

ダイオキシン類に係る生物検定法マニュアル
(排出ガス、ばいじん及び燃え殻)

平成 17 年 9 月 14 日

環境省環境管理局総務課ダイオキシン対策室

マニュアル制定にあたって

ダイオキシン類の測定については、環境中の超微量なダイオキシン類を測定するため、これまでの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では測定に多大な時間と費用が必要となっており、迅速で低廉な、いわゆる簡易測定法の開発・導入が期待されている。

このため、環境省では、平成 16 年 12 月 27 日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)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「ばいじん及び燃え殻」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の追加等を行った。規則において環境大臣が定めることとされている具体的な測定方法について、技術評価を踏まえて、平成 17 年 9 月 14 日に告示を行い、本マニュアルの対象となっている 4 種類の方法を指定した。

本マニュアルは、ダイオキシン類簡易測定法技術評価検討会の委員のご助力をいただき、作成したものである。本マニュアルが、ダイオキシン類の測定やモニタリングが一層、効果的、効率的に行われ、ダイオキシン類の削減に寄与することに期待する。

平成 17 年 9 月 14 日

環境省環境管理局ダイオキシン対策室

ダイオキシン類簡易測定法技術評価検討会委員名簿

(敬称略、五十音順)

伊藤 裕康	独立行政法人国立環境研究所化学環境研究領域計測管理研究室
小森 行也	独立行政法人土木研究所水循環研究グループ
酒井 伸一	京都大学環境保全センター
滝上 英孝	独立行政法人国立環境研究所循環型社会形成推進・廃棄物研究センター有害廃棄物管理研究室
半野 勝正	千葉県環境研究センター廃棄物・化学物質部化学物質研究室
細見 正明	東京農工大学大学院共生科学技術研究部
宮田 秀明	摂南大学薬学部
森田 昌敏	独立行政法人国立環境研究所
渡邊 肇	自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター

目 次

第 1 章 概論	1
第 1 節 対象物質	1
第 2 節 引用規格	1
第 3 節 用語の定義	1
第 4 節 測定方法の概要	2
第 2 章 各論 (生物検定法に共通する事項)	5
第 1 節 試料採取方法	5
第 2 節 測定結果の報告	8
第 3 節 測定データの精度管理	12
第 4 節 廃棄物保管及び安全管理	14
第 3 章 各論(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)	
その 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量を測定する方法	16
第 1 節 測定方法の概要	16
第 2 節 用語の定義	16
第 3 節 試料採取方法に関する特記事項	17
第 4 節 試料の前処理	18
第 5 節 測定	26
第 6 節 参考資料	41
その 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量を測定する方法	43
第 1 節 測定方法の概要	43
第 2 節 用語の定義	43
第 3 節 試料採取方法に関する特記事項	44
第 4 節 試料の前処理	45
第 5 節 測定	51
第 6 節 参考資料	57
その 3 前処理に、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量を測定する方法	59

第1節	測定方法の概要	59
第2節	用語の定義	59
第3節	試料採取方法に関する特記事項	60
第4節	試料の前処理	61
第5節	測定	67

第4章 各論(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量を測定する方法		75
第1節	測定方法の概要	75
第2節	用語の定義	75
第3節	試料採取方法に関する特記事項	75
第4節	試料の前処理	77
第5節	測定	83
第6節	参考資料	90

第1章 概論

本マニュアルに記載する各測定方法は、廃棄物焼却炉のうち、焼却能力が1時間当たり、2,000キログラム未満の施設において、当該施設設置者が排出ガスを測定する場合及び廃棄物焼却炉において当該施設設置者がばいじん等を測定する場合に、十分な精度を有するものとして用いることができるものとする。なお、今後の測定技術の進歩や科学的知見の集積等により、本測定法の改定があり得るものである。

また、本マニュアルに記載する各測定方法を罰則に係る測定で用いることはできない。

第1節 対象物質

本マニュアルに記載する各測定方法では、毒性等価係数を有するダイオキシン類(PCDDs、PCDFs及びコプラナーPCBs)を測定対象とし、各測定法による実測濃度に所定の係数を乗じて測定量(毒性等量)を算出する。

第2節 引用規格

次に掲げる規格は、本マニュアルに引用されることによって、各測定方法の一部を構成する。これらの引用規格は、その最新版(追補を含む)を適用する。

- JIS K0095 排ガス試料採取方法
- JIS K0211 化学分析用語(基礎部門)
- JIS K0215 化学分析用語(分析機器部門)
- JIS K0301 排ガス中の酸素分析方法
- JIS K0311 排ガス中のダイオキシン類の測定方法
- JIS K0901 気体中のダスト試料捕集用ろ過材の形状、寸法並びに性能試験法
- JIS R3503 化学分析用ガラス器具
- JIS R3505 ガラス製体積計
- JIS Z8808 排ガス中のダスト濃度の測定方法

第3節 用語の定義

本マニュアルで用いられる用語の定義を以下に説明する。なお、各測定方法に固有の単語については、第3章及び第4章各論において、説明する。

- 1) TEF 2,3,7,8-TeCDD 毒性等価係数
- 2) TEQ 2,3,7,8-TeCDD 毒性等量
- 3) WHO-TEF WHO/IPCS(1998)のTEF
- 4) HRGC/HRMS 高分離能ガスクロマトグラフ/高分解能質量分析計、ガスクロマトグラフのカラムとしてキャピラリーカラムを用い、分解能が10,000以上の二重収束形質量分析計を組み合わせたもの
- 5) 2,3,7,8-TeCDD 2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシン
- 6) 生物検定法 バイオアッセイ(生物学的定量法)ともいう。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
- 7) コプラナーPCBs ポリ塩化ビフェニル(PCBs)の中でダイオキシン類と同様の毒性をもつ異性体をさし、オルト位(2,2',6及び6')に置換塩素をもたない異性体(ノンオルト体)4種類及びオルト位

に置換塩素が1個ある異性体(モノオルト体)8種類を規定する、ダイオキシン類と同様にへん平構造を示し、ダイオキシン様 PCBs、DL-PCBs とも言われる

- 8) 抗原 抗原抗体反応または、免疫応答を誘発しうる物質の総称。免疫原性をもつ完全抗原に対して、比較的小さな分子で免疫原性をもたない抗原をハプテンという。ダイオキシン類はハプテンであり、適当な担体と結合させることで抗原性がでてくる
- 9) 抗体 免疫反応において、抗原の刺激によって生体内に作られ、その抗原と特異的に結合するタンパク質の総称
- 10) レポーター遺伝子アッセイ ダイオキシン類による生体内での遺伝子発現誘導メカニズムを活用し、ホタル等の発光酵素であるルシフェラーゼ等を発現させるレポーター遺伝子を導入した組換え細胞を用いて、試料中のダイオキシン類に反応した遺伝子により生成されるルシフェラーゼ等の活性(発光量)をルミノメーターで測定することにより、ダイオキシン類の量を定量する方法
- 11) 抗原抗体反応 抗原とそれに対応する抗体との特異的な結合によって起こる反応
- 12) 酵素免疫測定法 ELISA(Enzyme-linked Immunosorbent Assay)、酵素抗体法、エンザイムイムノアッセイともいう。本マニュアルに記載されている方法は、抗体中の結合部位を占有した抗原(ダイオキシン類)を、酵素標識抗体を用いて検出することによって、試料中のダイオキシン類濃度を測定する方法である
- 13) 実測濃度 各生物検定法において定められた標準物質を用いて検量線を作成し、それに基づいて得られた、試料中ダイオキシン類の標準物質に相当する濃度
- 14) 測定量(毒性等量) 生物検定法においては、実測濃度について対象測定媒体別に定められる換算による換算を行って得られた値
- 15) RLU Relative Light Unit、発光量ともいう。本マニュアルでは、レポーター遺伝子アッセイにおいてルシフェラーゼが基質と作用する際に生じる発光の強さを指す
- 16) 吸光度 物質が光を吸収する度合いを透過率の逆数の常用対数で表した数値

第4節 測定方法の概要

対象媒体ごとに試料を採取し、ダイオキシン類を抽出後、クリーンアップを行い、以下に列挙する4つの生物検定法のいずれかにより定量する。生物検定法を用いた測定のフローを図1-1に示す。

- 1) 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
 - (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量を測定する方法(環境省平成17年告示第92号第1の1)
 - (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量を測定する方法(環境省平成17年告示第92号第1の2)
 - (3) 前処理に、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量を測定する方法(環境省平成17年告示第92号第1の3)
- 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
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量を測定する方法(環境省平成 17 年告示第 92 号第 2)

(参考) ダイオキシン類は非常に有害性が高いので、吸入、誤飲、直接皮膚への接触などをできるだけ避け、前処理室及び分析室の換気並びに廃液や廃棄物の管理は十分に行うことが望ましい。また、その他の薬品、溶媒などでも吸入や誤飲によって測定者の健康を損なうものがあるので、取り扱いはできるだけ慎重に行い、実験室の十分な換気に注意する。

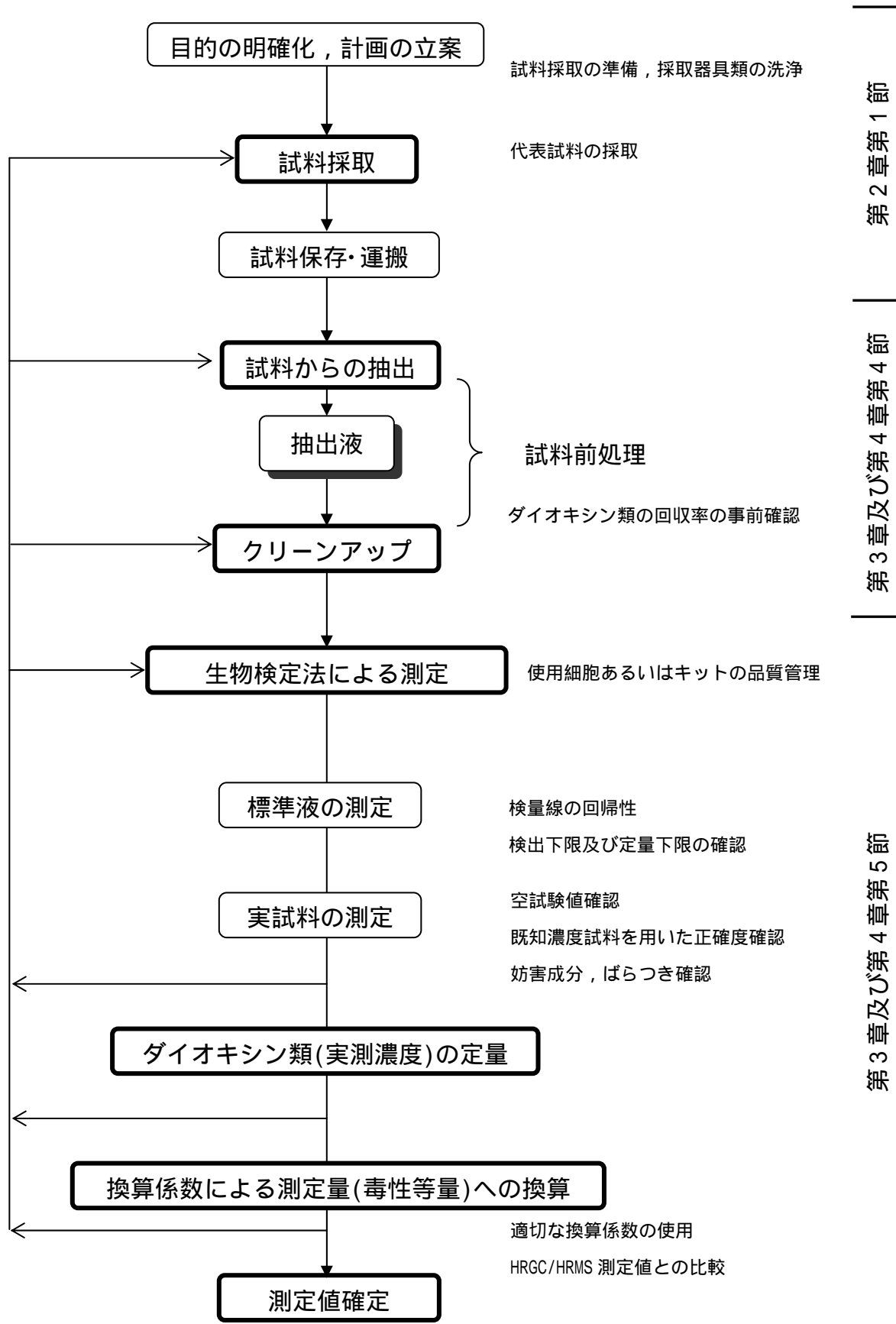


図 1-1 生物検定法によるダイオキシン類測定の流れ

第2章 各論(生物検定法に共通する事項)

本章では、第3章にて掲げる各生物検定法に共通する事項として、試料採取方法、測定結果の報告及び測定データの精度管理について説明する。

第1節 試料採取方法

1. 排出ガス

試料ガス採取の一般的事項はJIS K0095による。また、ダイオキシン類測定のための試料ガス採取方法はJIS K0311「5. 試料ガスの採取」に規定するものとする。

1.1 試料採取の概要

排出ガス試料の採取手順の概略を図2-1に示す。

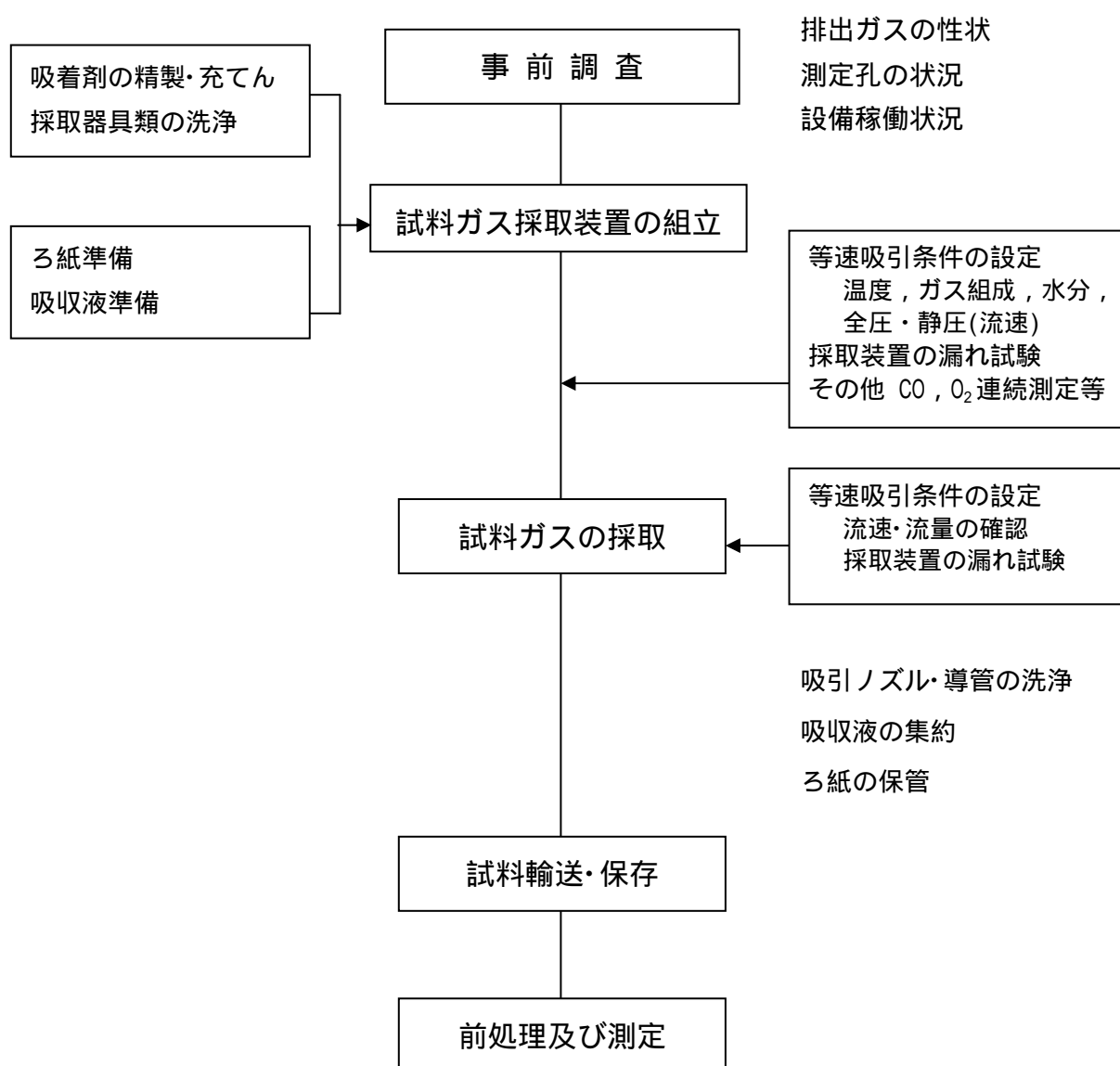


図 2-1 試料ガスの採取の作業手順

1.2 試薬

JIS K0311「5.3 試薬」に準拠したもの。

1.3 試料採取装置

JIS K0311「5.2 試料ガス採取装置」に準拠したもの。

1.4 試料ガスの採取の準備

JIS K0311「5.4 試料ガスの採取の準備」に準拠した方法。ただし、5.4.3の内標準物質の添加は行わない。

1.5 試料ガスの採取量

試料ガスの採取量は、次のような手順によって決定する。排出ガスの採取に当たっては、通常の作業状態において(燃焼状態が安定した時点から一時間以上経過した後)、原則 4 時間以上採取する。なお、採取時間については、その目的に応じて試料ガスの発生状況などを十分考慮して代表試料が採取できるようにしなければならない。具体的な算出方法については、第 3 章及び第 4 章に記載する、

$$V = \frac{Q_{DL} \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

- ここに、 V : 測定に必要な最小の試料ガスの量(m^3_N)
 Q_{DL} : 測定方法の検出下限($pg\text{-TEQ}/ml$)
 v : 測定用試料の液量(ml)
 V_E : 抽出液量(ml)
 V'_E : 抽出液分取量(ml)
 C_{DL} : 必要となる試料ガスにおける検出下限($ng\text{-TEQ}/m^3_N$)

1.6 採取操作

JIS K0311「5.6 採取操作」に準拠した方法。

1.7 試料の回収及び保存

JIS K0311「5.7 試料の回収及び保存」に準拠した方法。

1.8 試料採取量の算出

JIS K0311「5.8 試料ガスの採取量の算出」に準拠した方法。

1.9 試料ガスの採取の記録

JIS K0311「5.9 試料ガスの採取の記録」に準拠した方法。

2 . ばいじん及び燃え殻

2.1 試料採取の概要

ばいじん及び燃え殻、それらの処理物の採取方法は、厚生省平成 4 年告示第 192 号別表第一(第一号関係)(1)に規定するものとする。

2.2 試薬及び器具

厚生省平成 4 年告示第 192 号別表第一(第一号関係)(1)に準拠したもの。

2.3 採取の準備

厚生省平成 4 年告示第 192 号別表第一(第一号関係)(1)に準拠した方法。

2.4 ばいじん及び燃え殻の採取量

ばいじん及び燃え殻の採取量は、次のような手順によって決定する。

$$V = \frac{Q_{DL} \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、 V : 測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量(g)

Q_{DL} : 測定方法の検出下限(pg-TEQ/ml)

v : 測定用試料の液量(ml)

V_E : 抽出液量(ml)

V'_E : 抽出液量分取量(ml)

C_{DL} : 必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限(ng-TEQ/g)

2.5 採取操作

厚生省平成4年告示第192号別表第一(第一号関係)(1)に準拠した方法。

2.6 試料の回収及び保存

厚生省平成4年告示第192号別表第一(第一号関係)(1)に準拠した方法。

2.7 分析試料の調製

厚生省平成4年告示第192号別表第一(第一号関係)(2)に準拠した方法。ただし、同表ウ(イ)の内標準物質の添加の操作は行わない。

2.8 含水率

厚生省平成4年告示第192号別表第一(第一号関係)(2)に準拠した方法。

参考 厚生省平成4年告示第192号別表第一(第一号関係)

(1) 試料採取

焼却施設から排出される試料として代表的な試料を採取する。ばいじん及び燃え殻が分離して排出される焼却施設においては、ばいじん及び燃え殻をそれぞれ採取する。この場合において、焼却施設内でばいじん又は燃え殻を処理するときは、ばいじん又は燃え殻を処理したものを採取する。

ア 排出ピット等から、シャベル、スコップ等の採取具を用いて数箇所から採取し、容器(アルミ製バット等のダイオキシン類の吸着のない材質製のものに限る。)に移し入れ、不燃物等の異物を取り除き、十分に均一化する。

イ 均一化した試料を保存容器(ガラス製等のダイオキシン類の吸着のない材質製のものであって、密封できるものに限る。)に入れる。採取量は、試料の調製後に150g程度の試料を確保できる量とする。

ウ 保存容器を密封し、遮光された容器に収納する。

(2) 試料の前処理

ア 試薬

日本工業規格 K0311 の 6.2 に規定するものを用いる。

イ 器具及び装置

日本工業規格 K0311 の 6.3 に規定するものを用いる。

ウ 試料の調製等

(ア) 試料の調製

灰試料の場合は、5mm の目のふるいを用いてふるい分けし、風乾後、乳鉢中で均一にすりつぶして混合する。

固化物試料の場合は、試料を粒径 2mm 程度以下まで粉碎する。

汚泥の場合は、試料を湿状のまま秤量する。この場合において、汚泥に含まれる固型分の重量比は、当該汚泥 20g 以上 100g 以下(Ag)を平型量り瓶(容量 50ml 以上のもので、あらかじめ乾燥したものに限る。)又は蒸発皿(容量 100ml 以上のもので、あらかじめ乾燥したものに限る。)に正確に計り取り、沸騰しないように注意して水分を蒸発させ、105 以上 110 以下で 2 時間程度乾燥させ、デシケーター中で 30 分間程度放冷させた後、当該平型量り瓶又は蒸発皿に残留した物質の重量(Bg)を正確に求め、これを固型分の重量とし、次に掲げる式により求める。

$$\text{固型分の重量比(\%)} = B / A \times 100$$

(イ) 内標準物質の添加

(ア)の操作により調製した試料 20g 以上 100g 以下をビーカーに秤取し、日本工業規格 K0311 の 6.4.1 に規定する方法により、ダイオキシン類内標準物質を加える。

エ 抽出

(ア) ウの操作で得られた試料について、日本工業規格 K0311 の 6.4.2a)に規定する方法により塩酸処理及び洗浄を行い、ソックスレー抽出を行う。

(イ) (ア)の操作で得られた塩酸溶液及びメタノール又はアセトン洗浄液を分液漏斗に入れ、溶液 1l 当たりジクロロメタン 50ml で 3 回、液 液振とう抽出を行い、硫酸ナトリウムを用いて脱水する。

(ウ) (ア)及び(イ)の操作で得られた抽出液を合わせて溶媒を加え、一定量とし、抽出液とする。

(以下、省略)

第 2 節 測定結果の報告

本マニュアルに定める方法により測定を行った結果は、ダイオキシン類対策特別措置法施行規則(以下、規則という)様式第 6(図 2-2)の表 1 から 3 の該当する事項及び別紙 2(図 2-4)に記載する。このとき、規則様式第 6 の表 1 から 3 の備考欄に対応が分かるように簡易測定法と明記し、別紙 2 を添付する。別紙 2 の測定方法の欄には、測定法の告示中の番号(例：第 1 の 3)を記載しても差し支えない。

実測濃度の欄には、毒性等量に補正する前の濃度(つまり、各測定方法で規定される検量線より求められる測定値であり、媒体毎に換算されていない値)を記載することとする。

測定量の欄には、毒性等量に換算後の値を記載することとする。

また、実測濃度及び測定量とも従来の測定方法と同様に、標準酸素補正後の値を記入する。標準酸素補正の方法は、JIS K0311 に記載されている方法と同様であり、本マニュアルの第 3 章又は第 4 章にも記載する。

このほか、別紙 2 の備考欄には、基準値近傍の値である場合はその旨を、及び再測定を行った場合は別紙 1(図 2-3)に記載された当該再測定結果との対応を明記する。

様式第6（第8条関係）

ダイオキシン類測定結果報告書

年 月 日

都道府県知事 殿
市 長

報告者 氏名又は名称及び住所並び
に法人にあってはその代表者
の 氏 名 印

ダイオキシン類による汚染の状況について測定したので、ダイオキシン類対策特別措置法第28条第3項の規定により、次のとおり報告します。

表1 排出ガス

採取年月日及び時刻(開始時刻～終了時刻)	排出ガス量(m ³ N/日)	排出ガス中の酸素濃度(%)	測定箇所	特定施設の名称及び使用状況	分析年月日	測定結果(ng TEQ/m ³ N)	試料採取者	分析者	備考

表2 排水

採取年月日及び時刻	測定場所		特定施設の名称及び使用状況	分析年月日	測定結果(pg TEQ/L)	採水者	分析者	備考
	名称	排水量(m ³ /日)						

表3 ばいじん等

採取年月日及び時刻	試料の種類	採取箇所	特定施設の名称及び使用状況	分析年月日	測定結果(ng TEQ/g)	試料採取者	分析者	備考

- 備考 1 報告書及び別紙の大きさは、日本工業規格A4とすること。
 2 ダイオキシン類対策特別措置法施行規則（以下「規則」という。）第3条第1項に基づき換算した測定結果については、別紙1を添付するものとする。
 3 規則第3条第2項に基づき換算した測定結果については、別紙2を添付するものとする。
 4 2以上の測定結果がある場合は、添付する別紙1又は2のそれぞれとの対応関係がわかるように備考欄に記載すること。
 5 排出ガスにあっては表1、排水にあっては表2、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。）にあっては表3に記載すること。なお、同一届出者が大気基準適用施設及び水質基準対象施設をともに設置している場合には、併せて1葉の様式に記載すること。
 6 排出ガス量については、温度が零度であって圧力が1気圧の状態（以下「標準状態」という。）における量に、測定結果については、標準状態における排出ガス1立方メートル中の量に、それぞれ換算したものとする。
 7 2以上の水質基準対象施設を設置し、異なる排水系統を有する水質基準適用事業場にあつては、それぞれの排水系統の排水口ごとに測定を行い、結果を記載すること。
 8 表3の試料の種類として、ばいじん、焼却灰、混合灰又はこれらの処理物（処理方法）の別を記載すること。
 9 氏名（法人にあってはその代表者の氏名）を記載し、押印することに代えて、本人（法人にあってはその代表者）が署名することができる。

図2-2 規則様式第6

別紙 1

規則第 3 条第 1 項に基づき換算したダイオキシン類の構成

整理番号	実測濃度	試料における 定量下限	試料における 検出下限	毒性等価係数	毒性等量
ポリ塩化ベンゾフラン	2, 3, 7, 8 TeCDF			0.1	
	1, 2, 3, 7, 8 PeCDF			0.05	
	2, 3, 4, 7, 8 PeCDF			0.5	
	1, 2, 3, 4, 7, 8 HxCDF			0.1	
	1, 2, 3, 6, 7, 8 HxCDF			0.1	
	1, 2, 3, 7, 8, 9 HxCDF			0.1	
	2, 3, 4, 6, 7, 8 HxCDF			0.1	
	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 HpCDF			0.01	
	1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 HpCDF			0.01	
	OCDF			0.0001	
	Total PCDFs				
ポリ塩化ジベンゾパラジオキシン	2, 3, 7, 8 TeCDD			1	
	1, 2, 3, 7, 8 PeCDD			1	
	1, 2, 3, 4, 7, 8 HxCDD			0.1	
	1, 2, 3, 6, 7, 8 HxCDD			0.1	
	1, 2, 3, 7, 8, 9 HxCDD			0.1	
	1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 HpCDD			0.01	
	OCDD			0.0001	
	Total PCDDs				
Total (PCDFs + PCDDs)					
コプラナーポリ塩化ビフェニル	3, 4, 4', 5 TeCB (# 81)			0.0001	
	3, 3', 4, 4' TeCB (# 77)			0.0001	
	3, 3', 4, 4', 5 PeCB (# 126)			0.1	
	3, 3', 4, 4', 5, 5' HxCB (# 169)			0.01	
	2', 3, 4, 4', 5 PeCB (# 123)			0.0001	
	2, 3', 4, 4', 5 PeCB (# 118)			0.0001	
	2, 3, 3', 4, 4' PeCB (# 105)			0.0001	
	2, 3, 4, 4', 5 PeCB (# 114)			0.0005	
	2, 3', 4, 4', 5, 5' HxCB (# 167)			0.00001	
	2, 3, 3', 4, 4', 5 HxCB (# 156)			0.0005	
	2, 3, 3', 4, 4', 5' HxCB (# 157)			0.0005	
	2, 3, 3', 4, 4', 5, 5' HpCB (# 189)			0.0001	
Total コプラナーPCB					
Total ダイオキシン類					

