性、定量下限、測定の再現性及び偽陰性率等をもとに技術的な評価・検討を行った。

この評価を踏まえ、平成 17 年 9 月 14 日「ダイオキシン類対策特別措置法施行規則第 2 条第 1 項第 4 号の規定に基づき環境大臣の定める方法(平成 17 年環境省告示第 92 号)」を公布・施行し、具体的な生物検定法を指定した。

3. 生物検定法、マニュアルについて

指定された生物検定法は、大きく 2 種類に分かれる。

1) ダイオキシン類がアリール炭化水素受容体(AhR)に結合することを利用した方法、いわゆるレポータージーンアッセイと呼ばれる方法で、細胞を用いた測定方法である。

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、いわゆるイムノアッセイと呼ばれる方法で、免役反応を利用した測定方法である。

今回、1)について3種類、2)について1種類の技術が指定された。詳細技術・原理の説明については、平成 17 年 9 月 14 日「ダイオキシン類対策特別措置法施行規則第 2 条第 1 項第 4 号の規定に基づき環境大臣が定める方法について」³⁾に示されている。

さらに測定方法の指定と同時に、これら4種類の測定方法について、詳細な測定の手順を記載した「ダイオキシン類に係る生物検定法マニュアル⁴⁾」を作成し、平成 17 年 9 月 14 日に公表、都道府県等に配布された。

マニュアルは、各生物検定法共通の試料採取方法、測定結果の報告、精度管理の説明と、それぞれの測定方法毎の概要、前処理、測定方法等を説明している。

4. 生物検定法の精度管理

生物検定法の精度管理を考える場合、機器分析とは異なり生物応答を利用していることから、定量時においてダイオキシン類の濃度に対して常に線形な応答反応があるわけではないことに注意する必要がある。このため検出下限及び定量下限の考え方についても機器分析とは異なり、また、内部標準物質の添加を行うことも難しいため、回収率の確認が難しいという特徴もある。

環境省では、平成 18 年 3 月に「ダイオキシン類の環境測定に係る精度管理の手引き(生物検定法)」⁵⁾を公表した。その中で求められている事項は Tab.1 の通りである。

Tab.1 精度管理の手引きに求められる事項

(1) 試薬等、器具、装置及び施設の管理	(6) ブランク試験
(2) 試料採取の準備	6-1) 操作 ブランク試験
(3) 試料の前処理	6-2) トラベルブランク試験
(4) 生物検定法による測定(測定系の準備)	(7) 二重測定
(5) 検出下限及び定量下限の確認	(8) 既知濃度試料の測定
5-1) 標準物質における検出下限及び定量下限	(9) 換算係数の確認
5-2) 試料における検出下限及び定量下限	(10) 検量線の確認及び感度変動の管理図による確認

生物検定法は毒性等量を測定する方法であり、計量法に基づく特定計量認定制度 (MLAP) の対象とはならないため、環境省が定期的に受注資格審査を実施し、精度管理の普及等に努めているところであり、平成 18 年 4 月募集受付の受注資格審査 (平成 18 年度後期) から生物検定法による排ガスとは異なる等についても審査が開始され、平成 18 年 7 月に、結果を公表された。GC/MS と異なり、書面のみでは十分な情報が得られないことから、当面の間、書面審査に加えて、実試料を配布し、クロスチェックを行うこととなった。

5. 土壌、底質分野における検討

平成 18 年 7 月 5 日、環境省より「ダイオキシン簡易測定法評価検討会報告書」⁶⁾ が取りまとめられた。この報告書は、平成 17 年 1 月から「ダイオキシン類簡易測定法検討会」を開催し、土壌

及び底質におけるダイオキシン類測定を検討対象として、簡易測定法の適用可能性について評価したものである。公募後書類審査の結果、生物検定法 14 機関 14 技術、機器分析 7 機関 7 技術が検討の対象となった。その後、土壌 19 検体及び底質 18 検体の実試料を用いて適用性の検討を行った。詳細は、環境省 HP (<http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=7279>) にて公開されている。

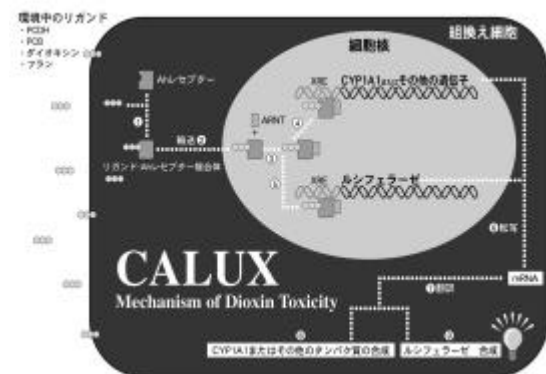
報告書の中では、「生物検定法は、異性体組成についての情報が得られない欠点があるが、毒性等量を求めることについて迅速性が認められる。機器分析法の多くの技術は、異性体組成の情報が得られる長所が見られた。これらのうち、いくつかの方法が今後スクリーニング法等としての利用が考えられる。」と結論付けている。

