

<特集>

ダイオキシン類の簡易測定・オンラインモニタリング技術の動向

Development of Rapid Analyses and On-line Monitoring Techniques for Dioxins

清水芳久

京都大学大学院工学研究科附属 環境質制御研究センター*

Yoshihisa Shimizu

Research Center for Environmental Quality Control, Kyoto University

Abstract

High-resolution gas chromatography with high-resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS) is currently the Japanese official and the most used analytical method to determine dioxine-concentrations. However, this method requires expensive equipment and highly trained analysts, whilst the sample preparation procedures are often time consuming and costly. Therefore, the development of an inexpensive and rapid screening method for dioxins is of high priority. Possible alternative methods for screening dioxins are immunoassay and bioassay, such as the enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) assay, respectively. The measurement of surrogate compounds for dioxins (*e.g.*, chlorobenzenes and chlorophenols) is also applied for estimating dioxin-concentrations in the flue gas from waste incineration plants on an on-line and real-time basis.

1 はじめに

ダイオキシン類測定の目的としては、廃棄物焼却炉等から非意図的に排出されるダイオキシン類の量を監視して環境中への拡散を防止すること、様々な環境中における汚染状況の調査、汚染浄化対策前後の効果確認、ダイオキシン類汚染防止対策のための基礎研究や技術開発、等があげられる。このように測定目的は多岐に渡り、また、測定対象試料および濃度範囲も、排ガスやばいじん等の比較的高濃度 {ng (10⁻⁹ グラム) レベル} から、大気や水質等の低濃度 {fg (10⁻¹⁵ グラム) レベル} のものまで多種多様である。

ダイオキシン類の濃度測定を複雑にしているもう一つの要因がある。それはダイオキシン類の異性体および同族体は多数あり、有毒なダイオキシン類はその一部であるが、その各異性体・同族体を分析しなければ正確な毒性評価が定まらないことである。

現在、ダイオキシン類濃度は、JIS K 0311¹⁾ 等に定める高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (High-

Resolution Gas Chromatography/High-Resolution Mass Spectrometry; HRGC/HRMS) を用いる方法で測定されている。この方法は高感度・高精度の測定ができ、法規制の対象となるダイオキシン類の濃度を正確に測定できるものである。この公定法では、ダイオキシン類濃度については、ポリ塩素化ジベンゾパラダイオキシン/ポリ塩素化ジベンゾフラン (PCDD/DFs) については 2, 3, 7, 8 位塩素置換体の 4~8 塩素化の 17 異性体について、および 4~8 塩素化それぞれの同族体についての報告が必要とされている。媒体によってはさらに他の異性体についても定量しなければならないものがある。コプラナーポリ塩素化ビフェニール (Co-PCBs) については、non-ortho PCBs 4 異性体および mono-ortho PCBs の 8 異性体を定量しなければならない。そしてこれらの定量値から毒性等価係数 (2, 3, 7, 8-TeCDD Toxicity Equivalency Factor; TEF) を用いて毒性等量 (2, 3, 7, 8-TeCDD Toxicity Equivalency Quality; TEQ) が算出されることになる。

平成 12 年 (2000 年) 1 月 15 日に「ダイオキシン類対策特別措置法」が施行されたことにより、HRGC/HRMS を用いる公定法による測定対象試料の急激な増加と共に、

*〒 520-0811 滋賀県大津市由美浜 1-2
TEL:077-527-6221 FAX:077-524-9869
E-mail:shimizu@biwa.eqc.kyoto-u.ac.jp

ダイオキシン類排出実態調査の掘りどころである測定技術に関する課題が浮き彫りになってきた。現状のダイオキシン類測定の問題点として指摘されている点は以下の通りである²⁾。

- ・ダイオキシン類の測定料金が高額である(約20万円/試料)。
- ・ダイオキシン類の測定に時間がかかりすぎる(最短で約1~2週間)。試料の前処理とデータ処理に時間とコストが必要となる。HRGC/HRMSをもってしても、ダイオキシン類に対する選択性は十分ではなく、試料の分析にあたってはHRGC/HRMSにかけ前に、多段階のクリーンアップ操作によって夾雑物を除去しなければならない。これは、全コストの約1/3以上を占めていると推定される。
- ・HRGC/HRMSを利用しているため、高額な装置を持つ機関でしか分析することができない。
- ・高度な分析技術が必要で、分析技術者の育成に時間が必要である。