- 備考 1 排出ガスの測定結果を記入する場合には、単位を $\text{ng}/\text{m}^3\text{N}$ (毒性等量にあっては、 $\text{ng TEQ}/\text{m}^3\text{N}$ 。) 排出水の測定結果を記入する場合には、単位を pg/L (毒性等量にあっては、 $\text{pg TEQ}/\text{L}$ 。)とし、ばいじん等の測定結果を記入する場合には、単位を ng/g (毒性等量にあっては、 $\text{ng TEQ}/\text{g}$ 。)とする。
- 2 実測濃度の項において、検出下限以上定量下限未満の濃度は括弧付きの数字で記載すること。
- 3 実測濃度の項において、検出下限未満のものは“ND”と記載すること。
- 4 毒性等量は、定量下限未満の実測濃度を零として算出すること。
- 5 用語の定義は、日本工業規格 K 0311 又は K 0312 によること。
- 6 整理番号は、測定結果が複数の場合に記入すること。

図 2-3 規則別紙 1

別紙 2

規則第 3 条第 2 項に基づき換算したダイオキシン類の測定方法

整理番号	測定方法	実測濃度	試料における 定量下限	試料における 検出下限	測定量 (毒性等量)	備考

- 備考
- 1 排出ガスの測定結果を記入する場合には、単位を $\text{ng}/\text{m}^3\text{N}$ (毒性等量にあつては、 $\text{ng TEQ}/\text{m}^3\text{N}$ 。)とし、ばいじん等の測定結果を記入する場合には、 ng/g (毒性等量にあつては、 $\text{ng TEQ}/\text{g}$ 。)とする。
 - 2 測定方法の項においては、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うち、測定に用いた方法を記載すること。
 - 3 実測濃度の項においては、2 の測定方法により測定された標準溶液相当濃度を記載すること。
 - 4 実測濃度の項において、検出下限以上定量下限未満の濃度は括弧付きの数字を記載すること。
 - 5 実測濃度の項において、検出下限未満のものは“ND”と記載すること。
 - 6 定量下限未満の実測濃度の測定量(毒性等量)は、零とすること。
 - 7 用語の定義は、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よること。
 - 8 整理番号は、測定結果が複数の場合に記入すること。

図 2-4 規則別紙 2

第3節 測定データの精度管理

ダイオキシン類の測定は、極めて低濃度の測定であるため、測定精度の管理を十分に行う必要がある。測定精度の管理は次による。

1. 測定データの信頼性の確保

1.1 検出下限及び定量下限の確認

1) 標準品についての検出下限及び定量下限

標準物質を含まない溶媒コントロール(DMSO)を生物検定法で測定する。原則としては、この操作を3回以上繰り返し、得られた測定値から標準偏差を求め、その3倍に相当する標準物質濃度を生物検定法の検出下限、10倍を定量下限とする。この標準品についての検出下限、定量下限は、使用する細胞や試薬の状態などによって変動するため、定期的に確認し、常に十分な性能が得られていることを確認する。

2) 試料についての検出下限及び定量下限

基本的には試料量と前処理を経た最終検液量の数値と、標準品についての検出下限及び定量下限値から理論的に算出する。試料についての検出下限及び定量下限は、試料採取量や最終検液量などにより異なってくるため、試料ごとに求める。

1.2 空試験

空試験は、試料採取、前処理時に使用する試薬などの汚染のレベルを確認する空試験(以下、操作ブランク試験という)と、試料採取及び試料運搬における汚染を確認するための空試験(以下、トラベルブランク試験という)の2種類とする。

(参考) 空試験値が大きいと測定感度が悪くなるばかりでなく、測定値の信頼性が低下するため、空試験値は極力低減を図らなければならない。そのため、必要に応じてクリーンドラフト内で前処理操作などを行うことが望ましい。

1) 操作ブランク試験

操作ブランク試験は、測定用試料の調製などに起因する汚染を確認し、試料の測定に支障のない測定環境を設定するために行うものである。試料の採取及び前処理に用いるのと同じ試薬などを同じ量を用いて試料と同様に行う。

この試験は、操作時の汚染に対して十分な管理がなされていれば毎行わなくてもよいが、次の場合には測定に先立って行い、操作ブランク試験の結果が十分低くなるようにしておくことが望ましい。場合によっては、試料測定値の補正に操作ブランク測定値を用いる必要がある。

(1) 新しい試薬や機器を使用したり、修理した機器を使用するなどの前処理操作に大きな変更があった場合。

(2) 試料間汚染が予想されるような高い濃度の試料を測定した場合。

2) トラベルブランク試験

トラベルブランク試験は、排出ガス試料について、試料採取準備時から試料分析時までの汚染の有無を確認するためのものであり、採取操作以外は試料と全く同様に扱い持ち運んだものについて、試料と同様の前処理操作を行う。

この試験は、移送中に汚染が考えられる場合(電気集じん機で集められた灰などによる汚染)には必ず測定しなければならないが、それ以外の場合には、その管理を十分しておけば毎回測定しなくてもよい。しかし、試料採取における信頼性を確保するため、前もってトラベルブランク試験について十

分検討しておき、必要があればそのデータが提示できるようにしておく。

1.3 二重測定

1) 排出ガス

二重測定用として、同一の試料を同時に 2 台の装置で採取する。この採取は一連の試料採取において 10%程度の頻度で行い、同一の生物検定法における定量下限以上の測定値について、その平均値を求め、個々の測定値が平均値の $\pm 30\%$ 以内であることを確認する。ただし、二重測定用の試料採取が不可能な場合には省略してもよい。また、試料採取の操作について十分な管理が行われれば、毎回二重測定用の試料採取を行わなくてもよいが、試料採取における信頼性について十分検討しておき、必要時にそのデータが提示できるようにしておく。

2) ばいじん及び燃え殻

試料採取、前処理操作及び測定操作における総合的な信頼性を確保するために、同一試料から二つ以上の測定試料について同様に測定し、同一の生物検定法における定量下限以上の測定値について、その平均値を求め、個々の測定値が平均値の $\pm 30\%$ 以内であることを確認する。差が大きいときには、測定操作を細かく確認して原因を究明し、改善した後、再度測定を行う。

二重測定は、特に断らない限り一連の試料採取において試料数の 10%程度の頻度で行うことが望ましい。しかし、二重測定用の試料採取が困難な場合には、十分な検討をしておき、そのデータが必要に応じて提示できるようにしてあれば省略してもよい。

1.4 標準物質

測定値は、採取試料と標準物質の測定結果を比較することによって得られるため、測定値の信頼性を確保するためには、可能な限りトレーサビリティの保証された標準物質を用いる必要がある。これらの標準液は、ガラス製の密閉容器に入れて、冷暗所に保管し、厳重な管理下で保管する。

1.5 前処理操作による回収率の確認

生物検定法では、内部標準そのものが活性物質として測定値に影響を与えるため使用することはできない。しかし、前処理操作でのダイオキシン類の回収率が十分であることを別途、標準品や標準試料を用いて確認しておく必要がある。

そのため、回収率の確認は、原則として試料数の 1~10%程度の頻度で行い、その結果は原則として 50~120%の範囲内でなければならない。

1.6 品質管理用試料の使用

適切な頻度で、生物検定法による測定値が既知(化学分析により毒性等量も既知であることが望ましい)の試料の試験を実施し、十分な正確度で測定が行われていることを確認することが望ましい。

そのため、品質管理用試料の測定は、原則として 1~10%程度の頻度で行い、その結果が一定の範囲内(例えば、保証値の $\pm 30\%$ 以内、又は標準偏差の 2 倍以内、等)であることを確認する。

2. 試料採取、前処理における留意事項

2.1 試料採取

1) 排出ガス

定期的に JIS K0311 に基づく測定を行い、サンプリングスパイクの回収率が 70~130%の範囲内であることを確認することが望ましい。

JIS K0311「附属書 1(規定)試料ガス採取装置」に記載の「操作上の注意」を参照のこと。

2) ばいじん及び燃え殻

厚生省平成4年告示第192号別表第一(第一号関係)を参照のこと。

2.2 前処理操作

各測定方法により前処理操作は異なるため、第3章又は第4章を参照のこと。

3. 測定操作における留意事項

3.1 測定

各測定方法により測定操作は異なるため、第3章又は第4章を参照のこと。

3.2 異常値、欠測値の扱い

定量結果の確定のため、各種記録類を検証した結果、測定値の信頼性に問題があると判断された場合は、異常値として再度測定分析を行うか、欠測値扱いとして再度試料の採取を行うこと。このような問題が起こると、多大な労力、時間、コストが消費されるだけでなく、調査結果全体の評価に影響するため、事前のチェックを十分に行う等、異常値や欠測値を出さないように注意すること。また、異常値や欠測値が出た経緯を十分に検討し、記録に残して以後の再発防止に役立てること。

4. 精度管理に関する報告

精度管理に関する以下の情報を記録し、データとともに報告する。

- 1) 試料採取装置などのトレーサビリティ、校正の記録
- 2) 細胞を使用するものであれば、細胞培養についての日常的点検、作業の記録(細胞観察、培養室、培養機器の点検など)、測定キットを使用するものであれば、キットの品質確認に関する記録
- 3) 測定機器の測定条件の設定と結果
- 4) 標準物質の製造者及びトレーサビリティ
- 5) 標準物質に対する応答性、検出下限及び定量下限の測定結果
- 6) 操作ブランク試験及びトラベルブランク試験の結果
- 7) 品質管理用試料の測定結果
- 8) 試料採取、前処理操作などの回収試験の検証結果
- 9) 測定操作の記録(試料採取から前処理及び測定に関する記録、測定値を得るまでの各種の数値)

第4節 廃棄物保管及び安全管理

1. 廃棄物保管

実験施設で発生した廃液及び廃棄物は汚染区分を設け、区分ごとに処理方法を明確にし、処分する。このうち、廃棄するものは、廃棄物処理業者に委託して処理されることとなるまで密閉容器に保管し、廃棄物保管室に保管することとする。

2. 安全性確保

生物検定法によるダイオキシン類分析施設は、試料採取や分析を行う作業従事者の安全及び健康を確保するとともに、施設周辺環境への汚染を防止することを第一とし、これを達成するための施設の構造、設備等を備えることとする。

- 1) 分析室

前処理室、生物検定法による測定室、標準試料室及び廃棄物保管室といった各ダイオキシン類の分析関連室への出入りは関係者に限定し、分析室のドア等に「関係者以外立入禁止」の表示を掲げる等して管理を行うこと。また、各分析室は、機密性を確保するとともに負圧にし、ダイオキシン類の流出を防止すること。また、排気及び排水設備の出口には、活性炭フィルターや活性炭槽を設置する等して、環境へのダイオキシン類放出を防止すること。

2) 試料採取現場での安全管理

試料採取現場内での作業中は、安全用保護具を着用すること。特に飛灰の採取時は、防じんマスク・防じんメガネ等を使用すること。

作業終了後、手洗い、うがいをいり空気中浮遊粉じんを摂取しないよう注意すること。また、試料採取に使用した機器類を測定場所から持ち帰る時は、測定作業中に堆積した粉じんの払い落としを行う等、ダイオキシン類汚染粉じん等による環境汚染に留意すること。

3) 前処理工程での安全管理

標準試料の取り扱いに際しては、危険性の程度に応じて、ドラフト(安全キャビネット)、グローブボックス等を適宜用いる。前処理工程時は、排気ファンを運転した状態で作業を行うこと。また、飛散する可能性の高い試料を取り扱う場合は、飛散しないよう注意して取り扱うと共に、防じんメガネ、防じんマスク及び使い捨てゴム手袋等を着用し、試料の吸引及び皮膚への直接接触を避けること。

4) 生物検定法による測定時の安全管理

培養細胞を用いるレポータージーンアッセイを行う場合、標準試料及び測定試料を曝露する際には、無菌状態の確保、ダイオキシン類による汚染防止の観点から安全キャビネット(例えば、JIS K3800に規定するバイオハザード対策用クラスIIキャビネット等)を使用することが望ましい。また、抗原抗体反応を利用した方法では、無菌状態を確保する必要はないが、ドラフトなどダイオキシン類による実験室の汚染を防止できる設備を使用することが望ましい。

5) 緊急時の対応

ダイオキシン類による汚染、被曝、漏洩、標準品の紛失等、あるいはそれらのおそれがある場合、速やかに関係者に連絡、対処をしなければならない。このため、事故発生時等の緊急時の警報等の連絡システム、緊急処置設備等を整備しておくこと。

6) 健康管理

作業従事者には労働安全衛生法による健康診断を実施するとともに、必要に応じ検査項目を追加することができるものとする。健康診断の結果、異常が認められた場合には速やかに措置を講ずるものとする。

7) 安全教育

安全管理指針(規定)を作成するとともに、作業従事者に対して分析施設、設備の周知を図り、ダイオキシン類の取り扱い、廃棄物の取り扱い等の教育訓練を実施する。

第3章 各論(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)

その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量を測定する方法(環境省平成 17 年告示第 92 号第 1 の 1)

第1節 測定方法の概要

対象媒体ごとに試料を採取し、ダイオキシン類を抽出後、クリーンアップを行い、ダイオキシン類応答性組換え細胞 H1L6.1c2 を用いた測定により定量する。測定方法のフローを図 3-1-1 に示す。

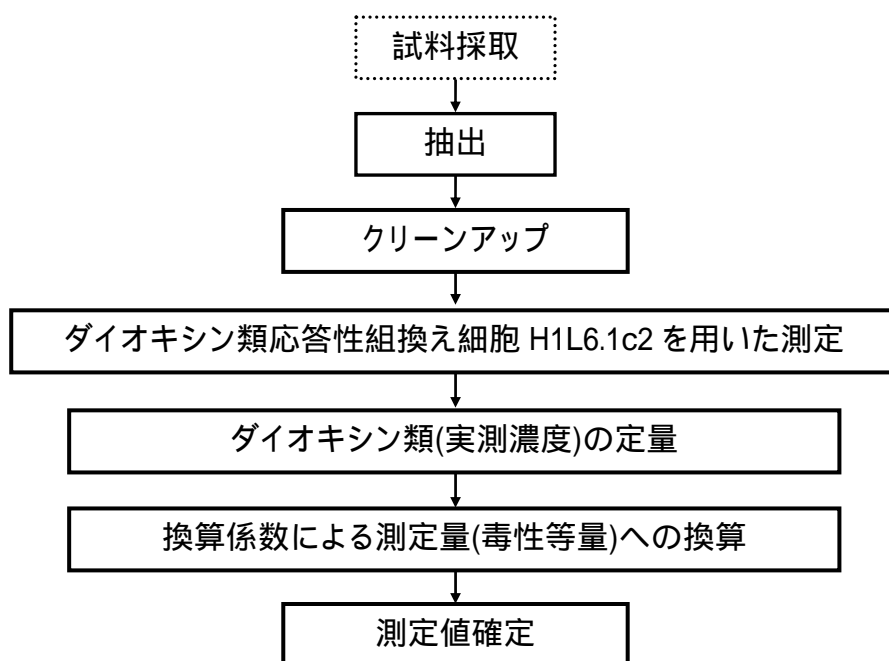


図 3-1-1 測定方法のフロー

第2節 用語の定義

- 1) 細胞株 Cell Line、培養により増殖できる植物や動物起源の細胞集団
- 2) 遺伝子組換え細胞 組換え DNA 技術を用いて作製された細胞
- 3) 組換え DNA 技術 組換え DNA を作製し、それを生細胞(宿主)に移入し、増殖させる技術
- 4) 外来遺伝子 Exogenous Gene、遺伝子工学的手法等により外部から細胞内に導入された遺伝子
- 5) ルシフェラーゼ遺伝子 Luciferase Gene、生物発光反応を触媒する酵素を発現するホタル由来の遺伝子
- 6) DRE Dioxin Responsive Element、ダイオキシン応答配列、ダイオキシン類が特異的に結合する遺伝子の塩基配列部分
- 7) ベクター Vector、DNA 組換え技術において、目的とする遺伝子を宿主細胞に運ぶ自己複製 DNA 分子
- 8) リガンド Ligand、タンパク質又は他の分子の特異的部位に結合する分子の総称。レセプターが鍵穴でリガンドが鍵の関係。両者が結合すると、両者の関係に特異的な信号が発生し生理反応を引き

起こされる

- 9) Ah 受容体 Arylhydrocarbon Receptor、芳香族炭化水素受容体、特異的な細胞外シグナル伝達分子(リガンド)に結合し、細胞の応答するきっかけとなるタンパク質。ダイオキシン類の生体影響の多くは、このレセプターと結合することにより引き起こされる
- 10) 遺伝子転写 Gene Transcription、ポリメラーゼという酵素により、DNA の一方の鎖から相補的な配列をもつ RNA をコピーすること
- 11) CYP1A1 Cytochrome P450、薬物代謝酵素シトクロム P450 類に属する薬物代謝酵素。CYP1A1 は、ダイオキシン類により誘導されることが知られている
- 12) 継代培養 Subculture、保存培養から微生物あるいは培養細胞の一部を分けて別の新鮮な培地に植え継ぎ、再び培養したもの
- 13) コンフルエント Confluent、培養細胞の密集生育状態
- 14) プラスミド Plasmid、小型の環状 DNA 分子のこと
- 15) 発光基質 生物発光反応の基質

第3節 試料採取方法に関する特記事項

1. 試料ガスの採取量

試料ガスの採取量は、次のような手順によって決定する。採取時間については、その目的に応じて試料ガスの発生状況などを十分考慮して代表試料が採取できるようにしなければならない。

- 1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。
- 2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。
- 3) 以下の式によって測定に必要な最小の試料ガスの量を算出する。

$$V = \frac{Q_{DL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、 V : 測定に必要な最小の試料ガスの量(m^3_N)

Q_{DL} : 測定方法の検出下限(pg/ml)

k : 測定量(毒性等量)への換算係数

v : 測定用試料の液量(ml)

V_E : 抽出液量(ml)

V'_E : 抽出液分取量(ml)

C_{DL} : 必要となる試料ガスにおける検出下限($ng-TEQ/m^3_N$)

- 4) 算出された最小の試料ガスの量以上を試料ガスの採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例)5ng-TEQ/ m^3_N レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となる試料ガスにおける検出下限は 0.17ng-TEQ/ m^3_N)

抽出液を 50ml に定容し、その抽出液から 10ml を分取してクリーンアップを行い、最終的に 4ml の測定用試料溶液に調製する場合の試料ガス採取量を下記に示す。

$$V = \frac{0.488 \times 0.253 \times 4}{1000} \times \frac{50}{10} \times \frac{1}{0.17} = 0.015$$

2. ばいじん及び燃え殻の採取量

ばいじん及び燃え殻試料の採取量は、次のような手順によって決定する。

- 1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。
- 2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の1/30以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。
- 3) 以下の式によって測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量を算出する。

$$W = \frac{Q_{DL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、 W : 測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量(g)

Q_{DL} : 測定方法の検出下限(pg/ml)

k : 測定量(毒性等量)への換算係数

v : 測定用試料の液量(ml)

V_E : 抽出液量(ml)

V'_E : 抽出液分取量(ml)

C_{DL} : 必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限(ng-TEQ/g)

- 4) 算出された最小のばいじん及び燃え殻試料の量以上をばいじん及び燃え殻試料の採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例)3ng-TEQ/g レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となる試料における検出下限は0.1ng-TEQ/g)

抽出液を50mlに定容し、その抽出液から25mlを分取してクリーンアップを行い、最終的に4mlの測定用試料溶液に調製する場合のばいじん及び燃え殻試料の採取量を下記に示す。

$$W = \frac{0.488 \times 0.336 \times 4}{1000} \times \frac{50}{25} \times \frac{1}{0.1} = 0.013$$

第4節 試料の前処理

1. 試料の前処理の概要

採取した試料は、抽出を行う。抽出液は必要に応じて分取を行い、クリーンアップに移る。図3-1-2に試料の前処理から測定までのフローの例を示す。

2. 試薬

試料の前処理に用いる試薬は、次による。これらの試薬は、空試験などによって測定に支障がないことを確認する。

- 1) 水 JIS K0557に規定するA4(又はA3)の水
- 2) メタノール JIS K 8891に規定するもの、又は同等の品質のもの
- 3) アセトン JIS K 8040に規定するもの、又は同等の品質のもの
- 4) トルエン JIS K 8680に規定するもの、又は同等の品質のもの
- 5) ジクロロメタン JIS K8117に規定するもの、又は同等の品質のもの
- 6) ヘキサン JIS K8825に規定するもの、又は同等の品質のもの
- 7) 酢酸エチル JIS K8361に規定するもの、又は同等の品質のもの

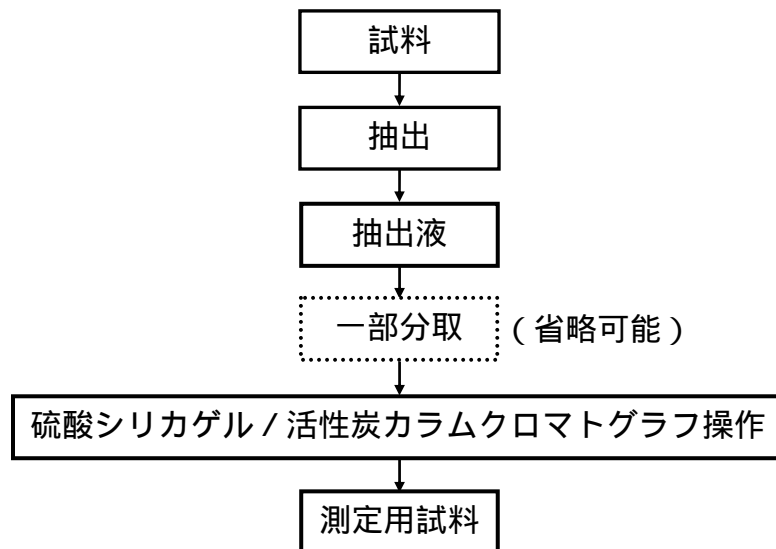


図 3-1-2 試料の前処理から測定までのフローの例

- 8) ノナン 測定に支障のない品質のもの
- 9) 硫酸ナトリウム JIS K8987 に規定するもの
- 10) セライト 545 測定に支障のない品質のもの
- 11) 塩酸 JIS K8180 に規定する特級、又は同等の品質のもの
- 12) 硫酸 JIS K8951 に規定するもの、又は同等の品質のもの
- 13) ヘキサン洗浄水 1)の水を 6)のヘキサンで十分洗浄したもの
- 14) シリカゲル カラムクロマト用シリカゲル(粒径 70 ~ 230 μm)をビーカーに入れて 180 で約 48 時間加熱した後、デシケーター中で約 30 分間放冷する。調製後、密栓できる試薬瓶に入れ、デシケーター中で保存する
- 15) 硫酸(33.3%質量分率)シリカゲル 14)のシリカゲル 100g に対して 12)の硫酸 50.0g を添加後、十分振とうし、粉末状にする。調製後、密栓できる試薬瓶に入れデシケーター中に保存する
- 16) XCARB 活性炭を分散させたセライト(1%XCARB/セライト、又はそれと同等以上の性能を有するもの)
- 17) ガラス繊維ろ紙 孔径 0.5 μm 程度のもの、ブフナー漏斗に用いる

3. 器具及び装置

試料の前処理に用いる器具及び装置は、次による。これらの器具及び装置は、空試験などによって測定に支障がないことを確認する。

3.1 ガラス器具

JIS R3503 及び JIS R3505 に規定するもの。コックの部分がふっ素樹脂製のものをを用いてもよい

3.2 ソックスレー抽出器

JIS R3503 に規定するもの又はこれと同等の品質のもの。接続部にグリースを使用してはならない

3.3 濃縮器

クデルナ-ダニッシュ(KD)濃縮器又はロータリーエバポレータ又は遠心エバポレータ。接続部にグリースを使用してはならない

3.4 硫酸シリカゲルカラムクロマトグラフ管(小)

内径 7mm、長さ 300mm のガラス製ディスポカラムクロマトグラフ管

3.5 硫酸シリカゲルカラムクロマトグラフ管(大)

内径 13mm、長さ 300mm のガラス製ディスポカラムクロマトグラフ管

3.6 活性炭カラムクロマトグラフ管

内径 6mm、長さ 300mm のガラス製ディスポカラムクロマトグラフ管

3.7 ブフナー漏斗

4 . 前処理操作

4.1 試料量の記録

採取した試料は、試料量を記録する。

4.2 抽出

1) 排出ガス

JIS K0311 6.4 又はこれと同等の方法により、抽出を行う。ただし、内標準物質の添加は行わない。

図 3-1-3 に排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

2) ばいじん及び燃え殻

厚生省平成 4 年告示第 192 号別表第一(第一号関係)(2)又はこれと同等の方法により抽出を行う。ただし、内標準物質の添加の操作は行わない。

ばいじん約 8g を用いて、約 7g をダイオキシン類分析に、約 1g を水分測定に使用する。図 3-1-4 にばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

4.3 クリーンアップ

図 3-1-5 にクリーンアップのフロー例を示す(注 1)。

(注 1) 本クリーンアップの手法は、下記の特許によるもの

引用文献 ; M.Chu, et al., Methods and apparatus for separating and detecting specific polyhalogenated diaromatic hydrocarbons, US Patent #6,720,431(2004)

1) 抽出液の分取

抽出液の分取操作の手順は、次による。

(1) あらかじめ、ノナン 20 μ l を受器に入れる。

(2) 抽出液をメスフラスコに入れ、トルエンにて標線までメスアップする。

(3) ホールピペットでメスフラスコから、規定量(注 2)を分取し、ノナンの入った遠沈管に抽出液を入れる。

(注 2) 抽出液分取の規定量(標準量)は、排出ガス試料については、通常 10%(試料量 3.0m³ 当り)、ばいじん及び燃え殻試料については、通常 50%(試料量 7g)を分取する。なお、本規定量は、標準的なものであり、目標定量下限値によっては、その限りではない。

(4) 遠心エバポレータで乾固寸前まで濃縮し、この濃縮液を室温中でトルエンを除去する。その後、次に示す硫酸シリカゲル-活性炭カラムクロマトグラフ操作によってクリーンアップを行う。

