

ダイオキシン類対策特別措置法施行規則及び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の一部改正案の概要

1. 趣旨

ダイオキシン類の測定については、従来の高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計による測定では、測定に多大な時間と費用が必要であり、低廉で迅速ないわゆる簡易測定法の開発・導入が期待されてきました。

このため、環境省では、平成16年12月にダイオキシン類対策特別措置法施行規則（平成11年総理府令第67号）（以下、「法施行規則」という。）の一部を改正し、廃棄物焼却炉からの排出ガス、ばいじん及び焼却灰その他の燃え殻（以下、「ばいじん等」という。）に含まれるダイオキシン類の測定の一部に生物検定法による簡易測定法を追加し、平成17年9月には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（平成17年環境省告示第68号）（以下、「方法告示」という。）を告示し、4種類の具体的な方法の指定を行いました。

その後の新たな科学的知見の蓄積を踏まえ、廃棄物焼却炉からの排出ガス、ばいじん等に含まれるダイオキシン類の測定の一部に適用可能な簡易測定法の追加導入について検討するため、平成19年に生物検定法による簡易測定法の公募を行い、実用化の検証を実施するとともに、土壌及び底質の測定の一部に導入された機器分析法による簡易測定法についても追加導入の検討を進めてきました。

今般、これらの測定方法に対する実用化検証の結果が取りまとめられ、追加導入可能な実用化レベルにあると評価された測定方法を追加するため、法施行規則及び方法告示の一部を改正するものです。

2. 法施行規則及び方法告示の改正案の概要

（1）法施行規則改正案

- 法施行規則第2条第1項第4号に掲げる方法として、機器分析法による方法である「高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計、ガスクロマトグラフ四重極形質量分析計又はガスクロマトグラフ三次元四重極形質量分析計により測定する方法」を追加する。
- 上記方法の追加に伴い、法施行規則第3条及び様式第6の規定の一部を改める。

（2）方法告示改正案

- 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、以下の測定方法を追加する。

<ダイオキシン類がアリール炭化水素受容体に結合することを利用した方法>

- ・前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 Hepa1c1c7 細胞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（ダイオキシン類応答性組換え細胞 Hepa1c1c7 は、生体異物応答配列 XRE（7個）を含むマウスのチトクローム P450 (CYP1A1) プロモーターにホタルのルシフェラーゼ遺伝子を融合したプラスミド pIND-GCDR7 を、マウス肝腫瘍細胞 Hepa1c1c7 に導入したものとす。）

- ・前処理に、硫酸シリカゲル加熱還流を使用し、測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 H4II E-luc 細胞を用いたレポータージーン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（ダイオキシン類応答性組換え細胞 H4II E-luc は、ホタルのルシフェラーゼを発現させるレポーター遺伝子 pGudLuc1.1 をラット肝がん細胞 H4IIE に導入したものとする。）
- ・前処理に、硫酸処理および多層シリカゲルカラムを使用し、測定に、ダイオキシン類-Ah 受容体 ARNT 複合体の形成を活用し、ダイオキシン類の毒性等量を測定する方法（Ah レセプターを含有するモルモット由来の細胞質液（サイトソル）、バキュロウイルスの発現系を用いて生産したヒト由来の ARNT 及び化学合成によるダイオキシン応答要素 DRE と、これらと形成したダイオキシン類複合体に対して、特異的に Ah レセプターとの複合体を作る ARNT 部分に反応する抗 ARNT ポリクロナール一次抗体、一次抗体に結合する二次抗体および発色試薬を使用する。）

<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>

- ・前処理に、多層シリカゲルカラム及び活性炭シリカゲルカラムを使用し、測定に、磁性ビーズ固定化抗ダイオキシン類抗体と酵素標識抗原を用いた 1 ステップ競合酵素免疫測定法を利用して、ダイオキシン類の毒性等量を測定する方法（磁性ビーズに固定化された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及び六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酵素標識抗原には、5-オキソ-5-[(2,4,5-トリクロロフェニル)アミノ]ペンタン酸及び 2,4,5-トリクロロフェノール誘導体を標識したアルカリ性ホスファターゼ標識抗原を使用する。）
- ・前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、測定に、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体を用いた間接競合酵素免疫測定法を組み合わせることにより、ダイオキシン類の毒性等量を測定する方法（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一次抗体を、一次抗体を認識する酵素標識二次抗体には、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）を標識した抗マウス IgE 抗体を、検量線作成用標準品及びプレート固相抗原には、6-(3,3',4'-トリクロロビフェニル-4-イロキシ)ヘキサノ酸を使用する。）
- ・前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、測定に抗ダイオキシンモノクローナル抗体と抗原固相化ビーズを用いた結合平衡除外法を利用してダイオキシン類の毒性等量を測定する方法（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 2,3,4,7,8-五塩化ジベンゾフランを特異的に認識する抗体を、色素標識二次抗体には、インドジカーボシアニン(Cy5)を標識した一次抗体を認識する抗体を、検量線作成用標準品及びビーズに固相化した抗原には、3-[6-(2,4,5-トリクロロフェノキシ)ヘキサノイルアミノ]プロピオン酸及び 2,4,5-トリクロロフェノキシ誘導体を使用する。）