以上の国の取り組みの中で CALUX についても積極的に参加し、評価を得てきました。以降、CALUX の原理、手順、HRGC/HRMS との相関性ととも国での検討・開発検証結果について紹介する。

6. CALUX での開発検証について

6.1 原理

CALUX は、Chemically Activated Luciferase eXpression の呼称で米国の Xenobiotic Detection Systems International, Inc. (以降 XDS 社) が開発した技術で、マウス肝癌細胞遺伝子の一部をルシフェラーゼ遺伝子に組み換えたレポーター遺伝子アッセイ法の一種である (原理は、Fig.1 参照)。本法は、平成 17 年環境省告示第 92 号第 1 の 1 にて「前処理に、硫酸シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 H1L6.1c2 を用いたレポーター遺伝子アッセイを利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法」と記述されている。



AhR に結合、核内への移行、Arnt との結合、DNA 上のダイオキシン特異的応答領域への結合
転写による mRNA の誘導、翻訳による各種蛋白質の生合成
7-ethoxyresorufin (CYP1A1)
ルシフェラーゼ + ATP + ルシフェリン + O₂
発光 + AMP + CO₂ + オキシルシフェリン [発光光度計]

Fig.1 CALUX の原理

6.2 CALUX の手順

CALUX における手順について Fig.2 により説明する。土壌や底質は、米国 EPA8290 を元に開発した方法、排ガス、

灰は、JIS に従った方法により抽出を行う。具体的には、乾燥試料を粉碎後、3.5g を分取し、トルエン/メタノール混合溶液により超音波抽出を行った後、さらにトルエンで2回超音波抽出を行う。この抽出液を濃縮した後、ヘキサンに再溶解させ、現在 XDS 社が特許取得済みであるクリーンアップ法を用いて処理を行う。このクリーンアップ法も簡便で、ヘキサンに再溶解させた抽出液を硫酸シリカゲルカラムとXCARB カラム (XDS 社製活性炭カラム) に通液させた後、適切な溶媒でコプラナーPCB (Co-PCBs) とダイオキシン/フラン (PCDD/DFs) を溶出、分画させる。その後、ジメチルスルホキシド (DMSO) に転溶し、96 穴プレート内で生育させた H1L6.1c2 マウス肝がん細胞に曝露させる。また、同一プレート内に 2,3,7,8-TCDD の希釈列を曝露し、検量線を得る。このプレートを 24 時間培養させた後、試料中のダイオキシン類濃度による毒性に応じて生成されるルシフェラーゼを定量し、総毒性量 CALUX-TEQ を得る。およそ、4 日間の測定である。

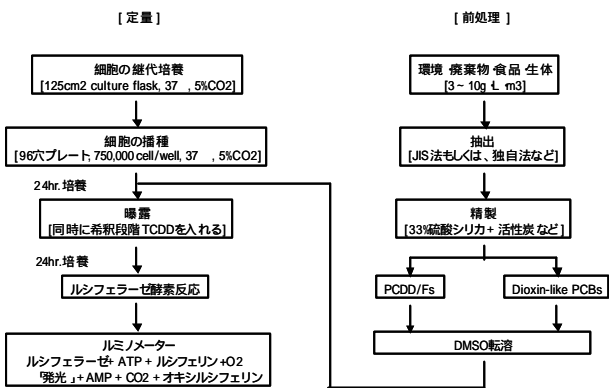
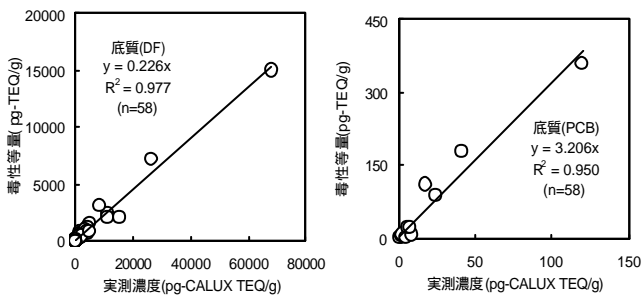


Fig.2 CALUX の手順

6.3 CALUX とHRGC/HRMS との相関

CALUX とHRGC/HRMS による測定値の相関をFig.3 に示す。HRGC/HRMS では、ダイオキシン類 29 異性体の個々の濃度が得られ、それぞれに固有の係数 (毒性等価係数) を乗じたものの総和をTEQ 濃度として、算出する。生物検定法の場合、生物検定法毎に実測濃度を得られ、媒体ごとの換算係数を乗じて HRGCM/HRMS 法同等の TEQ を換算する。その換算操作に用いるのが相関式で、個々の生物検定法