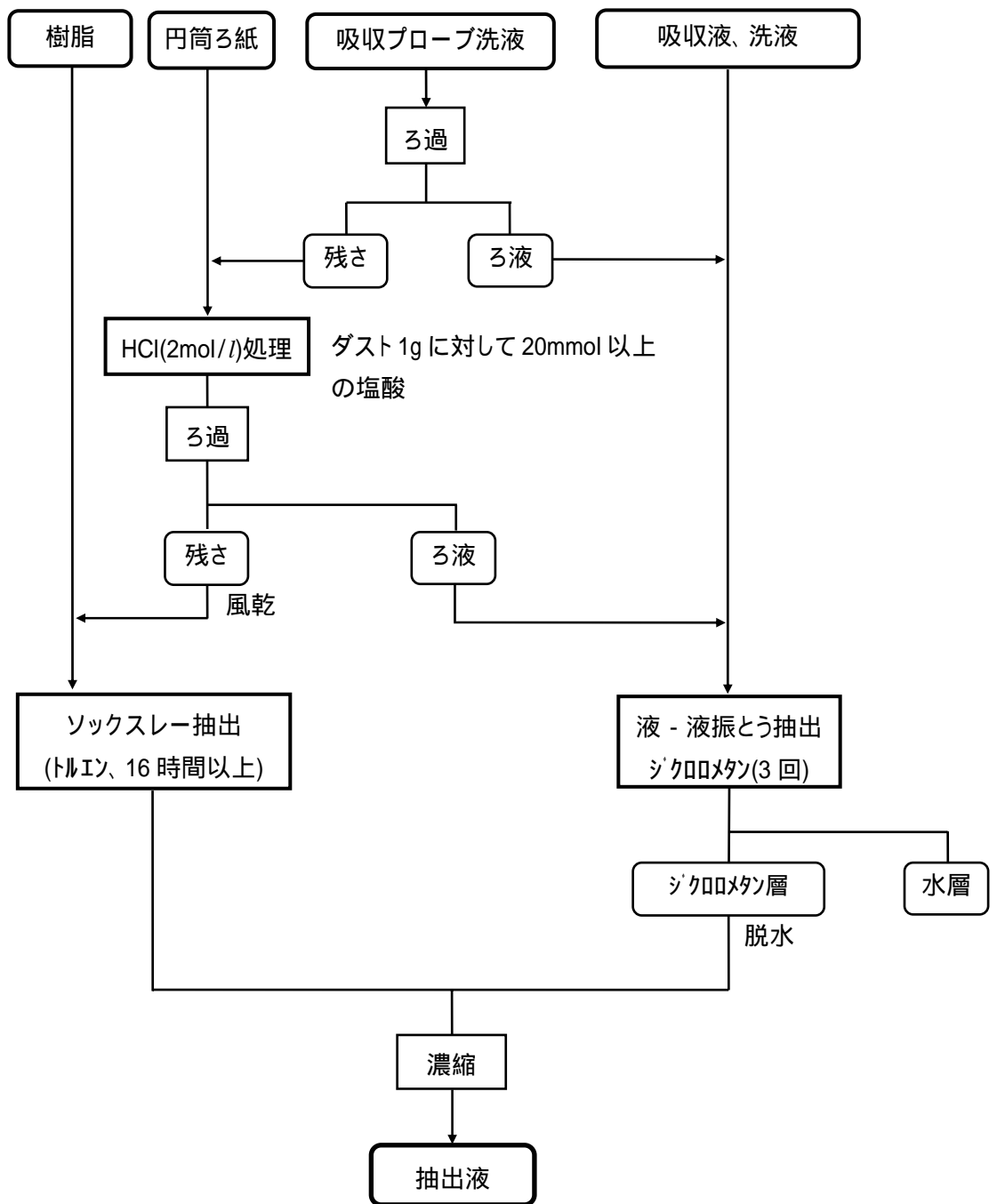


図 3-1-3 排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例

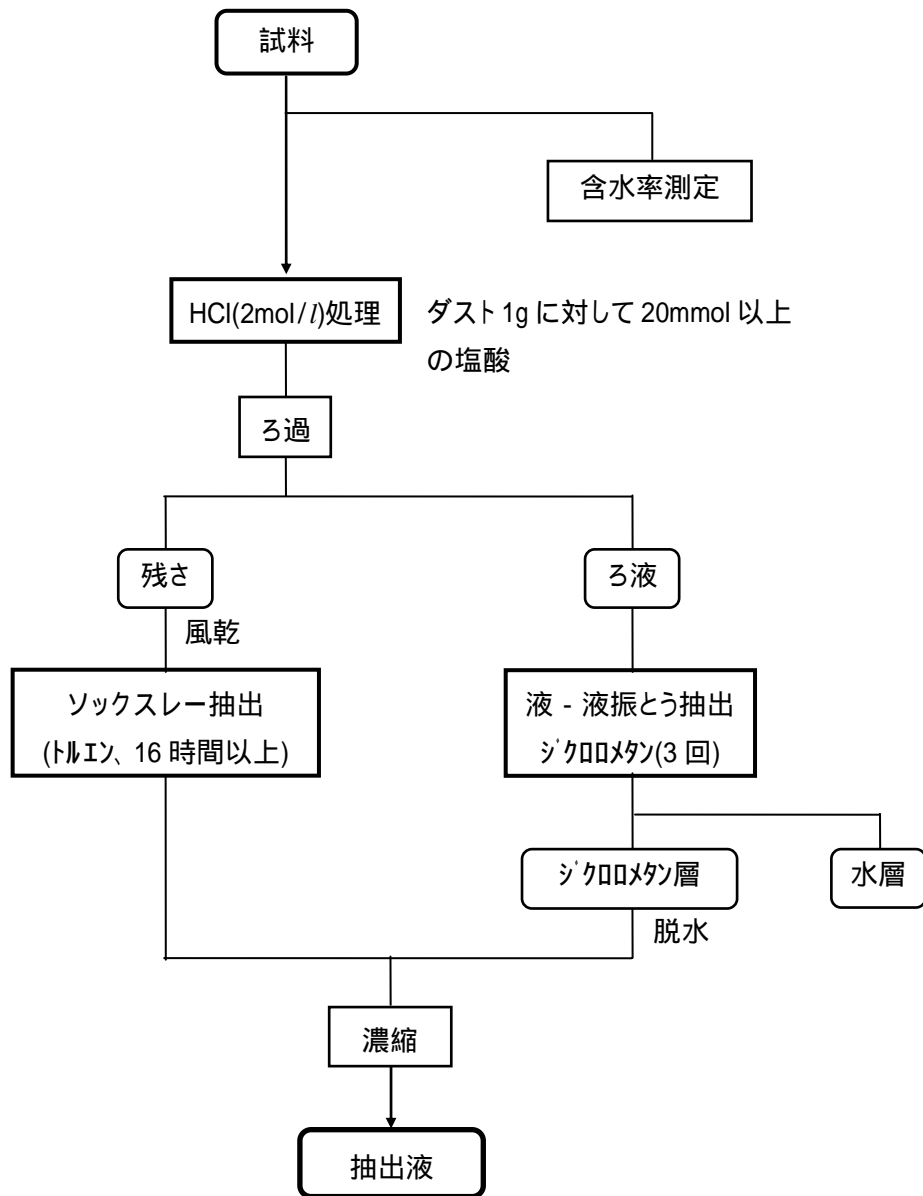


図 3-1-4 ばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例

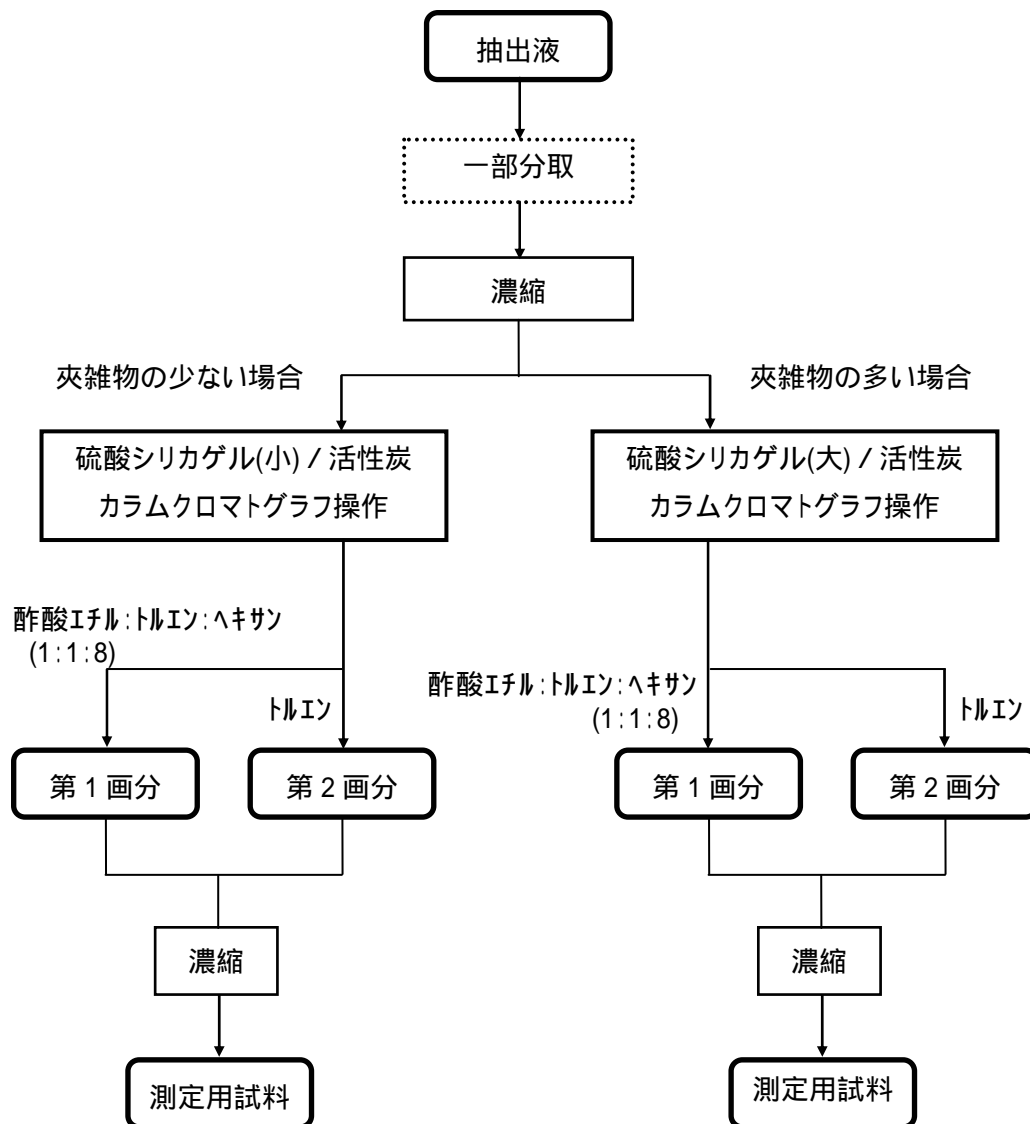


図 3-1-5 クリーンアップのフローの例

2) 精製カラムの作成

(1) 硫酸シリカゲルカラム(小)

a) 3.4 のカラムクロマトグラフ管の底部にガラスウールを詰め、硫酸ナトリウム 1.7g、硫酸 (33.3%質量分率)シリカゲル 3.0g、及び硫酸ナトリウム 1.7g を順次充てんする。このカラムを図 3-1-6 に示す。

b) ヘキサン 30ml を流下させる。

(2) 硫酸シリカゲルカラム(大)

a) 3.5 のカラムクロマトグラフ管の底部にガラスウールを詰め、硫酸ナトリウム 1.7g、硫酸 (33.3%質量分率)シリカゲル 7.1g、及び硫酸ナトリウム 1.7g を順次充てんする。このカラムを図 3-1-6 に示す。

b) ヘキサン 50ml を流下させる。

(3) 活性炭カラム(注3)

a) 3.6 のカラムクロマトグラフ管の底部にガラスウールを詰め、硫酸ナトリウム 0.5g、1%XCARB/セライト 0.3g(注4)、及び硫酸ナトリウム 1.0g を順次充てんする。このカラムを図 3-1-7 に示す。

b) アセトン 5ml、トルエン 20ml、ヘキサン 10ml を流下させる。

(注3) 活性炭は製造ロットによって、品質変動が考えられるため、内標準物質(クリーンアップスパイク)を用いて、ロットが変わるたび、添加回収を HRGC/HRMS 法により確認しておくことが望ましい。

(注4) 定規を使用し 1%XCARB/セライト層が 3cm の厚みになっていることを確認する。なっていない場合、3cm になるよう調整する。

3) 硫酸シリカゲル(小)-活性炭カラムクロマトグラフ操作(夾雑物の少ない場合)(注5)

(1) 上部に硫酸シリカゲルカラム(小)と下部に活性炭カラムを連結させる。

(2) 濃縮液に、ヘキサン 2ml を加え、超音波照射後、カラムに静かに注ぎ入れる。

(3) ヘキサン 2ml で超音波照射を行いながら、抽出液の容器を洗浄し、洗液はカラム内壁を洗いながら入れる。

(4) ヘキサン 1ml で同様の操作を行う。

(5) ヘキサン 10ml を流下させる。

(6) 硫酸シリカゲルカラムを外す。

(7) 活性炭カラムにヘキサン 10ml を流下させ、活性炭カラムを洗浄する。

(8) PCBs 溶出液(酢酸エチル/トルエン/ヘキサン(10%/10%/80%体積分率)15ml を流下させる(コプラナーPCBs 画分)。

(9) トルエン 20ml を流下させる(PCDDs 及び PCDFs 画分)。

(注5) コプラナーPCBs 画分 + PCDDs 及び PCDFs 画分を混合液として測定操作に用いる。

4) 硫酸シリカゲル(大)-活性炭カラムクロマトグラフ操作(夾雑物の多い場合)(注5)(注6)

(1) 濃縮液に、ヘキサン 5ml を加え、超音波照射後、硫酸シリカゲルカラム(大)に静かに注ぎ入れる。

(2) ヘキサン 3ml で超音波照射を行いながら、抽出液の容器を洗浄し、洗液はカラム内壁を洗いながら入れる。

(3) ヘキサン 2ml で同様の操作を行う。ヘキサン 25ml を流下させる。

(4) 遠心エバポレータでヘキサン 2ml まで濃縮する。

(5) 濃縮液を、活性炭カラムに静かに注ぎ入れる。

(6) ヘキサン 2ml で超音波照射を行いながら、抽出液の容器を洗浄し、洗液はカラム内壁を洗いながら入れる。

(7) ヘキサン 1ml で同様の操作を行う。

(8) ヘキサン 10ml を流下させ、活性炭カラムを洗浄する。

(9) PCBs 溶出液(酢酸エチル/トルエン/ヘキサン(10%/10%/80%体積分率)15ml を流下させる(コプラナーPCBs 画分)。

(10) トルエン 20ml を流下させる(PCDDs 及び PCDFs 画分)。

(注6) シリカゲル(大)-活性炭カラムクロマトグラフ操作を行なう目安としては、硫酸シリカゲ

ル(小)で処理した場合に黄色もしくは、黒色のバンドが下部の硫酸ナトリウム層まで達した場合とする。この場合は、抽出液の分取からやり直し、硫酸シリカゲル(大)での処理を行う。

5) 測定用試料の保存

- (1) 3)又は4)の操作によって得られた溶液(PCDDs 及び PCDFs + コプラナーPCBs 混合液)は遠心エバポレータで溶媒が完全になくなるまで濃縮する。
- (2) 濃縮液を乾固させた遠沈管にヘキサン 4ml を加える。
- (3) 遠沈管を 10 分間超音波照射する。
- (4) 遠沈管の内壁を 2、3 回洗いながら、ヘキサンを 4ml 容のバイアル瓶へ移す。
- (5) バイアル保管用の容器に入れ、冷蔵庫(5)で保存する。

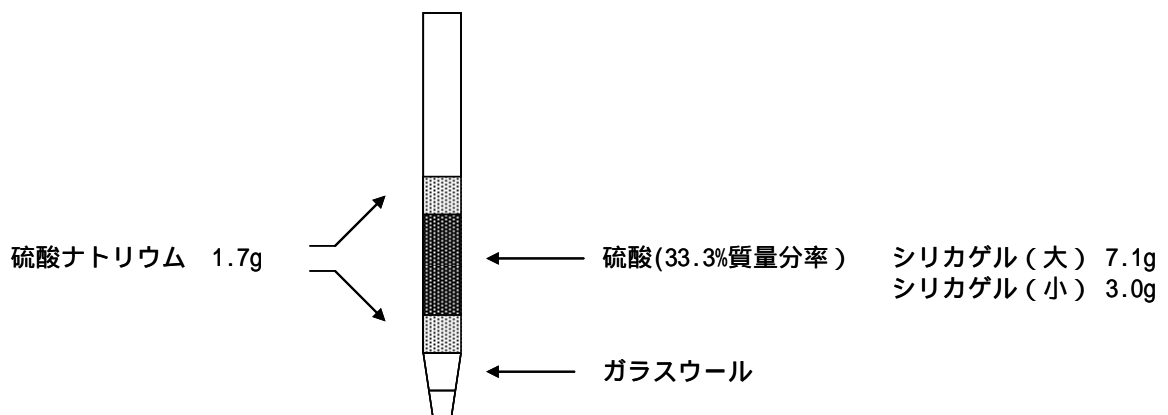


図 3-1-6 硫酸シリカゲルカラムの例

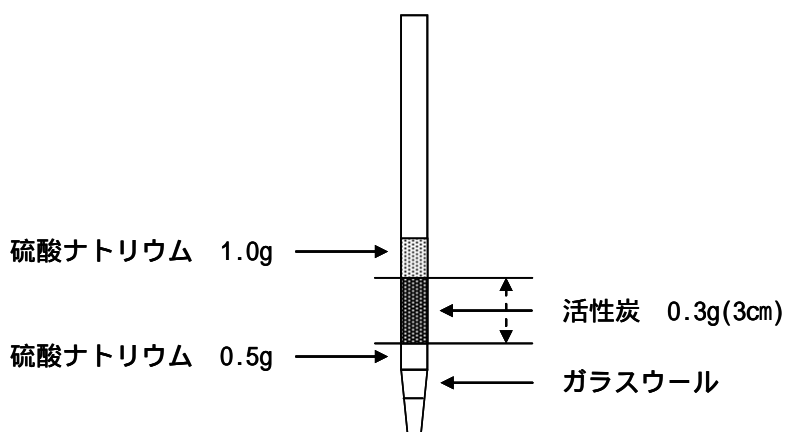


図 3-1-7 活性炭カラムの例

第5節 測定

1. 測定の概要

哺乳類細胞株(マウス肝がん細胞)に、外来遺伝子であるホタルルシフェラーゼ遺伝子に DRE をつないだベクターを細胞内に安定的に挿入した組み換え細胞が用いられる。ダイオキシン類がリガンドとして、Ah 受容体と結合し、生じた Ah 受容体 - リガンド複合体が DRE に結合し、下流遺伝子転写の結果、発現するルシフェラーゼの活性に基づく発光を発光光度計(ルミノメーター)で測定することによりダイオキシン類の定量を行う。

2,3,7,8-TeCDD により検量線を作成し、試料の発光量(RLU)から実測濃度を算出する。排出ガス、ばいじん及び燃え殻について定められた換算係数を実測濃度に乗じることにより、測定量(毒性等量)を算出する。

2. 試薬、器具及び装置

2.1 使用細胞

ダイオキシン類応答性組換え細胞 H1L6.1c2: ホタルルシフェラーゼ遺伝子の上流域に 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、マウス肝ガン細胞 Hepa1c1c7 に導入したもの(注7)

(注7)引用文献1;M.S.Denison,et al.,Bioassay for detecting 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin and TCDD-like compounds and novel recombinant cell line useful therefor,US Patent#5,854,010(1998),引用文献2;Dalhp Han,Scott R.Nagy and Michael S Denison,Comparison of recombinant cell bioassays for the detection of Ah receptor agonists,BioFactors 20(2004)11-22

2.2 試薬

測定に用いる試薬は、次による。

- 1) 細胞培養培地(RPMI1640 培地、FBS(+8%体積分率)、ペニシリン/ストレプトマイシン(+1%体積分率)) RPMI1640 with L-Glutamine 500ml に FBS 44ml、ペニシリン/ストレプトマイシン 5ml を混合したもの
- 2) RPMI1640 with L-Glutamine
- 3) ペニシリン/ストレプトマイシン混合溶液
- 4) Fetal Bovine Serum(FBS)
- 5) 0.25%トリプシン溶液
- 6) リン酸緩衝生理食塩水(PBS)
- 7) ジメチルスルホキシド(DMSO)(生化学用)
- 8) 凍結保存用培地 細胞培養培地 34ml にジメチルスルホキシド 6ml 加え、シリンジフィルタ(孔径 0.2 μm)を用い、ろ過滅菌を行ったもの
- 9) 標準物質(1) 2,3,7,8-TeCDD(50 μg/ml Toluene)
- 10) 保管用標準液(1-1)(Conc. TeCDD/DMSO 5 μg/ml DMSO) 9)の標準液を DMSO で 10 倍希釈する
- 11) 保管用標準液(1-2)(internal TeCDD/DMSO 250ng/ml) 10)の保管用標準液(1-1)を DMSO で 20 倍希釈する

- 12) 検量線作成用標準液(2,3,7,8-TeCDD/DMSO 溶液) 11)の保管用標準液(1-2)を DMSO で希釈して調製する(表 3-1-1)
- 13) 標準物質(2) PCDDs/DFs 混合溶液(4111ng-TEQ/ml nonane)
- 14) 保管用標準液(2-1) PCDDs/DFs 混合溶液(180ng-TEQ/ml DMSO) 13)の標準液を DMSO に転溶し、DMSO で 22.8 倍する
- 15) Quality Control PCDDs 及び PCDFs 混合液(QC 溶液)(0.250ng-TEQ/ml DMSO) 14)の保管用標準液(2-1)を DMSO で 720 倍希釈する(表 3-1-2)
- 16) ルシフェラーゼ定量キット
- 17) 細胞溶解液(Cell culture lysis reagent(×5 solution)) Cell culture lysis reagent(×5 solution)2ml に、水 8ml を加え調製する
- 18) 水 JISK0557 に規定する A4(又は A3)の水
- 19) ヘキサン JISK8825 に規定するもの、又は同等の品質のもの
- 20) 炭酸ガス 99.99%

2.3 器具及び装置

測定に用いる器具及び装置は、以下による。

- 1) ルミノメーター
- 2) CO₂インキュベーター 室温 +5 ~ 50
- 3) 遠心分離機 回転数 3000 ~ 4000 min⁻¹が得られるもの
- 4) 安全キャビネット クラス タイプ A
- 5) 液体窒素容器
- 6) システム顕微鏡
- 7) 培養顕微鏡
- 8) 恒温槽
- 9) 高圧蒸気滅菌器 JIS T7322 又は JIS T7324 に規定するもので 121 以上に加熱でき、196kPa の器内圧力で使用できるもの
- 10) 乾熱滅菌器 160 ~ 200 に調節できるもの
- 11) バキュームポンプ
- 12) ミキサー
- 13) 遠心エバポレータ
- 14) パスツールピペット ガラス製、ピペット滅菌箱に入れ、乾熱滅菌をしておく
- 15) 10ml プラスチックピペット ポリスチレン製、使い捨てできるディスポ式のもの
- 16) プラスチックチューブ 10ml、50ml、ポリプロピレン製、使い捨てできるディスポ式のもの
- 17) 培養フラスコ 25cm²、75cm²、150cm²、ポリプロピレン製
- 18) チップ 20 µl 用、200 µl 用、1000 µl 用、オートクレーブ可能なもの、ポリプロピレン製、高圧蒸気滅菌を行う
- 19) 連続分注ピペットチップ 10ml
- 20) 96 ウェルクリアボトムプレート(マイクロプレート) 96well Flat Bottom、ポリスチレン製、白色プレート、細胞培養表面処理、滅菌済み
- 21) バッキングテープ

- 22) 凍結保存用バイアル
- 23) 25mm シリンジフィルタ 孔径 0.2 μm、滅菌済み
- 24) 13mm ガラス試験管 13×100mm 直口フリントガラスチューブ
- 25) マイクロピペット 20 μl、200 μl、1000 μl
- 26) 8 連ピペット
- 27) 連続分注ピペット
- 28) 血球計算盤(改良型ノイバウエル血球計算盤、ブライトライン)
- 29) プレートシェーカー

表 3-1-1 検量線作成用標準液の調製例

標準物質(1)	濃度(ng/ml) (有効数字 3 桁表記)									
	STD0	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	STD8	STD9
2,3,7,8-TeCDD	25.0	12.5	6.25	3.13	1.56	0.781	0.391	0.195	0.997	0.488

表 3-1-2 QC 溶液の調製例

標準物質	濃度(ng/ml)		
	標準物質(2)	保管用標準液(2-1)	QC 溶液
2,3,7,8-TeCDD 1,2,3,7,8-PeCDD	1000	44	0.061
1,2,3,4,7,8-HxCDD 1,2,3,6,7,8-HxCDD 1,2,3,7,8,9-HxCDD 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	2000	88	0.12
OCDD	5000	219	0.30
2,3,7,8-TeCDF 1,2,3,7,8-PeCDF 2,3,4,7,8-PeCDF	1000	44	0.061
1,2,3,4,7,8-HxCDF 1,2,3,6,7,8-HxCDF 1,2,3,7,8,9-HxCDF 2,3,4,6,7,8-HxCDF 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	2000	88	0.12
OCDF	5000	219	0.30
Total PCDD/Fs(ng-TEQ/ml)	4111	180	0.250

2.4 器具などの滅菌操作

器具などの滅菌操作は、次の通り行う。

- 1) 乾熱滅菌 ガラス製及び金属製器具類の滅菌に用いる。約 170 で約 1 時間滅菌する。
- 2) 高圧蒸気滅菌 使用済み培地などの滅菌に用いる。121 で約 30 分間滅菌する。

2.5 消毒操作

消毒操作は、次の通り行う。

- 1) 試験操作の前後には、手指及び実験台、キャビネットを消毒する。消毒用エタノール(エタノール (70%体積分率))を用いる。
- 2) 使用済みのパストツール、吸引瓶、培地は、次亜塩素酸(10%)で消毒する。

2.6 吸引操作

吸引操作は、次の通り行う。

- 1) 安全キャビネット内で、バキュームポンプに接続しているチューブに滅菌済のパストツールピペットをつなぎ、バキュームポンプのスイッチを入れる。
- 2) 作業終了後は、2.5 の 2)の消毒操作を行う。

3 . 細胞の取り扱い

3.1 培養細胞の立ち上げ

- 1) 液体室素保存容器(凍結保存用バイアル)から立ち上げ、培養フラスコ(25cm²)へ培養
 - (1) 液体室素保存容器から凍結保存用バイアルを取り出す。
 - (2) 細胞培養培地 1ml をマイクロピペットで凍結保存用バイアルに移し、ピペッティングにより凍結保存用バイアル内の氷を溶かす。溶けたものはプラスチックチューブ(15ml)に移す。これらの動作を数回繰り返す(注 8)。
 - (3) 凍結保存用バイアル内の培地を全部移したプラスチックチューブ(15ml)を 500rpm、10min 遠心分離する。
 - (4) パストツールピペットを使用し、プラスチックチューブより培地を吸引除去する(注 8)。
 - (5) 細胞のペレットが入ったプラスチックチューブに 10ml プラスチックチューブを用いて培地 5ml を加え、ピペッティングにより細胞のペレットを懸濁する(注 8)。
 - (6) 培養フラスコ(25cm²)に細胞懸濁液を全量移し、培養フラスコを数回傾けてなじませる(注 8)。
 - (7) CO₂ インキュベーターにフラスコを入れ、CO₂ 5%、37 の環境下で培養する。
- 2) 培養フラスコ(25cm²)から播種し、培養フラスコ(75cm²又は 150cm²)へ継代培養を行う。
 - (1) 翌日より毎日細胞の増殖状況を観察し、コンフルエントになったのが確認できたら、培養フラスコ(25cm²)を CO₂ インキュベーターから取り出し、中の培地が濁っていないか目視で確認し、培養顕微鏡で細胞状態を確認する。
 - (2) 空の培養フラスコ(75cm²又は 150cm²)を用意し、3.2 及び 3.3 の操作を行う(注 8)(注 9)。