日常の自主的なモニタリングや広範囲な汚染箇所の調査等の場合には多数の検体をもっと迅速にしかも安価に測定することが可能な「簡易測定法」の構築が要望されている。この簡易測定法については、必要要件を満たす手法の構築に向けてまさに今、種々の研究機関での検討が精力的に進められているところである。

現状の公定法は今後も基準的な公定分析法として残るものと考えられる。簡易測定法は公定法が有する問題点を補完する測定方法としてのみならず、次のようなダイオキシン類対策を進める上での実践的なニーズ²⁾に応えることができる測定方法として重要であると考えられる。

- ・臭素化ダイオキシン類等の類縁物質も測定可能な、より選択的な分析法はないか。
- ・廃棄物焼却炉等の発生源の自動的なモニタリングやそれを用いた排出の制御ができないか。
- ・汚染現場で測定できるようにならないか。

このような状況をまとめると、簡易法の開発の方向性として以下の点が重要であると言える²⁾。

- ・簡易で安価な分析法の開発
- ・迅速な分析法の開発
- ・選択性の高い検出系の開発
- ・現場測定手法(オンライン・リアルタイムモニタリング等)の開発
- ・システムの最適化および開発

現在、ダイオキシン類の簡易で安価な測定法の開発に向けてあらゆる角度から様々な手法が試みられており、これらの報告には公定法で必要とされている項目を省略する、もしくは異なる方法を用いることでTEQを求める手法が多く見られる。例えば、試料採取工程に関しては新しい吸着剤の開発³⁾や簡易採取法{公定法(湿式捕集法)の簡易化⁴⁾、抽出では超音波抽出法⁴⁾や高速溶媒抽出(Accelerated Solvent Extraction; ASE)法⁵⁾、およびこれらの抽出方法の自動化・省力化、生成ではオンラインクリーンアップ、簡易型カートリッジ、液体クロマトグラフ(High Performance Liquid Chromatography; HPLC)を用いる手法といったものがあげられる。中でも特に機器分析の工程に着目すると、公定法で採用されているHRGC/HRMSを用いずに低分解能のGC/MSやGC/MS/MS、液体クロマトグラフ質量分析計(LC/MS)等を用いる方法や、同族体や関連物質といった代替指標物質{ダイオキシン類前駆物質であるクロロフェノール類^{3),6),7)}、クロロベンゼン類^{3),7)}、有機ハロゲン化合物(Tox)等}とTEQとの関係から概算値を算出する方法⁷⁾⁻⁹⁾がある。他の検出法として生物の選択性を利用した手法(イムノアッセイ法^{5),6),10),13)}、バイオアッセイ法^{12),13)}等の報告もある。

生物の選択性を利用する方法は未知化合物を含めダイオキシン類縁化合物のダイオキシン様活性を包括的に評価できる安価で簡便な手法であり、HRGC/HRMSによる個別化合物の定量との併用あるいは化学分析前のプレスクリーニングとして用いることにより、環境汚染のモニタリング、リスクアセスメント、処理プロセスのモニタリング等をより実際的に実施するうえで役立つものと期待される。また、代替指標を利用する方法は、ダイオキシン類の直接測定ではないものの原理的に短時間かつ自動的に測定できる方法であり、焼却施設排ガスのオンラインモニタリングが可能な簡易測定法としては有効であると考えられる。本稿では、以下にこれら2種の簡易測定法(生物の選択性を利用する方法と代替指標を利用する方法)について概説する。

2 生物の選択性を利用する簡易測定法(生物検定法)

HRGC/HRMSを利用する公定法では、ポリ臭素化ジベンゾパラダイオキシン(PBDDs)、ポリ臭素化ジベンゾフラン(PBDFs)、ポリ臭素化ナフタレン(PCNs)等、ダイオキシン類と同様の生理活性を有すると推定されて

いる化合物の分析は考慮されないことが多い。また、ダイオキシン類の生体反応における相互作用（相加，相乗，拮抗）は化学分析では考慮されていない。近年，このような化学分析の欠点を補充，あるいは化学分析に供する必要がある試料を選ぶための1次スクリーニングの方法として簡便で安価な生物の選択性を利用する測定法が注目されるようになってきている。これらの生物検定法は，抗原抗体反応を利用するイムノアッセイとダイオキシン類と選択的に結合するレセプター（Aryl hydrocarbon Receptor; AhR）との反応を利用するバイオアッセイに大別される。