毒性等量 (pg-TEQ/g) = 実測濃度 (pg-CALUX TEQ/g) × 換算係数
 換算係数 = PCDDs/Fs 0.226、Co-PCBs 3.206

Fig.3 CALUX (横軸) とHRGC/HRMS (縦軸) の相関性

技術ごとに換算係数の算出は決められており、CALUX の場合は、相関式の傾きより換算係数を決定する。さらに、他の生物検定法との違いは、PCDD/Fs 及び Co-PCBs を簡易に分画し、各々の相関関係が良好であるため、各々の換算係数をすることで、HRGC/HRMS 法同等の TEQ 濃度を換算することが可能である。

6.4 排ガス、灰の検討

平成 16 年 5 月に「ダイオキシン類簡易測定法検討会報告書」として取りまとめ公表された。

CALUX は、この技術公募要件に該当した 11 技術の中の一技術であり、技術 2 として掲載評価されている。上記検討における共通試料分析試験結果について、報告書にて公表された公定法測定結果と CALUX 測定結果を以下のとおり整理した。

表 2 に、CALUX によるダイオキシン類測定結果一覧 (換算値、公定法比) を示す。換算値とは、実測値を補正換算して公定法値を推定した結果の値である。弊社は、公定法との相関より事前に得ていた媒体毎の換算係数を使用して換算値を報告している。全試料についての比較を示すとともに、異性体比率の違いを考慮して標準試料と超低濃度試料 (公定法で定量下限値となった試料を含む) を除いた場合の比較を示す。CALUX は、低濃度域から高濃度域にわたり、公定法との相関が非常に高く、また換算値の公定法比 (CALUX-TEQ / 公定法-TEQ) が「1」に非常に近いことが判り、公定法を補完する技術要因の高い技術であると考えられる。

Tab.2 排ガス及びばいじんの結果一覧

試料名	技術名	標準物質、排ガス、ばいじん、燃え殻		
		HRGCMS	技術2 CALUX法	
単位は、pg-TEQ/ml m3 g	TEQ濃度	TEQ濃度	公定法比	
標準試料	標準 1E	20	36	1.8
	標準 1F	20	3.0	1.5
	標準 1G	21	34	1.7
排ガス	排ガス 1A	28	2.9	1.0
	排ガス 2A	0.10	0.11	1.1
	排ガス 2B	0.12	0.11	0.9
	排ガス 2C	0.015	0.016	1.1
ばいじん	煤塵 1B	19	2.2	1.2
	煤塵 1D	23	2.5	1.1
	煤塵 2D	0.0046	0.0067	1.5
	煤塵 2F	0.44	0.49	1.1
燃え殻	燃え殻 1C	0.018	0.018	1.0
	燃え殻 2I	0.0067	0.0073	1.1
公定法比 (CALUX ÷ HRGCMS)	平均		2.1	
	S.D.		2.74	
	C.V.(%)		132	

6.5 精度管理

平成 18 年 3 月の手引き及びマニュアルに記載されている精度管理、特に X 管理図及び検出下限・定量下限の算出に係る精度プロファイルの作成方法について記載する。

・ X 管理図

排ガス及びばいじん等媒体によって異なるが、手引き及びマニュアルに記載している通りに作成した X 管理図を Fig.4 に示す。工程平均 (μ) は 3.9、標準偏差 (σ) は 0.455、変動係数 11.6% であり、管理限界 (μ ± 2σ) は 3.02 ~ 4.81 である。手引きに記載の変動係数は 20% 以内となることが望ましい」という項目に満足した結果を得る。

C _s 試料中 実測濃度 ng/g	測定量 (毒性等量) ng-TEQ/g	管理限界値 (毒性等量) μ ± 2		
確認試料	11.6	4.0	3.9	± 0.91

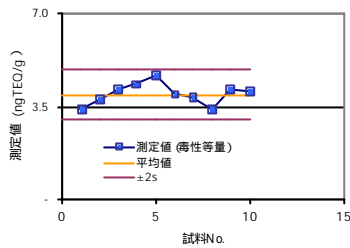


Fig.4 X 管理図の例

検出下限・定量下限の算出に係る精度プロフィール

手引き及びマニュアルによると測定量(毒性等量)の定量値の変動係数(CV%)が30%以下となる点を検出下限、20%以下となる上下2点間を定量範囲とすると定められる。CALUXでは、Fig.5及びTab.3のように検出下限は、0.977pg-TEQ/ml(実試料3.5gでは、0.5pg-TEQ/g)、定量下限は、1.95pg-TEQ/ml(実試料3.5gでは、1.0pg-TEQ/g)となる。