(注 8) 安全キャビネット内で無菌操作を行う。

(注 9) 中の培地が濁っていたり、細胞が接着面より剥がれている場合、コンタミネーションを起こしているため、同じ培養系列の細胞を破棄し、新しく冷凍細胞を起こして培養したものを使用する。

3.2 試験使用細胞の回収

- 1) 培養フラスコ(150cm²)(注 10)を CO₂ インキュベーターから取り出し、中の培地が濁っていないか目で確認し、培養顕微鏡で細胞状態を確認する。
- 2) パスツールピペットで培養フラスコから培地を完全に吸引除去する(注 8)。
- 3) プラスチックピペット(10ml)で PBS^{a)}を 5ml 加え、培養フラスコ壁面の洗浄を行い、パスツールピペットで PBS を吸引除去する(注 8)。
- 4) プラスチックピペットで、トリプシン^{b)}を 2ml 加え、細胞接着面になじませる(注 8)。
- 5) 1 分程度培養フラスコを寝かせて静置し、細胞が浮き上がってきたら、手のひらの付け根で培養フラスコの側面をたたいて細胞を剥がす(注 8)。
- 6) プラスチックピペットで細胞培養培地^{c)}を 10ml 加え、フラスコの壁面を洗いながら注ぎ込む(注 8)。
- 7) プラスチックピペットで、培養フラスコ中の細胞培養培地を吸い取り、プラスチックチューブに移し、500rpm、10 分間遠心分離する。
- 8) プラスチックピペットで PBS^{d)}を 10ml 加え、壁面の洗浄を行い、パスツールピペットで PBS を吸引除去する(注 8)。
- 9) 培養フラスコをすぐに使用しない場合は、冷蔵庫で保管する。
(注 10) 培養フラスコの種類は、この限りではない。面積により試薬の注入量を変更すればよい。

表 3-1-3 培養フラスコの容量と試薬の分注量の一覧(回収時)

培養フラスコ(cm ²)	a)PBS (ml)	b)トリプシン溶液 (ml)	c)細胞培養培地(ml)	d)PBS (ml)
150	5	2	10	10
75	2	1	5	5
25	1	0.5	2	2

3.3 試験使用細胞の継代

- 1) CO₂ インキュベーターから培養フラスコ(150cm²)(注 11)を取り出し、3.2 の回収操作を行う(注 8)。
- 2) 空の培養フラスコ(150cm²)にあらかじめ細胞培養培地^{a)}を 19ml 入れておく(注 8)。
- 3) 細胞のペレットが入ったプラスチックチューブ(50ml)に細胞培養培地^{b)}を加える。加える培地の量は、希釈倍率に応じて変わるため、回収した培養フラスコ 1 枚分の細胞につき表 3-1-3 のようになる(注 8)(注 12))。
- 4) プラスチックピペットで 10 回程度ピペティングし再懸濁し、細胞懸濁液 1ml を接種用に用意した培養フラスコに接種する(注 8)。
- 5) 培養フラスコを穏やかに数回傾け、培地中の細胞が均一になるようになじませる(注 8)。
- 6) CO₂ インキュベーターにフラスコを入れ、CO₂5%、37 °C の環境下で培養する。
(注 11) 培養フラスコの面積は、この限りではない。面積により試薬の注入量を変更すればよい(表 3-1-4 参照)。
(注 12) 細胞の希釈率の決定：試験使用細胞株は、24 時間でほぼ 2 倍に増殖する。したがって、細胞を回収、使用したい日にコンフルエントなフラスコ(フラスコ底面を細胞が 80%以上覆っている状態のもの)を手に入れるためには、以下の希釈倍率を用いればよい。コンフルエントなフラスコ 1

個から細胞を回収し、n 日後にコンフルエントな同等のフラスコ 1 個が欲しいとき、希釈率は、 $1:2n$ ($n=1 \sim 3$) で表すことができる。また、コンフルエントなフラスコ a 個から接種用のフラスコに $1:b$ の希釈率で接種するとき、回収した細胞を新しい培地 ($a \times b$) ml で再懸濁し接種用のフラスコに 1ml 播種する。

表 3-1-4 フラスコ容量と試薬の分注量の一覧(継代時)

培養フラスコ (cm ²)	a)細胞培養培地 (ml)	希釈倍率	b)懸濁液 (ml)
150	19	1:2	2
		1:4	4
		1:8	8
75	9	1:2	2
		1:4	4
		1:8	8

3.4 試験使用細胞の保存

- 1) CO₂ インキュベーターから培養フラスコ(150cm₂)を取り出し、3.2 の回収操作を行なう(注 8)。
- 2) パスツールピペットを使用し、プラスチックチューブ(50ml)より細胞培養培地を吸引除去する(注 8)。
- 3) 細胞のペレットが入ったプラスチックチューブにプラスチックピペット(10ml)を用いて、(20ml×播種したフラスコ数)の培地を加え、ピペッティングにより細胞のペレットで懸濁液を作成する(注 8)。
- 4) 4.1 の細胞数の計測に従い、細胞濃度を 0.4×10^6 cells/ml ~ 1.2×10^6 cells/ml となるように、培地を加え、プラスチックチューブを上下にしてよく混合する(注 8)。
- 5) 細胞懸濁液と凍結保存用培地を 1:1 の割合で混合する(注 8)。
- 6) マイクロピペット(1000 μl)を用いて、1.5ml ずつ凍結保存用バイアルに分注する(注 8)。
- 7) 発泡スチロールの容器に入れ、-20 で 4 時間保存する。
- 8) -80 で一晩保存する。
- 9) 液体窒素保存容器へ移し保管する。

4 . 測定操作

4 . 測定操作

4.1 細胞のマイクロプレートへの播種

- 1) CO₂ インキュベーターから培養フラスコ(150cm²)を取り出し、3.2 の操作を行なう(注 8)。目安として、およそ培養フラスコ 1 枚からプレート 1 枚作成が可能である。
- 2) パスツールピペットを使用し、プラスチックチューブ(50ml)より細胞培養培地を吸引除去する(注 8)。
- 3) 細胞のペレットが入ったプラスチックチューブにプラスチックピペット(10ml)を用いて培地 20ml を加え、ピペッティングにより細胞のペレットを懸濁液を作成する(注 8)。

- 4) マイクロピペット(20 μ l)を用いて細胞懸濁液 15 μ l を血球計算盤に乗せ、システム顕微鏡($\times 100$)で細胞数(1ml 当りの細胞数)を求める。
- 5) 下記の計算を行い(注 13) 最終濃度 7.5×10^5 cells/ml となるよう最終容量を求め、最終容量になるように培地で適宜、希釈調製を行う(注 8)。
- 6) 8 連ピペットを用いてマイクロプレートの各ウェルに細胞懸濁液を 200 μ l ずつ加えていく(注 8)。
- 7) CO₂ インキュベーターにマイクロプレートを入れ CO₂ 5%、37 の環境下で 14~24 時間培養する。
(注 13) 細胞数の計測の仕方：計算時の細胞濃度(cells/ml) = 血球計算盤の 4 \times 4 グリッドの細胞数の平均 $\times 10^4$

$$\text{最終容量(ml)} = \frac{\text{現在の容量(ml)} \times \text{計算時の細胞濃度(cells/ml)}}{7.5 \times 10^5 \text{ (cells/ml)}}$$

4.2 曝露

4.2.1 希釈率決定曝露操作

1) 溶液の適量配分

(1) 測定用試料の分取

- a) 13mm ガラス試験管に DMSO を 2 μ l 分注する。
- b) 測定用試料を 4ml バイアルより一部適量を分取する(注 14)。
(注 14) 希釈率決定曝露操作で適量とは、表 3-1-5 に示す分注量を指す。

表 3-1-5 希釈率と測定用試料の分注量の一覧

希釈率	測定用試料の分注量
1:40	50 μ l
1:400	5 μ l
1:4000	0.5 μ l

(2) 検量線作成用標準液及び QC 溶液の分取

- a) 13mm ガラス試験管に DMSO を 4 μ l 分注する。
- b) 9 段階に希釈された検量線作成用標準液及び QC 溶液を適所に 4 μ l ずつ加える。

(3) ネガティブコントロール(NC)の分取

- a) 13mm ガラス試験管に DMSO を 4 μ l 分注する。

2) DMSO 置換及び培地混合操作

- (1) ヘキサンを加え、測定用試料の試験管内液量を 0.5ml、検量線作成用標準液及び QC 溶液、NC の試験管内液量を 1ml になるようメスアップする。
- (2) 遠心エバポレータに試験管を入れ 12 分間濃縮する。
- (3) その後、2 分ごとに、ガラス試験管内のヘキサンの残量確認を行う。
- (4) 濃縮が確認されれば、最後に 2 分間濃縮を行い、完全に揮発させる。
- (5) 連続分注ピペットを使用し、測定用試料の 13mm ガラス試験管に細胞培養培地を 200 μ l、検量線作成用標準液及び QC 溶液、NC の試験管に細胞培養培地を 400 μ l 加え、10 秒程ミキサーにかけ攪拌する。

3) 細胞への曝露

- (1) 14～24 時間培養したマイクロプレートをインキュベーターから取り出す。
- (2) マイクロプレートのデカンテーションを行い、培地を完全に取り除く。
- (3) 培養顕微鏡で全てのウェルの細胞の状態を確認する。少しでも異常が見られたらプレートシートにチェックしておく。
- (4) 2) で得られた DMSO 置換溶液(測定用試料 + 検量線作成用標準液及び QC 溶液 + NC をマイクロピペットで、測定用試料 190 μ l を 1 ウェル、検量線作成用標準液及び QC 溶液 + NC 190 μ l ずつ 2 つのウェルに分注する。
- (5) 37 $^{\circ}$ C、CO₂ 5% の環境下で、20～24 時間培養する。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			希釈 1.1	希釈 1.2	希釈 1.3	希釈 2.1	希釈 2.2	希釈 2.3	希釈 3.1	希釈 3.2	希釈 3.3	
B		NC	"	STD5	"	希釈 4.1	希釈 4.2	希釈 4.3	希釈 5.1	希釈 5.2	希釈 5.3	
C		NC	"	STD4	"	希釈 6.1	希釈 6.2	希釈 6.3	希釈 7.1	希釈 7.2	希釈 7.3	
D		STD9	"	STD3	"	希釈 8.1	希釈 8.2	希釈 8.3	希釈 9.1	希釈 9.2	希釈 9.3	
E		STD8	"	STD2	"	希釈 10.1	希釈 10.2	希釈 10.3	希釈 11.1	希釈 11.2	希釈 11.3	
F		STD7	"	STD1	"	希釈 12.1	希釈 12.2	希釈 12.3	希釈 13.1	希釈 13.2	希釈 13.3	
G		STD6	"	QC 液	"	希釈 14.1	希釈 14.2	希釈 14.3	希釈 15.1	希釈 15.2	希釈 15.3	
H			希釈 16.1	希釈 16.2	希釈 16.3	希釈 17.1	希釈 17.2	希釈 17.3	希釈 18.1	希釈 18.2	希釈 18.3	

図 3-1-8 レイアウト例(希釈率決定)(注 15)

太枠：B2～G2、B3～G3、B4～G4、B5～G5 は、検量線作成用標準液、QC 溶液、NC に 2 ウェルごとに使用する

それ以外のウェル；1 試料当り希釈率 3 段階の調製液を 1 ウェルずつ曝露する。

(注 15) 定量操作における希釈率の決定：定量範囲として、Std8；0.977～Std；31.2 pg/ml を設定する(詳細は 6.1 を参照)。定量範囲に入る希釈倍率を希釈倍率決定用の曝露試験にて、試料ごとに決定する。定量範囲より低い RLU を示した場合、希釈倍率を下げる。定量範囲より高い RLU を示した場合、希釈倍率を上げる。希釈倍率としては、1：4 が最高濃度となることに注意する。

4.2.2 定量曝露操作

1) 溶液の適量配分

(1) 測定用試料の分取

- a) 13mm ガラス試験管に DMSO を 4 μ l 分注する。
- b) 測定用試料を 4ml バイアルより一部適量を分取する(注 16)。

(注 16) 適量とは、希釈率決定曝露操作で得た情報を元に分取率を決定する。

(2) 検量線作成用標準液及び QC 溶液の分取

- a) 9 段階に希釈された検量線作成用標準液及び QC 溶液を適所に 4 μ l ずつ加える。

(3) NC の分取

- a) 13mm ガラス試験管に DMSO を 4 μ l 分注する。

2) DMSO 置換及び培地混合操作

- (1) ヘキサンを加え、全ての 13mm ガラス試験管中の液量を 1ml とする。
- (2) 遠心エバポレータに 13mm ガラス試験管を入れ 12 分間濃縮する。
- (3) その後、2 分ごとに、ガラス試験管内のヘキサンの残量確認を行う。
- (4) 濃縮が確認されれば、最後に 2 分濃縮を行い、完全に揮発させる。
- (5) 連続分注ピペットを使用し、各試験管に培地を 400 μ l 加え、10 秒程ミキサーにかけ攪拌する。

3) 細胞への曝露

- (1) 14~24 時間培養したマイクロプレートに CO₂ インキュベーターから取り出す。
- (2) マイクロプレートのデカンテーションを行い、培地を完全に取り除く(注 8)。
- (3) 培養顕微鏡で全ウェルの細胞の状態を確認する。少しでも異常が見られたら記録用紙にチェックしておく。
- (4) 2) で得られた DMSO 置換溶液(測定用試料 + 検量線作成用標準液及び QC 溶液 + NC をマイクロピペットで、190 μ l ずつ 2 つのウェルに分注する(注 8)。
- (5) CO₂ 5%、37 °C の環境下で、20~24 時間培養する。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		NC	〃	STD5	〃	試料 1.1	〃	試料 4.1	〃	試料 7.1	〃	
C		NC	〃	STD4	〃	試料 1.2	〃	試料 4.2	〃	試料 7.2	〃	
D		STD9	〃	STD3	〃	試料 2.1	〃	試料 5.1	〃	試料 8.1	〃	
E		STD8	〃	STD2	〃	試料 2.2	〃	試料 5.2	〃	試料 8.2	〃	
F		STD7	〃	STD1	〃	試料 3.1	〃	試料 6.1	〃	試料 9.1	〃	
G		STD6	〃	QC 液	〃	試料 3.2	〃	試料 6.2	〃	試料 9.2	〃	
H												

図 3-1-9 レイアウト例(定量)

中太枠：B2~G2、B3~G3、B4~G4、B5~G5 は、検量線作成用標準液、QC 溶液、NC に 2 ウェルごとに使用する。

太枠：1 試料当り 2 つの同じ希釈調製液をそれぞれ横方向の 2 ウェルごとに曝露する。

4.3 ルシフェラーゼ活性の測定

1) 細胞の溶解

- (1) 20~24 時間培養したマイクロプレートを CO₂ インキュベーターより取り出す。
- (2) マイクロプレート内の培地をデカンテーションにより完全に取り除く。
- (3) 8 連ピペットを用いて PBS を各ウェルに 50 μ l ずつ加え、洗浄する。
- (4) マイクロプレート内の PBS をデカンテーションにより完全に取り除く。
- (5) 顕微鏡で全てのウェルの細胞の状態を確認する。少しでも異常がみられたら、プレートシートにチェックしておく。
- (6) マイクロプレートの底にバックグテープをはる。

- (7) 連続分注ピペッターを用いて細胞溶解液を各ウェルに 30 μ l ずつ加える。
- (8) プレートシェーカーにてマイクロプレートを 2 分間穏やかに振動させ混合する。
- (9) 10 分間静置する。

2) ルシフェラーゼ活性の測定(注 17)

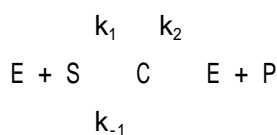
- (1) インジェクターに発光基質溶液を充填する。
- (2) フタをはずした 96 穴プレートをセットし、ルシフェラーゼ活性を測定する。測定条件は、下記の通り。
 - a) Delay 1 sec.
 - b) Shake Duration 1sec.(Slow)/ Diameter 0.1mm linear
 - c) Inject 10 μ l (Slow)
 - d) Measure 0.1 sec.
 - e) Kinetic 0.1 sec. / Total Time 1 sec. / Counting Time 0.1 sec. / Delay 0 sec.

(注 17) ルミノメーターの機器管理の一環として、毎日のセットアップ時にテストプレートを用いて、機器の発光の精度を確認することを薦める。

5. 定量

5.1 検量線の作成

- 1) 本法のダイオキシン類の検出原理を記述する最も単純化した反応式は酵素反応式と同様の反応と考えて、下の通りに記述できる。



ここに、E : 酵素反応式における酵素(本法では Ah 受容体に該当)

S : 酵素反応式における基質(本法ではダイオキシン類に該当)

C : 酵素反応式における酵素 - 基質複合体(本法では Ah 受容体-ダイオキシン類複合体に該当)

P : 酵素反応式における反応生成物(本法ではルシフェラーゼに該当)

k : 反応速度定数

本生物検定法ではダイオキシン類(S)と Ah 受容体(E)との結合、そしてその結果、活性化されるルシフェラーゼ遺伝子により生成するルシフェラーゼ(P)を、上記の酵素反応式に適用している。

- 2) 酵素反応のモデル式には Hill の式を用いている。

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]^n}{K_m + [S]^n} + b$$

Hill の式は最も単純な式である Michaelis-Menten の式

ここに、V : 反応速度

V_{\max} : 最大反応速度

[S] : 基質濃度

K_m : $V=1/2V_{\max}$ の時の基質濃度

b : Intercept parameter (切片変数)

の[S]の代わりに[S]ⁿを適用したもので、薬理学で薬物濃度とそれによる臓器や組織の反応を表現するのによく使われている式である。

3) 検量線のモデル式にはHillの式を用いる。

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]^n}{[K_m]^n + [S]^n} + b$$

- ここに、V : 薬理反応(ルシフェラーゼの生成濃度 = RLU)
V_{max} : 最大薬理反応(ルシフェラーゼ最大生成量)
[S] : 基質濃度(ダイオキシン類濃度)の自然対数値
K_m : V=1/2V_{max}の時の基質濃度の自然対数値
n : Hill's coefficient (Hillの係数)、Slope parameter (勾配変数)
b : Intercept parameter (切片変数)

4) 検量線の係数を求める

2,3,7,8-TeCDD標準物質の添加により生じる細胞のRLUを測定し、モデル式でカーブフィットさせ、パラメーターを決定する。

10段階のダイオキシン類濃度希釈列に対するRLUを測定し、理論式に代入し、表計算ソフトなどを用いて、4つのパラメーター、V_{max}、K_m、n、bの最適化(測定したRLUと理論式におけるRLUとの偏差の2乗が最小になるようにする)を行う。

標準物質質量 (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
A	B= A/190 × 1000	C= ln(B × 100)	RLU
23.75	125.00	9.43	22880
11.9	62.5	8.74	19448
5.94	31.3	8.05	16471
2.97	15.6	7.35	12357
1.48	7.81	6.66	7517
0.742	3.91	5.97	4754
0.371	1.95	5.27	2114
0.186	0.977	4.58	1233
0.0928	0.488	3.89	434

パラメーター			
V _{max} =	28631	n =	6.59
K _m =	7.75	b =	192

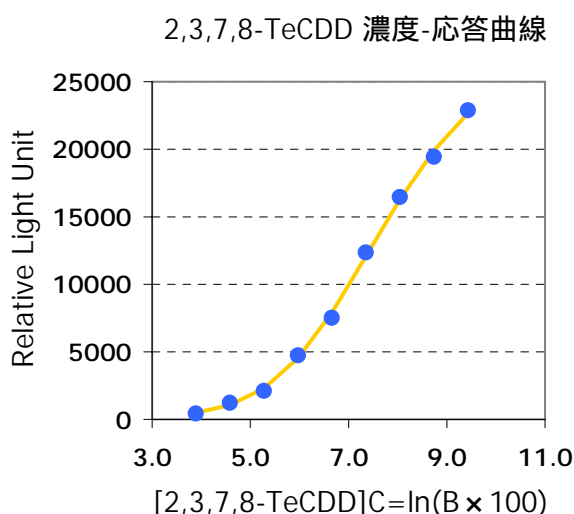


図 3-1-10 検量線作成及びパラメーターの例

5.2 測定試料の定量

実測濃度の算出方法の手順を以下に示す(注 18)。

1) 定量範囲にある RLU から対数換算値の算出 - Hill の式に検量線から求めた係数を当てはめる。なお、定量範囲については 6.1 の 2) で定義する。

$$\text{対数変換値} = \left(\frac{(RLU - b) \times K_m^n}{V_{\max} - RLU + b} \right)^{\frac{1}{n}}$$

2) 実測濃度 (pg/ml) の算出 - 対数換算値を乗数に換算する。

$$\text{実測濃度} = \frac{e^{\text{対数変換値}}}{100}$$

3) 400 μ l (13mm ガラス試験管) 当たりの実測濃度 (pg/400 μ l)

$$\text{試験管当たりの実測濃度} = \text{実測濃度} \times 0.4$$

4) 測定用試料中の実測濃度

$$\text{測定用試料中の実測濃度} = \text{試験管当たりの実測濃度} \times \text{希釈倍率}$$

5) 抽出液中の実測濃度

$$\text{抽出液中の実測濃度} = \text{測定用試料中の実測濃度} \times \frac{100}{\text{分取率}}$$

6) 試料中の濃度 (実測濃度)

$$\text{実測濃度 (ng/g 又は ng/m}^3\text{)} = \frac{\text{抽出液中の実測濃度}}{\text{供試料 (g 又は m}^3\text{)}}$$

(注 18) 解析例：1 試料につき、n=2 の試験管を用いて、DMSO 転溶し、細胞培養培地に溶解後、1 試験管当たり 2 ウェルに分注する。1 試料当たり、2 ウェルの RLU の平均を n=2 で算出する。

(備考) 排出ガスの酸素濃度による補正が必要な場合には、次式によって所定の酸素濃度に換算する。

$$C = \frac{21 - O_n}{21 - O_s} \times C_s$$

ここに、 C : 酸素の濃度 O_n における実測濃度 (ng/m³)

O_n : 換算する酸素の濃度 (%)

O : 排出ガス中の酸素の濃度 (注 19) (%)

C_s : 排出ガス中の実測濃度 (ng/m³)

(注 19) 排出ガス中の酸素の濃度が 20% を超える場合は、 $O_s=20$ とする。

表 3-1-6 実測濃度の解析例

発光量 (RLU)	対数 換算値	標準物質 相当量 (pg/ml)	標準物質 相当量 (pg/400 μ l)	希釈 倍率	分取率 (%)	供試量 (g, m ³)	実測濃度 (ng/g, ng/m ³)
6570	6.41	6.08	2.43	100	20	6	0.405
5890	6.27	5.30	2.12	100	20	6	0.353

6. 検出下限及び定量下限

6.1 標準品についての検出下限値及び定量下限値

標準品についての検出下限値及び定量下限値については、下記の条件によって決定する。

- 1) ブランク(DMSO)サンプル(4 ウェル)の標準偏差(s)の 3 倍の濃度(0.1pg/well)を検出下限値とし、10 倍の濃度(0.33pg/well)を定量下限値とする。表 3-1-7 に標準物質における RLU の例を示す。通常 3s は検量線 Std9(0.488pg/ml)、10s は検量線 Std7(1.95pg/ml)に相当する。
- 2) 定量範囲としては、プレート内に標準物質 2,3,7,8-TeCDD を数段階の濃度で添加し、同プレートの検量線に挿入して標準物質の濃度の決定を行った。これを 4 回繰り返し、変動係数を求め、変動係数=30%以内の 0.977 ~ 31.25pg/ml を定量範囲とした。

以上の点から便宜上、検出下限値として検量線 Std9(0.488pg/ml)、定量下限値として検量線 Std7(1.95pg/ml)と設定する。

表 3-1-7 標準物質における RLU の例

標準物質	標準物質 濃度	標準物質 対数 換算値	RLU			RLU-Blank	
			n=1/well	n=2/well	平均		
2,3,7,8-TeCDD	B(pg/ml)	C=ln(B*100)					
Std1	125	9.43	24654	25346	25000	22880	
Std2	62.5	8.74	21978	21159	21568	19448	
Std3	31.3	8.05	18788	18395	18592	16471	
Std4	15.6	7.35	13962	14992	14477	12357	
Std5	7.81	6.66	10077	9197	9637	7517	
Std6	3.91	5.97	6779	6969	6874	4754	
Std7	1.95	5.27	3980	4488	4234	2114	
Std8	0.977	4.58	3073	3634	3354	1233	
Std9	0.488	3.89	2187	2922	2554	434	
Blank1	0	0	1969	2271	2120	平均 (n=4)	0
Blank2	0	0	1928	2313			
					200	s(n=4)	
					599	3s	
					1997	10s	

表 3-1-8 標準物質添加による変動の調査一覧

標準物質濃度 (pg/ml)	標準物質濃度(4 回繰り返し)			CV(%)	RLU 例
	平均 ± s(pg/ml)				
125.	53.07 ± 26.51			49.96	25000
62.5	39.21 ± 12.53			31.96	20000 ~ 25000
31.3	23.76 ± 4.48			18.88	20000 ~ 23000
15.6	13.27 ± 2.32			17.47	18000 ~ 19000
7.81	7.44 ± 0.29			3.90	14000 ~ 18000
3.91	4.11 ± 0.24			5.93	8000 ~ 10000
1.95	2.17 ± 0.24			10.90	2000 ~ 3000
0.977	0.99 ± 0.17			16.89	1200 ~ 2000
0.488	- ± -			-	300 ~ 600

6.2 試料についての検出下限及び定量下限

試料ガスにおける検出下限及び定量下限は、以下の式により算出する。

$$C_{DL} = \frac{Q_{DL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{V} \quad C_{QL} = \frac{Q_{QL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{V}$$

ここに、 C_{DL} : 試料ガスにおける検出下限(0、101.32kPa)(ng-TEQ/m³)

C_{QL} : 試料ガスにおける定量下限(0、101.32kPa)(ng-TEQ/m³)

Q_{DL} : 測定方法の検出下限(pg/ml)(通常 0.195(pg/400 μl) = 0.488(pg/ml) × 0.400(ml))
検出下限値 ; Std9(0.488pg/ml)域に対して、1 試験管当たりの培地濃度

Q_{QL} : 測定方法の定量下限(pg/ml)(通常 0.391(pg/400 μl) = 0.977(pg/ml) × 0.400(ml))
定量下限値 ; Std7(1.95pg/ml)域に対して、1 試験管当たりの培地濃度

v : 測定用試料の液量(ml)
希釈倍率(測定用試料中からの分注量)(通常 4)
4ml 容測定用試料の一部を分注する率 = 4/d(d;分注量(ml))

V_E : 抽出液量(ml)(通常 50ml)

V'_E : 抽出液分取量(ml)(通常 10ml)

V : 試料ガスの採取量(0、101.32 kPa)(m³)

k : 補正係数 = 0.253(排出ガス、平成 17 年 7 月現在)

ばいじん及び燃え殻試料における検出下限及び定量下限は、以下の式により算出する。

$$C_{DL} = \frac{Q_{DL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{W} \quad C_{QL} = \frac{Q_{QL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{W}$$

ここに、 C_{DL} : ばいじん及び燃え殻試料における検出下限(ng-TEQ/g)