<高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計、ガスクロマトグラフ四重極形質量分析計又はガスクロマトグラフ三次元四重極形質量分析計により測定する方法>

- ・前処理に、硫酸シリカゲルカラム、多層シリカゲルカラム、又は多層シリカゲルカラム及び活性炭シリカゲルカラムを使用し、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計によりダイオキシン類を測定する方法
- ・前処理に、多層シリカゲルカラム又は多層シリカゲルカラム及び活性炭シリカゲルカラムを使用し、ガスクロマトグラフ四重極形質量分析計によりダイオキシン類を測定する方法

- ・前処理に、多層シリカゲルカラム又は多層シリカゲルカラム及び活性炭シリカゲルカラムを使用し、ガスクロマトグラフ三次元四重極形質分析計によりダイオキシン類を測定する方法

なお、今回追加する予定の測定方法を用いることができる測定は以下のとおりです。

- 法第 28 条第 1 項及び第 2 項の規定に基づき特定施設の設置者が行う排出ガス（焼却能力 2,000kg/時未満の廃棄物焼却炉に限る。）及びばいじん等の測定
- 法第 24 条第 1 項に基づく廃棄物焼却炉に係るばいじん等の処理の基準の検定

3. 今後の予定

パブリックコメント実施後、法施行規則及び方法告示の一部の改正を行うとともに、機器分析法による簡易測定法マニュアルの策定、生物検定法マニュアル、ダイオキシン類の環境測定に係る精度管理指針及び精度管理の手引きの改訂を行う予定です。

別添：ダイオキシン類簡易測定法実用化検証結果の概要

(別添)

ダイオキシン類簡易測定法実用化検証結果の概要

1. 検証方法

(1) 生物検定法

- ・検証対象の測定方法を公募（公募期間：平成19年5月21日～7月20日）により募集。
- ・応募された7種の方法について、応募要件の確認を行い、要件に該当することが確認された方法を対象に検証試験(第1回、第2回、第2回(追加試験)、一部の方法について繰り返し再現性試験も実施)を実施し、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計による測定方法（GC/MS法）との比較、定量下限値及び測定の再現性の観点から各測定方法の適用可能性の評価を行うとともに、迅速性及び経済性の観点から評価を実施。

<応募要件>

○ 測定方法

- ・排出ガス、ばいじん及び燃え殻に含まれるダイオキシン類を測定することができる生物検定法（小型の生物、細胞又はその構成物質等を用いて、物質の活性又は量を測定する方法）による測定方法であること。
- ・実用化されていること（市販／受託の実績があること）。
- ・GC/MS法に比べ、測定に要する時間が短く、費用がかからないこと。
- ・中立機関による実証試験の実施が可能であること。
- ・測定方法に関する特許権の所有者が、非差別的かつ合理的な条件でいかなる者に対しても当該特許権の実施を許諾することを表明できること。
- ・GC/MS法との比較データが、排出ガス試料、灰試料（ばいじん及び燃え殻）についてそれぞれ20以上あること。

<適用可能性評価項目> (): 評価の目安値

- ・当該測定方法による換算毒性等量とGC/MS法による毒性等量との相関性
- ・当該測定方法による換算毒性等量とGC/MS法による毒性等量との比（概ね1/2から2倍の範囲内に入っていること）
- ・定量下限値（規制基準値の1/10以下を満たすものであること）
- ・測定の再現性（前処理を含む3回以上の測定を行った場合の変動係数が実試料で30%以下であること）

(2) 機器分析法

- ・以下の選定要件に該当する方法を検証対象の測定方法として選定。
- ・選定された3種類のクリーンアップ方法及び3種類の測定機器の組み合わせによる7種の方法について、検証試験（一部の方法について低濃縮試料測定、試料量増加測定も実施）を実施し、GC/MS法との比較、定量下限値及び測定の再現性の観点から各測定方法の適用可能性の評価を行うとともに、迅速性及び経済性の観点から評価を実施。