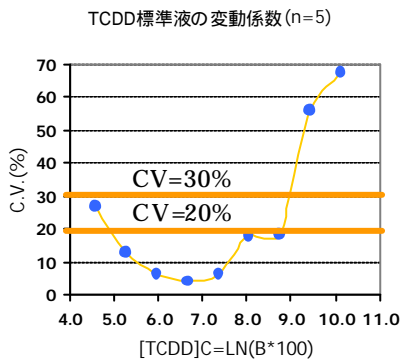


Fig.5 精度プロフィールの例

Tab.3 精度プロフィールの例

標準物質 濃度 (pg/well)	標準物質 濃度 (pg/ml)	標準物質 対数 変換値	標準物質 計測値	標準物質濃度 (n=5) (pgTEQ/ml)			乖離度
A	B= A/190*1000	C= LN(B*100)	(RLU)	平均	標準偏差	変動係数 C.V.(%)	
47.5	250	10.13	24560	257	173	67.5	1.03
23.8	125	9.43	23926	189	106	56.0	1.51
11.9	62.5	8.74	19727	62.2	11.6	18.6	1.00
5.94	31.3	8.05	15002	31.0	5.54	17.9	0.99
2.97	15.6	7.35	9696	15.5	1.00	6.43	0.99
1.48	7.81	6.66	5195	7.82	0.338	4.33	1.00
0.742	3.91	5.97	2597	4.17	0.267	6.39	1.07
0.371	1.95	5.27	1328	2.30	0.303	13.1	1.18
0.186	0.977	4.58	637	0.97	0.260	26.8	0.99
0.0928	0.488	3.89	364	ND	-	-	-
0.0464	0.244	3.20	271	ND	-	-	-

6.6 土壌、底質の検討

弊社の底質の結果についてTab.4に記す。環境省の評価基準としては、簡易法で得られた毒性等量値が公定法(HRGC/HRMS)により得られた毒性等量の1/2~2倍の範囲内かどうかみているが、CALUXでは、焼却やPCB等汚染由来が異なっても毒性等量評価に関して一定の正確度が得られていた。

Tab.4 種々の底質試料におけるHRGC/HRMS法とCALUX法の結果比較

底質試料				
試料名	技術名	techniqueB-2 CALUX法		
		HRGCMS	TEQ濃度	公定法比
単位は、pg-TEQ/g				
焼却関連1	G-1	110	121	1.1
	G-2	240	288	1.2
	G-3	71	99	1.4
	G-4	1500	2400	1.6
	G-5	180	270	1.5
	G-6	380	684	1.8
	G-7	2400	3840	1.6
焼却関連2	H-1	180	252	1.4
	H-2	550	1045	1.9
	H-3	24	38	1.6
PCB汚染油 漏洩	I-1	100	200	2.0
	I-2	61	116	1.9
	I-3	170	187	1.1
	I-4	11	15	1.4
農薬	J-1	180	270	1.5
	J-2	120	180	1.5
	J-3	2.8	2	0.61
	J-4	28	36	1.3
公定法比 (CALUX ÷ HRGCMS)			平均	1.47
			S.D.	0.34
			C.V.(%)	23.0

7.最後に

簡易測定は、誰でもできるといった意味ではなく、超微量の物質の測定を行うことには変わりはなく、測定精度には非常に慎重を期する部分が相当にあり、環境省はこれら生物検定法の精度管理指針を整備した。分析機関として、以前より国際クロスチェック参加等様々な活動を行っているが、さらに一層の信頼できる管理システムの構築や検証データを蓄積していきたいと思う。分析が安価で結果が早く得られることは、対策費用の大きな軽減、対策箇所、頻度の拡大に寄与することができる。さらにHRGC/HRMSとの的確な併用及び使い分けを行うことによって、より効果的な調査・対策が期待できる。

また、WHOが組織した専門委員会によるTEFの再評価結果が、DIOXIN2006(オスロ)にて発表された。これを受けて、日本においてもTEQ算出には修正されたTEFを用いることも予想され、生物検定法での毒性等量換算に多少修正を加える可能性がある。我々も、早期に対応準備を進めていきたい。

参考文献

- 1) 「ダイオキシン類簡易測定法検討会報告書」(平成16年5月)ダイオキシン類簡易測定法検討会
- 2) 「ダイオキシン類の測定における簡易測定法導入のあり方」(平成17年7月)
- 3) 「ダイオキシン類対策特別措置法施行規則第2条第1項第4号の規定に基づき環境大臣が定める方法について」(平成17年9月)
- 4) 「ダイオキシン類に係る生物検定法マニュアル」(平成17年9月、平成18年3月改訂)
- 5) 「ダイオキシン類の環境測定に係る精度管理の手引き(生物検定法)」(平成18年2月)
- 6) 「ダイオキシン類簡易測定法評価検討会報告書」(平成18年3月)環境省水・大気環境局総務課ダイオキシン対策室