- C_{QL} : ばいじん及び燃え殻試料における定量下限(ng-TEQ/g)
- Q_{DL} : 測定方法の検出下限(pg/ml) (通常 $0.195(\text{pg}/400\ \mu\text{l}) = 0.488(\text{pg}/\text{ml}) \times 0.400(\text{ml})$)
 検出下限値 ; Std9(0.488pg/ml)域に対して、1試験管当たりの培地濃度
- Q_{QL} : 測定方法の定量下限(pg/ml) (通常 $0.391(\text{pg}/400\ \mu\text{l}) = 0.977(\text{pg}/\text{ml}) \times 0.400(\text{ml})$)
 定量下限値 ; Std7(1.95pg/ml)域に対して、1試験管当たりの培地濃度
- V : 測定用試料の液量(ml)
 希釈倍率(測定用試料中からの分注量)(通常 4)
 4ml 容測定用試料の一部を分注する率 = $4/d$ (d;分注量(ml))
- V_E : 抽出液量(ml) (通常 50ml)
- V'_E : 抽出液分取量(ml) (通常 25ml)
- W : ばいじん及び燃え殻試料の採取量(g) (通常 7g)
- k : 補正係数 = 0.351(ばいじん)、0.336(燃え殻) (平成 17 年 7 月現在)

7. 測定量(毒性等量)への換算

測定量(毒性等量)の算出方法を以下に示す。

本生物検定法における実測濃度は、2,3,7,8-TeCDD 検量線より求めた生物検定法独自の毒性評価値となる。従って HRGC/HRMS 法にて測定した毒性等量と比較するためには、換算が必要となる。

あらかじめ、多検体の HRGC/HRMS 法によって測定された試料について本生物検定法による測定を行い、両法における相関関係を求め、その回帰式の傾きを換算係数として、実測濃度から測定量(毒性等量)を算出する必要がある。

測定量(毒性等量)(ng-TEQ/g、ng-TEQ/m³_N) = 実測濃度(ng/g、ng/m³_N) × 換算係数

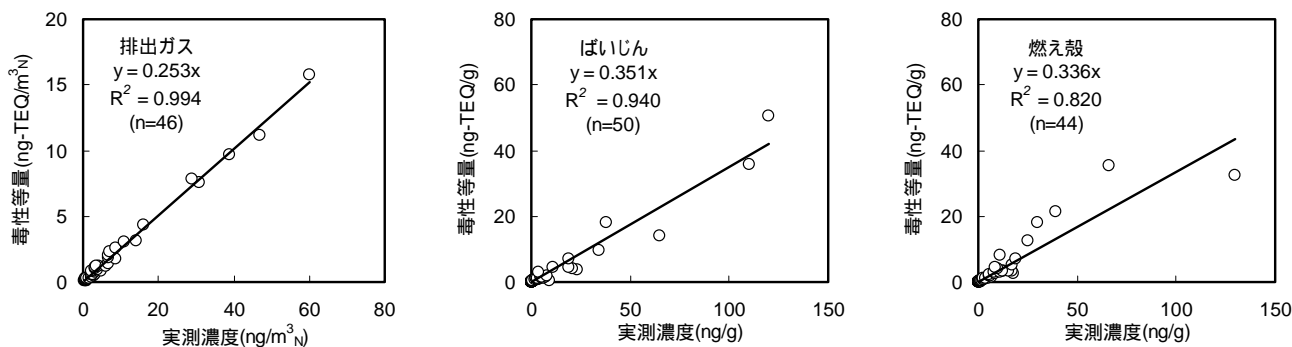


図 3-1-11 生物検定法による実測濃度と HRGC/HRMS 法による毒性等量の相関(例)

なお、測定結果の報告様式については、第 2 章第 2 節「測定結果の報告」を参照すること。

第6節 参考資料

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(排出ガス試料)」

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(ばいじん及び燃え殻試料)」

参考として、換算係数を求めるベースとなった各試料の HRGC/HRMS 法による毒性等量及び本生物検定法による実測濃度を添付する。

表 3-1-9 HRGC/HRMS 法と本生物検定法の比較データ一覧

No.	排出ガス試料 換算係数 0.253			ばいじん試料 換算係数 0.351			燃え殻試料 換算係数 0.336		
	HRGC/HRMS 毒性等量 (ng-TEQ/m ³)	生物検定法		HRGC/HRMS 毒性等量 (ng-TEQ/g)	生物検定法		HRGC/HRMS 毒性等量 (ng-TEQ/g)	生物検定法	
		実測 濃度 (ng/m ³)	測定量 (毒性等量) (ng-TEQ/m ³)		実測 濃度 (ng/g)	測定量 (毒性等量) (ng-TEQ/g)		実測 濃度 (ng/g)	測定量 (毒性等量) (ng-TEQ/g)
1	0.076	0.37	0.094	0.014	0.015	0.0053	0.031	0.14	0.047
2	0.079	0.56	0.14	0.015	0.10	0.035	0.034	0.27	0.091
3	0.083	0.52	0.13	0.018	0.11	0.039	0.048	0.16	0.054
4	0.135	1.0	0.25	0.033	0.34	0.119	0.059	0.19	0.064
5	0.135	1.1	0.28	0.034	0.23	0.081	0.073	0.34	0.11
6	0.139	0.87	0.22	0.045	0.20	0.070	0.086	0.34	0.11
7	0.144	0.83	0.21	0.051	0.20	0.070	0.11	0.73	0.25
8	0.152	0.60	0.15	0.092	0.36	0.13	0.14	0.40	0.13
9	0.159	0.84	0.21	0.11	0.32	0.11	0.15	0.37	0.12
10	0.215	0.80	0.20	0.12	0.38	0.13	0.16	0.75	0.25
11	0.222	0.81	0.20	0.16	0.84	0.29	0.16	0.93	0.31
12	0.226	1.1	0.28	0.16	0.58	0.20	0.24	0.67	0.23
13	0.230	0.75	0.19	0.17	0.69	0.24	0.25	1.5	0.50
14	0.267	1.1	0.28	0.18	0.58	0.20	0.27	0.95	0.32
15	0.283	0.90	0.23	0.19	0.46	0.16	0.31	1.0	0.34
16	0.293	1.5	0.38	0.24	1.1	0.39	0.50	1.6	0.54
17	0.372	2.1	0.53	0.32	0.89	0.31	0.59	2.2	0.74
18	0.489	2.8	0.71	0.33	1.8	0.63	0.64	2.9	0.97
19	0.543	2.1	0.53	0.37	0.66	0.23	0.81	2.7	0.91
20	0.553	2.3	0.58	0.38	0.68	0.24	0.97	4.7	1.6
21	0.556	3.2	0.81	0.39	9.4	3.3	1.0	2.6	0.87
22	0.564	2.7	0.68	0.40	1.2	0.42	1.0	3.8	1.3
23	0.760	3.1	0.78	0.43	1.5	0.53	1.5	7.0	2.4
24	0.794	2.9	0.73	0.44	0.94	0.33	1.7	5.7	1.9
25	0.837	2.3	0.58	0.45	0.73	0.26	1.8	6.1	2.0

26	0.856	4.7	1.2	0.65	1.6	0.56	2.1	5.8	1.9
27	0.921	3.8	0.96	0.68	3.5	1.2	2.4	8.5	2.9
28	1.0	3.1	0.78	0.81	3.2	1.1	2.7	18	6.0
29	1.1	3.2	0.81	1.00	2.8	0.98	2.8	8.0	2.7
30	1.2	4.1	1.0	1.0	2.8	0.98	2.9	11	3.7
31	1.2	3.4	0.86	1.1	2.5	0.88	3.3	13	4.4
32	1.2	6.0	1.5	1.1	2.6	0.91	3.4	17	5.7
33	1.4	6.7	1.7	1.2	2.8	0.98	3.5	15	5.0
34	1.7	8.6	2.2	1.3	6	2.1	3.5	12	4.0
35	1.8	6.8	1.7	1.3	5.1	1.8	3.9	9.7	3.3
36	2.1	6.8	1.7	1.3	4.6	1.6	4.3	8.5	2.9
37	2.3	7.1	1.8	1.4	7.5	2.6	5.3	17	5.7
38	2.6	8.8	2.2	1.4	5.3	1.9	6.9	19	6.4
39	3.1	11	2.8	1.7	7.7	2.7	8.0	11	3.7
40	3.1	14	3.5	3.1	3.5	1.2	13	25	8.4
41	4.3	16	4.0	3.7	23	8.1	18	30	10
42	7.6	31	7.8	4.2	21	7.4	21	39	13
43	7.8	29	7.3	4.5	19	6.7	33	130	44
44	9.7	39	9.9	4.6	11	3.9	35	66	22
45	11	47	12	7.0	19	6.7			
46	16	60	15	9.4	34	12			
47				14	65	23			
48				18	38	13			
49				36	110	39			
50				51	120	42			

その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(環境省平成 17 年告示第 92 号第 1 の 2)

第 1 節 測定方法の概要

対象媒体ごとに試料を採取し、ダイオキシン類を抽出後、クリーンアップを行い、ダイオキシン類応答性組換え細胞 101L を用いた測定により定量する。測定方法のフローを図 3-2-1 に示す。

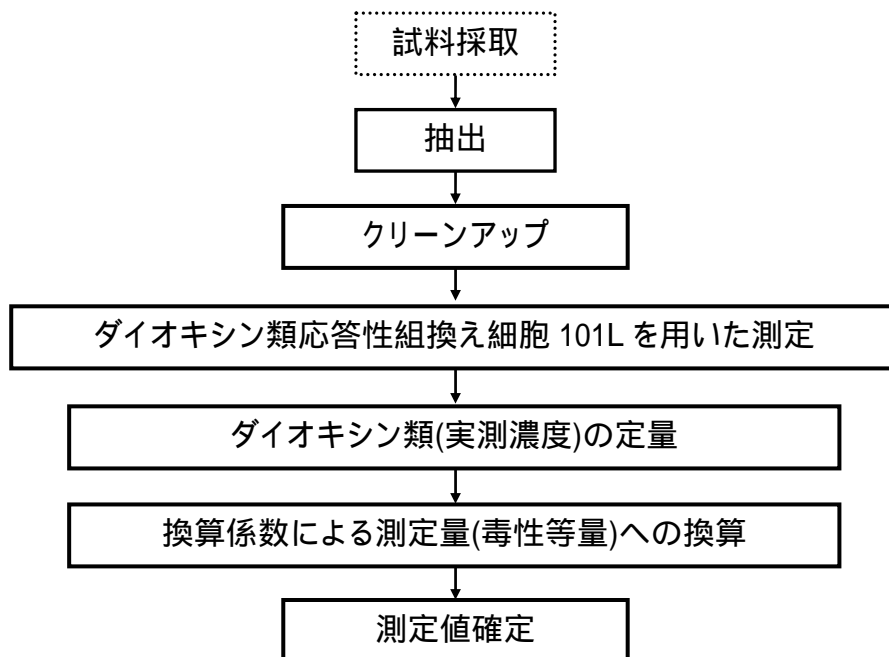


図 3-1-1 測定方法のフロー

第 2 節 用語の定義

- 1) 遺伝子組換え細胞 組換え DNA 技術を用いて作製された細胞
- 2) 組換え DNA 技術 組換え DNA を作製し、それを生細胞(宿主)に移入し、増殖させる技術
- 3) Ah 受容体 Ah Receptor、Arylhydrocarbon Receptor、芳香族炭化水素受容体、特異的な細胞外シグナル伝達分子(リガンド)に結合し、細胞の応答するきっかけとなるタンパク質。ダイオキシン類の生体影響の多くは、このレセプターと結合することにより引き起こされる
- 4) リガンド Ligand、タンパク質又は他の分子の特異的部位に結合する分子の総称。レセプターが鍵穴でリガンドが鍵の関係。両者が結合すると、両者の関係に特異的な信号が発生し生理反応が引き起こされる
- 5) ルシフェラーゼ遺伝子 Luciferase Gene、生物発光反応を触媒する酵素を発現するホタル由来の遺伝子
- 6) CYP1A1 Cytochrome P450、薬物代謝酵素シトクロム P450 類に属する薬物代謝酵素。CYP1A1 は、ダイオキシン類により誘導されることが知られている

- 7) DRE Dioxin Responsive Element、ダイオキシン応答配列、ダイオキシン類が特異的に結合する遺伝子の塩基配列部分
- 8) プラスミド Plasmid、小型の環状 DNA 分子のこと
- 9) 継代培養 Subculture、保存培養から微生物あるいは培養細胞の一部を分けて別の新鮮な培地に植え継ぎ、再び培養したもの
- 10) 発光基質 生物発光反応の基質

第3節 試料採取方法に関する特記事項

1. 試料ガスの採取量

試料ガスの採取量は、次のような手順によって決定する。採取時間については、その目的に応じて試料ガスの発生状況などを十分考慮して代表試料が採取できるようにしなければならない。

- 1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。
- 2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。
- 3) 以下の式によって測定に必要な最小の試料ガスの量を算出する。

$$V = \frac{Q_{DL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、 V : 測定に必要な最小の試料ガスの量(m^3_N)

Q_{DL} : 測定方法の検出下限(pg/ml)

k : 測定量(毒性等量)への換算係数

v : 測定用試料の液量(ml)

V_E : 抽出液量(ml)

V'_E : 抽出液分取量(ml)

C_{DL} : 必要となる試料ガスにおける検出下限 ($ng-TEQ/m^3_N$)

- 4) 算出された最小の試料ガスの量以上を試料ガスの採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例) $5ng-TEQ/m^3_N$ レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となる試料ガスにおける検出下限は $0.17ng-TEQ/m^3_N$)

抽出液を $10ml$ に定容し、その抽出液から $5ml$ を分取してクリーンアップを行い、最終的に $0.2ml$ の測定用試料溶液に調製する場合の試料ガス採取量を下記に示す。

$$V = \frac{300 \times 0.217 \times 0.08}{1000} \times \frac{10}{5} \times \frac{1}{0.17} = 0.061$$

2. ばいじん及び燃え殻の採取量

ばいじん及び燃え殻試料の採取量は、次のような手順によって決定する。

- 1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。
- 2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。
- 3) 以下の式によって測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量を算出する。

$$W = \frac{Q_{DL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、 W : 測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量(g)

Q_{DL} : 測定方法の検出下限(pg/ml)

k : 測定量(毒性等量)への換算係数

v : 測定用試料の液量(ml)

V_E : 抽出液量(ml)

V'_E : 抽出液分取量(ml)

C_{DL} : 必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限(ng-TEQ/g)

4) 算出された最小のばいじん及び燃え殻試料の量以上をばいじん及び燃え殻試料の採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例)3ng-TEQ/g レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となる試料における検出下限は0.1ng-TEQ/g)

抽出液を 10ml に定容し、その抽出液から 10ml を分取してクリーンアップを行い、最終的に 0.2ml の測定用試料溶液に調製する場合のばいじん及び燃え殻試料の採取量を下記に示す。

$$W = \frac{300 \times 0.217 \times 0.2}{1000} \times \frac{10}{10} \times \frac{1}{0.1} = 0.13$$

第4節 試料の前処理

5) 試料の前処理の概要

採取した試料は、抽出を行う。抽出液は必要に応じて分取を行い、クリーンアップに移る。図 3-2-2 に試料の前処理から測定までのフローの例を示す。

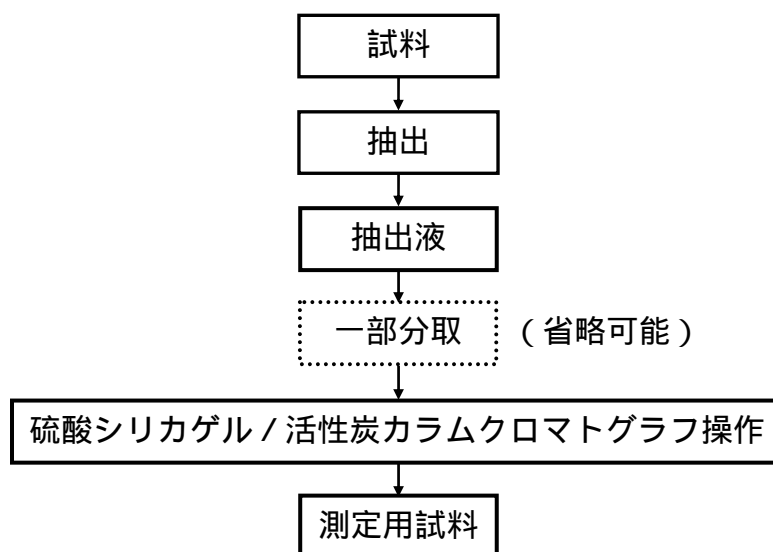


図 3-2-2 試料の前処理から測定までのフローの例

2. 試薬

試料の前処理に用いる試薬は、JIS K 0311 又は厚生省平成 4 年告示第 192 号別表第一(第一号関係)(1)に記載の試薬(但し、内標準物質は使用しない)、及び次による。これらの試薬は、空試験などによって測定に支障がないことを確認する。

- 1) ジメチルスルホキシド(DMSO) 試薬特級
- 2) ケイソウ土

3. 器具及び装置

試料の前処理に用いる器具及び装置は、次による。これらの器具及び装置は、空試験などによって測定に支障がないことを確認する。

3.1 ガラス器具

JIS R3503 及び JIS R3505 に規定するもの。コックの部分がふっ素樹脂製のものをを用いてもよい

3.2.1 ソックスレー抽出器

JIS R3503 に規定するもの又はこれと同等の品質のもの。接続部にグリースを使用してはならない

3.2.2 高速溶媒抽出装置(ASE 抽出装置)

ダイオネクス製 ASE-300 又は同等品。ASE 用の器具一式(セルポディー、セルエンドキャップアセンブリ、溶媒ボトル、捕集ボトルアセンブリー、コンプレッサー等)

3.3 濃縮器

クデルナ-ダニッシュ(KD)濃縮器又はロータリーエバポレータ。接続部にグリースを使用してはならない

3.4 その他

JIS K 0311 又は厚生省平成 4 年告示第 192 号別表第一(第一号関係)(1)に記載のもの及び下記の器具、又は同等品

- 1) pH 試験紙 ばいじん等の pH 測定に使用
- 2) アルミロート ハイδροマトリックスの充填に使用
- 3) セルロースフィルター 33mm、ASE 抽出に使用
- 4) 固相抽出用チューブ 60ml 用、フリッツ付、クリーンアップに使用
- 5) 固相抽出用チューブ 10ml 用、クリーンアップに使用
- 6) フリット 9mm、クリーンアップに使用
- 7) ユニストッパー 4)と5)の連結に使用、中央に 4mm 程度の穴を開けたもの
- 8) カラムアタッチメント 50ml プラスチックボトルのフタ中央に 4mm 穴を開けたもの
- 9) KD 管

4. 前処理操作

4.1 試料量の記録

採取した試料は、試料量を記録する。

4.2 抽出

- 1) 排出ガス

JIS K0311 6.4 又はこれと同等の方法により、抽出を行う。ただし、内標準物質の添加は行わない。

図 3-2-3 に排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

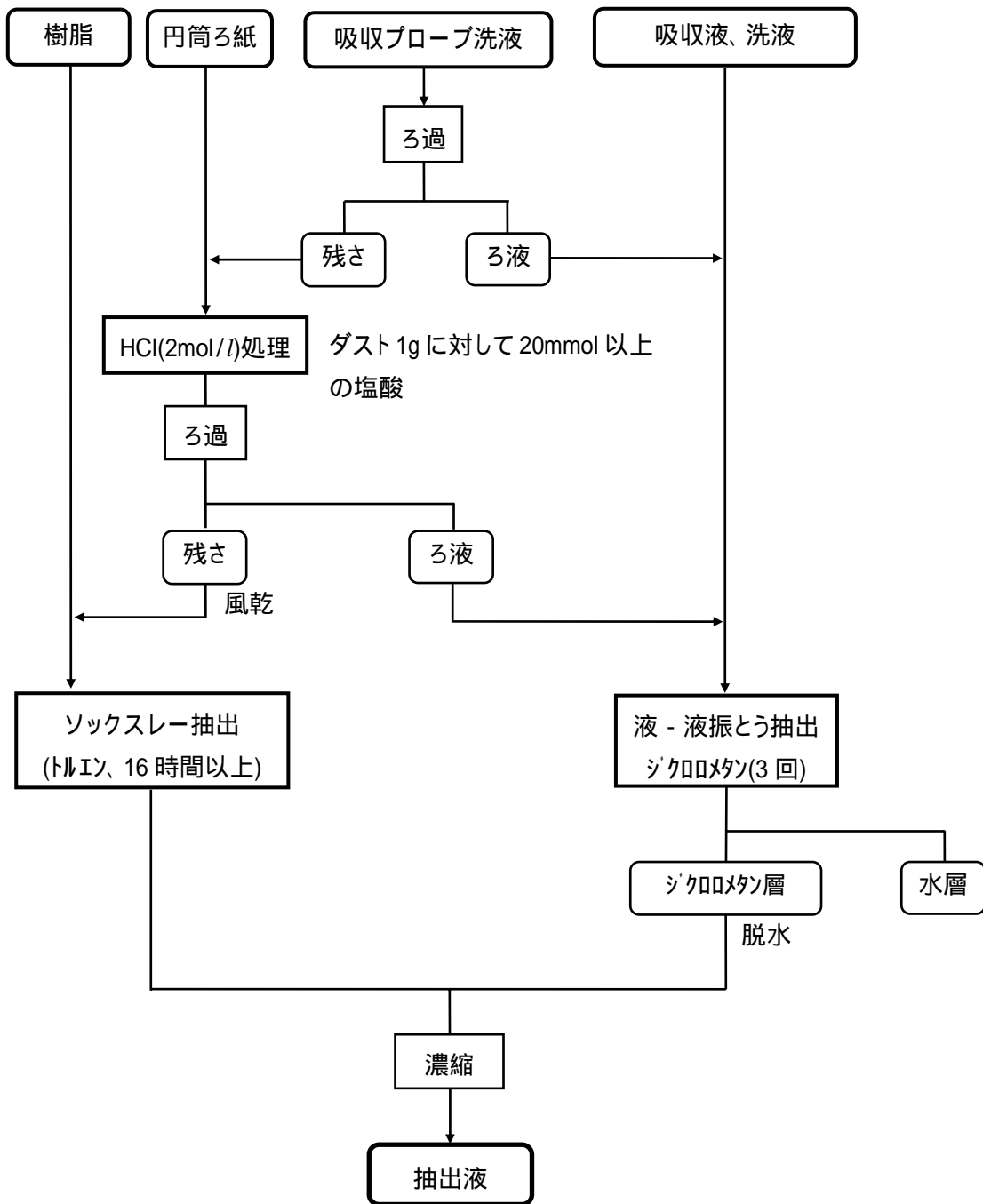


図 3-2-3 排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例

2) ばいじん及び燃え殻

厚生省平成 4 年告示第 192 号別表第一(第一号関係)(2)又はこれと同等の方法により抽出を行う。
ただし、内標準物質の添加の操作は行わない。

図 3-2-4 にばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

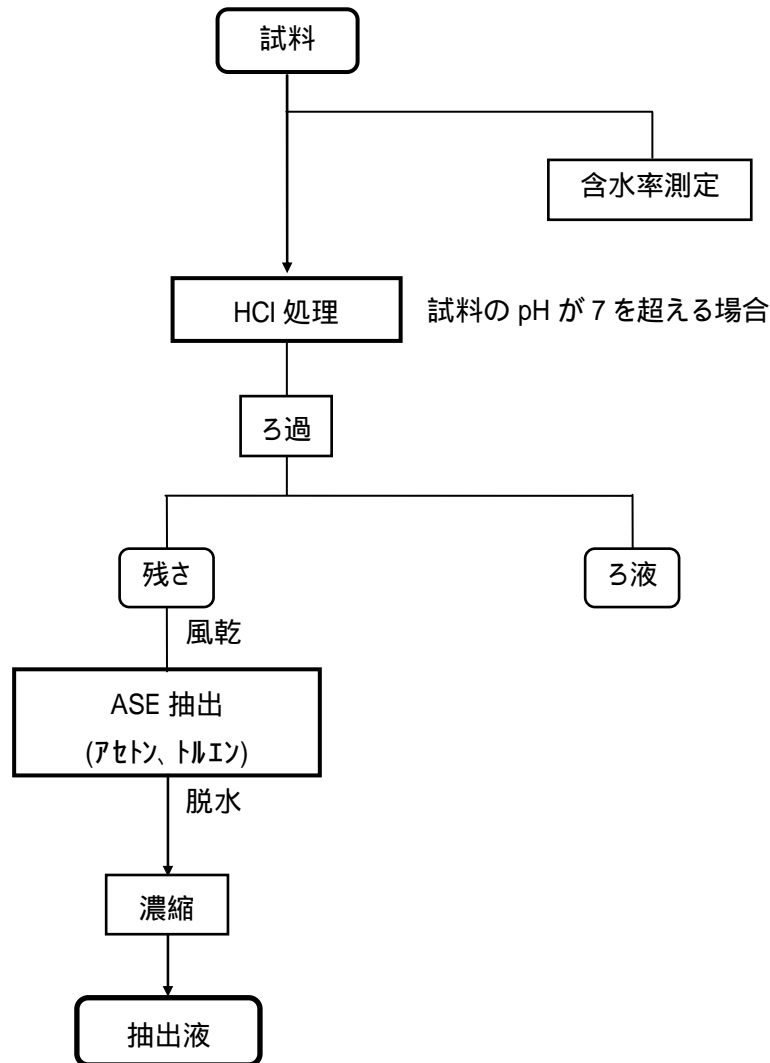


図 3-2-4 ばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例

以下に、例として ASE 抽出装置を用いた方法を示す。

(例)ASE 抽出装置を用いた方法

- (1) 試料を適量の精製水中に入れて混和し、pH 試験紙で水層の pH を測定する。pH が 7 を超える場合は、塩酸処理を行う。pH が 7 以下の場合には塩酸処理を省略し、抽出操作に進む。
- (2) 抽出操作を行う場合には損失のないように注意し、容器に残った試料を完全に拭き取りセル中に

合わせる。

(3) ASE の抽出は下記の条件で行う。

サイクル数：2(1 サイクル目：アセトン、2 サイクル目：トルエン)

HEATING：9 分

STATIC：10 分

FLUSHING：50%

PURGING：300 秒

温度：200

圧力：1500psi

(4) アセトン及びトルエンの抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、ナスフラスコに合わせる。その際、捕集ボトルも使用溶媒でよくリンスし抽出液に合わせる。

(5) ナスフラスコをエバポレータ等の濃縮器にセットし抽出液を濃縮する。

(6) 濃縮液を 10ml にメスアップする。

4.3 クリーンアップ

厚生省平成 4 年告示第 192 号に記載の方法、又は測定値に影響の無いことが確認された同等の方法によりクリーンアップを行う。図 3-2-4 にクリーンアップのフローの例を示す。

1) 抽出液の分取

10ml にメスアップした抽出液から必要量(通常は、排出ガス試料の場合 5ml、ばいじん及び燃え殻試料の場合 10ml とするが、試料の濃度等により増減する)を分取する。

2) 精製カラムの作成(図 3-2-5)

(1) 硫酸シリカゲルカラム

60ml 用固相抽出用チューブに下から乾式充填法で、脱脂綿適量、44%硫酸シリカゲル 10±0.1g、シリカゲル 1.8±0.1g、無水硫酸ナトリウム 5~5.5g、フリッツの順に積層する。

(2) 活性炭カラム

12ml 用固相抽出用チューブに下から乾式充填法で、フリット、活性炭埋蔵シリカゲル 0.5±0.02g、無水硫酸ナトリウム 0.3±0.02g、フリットの順に積層する。

3) クリーンアップ

(1) 硫酸シリカゲルカラム及び活性炭カラムにヘキサンを 20ml 流す。

(2) 活性炭カラムの上に硫酸カラムをセットし、ヘキサンを 10ml 流す。

(3) ヘキサンが流れ終わってから、試料をカラムに添加する。ヘキサン 1ml で抽出液の入っていた容器を洗浄し、洗液をカラムに注入する。次にヘキサン 2ml で同様の操作を行う。