<選定要件>

- ・廃棄物焼却炉からの排出ガス、ばいじん及び燃え殻に含まれるダイオキシン類を測定することができる機器分析法であること。
- ・実用化されていること。
- ・GC/MS法に比べ、測定に要する時間が短く、費用がかからないこと。

<適用可能性評価項目> (): 評価の目安値

- ・当該測定方法による換算毒性等量とGC/MS法による毒性等量との相関性
- ・当該測定方法による換算毒性等量とGC/MS法による毒性等量との比（概ね1/2から2倍の範囲内に入っていること）
- ・定量下限値（規規制基準値の1/10以下を満たすものであること）
- ・測定の再現性（前処理を含む3回以上の測定を行った場合の変動係数が実試料で30%以下であること）

2. 検証結果

(1) 生物検定法

・検証を行った測定方法は、いずれも、追加導入可能な実用化レベルにあると評価。

評価項目	GC/MS 法との の相関性(R ²)	GC/MS 法による 毒性等量との比	定量下限値	測定の再現性	迅速性	経済性	備考	
評価の目安値		概ね 1/2 倍から 2 倍の範囲内	規制基準値の 1/10 以下 [ばいじん及び燃え殻： 0.3ng-TEQ/g 以下]	変動係数 (n=3 以上) が実試料で 30%以下	GC/MS 法に比 べ迅速 [7 日/検体]	GC/MS 法に比べ安価 [150,000 円/検体]		
評価対象試験等	第 2 回検証試 験(追加試験)	第 2 回検証試験 (追加試験)	第 2 回検証試験 (追加試験)	第 2 回検証試験 <繰り返し再現性検 証試験>*1	第 2 回検証試験	応募資料 ①排出ガス ②ばいじん及び燃え殻	*1: 独立プレートでの再試験	
AhR-1	前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、 測定に、ダイオキシン類応答性組換え細胞 Hepa1c1c7 細胞を用 いたレポータージーン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	0.9945	1.0~1.3	0.0034~0.0042 ng-TEQ/g	<4.2~8.9%>	10 日/検体*2 (7 日/検体)	①②7,000 円/検体*3	*2: 予備操作を含む。()は予 備操作を行わない場合。応 募資料では 7 日/検体。 *3: 消耗品等実費のみ
AhR-2	前処理に、硫酸シリカゲル加熱還流を使用し、測定に、ダイオ キシン類応答性組換え細胞 H4 II E-luc 細胞を用いたレポーター ジーン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	0.9878	0.73~1.4	0.00048~0.00056 ng-TEQ/g	3.6~22%	7 日/検体	①②50,000 円/検体	
AhR-3	前処理に、硫酸処理および多層シリカゲルカラムを使用し、測 定に、ダイオキシン類-Ah 受容体 ARNT 複合体の形成を活用 し、ダイオキシン類の毒性等量を測定する方法	0.9904	0.59~1.4	0.21 ng-TEQ/g	<12~13%>	2 日/検体	①45,000~55,000 円/検体 ②40,000~50,000 円/検体	
IA-1	前処理に、多層シリカゲルカラム及び活性炭シリカゲルカラム を使用し、測定に、磁性ビーズ固定化抗ダイオキシン類抗体と 酵素標識抗原を用いた 1 ステップ競合酵素免疫測定法を利用し て、ダイオキシン類の毒性等量を測定する方法	0.9962	1.1~2.0	0.038 ng-TEQ/g	0.58~5.5%	4 日/検体	①19,500 円/検体 ②17,650 円/検体	
IA-2	前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、 測定に、抗ダイオキシン類モノクローナル抗体を用いた間接競 合酵素免疫測定法を組み合わせることにより、ダイオキシン類 の毒性等量を測定する方法	0.9977	0.63~1.2	0.014~0.015ng-TEQ/g	<9.3~14%>	3 日/検体	①②14,400 円/検体	
IA-3	前処理に、多層シリカゲルカラム及び活性炭カラムを使用し、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量を測定する方法*4	0.9976	1.0~1.7	0.04 ng-TEQ/g	1.7~4.1%	5 日/検体	①24,000 円/検体 ②23,000 円/検体	*4: 方法告示第 2 の方法
IA-4	前処理に、多層シリカゲルカラム及びアルミナカラムを使用し、 測定に抗ダイオキシンモノクローナル抗体と抗原固相化ビーズ を用いた結合平衡除外法を利用してダイオキシン類の毒性等量 を測定する方法	0.9818	0.69~1.9	0.04~0.05 ng-TEQ/g	2.2~4.8%	2 日/検体	①8,300 円/検体 ②8,100 円/検体	