現在，多く用いられているイムノアッセイとして酵素免疫測定法（Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; ELISA）があげられる。ELISAは，抗体をマイクロプレート，試験管，磁気ビーズ，ラテックス等の固相にコーティング（固定化）したものに，対象物質（サンプルや標準物質）および標識抗原として用いる酵素を添加して競合結合させ，抗体に結合しなかった対象物質や標識抗原を洗浄後，酵素基質を添加して酵素による発色反応をさせ，次いで発色の程度を測定し，対象物質の標準品の発色度と比較することにより対象物質の濃度を測定する方法である（Fig 1）。

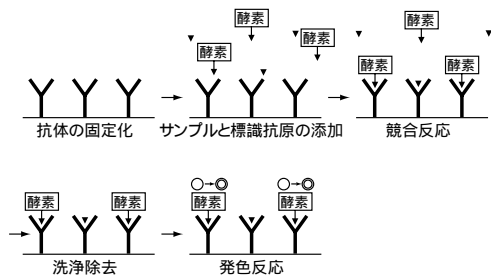


Fig.1 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

一方，ダイオキシン類等のハロゲン化芳香族炭化水素化合物による毒性が細胞内に存在する AhR を介した遺伝子発現に基づくことを利用するバイオアッセイは，その遺伝子発現を調節する転写プロモーターの特性や活性，またはそのプロモーターに結合する転写因子を生物学的に測定する方法である。目的遺伝子の転写プロモーターを *beta*-ガラクトシターゼやルシフェラーゼ等のレポーター遺伝子上流に挿入した人工遺伝子を作成し，これを細胞内に導入して，レポーター遺伝子の発現を酵素の活性や生物化学的発光を測定することによって定量化する方法である。ダイオキシン類の生理活性を検出する系としては，プロモーターにダイオキシンレセプター結合配列，レポーター遺伝子として発光生物に由来するルシフェ

ラーゼ遺伝子や緑色蛍光タンパク質遺伝子が用いられる（Fig 2）。

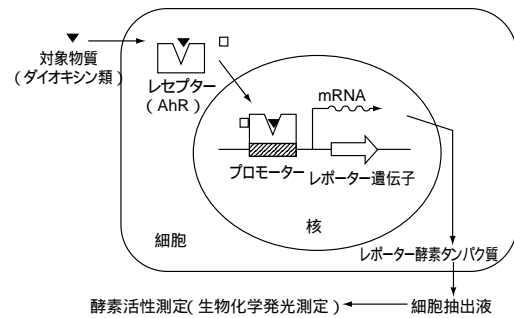


Fig.2 Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Assay

これらの生物検定法は，簡便で分析時間が短く（試料添加後，イムノアッセイで数時間以内，バイオアッセイで24時間程度），公定法による TEQ との相関が高いといった利点を有する。バイオアッセイは分析対象の生物活性を包括的に検出できる等，培養細胞を使用することによるメリットが大きい反面，イムノアッセイに比較すると幾分簡便性，迅速性といった点で劣っている。それぞれの長所，短所を活かした今後の適用，展開が期待される。

欧州連合（EU）では，2002年7月1日に施行された「食品・飼料のダイオキシン類基準」を担保するための公定測定法の中のスクリーニング手法として生物検定法を採用した。2002年7月の欧州委員会（EC）指令では，本格測定法（HRGC/HRMS）とスクリーニング測定法（バイオアッセイ）を定め，スクリーニング法での測定で，基準値の6~7割以上の場合には，本格測定法で再度測定し判定するものとし，これ以下の値であれば基準を満たしているものと判定することとしている。また，米国環境保護庁（US EPA）でも，ヒトの細胞を用いたスクリーニング測定用生物検定法を利用することを2000年1月に Method 4425 において制定している。

3 代替指標を利用する簡易測定法

現在のダイオキシン類の主要発生源は廃棄物焼却炉と推定されており，排ガスを常時オンラインモニタリングし，そのモニター値を排出抑制の制御系にフィードバックして排出抑制を行うことが考えられている。

現在，焼却炉の燃焼状態を常時モニタリングする指標として一酸化炭素（CO）が用いられている。COは不完全燃焼を把握するには効果的であるが，現在の焼却炉で

は十分な燃焼管理が施されており、CO濃度が低い場合はダイオキシン類濃度との相関が小さい。またダイオキシン類の発生は燃焼過程に限らず燃焼炉から煙突までにおきる再合成過程が重要で、COはその指標にならない。そのためダイオキシン類の生成過程での中間生成物(即ち、ダイオキシン類前駆体)がダイオキシン類量の数百倍含まれていて、ダイオキシン類量と相関することが多いことに注目して、これらを代替指標としてモニターすることにより生成・排出を抑制しようとするアプローチである。