(4) カラムにヘキサン 70ml を流す。

(5) 硫酸シリカゲルカラムの層を観察し、破過した場合には(8)まで操作を行った後(10)へ。

(6) 硫酸シリカゲルカラムを外し、活性炭カラムの上に空の 60ml 用固相抽出用チューブを接続し、ジクロロメタン：ヘキサン=1：3を 50ml 流す。

(7) 活性炭カラムの下にナスフラスコをセットし、トルエン 70ml で溶出する。

(8) ナスフラスコをロータリーエバポレータ等の濃縮器にセットし、トルエン層を 0.5ml 程度まで濃縮する。

- (9) 濃縮液を KD 濃縮器に移す。ナスフラスコをヘキサンで洗い込みながら KD 管に移し約 3ml にし 4)の溶媒置換の工程へ。
- (10) 新しい硫酸シリカゲルを用意し、ヘキサン 30ml を流す。
- (11) 硫酸シリカゲルカラムの下に空のナスフラスコをセットする。
- (12) 濃縮液をカラムに注入する。濃縮液の入っていたナスフラスコをヘキサン 1ml で洗い洗液をカラムに注入する。次にヘキサン 2ml で洗い洗液をカラムに注入する。
- (13) カラムにヘキサン 70ml を流す。
- (14) ナスフラスコをロータリーエバポレータ等の濃縮器にセットし、ヘキサン層を 0.5ml 程度まで濃縮する。
- (15) 硫酸シリカゲルカラムが破過していない場合は(9)、破過している場合は(10)の工程へ。

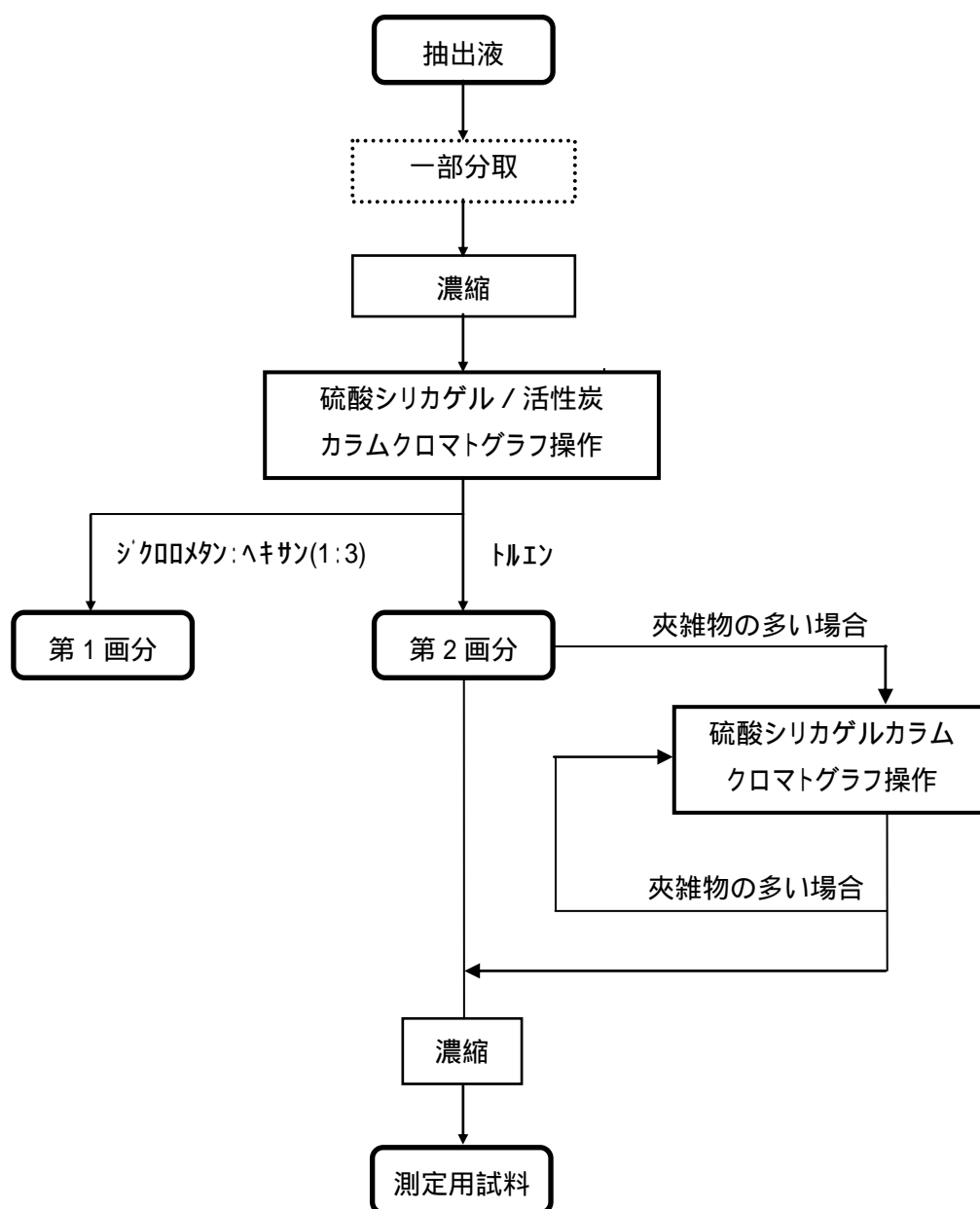


図 3-2-4 クリーンアップのフローの例

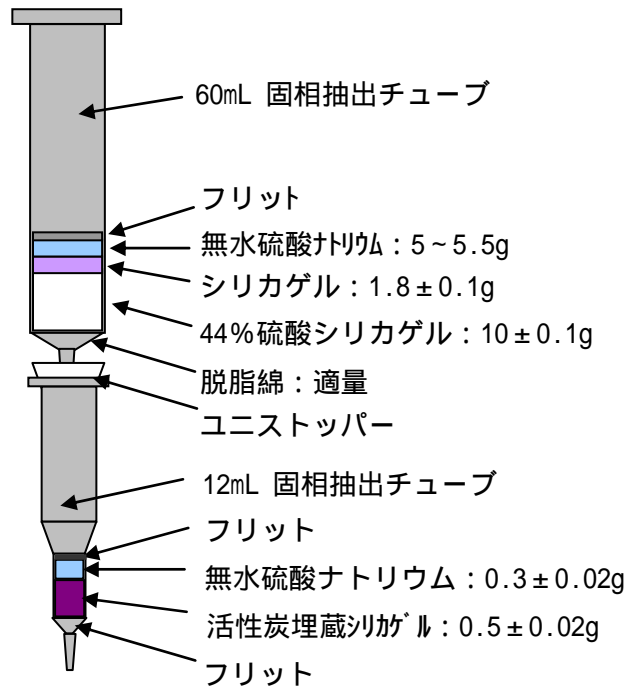


図 3-2-5 精製カラムの例

4) 溶媒置換及び測定用試料の保存

- (1) 3)で得られた試料(ヘキサン層)の入った KD 濃縮器を吹き付け装置にセットして 20 μ l まで濃縮し、着色や沈殿等の異常がないことを確認する。次に DMSO 20 μ l を添加し、20 μ l まで濃縮することにより DMSO に溶媒置換する。
- (2) KD 濃縮器に DMSO を適量加え(排出ガス試料の場合 60 μ l、ばいじん等試料の場合 180 μ l。試料の濃度等により増減する場合もあり)、試験管ミキサー等でよく攪拌する。
- (3) 試料をバイアルに移し、試料識別用のラベルを貼り、最終検液として室温で暗所に保存する。

第 5 節 測定

1. 測定の概要

ヒト遺伝子組み換え細胞である 101L 細胞が用いられる。試料中に含まれるダイオキシン類が細胞内の Ah 受容体と結合することに由来して発現するルシフェラーゼの活性に基づく発光を発光光度計(ルミノメーター)で測定することによりダイオキシン類の定量を行う。

2,3,7,8-TeCDD により検量線を作成し、試料の発光量(RLU)から実測濃度を算出する。排出ガス、ばいじん及び燃え殻について定められた換算係数を実測濃度に乘じることにより、測定量(毒性等量)を算出する。

2. 試薬、器具及び装置

2.1 使用細胞

ダイオキシン類応答性組換え細胞 101L : 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 に導入したものの

2.2 試薬

測定に用いる試薬は、次による。

- 1) イーグル MEM 炭酸水素ナトリウム含有、L-グルタミン不含、ろ過滅菌及びエンドトキシンテスト済、冷蔵保存
- 2) FETAL BOVINE SERUM(FBS) 56 、30 分間非働化处理済、-20 凍結保存
- 3) L-グルタミン 200 mM、ろ過滅菌及びエンドトキシンテスト済、0 以下凍結保存
- 4) ピルビン酸ナトリウム 100mM、ろ過滅菌及びエンドトキシンテスト済、冷蔵保存
- 5) 培養液 1)の 500ml、2)の 25ml、3)の 10ml、4)の 5ml を混合したもの、冷蔵保存
- 6) GENETICIN(G418)(線滅菌済) 1g に 25ml の滅菌水を加えて 40mg/ml に調製し、0 以下で凍結保存したもの
- 7) ペニシリン・ストレプトマイシン 10000units ペニシリン・10mg/ml ストレプトマイシン、ろ過滅菌及びエンドトキシンテスト済、0 以下凍結保存
- 8) トリプシン 1×solution、0 以下凍結保存
- 9) ハンクス緩衝液 炭酸水素ナトリウム含有、ろ過滅菌及びエンドトキシンテスト済
- 10) リン酸緩衝液(PBS) マグネシウム及びカルシウム不含
- 11) ルシフェラーゼアッセイキット BD PharMingen 製 556866(発光基質、緩衝液、ライシスバッファ－同梱)又はこれと同等以上の性能を有するもの
- 12) 2,3,7,8-TeCDD
- 13) CO₂ ボンベ
- 14) 液体窒素
- 15) 細胞凍結用調製液 1)、2)、DMSO 及び 7)を 40 : 50 : 9 : 1 の割合で混合したもの、使用時に毎回調製する

2.3 器具及び装置

測定に用いる器具及び装置は、以下による。

- 1) 培養シャーレ(ペトリ皿) 100 mm、滅菌済のものを用いる
- 2) 培養マイクロプレート 96 ウェル、滅菌済のものを用いる
- 3) メスピペット 50ml 及び 10ml、滅菌済のものを用いる
- 4) 遠心管 50ml 及び 10ml、滅菌済のものを用いる
- 5) 三角フラスコ 滅菌済のものを用いる
- 6) ビーカー 滅菌済のものを用いる
- 7) マイクロピペット用滅菌チップ 200 µl、1000 µl、滅菌済のものを用いる
- 8) マイクロピペット用チップ 200 µl、1000 µl
- 9) マイクロピペット
- 10) 12 チャンネルマイクロピペット
- 11) ピペットエイド
- 12) 安全キャビネット
- 13) CO₂ インキュベーター 37 、CO₂ 濃度 5%
- 14) ウォーターバス

- 15) 遠心分離機 1000rpm で遠心分離できるもの
- 16) 試験管ミキサー
- 17) 血球計算盤
- 18) 光学顕微鏡
- 19) カウンター
- 20) 微量遠心管
- 21) 試験管 12×75mm
- 22) マイクロプレートミキサー
- 23) ルミノメーター
- 24) オートクレーブ
- 25) 凍結保存用チューブ 2ml、滅菌済のものを用いる
- 26) 凍結処理容器 BICELL 又はそれと同等以上の性能を有するもの、又はプログラムフリーザー
- 27) ドライアイスまたはディープフリーザー (-80)
- 28) 液体窒素保管容器
- 29) 吸引装置(アスピレーター)

3 . 細胞の取り扱い

3.1 培養細胞の立ち上げ

- 1) 液体窒素中で凍結保存された 101L 細胞の入ったバイアルを取り出し、37 のウォーターバス中で解凍する。
- 2) バイアルの内容物を培養シャーレに移した後、培養液 12ml を加えて混和する(注 1)。
- 3) 培養シャーレを CO₂ インキュベーターに入れ、5 時間程度培養する。
- 4) 培養シャーレを CO₂ インキュベーターから取り出し、培養液を新しいものと交換する(注 1)。
- 5) 培養シャーレを CO₂ インキュベーターに入れ、3~4 日間培養する。

3.2 細胞の継代

- 1) 培養シャーレを CO₂ インキュベーターから取り出し培養液を取り除く。トリプシンを 2ml 分注し混和する(注 1)。
- 2) 培養シャーレを CO₂ インキュベーターに 8 分間入れる。
- 3) 培養シャーレを CO₂ インキュベーターから取り出し、培養液を 2ml 分注し混和する。
シャーレの底面に張り付いている細胞をメスピペットを用いてピペッティングで剥がして遠心管に移す(注 1)。
- 4) 遠心管を遠心分離機に入れ、1000rpm で 5 分間遠心分離操作を行う。
- 5) 上澄み液を廃棄し、残ったペレット状の細胞に培養液を適量加えてメスピペットを用いてピペッティングし、懸濁液を作製する(注 1)。
- 6) 懸濁液の一部を微量遠心管に移し、ハンクス緩衝液等の緩衝液又は培養液をマイクロピペットで適量加えて希釈する(注 1)。
- 7) よく混和した懸濁液を血球計算盤に適量分注し、顕微鏡で細胞数をカウントする。カウントをもとに懸濁液の濃度(cells/ml)を計算する。

- 8) 125,000cells/ml の濃度調製に必要な懸濁液量と培養液量を計算し、両者の合計量の 1/100 量に相当する G418 及びペニシリン・ストレプトマイシン量を計算する(注 1)。
- 9) G418 及びペニシリン・ストレプトマイシンと培養液を混合した後、懸濁液を加えて混和し、培養シャーレ 1 枚当たり 12ml ずつ分注する(注 1)。
- 10) CO₂ インキュベーターに入れ、3~4 日間培養する。
(注 1)安全キャビネット内で無菌操作を行う。

3.3 細胞の保存 (BICELL を用いた方法の例)

- 1) 3.2 の 1) ~7) の方法で細胞懸濁液を調製する。
- 2) 細胞懸濁液を遠心管に移し、遠心分離機に入れ、1000rpm で 5 分間遠心分離操作を行う。
- 3) 上澄み液を廃棄し、残ったペレット状の細胞に細胞凍結用調製液を加えてピペティングし、細胞懸濁液の濃度が 2,000,000 ~ 4,000,000cells/ml 程度になるよう調製する。
- 4) 凍結保存用チューブに 1ml ずつ分注して BICELL の中に入れ、ドライアイス入りの箱またはディープフリーザー (- 80) に 3 時間入れる。
- 5) 凍結保存用チューブを取り出し、液体窒素保管容器の中に入れて保存する。

4 . 測定操作

4.1 細胞のマイクロプレートへの播種

- 1) 3.2 の 9) で調製した懸濁液を培養マイクロプレートの各ウェルに 200 μ l ずつ分注する(注 1)。
- 2) 培養マイクロプレートを CO₂ インキュベーターに入れ、3~4 日間培養する。

4.2 曝露

- 1) 測定値が定量範囲内に入るように必要に応じて、第 4 節 4.3 の 4) で調製した測定用試料に DMSO を加えて希釈系列試料を作製する。
- 2) ブランク溶媒、検量線作成用標準液 (Std)、及び 1) で作製した希釈系列試料を試験管内で培養液で 100 倍希釈し、測定用試料液を調製する(注 1)。
- 3) 3~4 日間培養した培養マイクロプレートを CO₂ インキュベーターから取り出し、ウェル中の培養液をアスピレーター等で吸引除去する(注 1)。
- 4) ブランク溶媒、Std、希釈系列試料の測定用試料液をマイクロプレートの各ウェルに 50 μ l ずつ、2 つ以上のウェルに分注する(注 1)。
- 5) マイクロプレートを CO₂ インキュベーターに入れ、16 \pm 0.5 時間曝露する。

4.3 ルシフェラーゼ活性の測定

- 1) 曝露が終わった培養マイクロプレートを CO₂ インキュベーターから取り出し、ウェル中の測定用試料液をアスピレーター等で吸引除去する。
- 2) マイクロプレートの各ウェルに PBS を 100 μ l 加え、アスピレーター等で吸引除去する。
- 3) 各ウェルに細胞溶解液を 50 μ l 加え、室温で 10 分間放置する。
- 4) マイクロプレートをマイクロプレートミキサーにセットし、5 分間攪拌する。
- 5) ルミノメーターに発光基質及び緩衝液をセットし、ルミノメーターに接続されたコンピュータ等に設定条件を入力する。
- 6) マイクロプレートをルミノメーターにセットし、緩衝液及び発光基質を適量自動分注させ、発光基質分注 1 秒後から 2 秒後までの 1 秒間の RLU を測定する。

5. 定量

5.1 検量線の作成

- 1) 検量線は、濃度 0(ブランク溶媒)を含め、合計 5 段階以上に調製した Std の濃度系列を用いて測定バッチごとに作成する(濃度調製例：0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 ng/ml)。Std の各濃度列は同一マイクロプレート内で 2 ウェル以上設定する。
- 2) ルミノメーターで測定した Std の RLU をブランク溶媒の RLU で除し、fold induction(発光量比)を求める。
- 3) Std の濃度(Y)及び fold induction (X)について、一次回帰式による検量線を作成する。
- 4) 検量線の決定係数 R^2 0.98 を目標とする。

5.2 測定試料の定量

- 1) ルミノメーターで測定した試料の発光量をブランク溶媒の発光量で除し、fold induction を求める。
- 2) 測定試料の fold induction を検量線の回帰式に代入し、測定試料の定量を行う。
- 3) 検量線の定量範囲内にある定量データ(fold induction)のうち、試料の希釈倍率と定量データの間に良好な直線関係(希釈直線性)が得られる希釈段階について、原則として希釈倍率の最も小さな場合の定量データに希釈倍率を乗じて実測濃度(測定用試料当たり)を求める。データの希釈直線性を簡便に判定する方法の例として、連続した 2 つの希釈段階における実測濃度(測定用試料当たり)の比が 0.8~1.2 の範囲に収まることを確認する方法がある。
- 4) 3)で求めた実測濃度(測定用試料当たり)について、抽出に供した実試料およびクリーンアップ、測定に供した試料の分取割合等から単位測定試料量あたりの実測濃度を算出する。
- 5) 試料希釈列の全ての発光量(fold induction)が検量線の定量範囲から外れた場合、試料の希釈倍率を再度調製した上で測定を行う。

(備考) 排出ガスの酸素濃度による補正が必要な場合には、次式によって所定の酸素濃度に換算する。

$$C = \frac{21 - O_n}{21 - O_s} \times C_s$$

ここに、 C : 酸素の濃度 O_n における実測濃度(ng/m^3)

O_n : 換算する酸素の濃度(%)

O : 排出ガス中の酸素の濃度(注 2)(%)

C_s : 排出ガス中の実測濃度(ng/m^3)

(注 2) 排出ガス中の酸素の濃度が 20%を超える場合は、 $O_s=20$ とする。

6. 検出下限及び定量下限

6.1 標準品についての検出下限及び定量下限

標準品(2,3,7,8-TeCDD)の検出下限値：0.3 ng/ml、定量下限値：0.5 ng/ml

検出下限値：濃度 0(ブランク溶媒)の平均 RLU + 3 × 標準偏差の値(A)と標準品の平均 RLU - 3 × 標準偏差の値(B)を求めたときに、(A) < (B)となる標準品の最低濃度

定量下限値：濃度 0(ブランク溶媒)の平均 RLU + 10 × 標準偏差の値(A')と標準品の平均 RLU - 3 × 標準偏差の値(B')を求めたときに、(A') < (B')となる標準品の最低濃度

6.2 試料についての検出下限及び定量下限

1) 排出ガス(試料量 4m^3_{N} を用いた場合)

検出下限値 : $0.0026\text{ng-TEQ}/\text{m}^3_{\text{N}}$ 、定量下限値 : $0.0043\text{ng-TEQ}/\text{m}^3_{\text{N}}$

(いずれも下記 7 に例示した方法により、実測濃度を測定量(毒性等量)に換算した場合の値)

2) ばいじん等(試料 5g を用いた場合)

検出下限値 : $0.0026\text{ng-TEQ}/\text{g}$ 、定量下限値 : $0.0043\text{ng-TEQ}/\text{g}$

(いずれも下記 7 に例示した方法により、実測濃度を測定量(毒性等量)に換算した場合の値)

検出下限値及び定量下限値は分析に供する試料量等により変動する。

7 . 測定量(毒性等量)への換算

5.2 で求めた実測濃度に排出ガス、ばいじん等ともに換算係数(下記参考資料の例では 1/4.6)を乗じることによって測定量(毒性等量)に換算することができる。なお、測定結果の報告様式については、第 2 章第 2 節「測定結果の報告」を参照すること。

第6節 参考資料

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(排出ガス試料)」
複数の排出ガス試料(n=20以上が望ましい)について本測定方法とHRGC/HRMS法でそれぞれ実測濃度、毒性等量を求める。HRGC/HRMS法による毒性等量を本測定方法による実測濃度で除したものの平均値を換算係数とする。

(例)排出ガス試料の換算係数導出の方法

本測定方法による実測濃度をX、HRGC/HRMS法による毒性等量をYとし、Y/Xを求める。

全試料についてY/Xの値を求め、全試料の平均値を計算し、これを換算係数とする(図3-2-5ではY/Xの平均値である1/4.6を換算係数とした)。

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(ばいじん及び燃え殻試料)」
複数のばいじん及び燃え殻試料(n=20以上が望ましい)について本測定方法とHRGC/HRMS法でそれぞれ実測濃度、毒性等量を求める。HRGC/HRMS法による毒性等量を本測定方法による実測濃度で除したものの平均値を換算係数とする。

(例)ばいじん及び燃え殻試料の換算係数導出の方法

本測定方法による実測濃度をX、HRGC/HRMS法による毒性等量をYとし、Y/Xを求める。

全試料についてY/Xの値を求め、全試料の平均値を計算し、これを換算係数とする(図3-2-6ではY/Xの平均値である1/4.6を換算係数とした)。

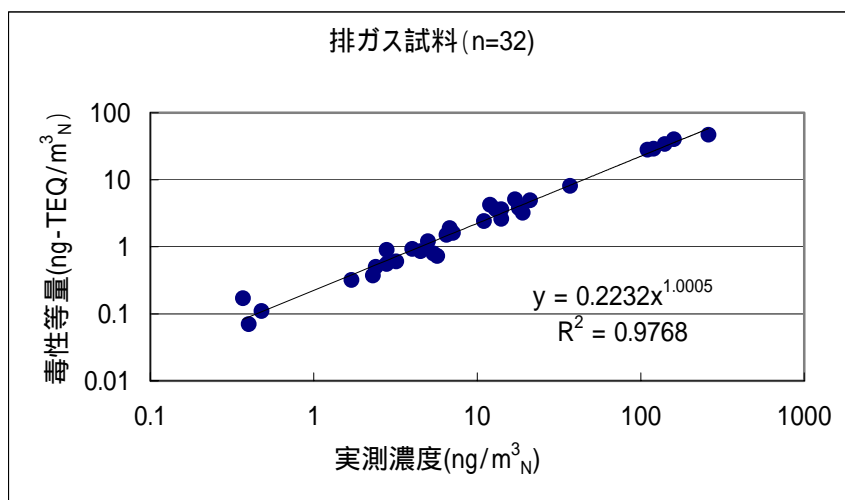


図3-2-6 生物検定法による実測濃度とHRGC/HRMS法による毒性等量の相関(例)(排出ガス)

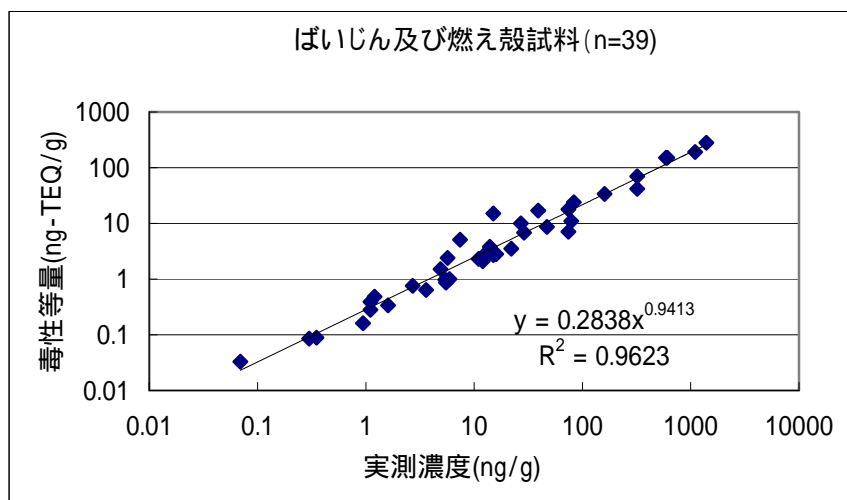


図 3-2-7 生物検定法による実測濃度と HRGC/HRMS 法による毒性等量の相関(例)(ばいじん及び燃え殻)

その3 前処理に、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量を測定する方法(環境省平成 17 年告示第 92 号第 1 の 3)

第 1 節 測定方法の概要

対象媒体ごとに試料を採取し、ダイオキシン類を抽出後、クリーンアップを行い、ダイオキシン類応答性組換え細胞 HeB5 を用いた測定により定量する。測定方法のフローを図 3-3-1 に示す。

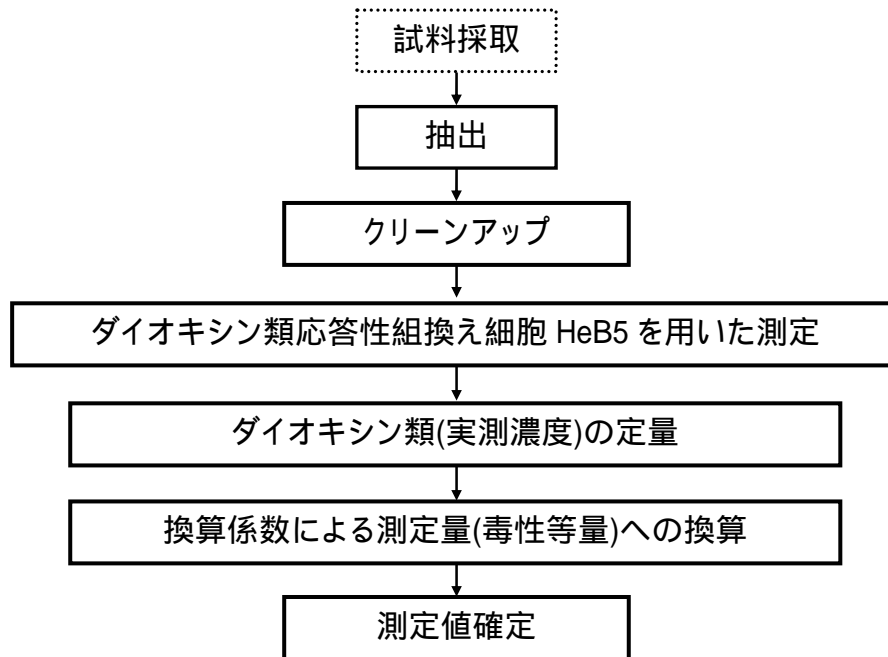


図 3-3-1 測定方法のフロー

第 2 節 用語の定義

- 1) 遺伝子組換え細胞 組換え DNA 技術を用いて作製された細胞
- 2) 組換え DNA 技術 組換え DNA を作製し、それを生細胞(宿主)に移入し、増殖させる技術
- 3) Ah 受容体 Arylhydrocarbon Receptor、芳香族炭化水素受容体、特異的な細胞外シグナル伝達分子(リガンド)に結合し、細胞の応答するきっかけとなるタンパク質。ダイオキシン類の生体影響の多くは、このレセプターと結合することにより引き起こされる
- 4) ルシフェラーゼ遺伝子 Luciferase Gene、生物発光反応を触媒する酵素を発現するホタル由来の遺伝子
- 5) 転写調節領域 ある遺伝子の転写調節に関わる遺伝子上の領域
- 6) XRE Xenobiotics Responsive Element、生体異物応答配列
- 7) 継代培養 Subculture、保存培養から微生物あるいは培養細胞の一部を分けて別の新鮮な培地に植え継ぎ、再び培養したもの
- 8) 発光基質 生物発光反応の基質

