

## 公定法としての生物検定法

### ～ダイオキシン類測定における一部排出ガス及びばいじん等への適用～

愛媛事業所 今井 眞

#### 1 はじめに

平成16年12月27日、ダイオキシン類対策特別措置法施行規則が一部改正され、「焼却能力が1時間当たり2000kg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及び設置者が行う測定」において、環境大臣の定める生物検定法を用いることが可能になりました<sup>1)</sup>。この改正を受けて、平成17年9月14日、環境大臣が定める方法（平成17年環境省告示第92号）が公布され<sup>2)</sup>、生物検定法が、国内で初めて公定法として指定されました。

ここでは、生物検定法について、導入の経緯、告示技術の概要および今後の課題について紹介します。

#### 2 生物検定法

生物検定法は、環境省マニュアル<sup>3)</sup>によれば、「物質の量や構成成分、効力を、その物質を与えられた生物の反応から推定する方法〔バイオアッセイ(生物学的定量法)ともいう〕」と定義されています。環境省から告示された生物検定法は、現在4種類ありますが、そのうち3種類が細胞を用いるもの、残り1種類が抗体を用いるものとなっています。

この生物検定法は、ダイオキシン類対策特別措置法（平成11年法律第105号）以外にも、「廃棄物焼却施設内作業におけるダイオキシン類ばく露防止対策要綱」に示されている付着物のダイオキシン類の含有率測定に適用が認められました<sup>4)</sup>。

ただし、立入検査（ダイオキシン類特措法第45条第3項）に係る測定は、簡易測定法によらず従来の測定方法（高分解能型ガスクロマトグラフ質量分析法（HRGC-HRMS法））を用いることが必要である<sup>5)</sup>とされています。

#### 3 生物検定法導入の経緯

ダイオキシン類特措法に定められている規制項目の測定には、分解能10000以上にチューニングされたHRGC-HRMSを用いる方法が唯一認められていました。しかし、異性体の一つひとつ測定するHRGC-HRMS法は、測定に多大な時間と費用が必要になることから、迅速で低廉な簡易測定法の開発・導入が望まれ、平成15年5月、環境省により「ダイオキシン類簡易測定法検討会」が設置されました。

検討会では、公募に応募した13技術について、公定法を補完する技術としての適用可能性を検討し、平成16年5月、「Ahレセプターバインディングアッセイ法について

表1 環境大臣が定めた方法<sup>2)</sup>（平成17年環境省告示第92号）

告示番号	方法名	備考
第1の1	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を測定する方法	ダイオキシン類応答性組換え細胞H1L6.1c2は、ホタルシフェラーゼ遺伝子の5'上流域に4個のダイオキシン応答配列DREを含むシトクロムP450(CYP1A1)プロモーターを持つプラスミドpGudLuc6.1を、マウス肝細胞Hepa1c1c7に導入したものとす
第1の2	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101L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を測定する方法	ダイオキシン類応答性組換え細胞101Lは、3個の生体異物応答配列XREを含む人のシトクロムP450(CYP1A1)プロモーターにホタルのルシフェラーゼ遺伝子と融合した5'隣接配列が安定的に統合されたプラスミドpL1A1Nを、人肝細胞由来HepG2に導入したものとす
第1の3	前処理に、変則多層カラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞HeB5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を測定する方法	ダイオキシン類応答性組換え細胞HeB5は、ラットグルタチオンS-トランスフェラーゼYaサブユニット遺伝子の転写調節領域にあるダイオキシン応答配列XREをプラスミドpGL3のホタルのルシフェラーゼ遺伝子上流域に含むプラスミドpGL3-chTATA-YaXRE x 5-bsdを、マウス肝由来Hepa-1細胞に導入したものとす
第2	前処理に、多層シリカゲルカラム及びカーボンカラムを使用し、測定に、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体と、検量線作成用標準品及びプレート固相抗原を用いた抗原固相化-酵素免疫反応を利用してダイオキシン類の毒性等を測定する方法	抗ダイオキシン類モノクローナル抗体には、マウス由来の融合細胞(ハイブリドーマ)から取得した五塩化ジベンゾフラン類を特異的に認識する抗体を、検量線作成用標準品及びプレート固相抗原には、2,4,5-トリクロロフェノール及びグリシルグリシン又は牛血清アルブミン(BSA)から合成した化合物を使用する

は、概ね各評価項目を満足しており、一定の技術レベルにあると評価できる」との報告書がまとめられました<sup>6)</sup>。

この検討結果に基づき、中央環境審議会の答申（平成16年11月12日）を経て、生物検定法が公定法として指定されることになりました。

#### 4 告示技術の概要

簡易測定法は、平成16年12月27日に再度公募されました。その中から環境大臣が定める方法として指定された技術を表1に示します。

住友化学株式会社と当社が共同で開発したAhルシフェラーゼアッセイは、告示番号第1の3として指定されました。

#### 5 今後の課題

生物検定法は、簡易測定法として開発・導入されましたが、実際の測定操作においては、相当高度な技術が含まれているため、十分な精度管理が必要となります。

環境省は、「ダイオキシン類環境測定精度管理検討会」を設置し、「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)」を策定しました<sup>3)</sup>。この手引きに従い、的確な精度管理により、公定法としての信頼を一層高めていくことが求められます。

また、生物検定法の導入は、近年のバイオテクノロジーの進展を踏まえて、先端技術の積極的な活用を図るものであり、生物検定法マニュアルにおいても、今後の測定技術の進歩や科学的知見の集積等により、改定があり得るとされ、前処理技術を含めた測定法のさらなるブラッシュアップと土壌

及び底質への適用拡大が期待されています。

#### 6 おわりに

生物検定法は、欧米ではダイオキシン類のスクリーニング手法として公的に認められていましたが、今回の環境省の認定のように生物検定法の結果がHRGC-HRMS法の結果と同等に扱われることを前提にした公定法化は先進的です。分析費用が廉価で、結果が早く得られるという面では「簡易法」ですが、分析機関が結果に対して負う責任は同じであり軽減されるものではありません。細胞の培養から試薬のロット管理までが結果に影響を与える要素となり得ることを肝に銘じ、公定法としての信頼に足るデータの提供に努めていきたいと考えています。

#### 文献

- 1) <http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=5587>
- 2) <http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=6349>
- 3) <http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=6976>
- 4) 基安化発第1115001号（平成17年11月15日）
- 5) 環管総発第050914001号（平成17年9月14日）  
環産対発第050914002号（平成17年9月14日）  
環産産発第050914001号（平成17年9月14日）
- 6) <http://www.env.go.jp/press/press.php?serial=4979>



今井 眞  
(いまい まこと)  
愛媛事業所