代替指標としてはクロロベンゼン類やクロロフェノール類の他、全有機ハロゲン化合物(TOX)あるいは多環式芳香属炭化水素類(PAHs)等も検討されている。測定方法としては、排ガス出口からの試料ガスをサンプリングしてGC/MS等で計測することとなる。これらの代替指標を用いてモニターする方法は既に市販の装置も存在する。

この代替指標による測定方法の意義としては、公定法を補完する形で日常的にダイオキシン類の排出状況を把握できること、プラントの状況を日常的に監視することができ、迅速にダイオキシン類を低減させる適切な運転管理を行うことができること、運転管理指標とすることで適切な運転条件・運用方法が把握でき、例えば排ガスへの粉状活性炭投入量の適正化等の運転経費の削減が期待できること、焼却炉や環境対策整備の改造・新設に伴う性能評価が簡単にでき、最適な運用方法が把握できること、および同様に研究開発用の簡易な性能評価手法に利用できることが考えられる。尚、このアプローチの弱点は代替指標が排ガス中ダイオキシン類濃度を常に反映しているかどうかが一つ明確ではないという点にあり、今後、その指標性についてのデータの更なる積み上げが求められる。

4 おわりに

本稿では、ダイオキシン類濃度を測定するために利用されている公定法(HRGC/HRMS)が多大な時間とコストを必要としている現状を述べ、これを補完することを目的として現在検討が進んでいる簡易測定法の中から、生物の選択性を利用する方法(生物検定法)と代替指標を利用する方法についてその概略を述べた。これらの簡易測定法は、何れも簡易性(コスト、時間、取り扱い)に関してはその要件を満たしていると考えられる。しかし、現状では、測定原理の妥当性、公定法との相関性(乖離

の程度とその原因)、再現性やばらつきの程度、感度(検出限界、定量限界)等の点で問題を抱えていることは否定できない。これらの方法の他にも、ダイオキシン類を直接測定する方法も種々検討されているがまだ実用化されておらず、また価格の問題も存在する。今後はこれらの要件を全て満足するような簡易測定法の確立が待たれる。

[参考文献]

- 1) 日本工業規格:排ガス中のダイオキシン類およびコプラナーPCBの測定方法, K0311 (1999).
- 2) 伊藤裕康:ダイオキシン類の簡易測定技術とその開発状況, "ダイオキシン等微量有害物質迅速・簡易測定実務セミナーテキスト", pp.15-28 (2002).
- 3) 山下正純, 本田克久:小型焼却炉におけるダイオキシン類の簡易監視法, 環境化学, 13 (2), 435-443 (2003).
- 4) 上東 浩:ダイオキシン類測定分析の迅速化・簡易化, 資源環境対策, 37 (9), 50-55 (2001).
- 5) 坂田一登, 松木宏和, 岡本巧誠, 谷岡洋平, 藤本 昇:高速溶媒抽出法と免疫測定法を組み合わせた迅速ダイオキシン分析技術, 資源環境対策, 37 (9), 87-90 (2001).
- 6) 斉藤 拓:クロロフェノールを用いたダイオキシン類の連続監視簡易測定, 資源環境対策, 37 (9), 56-59 (2001).
- 7) 野口嘉一:有機ハロゲン化合物を用いた排ガス中ダイオキシン類の連続モニタリング, 資源環境対策, 39 (6), 46-49 (2003).
- 8) Urano, K. and Kato, M.: Convenient Substitute Indices to Toxic Equivalent Quantity for Controlling and Monitoring Dioxins from Waste Incinerators, *Organohalogen Compounds*, 54, 364-367 (2001).
- 9) 柴山 基, 林 篤宏, 井上 毅, 高菅卓三:指標異性体を用いたダイオキシン類の迅速測定法, 環境化学, 13 (1), 17-29 (2003).
- 10) Harrison, R. O. and Carlson, R. E.: An Immunoassay for TEQ Screening Dioxin/Furan Samples: Current Status of Assay and Application Development, *Chemosphere*, 34, 915-928 (1997).
- 11) 小林康男, 植地俊仁:ELISA法によるAhレセプターを利用したダイオキシン分析, 環境技術, 31 (8), 594-599 (2002).
- 12) 細江和典, 波戸義雄:DR-CALUX法によるダイオキシン類の簡易分析, 環境技術, 31 (8), 600-603 (2002).
- 13) 酒井伸一, 滝上英孝, 細江和典:ダイオキシン様物質の培養細胞によるバイオアッセイ, 廃棄物学会誌, 14 (1), 34-50 (2003).