第3節 試料採取方法に関する特記事項

1. 試料ガスの採取量

試料ガスの採取量は、次のような手順によって決定する。採取時間については、その目的に応じて試料ガスの発生状況などを十分考慮して代表試料が採取できるようにしなければならない。

- 1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。
- 2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の1/30以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。
- 3) 以下の式によって測定に必要な最小の試料ガスの量を算出する。

$$V = \frac{Q_{DL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、 V : 測定に必要な最小の試料ガスの量(m^3_N)

Q_{DL} : 測定方法の検出下限(pg/ml)

k : 測定量(毒性等量)への換算係数

v : 測定用試料の液量(ml)

V_E : 抽出液量(ml)

V'_E : 抽出液分取量(ml)

C_{DL} : 必要となる試料ガスにおける検出下限($ng-TEQ/m^3_N$)

- 4) 算出された最小の試料ガスの量以上を試料ガスの採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例)5ng-TEQ/ m^3_N レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となる試料ガスにおける検出下限は0.17ng-TEQ/ m^3_N)

抽出液を50mlに定容し、その抽出液から25mlを分取してクリーンアップを行い、最終的に0.07mlの測定用試料溶液に調製する場合の試料ガス採取量を下記に示す。

$$V = \frac{100 \times 0.375 \times 0.07}{1000} \times \frac{50}{25} \times \frac{1}{0.17} = 0.031$$

2. ばいじん及び燃え殻の採取量

ばいじん及び燃え殻試料の採取量は、次のような手順によって決定する。

- 1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。
- 2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の1/30以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。
- 3) 以下の式によって測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量を算出する。

$$W = \frac{Q_{DL} \times k \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、 W : 測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量(g)

Q_{DL} : 測定方法の検出下限(pg/ml)

k : 測定量(毒性等量)への換算係数

v : 測定用試料の液量(ml)

V_E : 抽出液量(ml)

V'_E : 抽出液分取量(ml)

C_{DL} : 必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限(ng-TEQ/g)

- 4) 算出された最小のばいじん及び燃え殻試料の量以上をばいじん及び燃え殻試料の採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例)3ng-TEQ/g レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限は0.1ng-TEQ/g)

抽出液を50mlに定容し、その抽出液全量を用いてクリーンアップを行い、最終的に0.07mlの測定用試料溶液に調製する場合のばいじん及び燃え殻試料の採取量を下記に示す。

$$W = \frac{100 \times 0.872 \times 0.07}{1000} \times \frac{50}{50} \times \frac{1}{0.1} = 0.061$$

4節 試料の前処理

1. 試料の前処理の概要

採取した試料は、抽出を行う。抽出液は必要に応じて分取を行い、クリーンアップに移る。図3-3-2に試料の前処理から測定までのフローの例を示す。

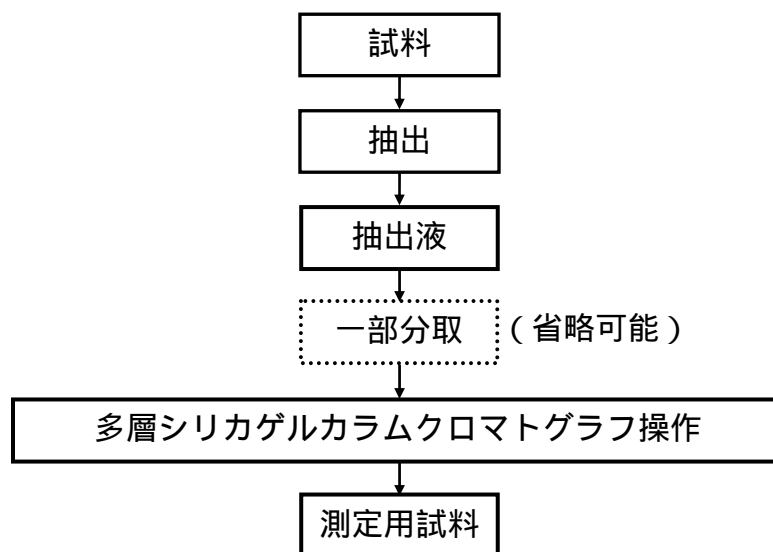


図3-3-2 試料の前処理から測定までのフローの例

2. 試薬

試料の前処理に用いる試薬は、次による。これらの試薬は、空試験などによって測定に支障がないことを確認する。

- 1) 水 JIS K0311 6.2に規定するもの、又は同等な品質のもの
- 2) メタノール JIS K0311 6.2に規定するもの、又は同等な品質のもの
- 3) アセトン JIS K 0311 6.2に規定するもの、又は同等な品質のもの
- 4) トルエン JIS K 0311 6.2に規定するもの、又は同等な品質のもの

- 5) ジクロロメタン JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等な品質のもの
- 6) ヘキサン JIS K 0311 6.2 に規定するもの、又は同等な品質のもの
- 7) ジメチルスルホキシド JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等な品質のもの(注 1)
- 8) 硫酸ナトリウム JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等な品質のもの
- 9) 塩酸 JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等な品質のもの
- 10) 硫酸 JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等な品質のもの
- 11) ヘキサン洗浄水 JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等な品質のもの
- 12) シリカゲル JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等な品質のもの
- 13) 水酸化カリウム(2%質量分率)シリカゲル JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等な品質のもの
- 14) 硫酸(44%質量分率)シリカゲル JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等な品質のもの
- 15) 硝酸銀(10%質量分率)シリカゲル JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等な品質のもの
- 16) アルミナ JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等な品質のもの
- 17) ガラス繊維ろ紙 JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等な品質のもの
- 18) 窒素 JIS K0311 6.2 に規定するもの、又は同等な品質のもの
- 19) 酢酸 JIS K8355 に規定する特級、又は同等の品質のもの
- 20) 無水酢酸 JIS K8886 に規定する特級、又は同等の品質のもの
- 21) テフロンフィルタ 孔径 0.5 μ m のもので、ダイオキシン類の吸着や妨害成分の溶出がないもの
(注 1) ジメチルスルホキシドの品質変動は、測定結果に影響を及ぼすことがあるためロットの変更時等には十分注意する。

3. 器具及び装置

試料の前処理に用いる器具及び装置は、次による。これらの器具及び装置は、空試験などによって測定に支障がないことを確認する。

3.1 ガラス器具

JIS R3503 及び JIS R3505 に規定するもの。コックの部分がふっ素樹脂製のものをを用いてもよい

3.2 ソックスレー抽出器

JIS R 3503 に規定するもの又はこれと同等の品質のもの。接続部にグリースを使用してはならない

3.3 濃縮器

クデルナ-ダニッシュ(KD)濃縮器又はロータリーエバポレータ。接続部にグリースを使用してはならない

3.4 還流抽出器

3.2 のソックスレー抽出器(JIS R3503 付図 71)の抽出塔を外して、代わりに共通すり合わせ直管形連結管(JIS R3503 付図 76)により、共通すり合わせ球管冷却器と共通すり合わせ短首平底フラスコを連結したもの、又は同等のもの

3.5 超音波洗浄器

水槽を約 50 に加温でき、38kHz 前後の超音波を発振できるもの

3.6 マントルヒーター

3.2 のソックスレー抽出器及び 3.4 の還流抽出器を加熱し、還流させることが出来るもの

4. 前処理操作

4.1 試料量の記録

採取した試料は、試料量を記録する。

4.2 抽出

4.2.1 排出ガス

JIS K0311 6.4 又はこれと同等の方法により、抽出を行う。ただし、内標準物質の添加は行わない。

図 3-3-3 に排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

4.2.2 ばいじん及び燃え殻

試料を酢酸に浸して酸処理を行った後、還流抽出器にかけて抽出を行い、硫酸ナトリウムによる脱水後に、濃縮器等で濃縮する。分取して用いる場合はこれを一定量とする。

図 3-3-4 にばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

1) 分析試料採取

試料約 2g を共通すり合わせ短首平底フラスコ等に採取する。水分の多い試料の場合は風乾を行った後に採取することが望ましい。

2) 酢酸処理

酢酸を 10ml 加える。湿りのあるサンプルについては、さらに無水酢酸を 10ml 添加する。その後、超音波洗浄器に 10 分以上かける。

3) 還流抽出

酢酸処理を行った平底フラスコにトルエン 50ml を加え、直管形連結管により、球管冷却器と平底フラスコを連結し、2 時間以上還流抽出を行う。(酢酸処理の酢酸は、還流抽出前に取り出す必要は無く、トルエンを追加してそのまま還流を行うことができる。)

4) 超音波抽出

還流抽出後、超音波洗浄器に約 20 分かける。

5) 脱水ろ過

ガラスロートに石英ウールをいれ、その上に無水硫酸ナトリウムを約 50g 敷き詰め、あらかじめヘキサン 100ml で洗浄した脱水用ロートをセットした 300ml ナスフラスコに試料液を移して脱水ろ過する。トルエンで 3 回、ヘキサンで 3 回洗浄する。

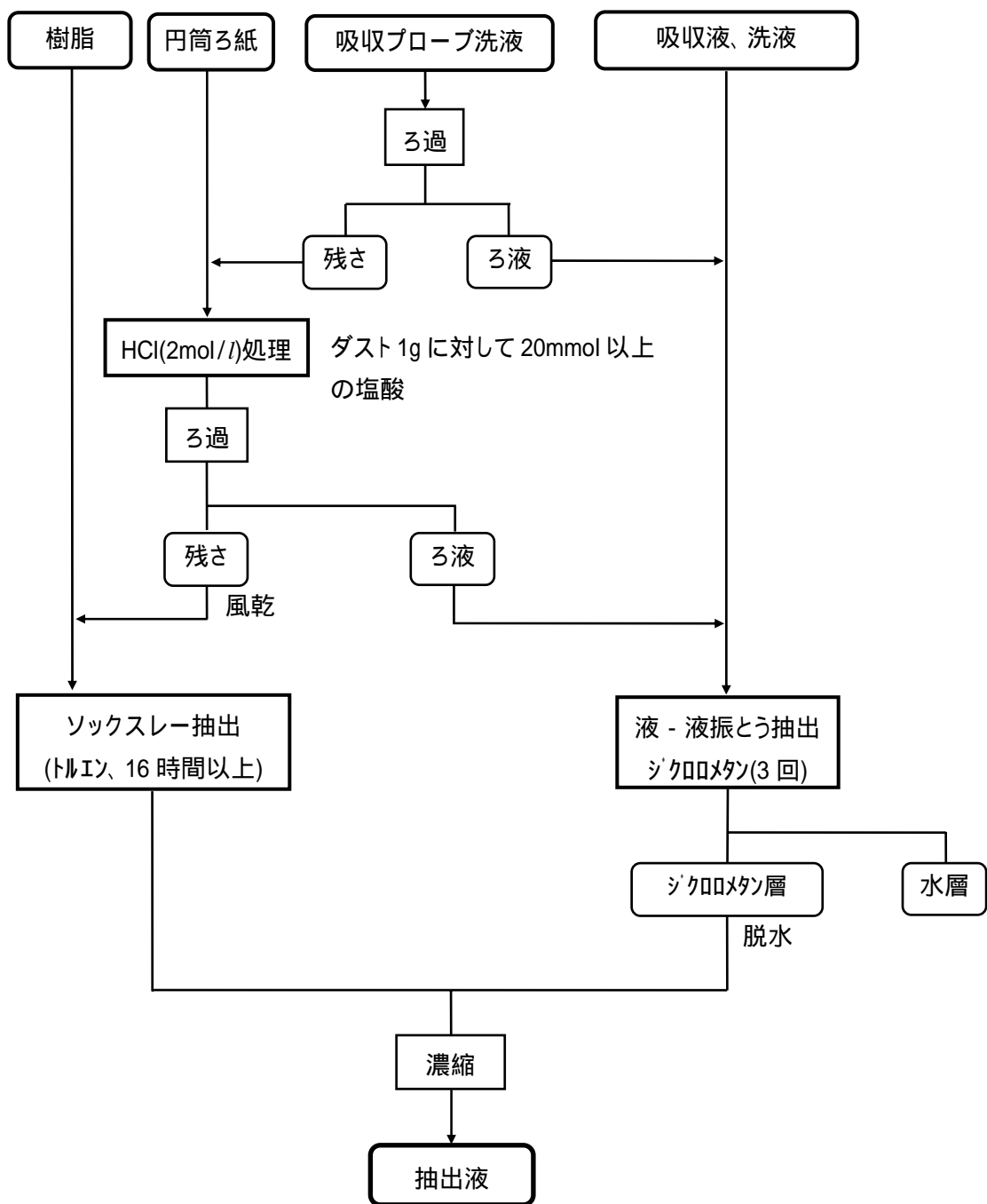


図 3-3-3 排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例

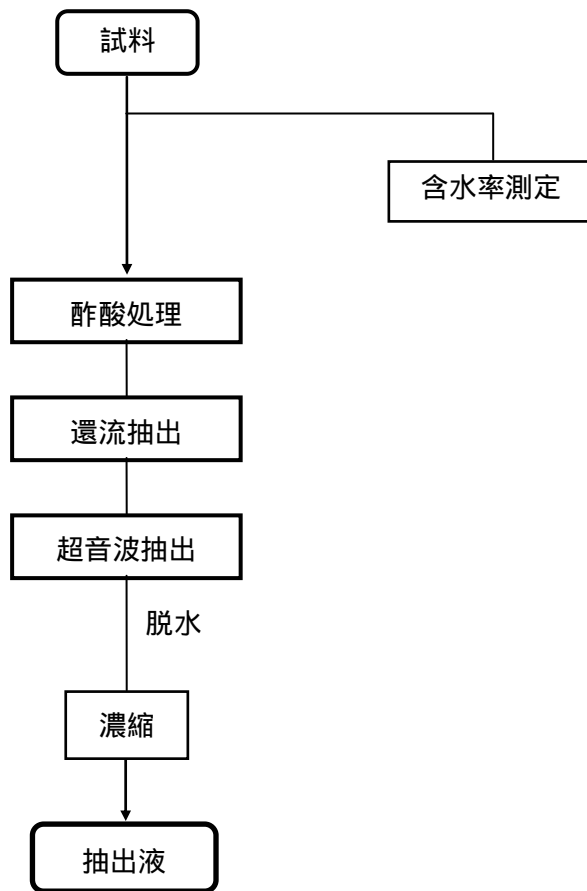


図 3-3-4 ばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例

4.3 クリーンアップ

図 3-3-5 にクリーンアップのフローの例を示す。

4.3.1 抽出液の分取

抽出液を分取して一部を測定に使用する場合には、定容した抽出液から目的に合わせて一部を分取する。

4.3.2 精製カラムの作製

ここに示すカラムは一例であり、クリーンアップの効果が十分に得られ、測定に妨害を及ぼさないものであれば、この通りでなくても良い。

1) 多層シリカゲルカラム

- (1) 石英ウールを詰めたガラスクロマト管(内径 15mm)に、図 3-3-6 に示すように、下から、シリカゲル、硝酸銀シリカゲル、シリカゲル、水酸化ナトリウムシリカゲル、シリカゲルをトルエンでクロマト管に湿式充填により積層する。
- (2) トルエン 50ml を通液し、充填カラムの洗浄を行う。
- (3) ヘキサン 50ml を通液し、カラム内の溶媒をヘキサンに置換する。
- (4) 硫酸(44%質量分率)シリカゲル、シリカゲル、硫酸ナトリウムをヘキサンで湿式充填により積層する。

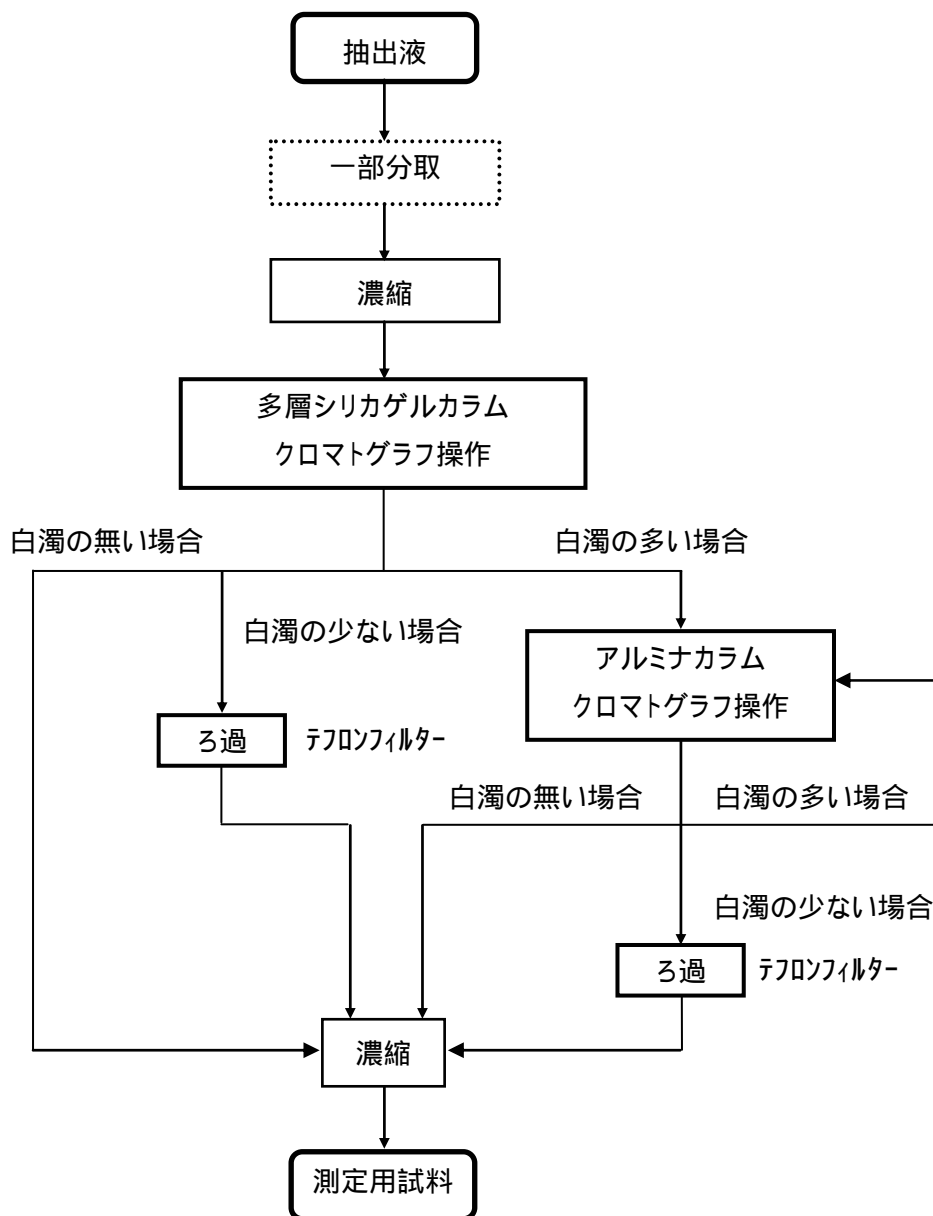


図 3-3-5 クリーンアップのフローの例

(5) ヘキサン 100ml を通液し、充填カラム全体の洗浄を行う。ヘキサンの液面が無水硫酸ナトリウムの上面まで下がったところで通液を止める。

2) アルミナカラム

石英ウールを詰めたガラスクロマト管(内径 10mm)に、アルミナ 10g を湿式充填により充填する。ただし、アルミナカラムは試料の性状によって必要な場合のみ使用するため、必要の都度、作製する。

4.3.3 クリーンアップ操作

クリーンアップは、4.3.2 の 1)多層シリカゲルカラム、2)アルミナカラム、及び孔径 0.5 μ m のテフロンフィルター等を用いて、図 3-3-5 のフローに従って行う。ただし、ここに示すフローは一例であり、クリーンアップの効果が十分に得られ、測定に妨害を及ぼさないものであれば、この通りでなくても良い。

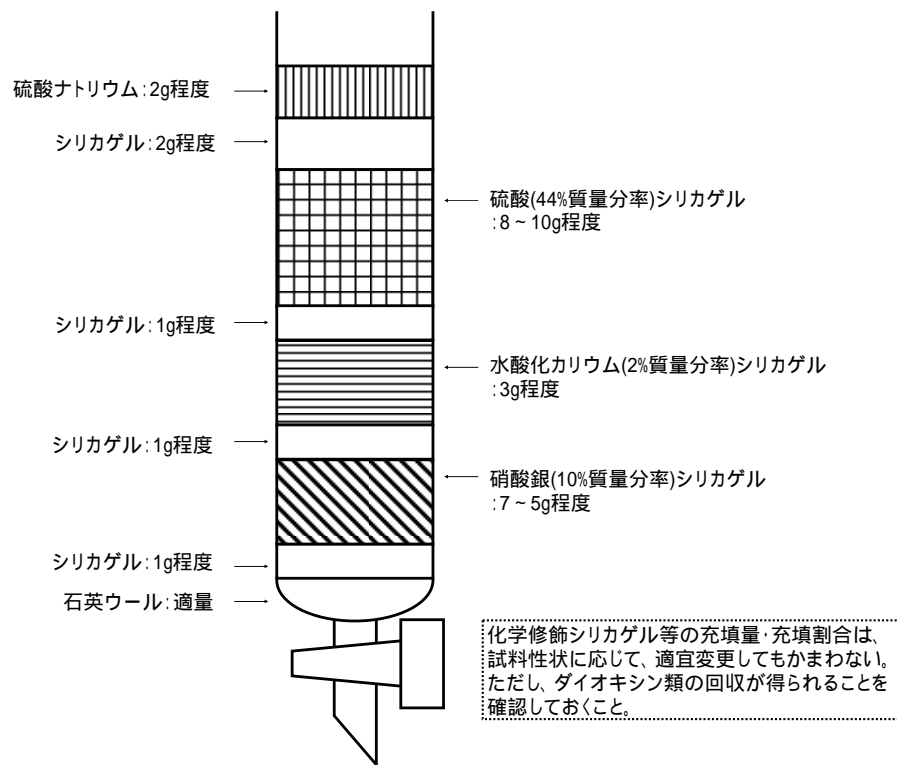


図 3-3-6 多層シリカゲルカラムの例

4.3.4 溶媒置換及び測定用試料の保存

溶媒置換は、トルエン、ヘキサン等の極性の低い溶媒から、DMSO への転溶方法について示すが、ダイオキシン類の損失がなく、生物検定法による測定に妨害を及ぼさない方法であれば、この通りでなくても良い。

溶媒置換はロータリーエバポレータ等の濃縮器を用いて、可能な限り無極性溶媒の量を減じる。

約 50ml のアセトンを加えて再度、濃縮器で濃縮を行う。この操作を 3 回繰り返す。その後、アセトンに、測定用試料として必要な量の DMSO を添加して濃縮する。

濃縮液は、測定用試料の保存に使用する容器にアセトンを用いて洗い込む。アセトンによる洗い込み及び、窒素吹付け等による濃縮を繰り返し、最終的に DMSO のみの溶液に調製する。

測定用試料は、測定するまでの間、室温で暗所に保存する。

第 5 節 測定

1. 測定の概要

マウス肝由来の遺伝子組み換え細胞である HeB5 細胞を用いて、試料中に含まれるダイオキシン類が細胞内の Ah 受容体と結合することによって発現するルシフェラーゼの活性に基づく発光を発光光度計(ルミノメーター)で測定することにより、ダイオキシン類の定量を行う。

2,3,7,8-TeCDD により検量線を作成し、試料の発光量(RLU)から実測濃度を算出する。排出ガス、ばいじん及び燃え殻について定められた換算係数を実測濃度に乘じることにより、測定量(毒性等量)を算出する。

2. 試薬、器具及び装置

2.1 使用細胞

ダイオキシン類応答性組換え細胞 HeB5：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 × 5-bsd を、マウス肝由来 Hepa-1 細胞に導入したものの

2.2 試薬

測定に用いる試薬は、次による。

- 1) 培地 MEM、NaHCO₃(特級)
- 2) 血清 牛胎児血清
- 3) 洗浄用緩衝液 PBS(-)
- 4) 細胞分散用試薬 0.25%トリプシン / 1mM EDTA 溶液
- 5) 選択試薬 プラストサイジン S(Bsd)
- 6) 細胞凍結保存液
- 7) 発光基質 ルシフェリン及び組成物
- 8) 細胞溶解剤 ホタルルシフェラーゼによる発光が測定可能なもの
- 9) 標準溶液 2,3,7,8-TeCDD、50 µg/ml DMSO 溶液
- 10) 試料溶媒 DMSO(生化学用)
- 11) 水 超純水

2.3 器具及び装置

測定に用いる器具及び装置は、以下による。

- 1) 細胞培養用プレート 100mm 培養シャーレ(ペトリ皿)
- 2) 培養 / アッセイ用プレート 96 ウェルプレート
- 3) ピペット 滅菌ピペット 10ml、25ml など
- 4) 滅菌用フィルター 0.22 µm
- 5) マイクロピペット及びマルチチャンネルピペット用チップ類 200 µl、1000 µl、1200 µl など
- 6) 細胞凍結保存用チューブ
- 7) 血球計算盤
- 8) 96 ウェルディープウェルプレート ポリプロピレン製、試料を培地に添加・混合するのに用いる
- 9) リザーバー 細胞懸濁液の調製、分注に用いる
- 10) マルチチャンネル(8ch 又は 12ch)ピペッター 電動又はマニュアル
- 11) マイクロピペット
- 12) 電動ピペッター
- 13) CO₂ インキュベーター 37 恒温、飽和湿度、5% CO₂ 濃度
- 14) 安全キャビネット クラス B
- 15) オートクレーブ
- 16) 培養用倒立位相差顕微鏡
- 17) ルミノメーター マルチウェル発光プレートリーダー
- 18) ディープフリーザー(-80)

- 19) 液体窒素保存容器(細胞保存用)
- 20) 培地吸引装置(吸引ポンプ、トラップ、チューブなど一式)
- 21) 吸引装置(アスピレーター)

3. 細胞の取り扱い

3.1 培養細胞の立ち上げ

3.1.1 培地の調製

粉末 MEM培地(1l 分)を超純水に溶解した後、NaHCO₃を 2.2g 添加・溶解し(黄色透明 赤色透明)、超純水で 1l 容とする。これを滅菌用フィルターで減圧濾過し、この無血清培地 500ml に対し、50ml の FBS を混合し、10%血清入り培地とする。培地の容器を開放する(フィルターを取り外す、又は蓋を開ける)などの無菌操作が必要な場合は安全キャビネット内で行う。安全キャビネット内に物品及び手を入れる際、約 80%エタノールのスプレーで消毒する。

ブラストサイジン S(Bsd)含有培地は以下のように調製する。Bsd が粉末の場合はまず PBS(-)に溶解し、0.22 μm のフィルターでろ過滅菌する。滅菌済み Bsd 溶液は適当量(目安として 2mg/ml の濃度で 4ml ずつ)小分けし凍結保存しておくが良い。この Bsd 溶液を上記 10%血清入り培地の Bsd の終濃度が 16 μg/ml となるように添加・混合する。

3.1.2 細胞の立ち上げ

冷蔵庫に保管している Bsd 含有 / 10%血清入り培地を、37 恒温水槽であらかじめ温めておく。前記培地を 100mm の培養シャーレに 10ml 注ぐ。液体窒素又はディープフリーザーで保存した細胞入り保存チューブを取り出し、直ちに 37 恒温水槽でチューブを振りながら融解する(1~2 分程度)。保存チューブの外側を 80%エタノール噴霧により消毒し、融解した細胞懸濁液を培地入り 100mm 培養シャーレに注ぐ。凍結塊が残っている状態で培地を少量添加し、融解・懸濁させて培養シャーレに注いでも良い。培養シャーレを縦及び横方向に数回ゆすって細胞を拡散させた後、この培養シャーレを炭酸ガスインキュベーターに入れて培養する。培養条件は、5%CO₂、37、飽和湿度に設定する。