(注) 繰り返し再現性検証試験を実施した方法は、その試験データで評価。

(2) 機器分析法

・ 検証を行った測定方法は、一部の方法について試料量の調節に留意が必要なものがあるものの、いずれも、追加導入可能な実用化レベルにあると評価。

評価項目	GC/MS 法との 相関性(R ²)	GC/MS 法による 毒性等量との比	定量下限値	測定の再現性	迅速性	経済性	備考
評価の目安値		概ね 1/2 倍から 2 倍の 範囲内	規制基準値の 1/10 以下 [ばいじん及び燃え殻： 0.3ng-TEQ/g 以下]	変動係数 (n=3 以上) が実試料で 30%以下	GC/MS 法に比べ迅速 [7 日/検体]	GC/MS 法に比べ 安価 [150,000 円/検体]	
評価対象試験・測定等	検証試験 (低濃縮試料 測定) *1	検証試験 (低濃縮試料測定)*1 <試料量増加測定>*2	検証試験 (低濃縮試料測定)*1 <試料量増加測定>*2	検証試験 (低濃縮試料測定)*1 <試料量増加測定>*2	検証試験 (低濃縮試料測定)*1 <試料量増加測定>*2	試算 ①排出ガス ②ばいじん及び燃 え殻	*1 : 最終試料液量を 2.5ml(検証試験の 50 倍)で実施 *2 : 試料量を 2.0g (検証試 験の 4 倍) で実施
前処理に、硫酸シリカゲルカラム、多 層シリカゲルカラム、又は多層シリカ ゲルカラム及び活性炭シリカゲルカ ラムを使用し、高分解能ガスクロマト グラフ質量分析計によりダイオキシ ン類を測定する方法	シリカゲルカラム処理 →GC/HRMS 法による方法	(0.9993)	(0.97~1.1)	(0.3 ng-TEQ/g)	(2.0~6.6%)	(4~5 日/検体)	① 46,000 円/検体 ② 44,000 円/検体
	多層シリカゲル処理 →GC/HRMS 法による方法	0.9998	0.95~1.1	0.02 ng-TEQ/g	0.57~4.7%	4~5 日/検体	① 48,000 円/検体 ② 46,000 円/検体
	多層シリカゲルカラム及び 活性炭シリカゲルカラム処理 →GC/HRMS 法による方法	0.9999	0.96~1.1	0.02 ng-TEQ/g	0.090~2.6%	4~6 日/検体	① 56,000 円/検体 ② 54,000 円/検体
前処理に、多層シリカゲルカラム又は 多層シリカゲルカラム及び活性炭シ リカゲルカラムを使用し、ガスクロマ トグラフ四重極形質量分析計により ダイオキシニン類を測定する方法	多層シリカゲル処理 →GC/QMS 法による方法	0.9999	0.67~1.0 <1.2>	<0.3 ng-TEQ/g>	1.5~5.7% <3.0%>	<4~5 日/検体>	① 48,000 円/検体 ② 46,000 円/検体
	多層シリカゲルカラム及び 活性炭シリカゲルカラム処理 →GC/QMS 法による方法	0.9999	0.72~1.1 <1.1>	<0.3 ng-TEQ/g>	1.4~5.4% <6.1%>	<4~6 日/検体>	① 56,000 円/検体 ② 54,000 円/検体
前処理に、多層シリカゲルカラム又は 多層シリカゲルカラム及び活性炭シ リカゲルカラムを使用し、ガスクロマ トグラフ三次元四重極形質量分析計 によりダイオキシニン類を測定する方 法	多層シリカゲル処理 →GC/ITMS/MS 法による方法	0.9999	0.97~1.1	0.3 ng-TEQ/g	2.6~15%	4~5 日/検体	① 48,000 円/検体 ② 46,000 円/検体
	多層シリカゲルカラム及び 活性炭シリカゲルカラム処理 →GC/ITMS/MS 法による方法	0.9999	0.94~1.0	0.3 ng-TEQ/g	1.8~17%	4~6 日/検体	① 56,000 円/検体 ② 54,000 円/検体

(注) 低濃縮試料測定、試料量増加測定を実施した方法は、その測定データで評価。なお、試料量増加測定は、1 試料について実施したため、GC/MS 法による毒性等量との比較及び測定の再現性については検証試験のデータも併せて評価。