3.2 細胞の継代

通常、細胞が培養シャーレの底面一杯を覆うまで増殖する前に細胞を継代する。使用する培地及び PBS(-)をあらかじめ 37 恒温水槽で温めておく。培養シャーレを CO₂ インキュベーターから取り出し、80%エタノールを噴霧して消毒後、安全キャビネット内に入れる。培養シャーレに付着しているエタノール液をふき取っておく。片手で培養シャーレを持ち、蓋を開け(全開にはしない)、先にチップ(200 μl)を装着したアスピレーター等で培地を吸引除去する。次に PBS(-)をピペットで 5ml 程度、培養シャーレの側面に液を当てながら注入する。培養シャーレを傾けるなどにより PBS(-)が培養シャーレの底面全体に行き渡るようにする。洗浄済みの PBS(-)を吸引除去する。トリプシン / EDTA 溶液を培養シャーレの側面から 1~2ml 程度注ぎ、培養シャーレを傾けて底面全体に液が行き渡るようにする。トリプシン / EDTA 溶液を吸引除去し、培養シャーレを室温で 5~10 分程度静置する。培養用倒立位相差顕微鏡で細胞が底面から剥がれそうになっていること、及び細胞が互いに分離していることを確認したら、培養シャーレの底を手で軽く叩き、細胞を底面から剥離させる。安全キャビネット内で、剥がれた細胞に培地(通常 Bsd 不含 / 10%血清培地)を 10ml 程度加え、ピペットによる吸引・吐出を繰り返し細胞を分離させる。あらかじめ 10ml の Bsd 含有 / 10%血清培地を注いだ培養シャーレに、細胞懸濁液の一部(通常 0.3~0.5ml 程度、目的に応じて増減させる)を注ぎ、培養シャーレを縦及び横方向に数回ゆすって細胞を拡散させ

る。培養シャーレを炭酸ガスインキュベーターに入れて培養する。

3.3 試験使用細胞の保存

3.2 の記載方法に従って細胞懸濁液を調製後、細胞懸濁液を遠心チューブに移して低速(～1000rpm)で2～5分間遠心する。培地を除去した後、細胞ペレットに細胞凍結保存液を加え、ピペティングによって穏やかに懸濁させる。懸濁液の濃度は目安として $2 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells/ml とする。凍結保存用チューブに 0.5～1ml/チューブの割合で細胞保存懸濁液を分注し、ディープフリーザーにて凍結させる(-20～-30 のフリーザーで凍結後、ディープフリーザーに移しても良い)。ディープフリーザーにて凍結後、適宜、凍結保存用チューブを液体窒素保存容器に移して保管する。

4. 測定操作

4.1 細胞の96ウェルプレートへの播種

3.2 の記載方法に従って細胞を剥離し、10%血清培地(Bsd 不含)により細胞懸濁液を調製する。細胞懸濁液の一部を血球計数盤に採取し、位相差顕微鏡で細胞数を計測する。細胞の数え方は血球計数盤の使用方法に従う。

細胞懸濁液を10%血清培地(Bsd 不含)で適宜希釈し、10,000～20,000(通常15,000)cells/100 μ l 濃度に調整する。希釈細胞懸濁液をリザーバーに注ぎ、8ch 電動ピペッターなどで96ウェルプレートに100 μ l/well の割合で分注する。この間、細胞懸濁液がなるべく均一になるよう、混合・攪拌に努める。細胞を播種した96ウェルプレートを炭酸ガスインキュベーターに入れ、培養する。

4.2 曝露

前処理の後、DMSO 溶液とした試料は、適宜、DMSO により希釈する。TEQ 濃度が全く未知の試料の場合、1例として、原液、20倍希釈液、400倍希釈液、及び8000倍希釈液の4水準濃度の測定を行う(表3-3-1)。必要に応じて更に希釈を行う。希釈にはガラス容器(ガラスバイアル)を用いる。

表 3-3-1 試料の希釈例

	希釈元(μ l)	DMSO(μ l)
20倍	原液 10	190
400倍	20倍希釈液 10	190
8000倍	400倍希釈液 10	190

試料のほかに、必ず検量線作成のための標準溶液を用意する。1例として、0(DMSO)、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、10、20、50、100pg/ μ l 濃度の2,3,7,8-TeCDDのDMSO溶液を調製する。希釈元には市販の2,3,7,8-TeCDDのDMSO溶液が利用できる。

上述各調製DMSO溶液を10%血清培地(Bsd 不含)に添加する。例として、あらかじめ37の恒温槽で温めた10%血清培地(Bsd 不含)をリザーバーに注ぎ、96ウェルディープウェルプレートに8ch電動ピペッターを用いて990 μ l/well 分注する。これに上で調製した試料のDMSO溶液を10 μ l/well 添加する。一連(例えば、96ウェルプレートの1枚分)の試料添加が終了したら、8ch電動ピペッターで試料添加済み培地を、吸引、吐出の繰り返しにより混合した後、4.1で播種し1日(約24時間)培養した96ウェルプレートに100 μ l/well の割合で添加する(DMSO溶液ベースでは1 μ l/well ; DMSOの終濃度は0.5%体積分

率)。96 ウェルプレート上での試料の配置例を図 3-3-7 示す。通常 4 ウェルの平均値をとることとし、4 ウェルずつに試料を添加する。試料の添加後、96 ウェルプレートが炭酸ガスインキュベーターに戻し、培養を続ける。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		DMSO	試料 1-1	試料 2-1	試料 3-1	試料 4-1	試料 5-1	試料 6-1	試料 7-1	試料 8-1	試料 9-1	試料 10-1
B		DMSO	試料 1-2	試料 2-2	試料 3-2	試料 4-2	試料 5-2	試料 6-2	試料 7-2	試料 8-2	試料 9-2	試料 10-2
C		DMSO	試料 1-3	試料 2-3	試料 3-3	試料 4-3	試料 5-3	試料 6-3	試料 7-3	試料 8-3	試料 9-3	試料 10-3
D		DMSO	試料 1-4	試料 2-4	試料 3-4	試料 4-4	試料 5-4	試料 6-4	試料 7-4	試料 8-4	試料 9-4	試料 10-4
E	試料 11-1	試料 12-1	試料 13-1	試料 14-1	試料 15-1	試料 16-1	試料 17-1	試料 18-1	試料 19-1	試料 20-1	試料 21-1	Std.100
F	試料 11-2	試料 12-2	試料 13-2	試料 14-2	試料 15-2	試料 16-2	試料 17-2	試料 18-2	試料 19-2	試料 20-2	試料 21-2	Std.100
G	試料 11-3	試料 12-3	試料 13-3	試料 14-3	試料 15-3	試料 16-3	試料 17-3	試料 18-3	試料 19-3	試料 20-3	試料 21-3	Std.100
H	試料 11-4	試料 12-4	試料 13-4	試料 14-4	試料 15-4	試料 16-4	試料 17-4	試料 18-4	試料 19-4	試料 20-4	試料 21-4	Std.100

図 3-3-7 96 ウェルプレート上での試料の配置例

4.3 ルシフェラーゼ活性の測定

以下に、培地を除去後、細胞を溶解してから発光基質を添加する方法(ノン・ホモジニアスアッセイ)について記す。試料添加の 20~24 時間後に、96 ウェルプレートから培地を吸引除去する。続いて、PBS(-)(非滅菌)を 8ch 電動ピペッターで 80~100 μ l/well 添加し、96 ウェルプレートを緩やかに傾け(回して)ウェル内を洗浄する(細胞が剥がれないように注意)。PBS(-)を吸引除去し、再び PBS(-)を 80~100 μ l/well の割合で添加する。同様にウェル内を洗浄後、PBS(-)を吸引除去する。別途作製した細胞溶解剤(通常 5 倍濃度のものを超純水で 5 倍希釈する)を 15 μ l/well 添加する。96 ウェルプレートを傾けてウェル底面全体に溶解剤が行き渡るようにする。時々、96 ウェルプレートを傾けながら、室温で 30 分間細胞を溶解する。細胞が溶解していることを確認後(細胞の溶解後の組織片の目視、あるいは顕微鏡観察)、96 ウェルプレートをラップで包み、冷凍庫に保管する。96 ウェルプレートが複数の場合は前の 96 ウェルプレートの細胞溶解中に培地の除去・洗浄等の作業を行ってよい。

凍結保存した 96 ウェルプレートを取り出し、室温で融解する。融解後は 96 ウェルプレートを傾けて底面全体に液を行き渡らせ、また、ミキサーで攪拌する。室温においてから約 15 分後に 96 ウェルフォーマットのルミノメーターに 96 ウェルプレートをセットする。ルミノメーターのパラメーターは機器付属マニュアルを参照して設定する。表計算ソフトにて、測定結果のデータ処理を行う。

5. 定量

5.1 検量線の作成

測定した RLU に関し、4 ウェルの平均値及び標準偏差(s_i)を求める。

2,3,7,8-TeCDD の各濃度に対応する平均 RLU から、DMSO コントロール(0)の平均 RLU を差し引いて、総 RLU を求める。

0 濃度を除き、各 s_i^{-2} を求め、その総和 $\sum_i s_i^{-2}$ を算出する。

次に各 RLU の重み $w_i = s_i^{-2} / \sum_i (s_i^{-2} / n)$ を求める。

ロジスティック曲線の一般式 $y = \frac{1}{1 + e^{-x}} + \dots$ (式) を基にし、

表計算ソフトで変数 、 、 、 及び パラメータのセルを設定する(図 3-3-8)。

図 3-3-7 の y の予測値の欄に式 を入力する。ただし、濃度 X は常用対数 log(x)を用いる。次に試料の RLU y と y の予測値の差の平方(残差平方)を求める(式を入力)。次いで、各残差平方に対応する重み w_i を乗じた重み付き残差平方を求める(式を入力)。この重み付き残差平方和が最小となるように変数 、 、 及び を算出する。

$y = \frac{1}{1 + \text{EXP}(- \text{LOG}(x))} +$

	1146397
	61.56395
	4.193491
	49.45624

x	y	y の予測値	残差平方	差平方*重	重み付き xの 予測値
0.1	300	330.4472	957.7276	5665.388	0.09
0.2	1056	1041.798	208.8485	1586.834	0.20
0.4	3834	3548.495	81370.51	20497.92	0.42
0.6	7253	7347.423	8962.979	1159.665	0.60
0.8	13231	12319.38	831056	47628.06	0.83
1	17406	18373.06	935203.3	16750.81	1.0
2	61390	62280.63	794114.9	23070.52	2.0
3	115216	122986.4	60382604	21451.29	2.9
4	206752	193370.3	1.79E+08	48360.85	4.2
5	297094	267671.7	8.66E+08	137042.4	5.4
10	584850	594278.9	88914100	8186.252	10
20	902674	907761.1	25881251	374.061	20
50	1102555	1092312	1.05E+08	3058.57	56
100	1125886	1130591	22132587	1171.101	87

残差平方和 1.33E+09 3.36E+05 最小二乗法計算セル

図 3-3-8 表計算ソフトを用いたロジスティック曲線近似式による予測の例

5.2 測定試料の定量

通常、試料の RLU から、並行処理している操作ブランクの RLU を差し引いた総 RLU を求める。この総 RLU を 5.1 で求めた近似式に代入し、実測濃度を算出する。希釈試料の複数の水準が定量範囲に収まった場合、希釈倍率の高い方の RLU を採用する。

求めた濃度 X (ng/ml) から以下の式によって試料量あたりの実測濃度を求める。

$$\text{濃度 } X \text{ の求め方 : } X = 10^{-\frac{1}{y-1} \ln\left(\frac{1}{y}\right)}$$

1) 排出ガス

$$C_s = X \times n \times v \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{V}$$

ここに、 C_s : 排出ガス中の実測濃度 (ng/m³_N)

X : 希釈試料中実測濃度 (ng/ml)

n : 希釈倍率

v : 測定用試料の液量 (ml)

V_E : 抽出液量 (ml)

V'_E : 抽出液分取量 (ml)

V : 試料ガスの採取量 (m³_N)

(備考) 排出ガスの酸素濃度による補正が必要な場合には、次式によって所定の酸素濃度に換算する。

$$C = \frac{21 - O_n}{21 - O_s} \times C_s$$

ここに、 C : 酸素の濃度 O_n における実測濃度 (ng/m³_N)

O_n : 換算する酸素の濃度 (%)

O_s : 排出ガス中の酸素の濃度 (注 2) (%)

C_s : 排出ガス中の実測濃度 (ng/m³_N)

(注 2) 排出ガス中の酸素の濃度が 20% を超える場合は、 $O_s=20$ とする。

2) ばいじん及び燃え殻

$$C_w = X \times n \times v \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{W}$$

ここに、 C_w : ばいじん及び燃え殻中の実測濃度 (ng/g)

X : 希釈試料中実測濃度 (ng/ml)

n : 希釈倍率

v : 測定用試料の液量 (ml)

V_E : 抽出液量 (ml)

V'_E : 抽出液分取量 (ml)

W : ばいじん及び燃え殻の採取量 (g)

6 . 検出下限及び定量下限

6.1 標準品についての検出下限及び定量下限

溶媒 (DMSO) コントロールの RLU の標準偏差 (s) の 3 倍 (3s) に相当する 2,3,7,8-TeCDD 標準液の濃度を検出下限とし、10 倍 (10s) に相当する 2,3,7,8-TeCDD 標準液の濃度を定量下限とする。

6.2 試料についての検出下限及び定量下限

試料についての検出下限及び定量下限は、図 3-3-9 に示すように、近似式が切片を持たない(試料のバックグラウンドによる影響が無視できる)ことから、前記標準品についての検出下限及び定量下限から試料量当たりの実測濃度を計算によって求める。

7 . 測定量(毒性等量)への換算

図 3-3-9 に、生物検定法によって測定された濃度の HRGC/HRMS 法によって求めた濃度に対する相関グラフを示す。現時点で相関グラフより近似式を求めた結果、排出ガスの場合 $y=0.375x$ 、ばいじん・及び燃え殻の場合 $y=0.872x$ となっている。従って、生物検定法で求めた実測濃度($\text{ng}/\text{m}^3_{\text{N}}$ あるいは ng/g)を、排出ガスの場合、換算係数 0.375、ばいじん及び燃え殻の場合、換算係数 0.872 を乗じて測定量(毒性等量)を求める。なお、測定結果の報告様式については、第 2 章第 2 節「測定結果の報告」を参照すること。

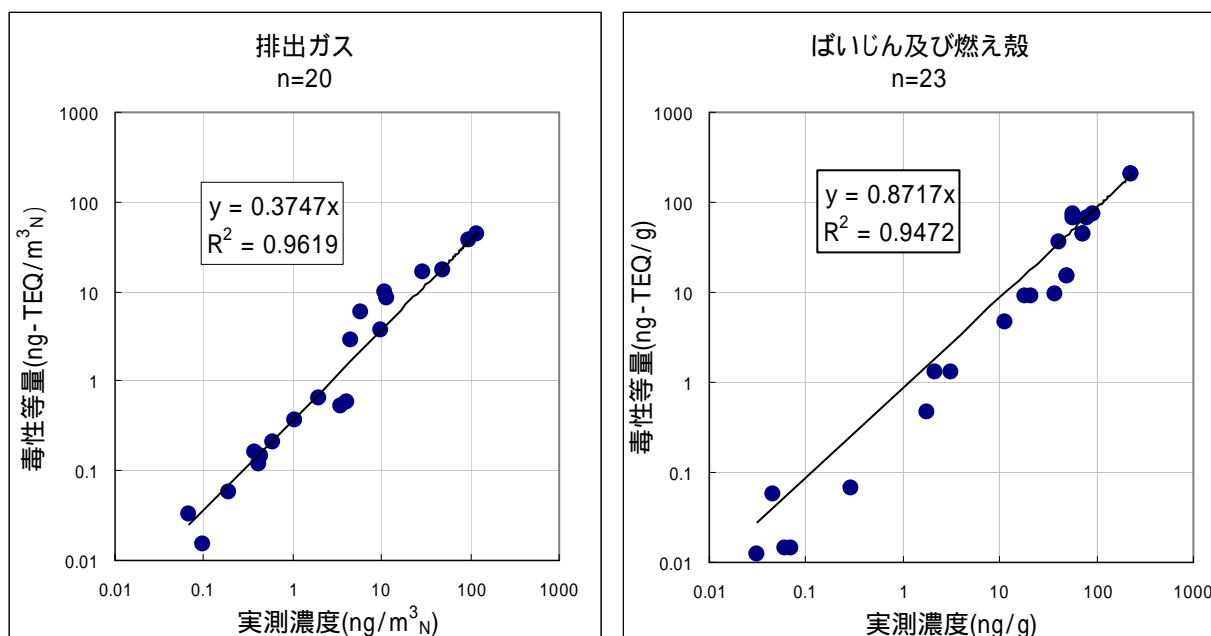


図 3-3-9 生物検定法による実測濃度と HRGC/HRMS 法による毒性等量の相関(例)
(排出ガス、ばいじん及び燃え殻)

第4章 各論(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量を測定する方法(環境省平成17年告示第92号第2)

第1節 測定方法の概要

対象媒体ごとに試料を採取し、ダイオキシン類を抽出後、クリーンアップを行い、抗原固相化-酵素免疫反応を用いた測定により定量する。測定方法のフローを図4-1-1に示す。

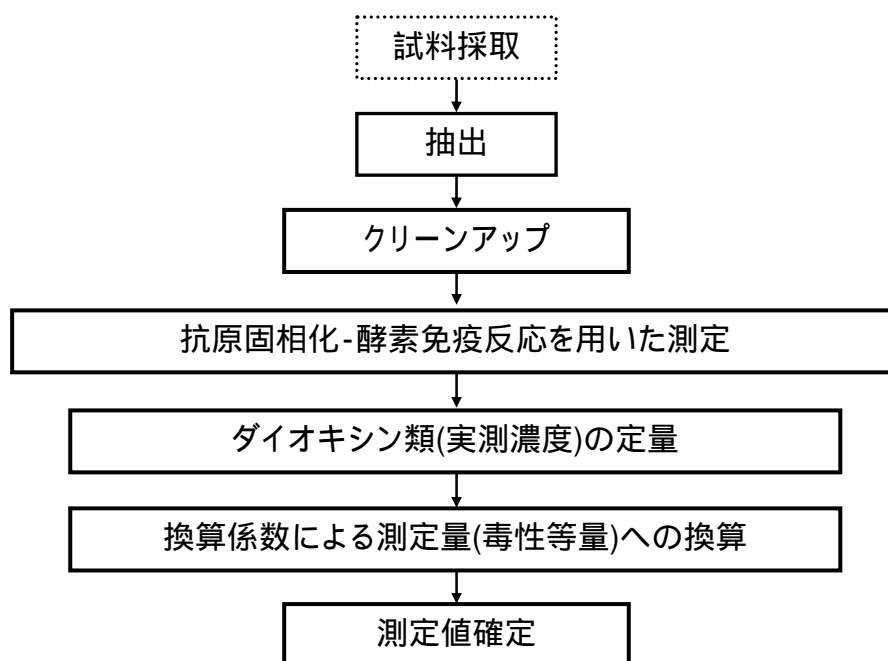


図4-1-1 測定方法のフロー

第2節 用語の定義

- 1) 抗ダイオキシン類抗体 免疫反応によって脊椎動物に産生される抗体(タンパク質)を、マウス由来の融合細胞(ハイブリドーマ)を用いて取得したもので、ダイオキシン類と特異的に反応する性質を有する。
- 2) 一次抗体溶液 抗ダイオキシン類抗体を緩衝液中に溶解させたもの
- 3) 二次抗体溶液 マウス由来の抗ダイオキシン類抗体と特異的に反応するヤギ由来の酵素標識されたポリクローナル抗体を緩衝液に溶解したもの
- 4) 一次免疫反応 抗ダイオキシン類抗体と抗原(ダイオキシン類)との反応
- 5) 二次免疫反応 固相プレート上の擬似抗原に結合した抗ダイオキシン類抗体と二次抗体との反応

第3節 試料採取方法に関する特記事項

1. 試料ガスの採取量

試料ガスの採取量は、次のような手順によって決定する。採取時間については、その目的に応じて試

料ガスの発生状況などを十分考慮して代表試料が採取できるようにしなければならない。

- 1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。
- 2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。
- 3) 以下の式によって測定に必要な最小の試料ガスの量を算出する。

$$V = \frac{Q_{DL} \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、 V : 測定に必要な最小の試料ガスの量(0、101.32kPa)(m^3)

Q_{DL} : 測定方法の検出下限(pg-TEQ/ ml)

v : 測定用試料の液量(ml)

V_E : 抽出液量(ml)

V'_E : 抽出液分取量(ml)

C_{DL} : 必要となる試料ガスにおける検出下限(0、101.32kPa)(ng-TEQ/ m^3)

- 4) 算出された最小の試料ガスの量以上を試料ガスの採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例)5ng-TEQ/ m^3_N レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となる試料ガスにおける検出下限は0.17ng-TEQ/ m^3_N)

抽出液を 20 ml に定容し、その抽出液から 10 ml を分取してクリーンアップを行い、最終的に 1 ml の DMSO 溶液に調製する場合の試料ガス採取量を下記に示す。

$$V = \frac{10 \times 1}{1000} \times \frac{20}{10} \times \frac{1}{0.17} = 0.12$$

2. ばいじん及び燃え殻の採取量

ばいじん及び燃え殻試料の採取量は、次のような手順によって決定する。

- 1) 評価しなければならない最小の濃度を決定する。
- 2) 特に指定がない限り、1)で決定した濃度の 1/30 以下に試料ガスにおける検出下限を設定する。
- 3) 以下の式によって測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量を算出する。

$$W = \frac{Q_{DL} \times v}{1000} \times \frac{V_E}{V'_E} \times \frac{1}{C_{DL}}$$

ここに、 W : 測定に必要な最小のばいじん及び燃え殻試料の量(g)

Q_{DL} : 測定方法の検出下限(pg-TEQ/ ml)

v : 測定用試料の液量(ml)

V_E : 抽出液量(ml)

V'_E : 抽出液分取量(ml)

C_{DL} : 必要となるばいじん及び燃え殻試料における検出下限(ng-TEQ/ g)

- 4) 算出された最小のばいじん及び燃え殻試料の量以上をばいじん及び燃え殻試料の採取量とする。ただし、試料の代表性及び均一性を確保するように配慮しなければならない。

(例)3ng-TEQ/ g レベルのダイオキシン類濃度を測定する場合(必要となる試料における検出下限は

0.1ng-TEQ/g)

抽出液を 20ml に定容し、その抽出液から 10ml を分取してクリーンアップを行い、最終的に 1ml の DMSO 溶液に調製する場合のばいじん及び燃え殻試料の採取量を下記に示す。

$$W = \frac{3 \times 1}{1000} \times \frac{20}{10} \times \frac{1}{0.1} = 0.060$$

第4節 試料の前処理

1. 試料の前処理の概要

採取した試料は、抽出を行う。抽出液は必要に応じて分取を行い、クリーンアップに移る。図 4-1-2 に試料の前処理から測定までのフローの例を示す。

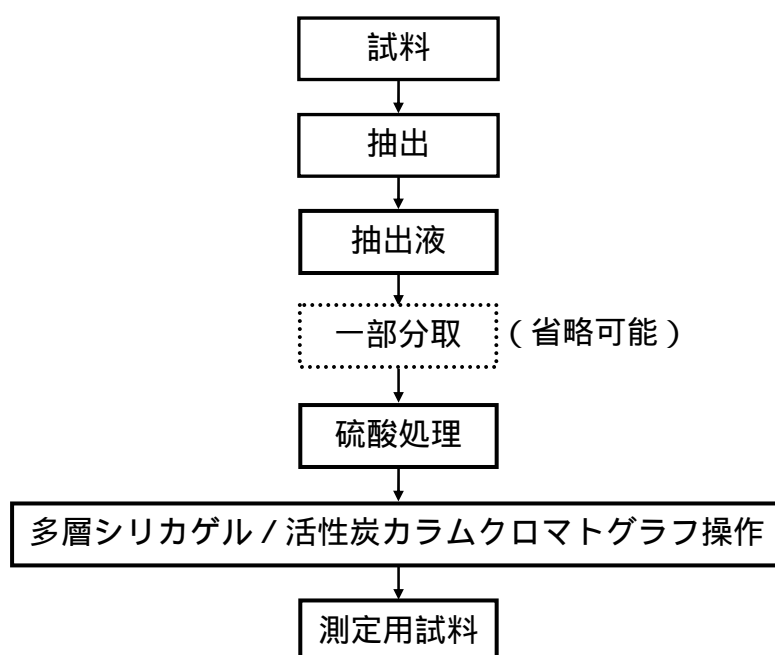


図 4-1-2 試料の前処理から測定までのフローの例

2. 試薬

試料の前処理に用いる試薬は、次による。これらの試薬は、空試験などによって測定に支障がないことを確認する。

- 1) 水 JIS K0557 に規定する A4(又は A3)の水
- 2) アセトン JIS K8040 に規定するもの、又は同等の品質のもの
- 3) トルエン JIS K8680 に規定するもの、又は同等の品質のもの
- 4) ジクロロメタン JIS K8117 に規定するもの、又は同等の品質のもの
- 5) ヘキサン JIS K8825 に規定するもの、又は同等の品質のもの
- 6) ジメチルスルホキシド(DMSO) JIS K9702 に規定するもの、又は同等の品質のもの
- 7) 硫酸ナトリウム JIS K8987 に規定するもの、又は同等の品質のもの
- 8) 硫酸 JIS K8951 に規定するもの、又は同等の品質のもの
- 9) 多層シリカゲルカラム JIS K0311 に規定されたシリカゲル類と同等の分離性能を有するもの

- 10) 活性炭カラム ダイオキシン類のクリーンアップ用として市販されているものの中で、本法に適用して良好な結果が得られることが確認されているもの(リバーシブルカーボンカラム、又はそれと同等以上の性能を有するもの)
- 11) 円筒ろ紙 ソックスレー抽出に用いる。ガラス製又は石英製で、必要量の風乾した試料が入るサイズのもの。使用に先立ってアセトン洗浄し、さらにトルエン等でソックスレー抽出を行うか、又は 450 ℃ 以上で 4 時間以上加熱処理して用いるとよい
- 12) 窒素 JIS K1107 に規定する高純度窒素 2 級

3. 器具及び装置

試料の前処理に用いる器具及び装置は、次による。これらの器具及び装置は、空試験などによって測定に支障がないことを確認する。

3.1 ガラス器具

JIS R3503 及び JIS R3505 に規定するもの。コックの部分がふっ素樹脂製のものをを用いてもよい

3.2 ソックスレー抽出器

JIS R 3503 に規定するもの又はこれと同等の品質のもの。接続部にグリースを使用してはならない

3.3 濃縮器

クデルナ-ダニッシュ(KD)濃縮器又はロータリーエバポレータ。接続部にグリースを使用してはならない

3.4 その他

吸引ポンプ、最高使用圧力が 0.25MPa の真空ポンプ、又は同等の性能を有するもの

4. 前処理操作

4.1 試料量の記録

採取した試料は、試料量を記録する。

4.2 抽出

1) 排出ガス

JIS K0311 6.4 又はこれと同等の方法により、抽出を行う。ただし、内標準物質の添加は行わない。図 4-1-3 に排出ガス試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

2) ばいじん及び燃え殻

厚生省平成 4 年告示第 192 号別表第一(第一号関係)(2)又はこれと同等の方法により抽出を行う。ただし、内標準物質の添加の操作は行わない。図 4-1-4 にばいじん及び燃え殻試料の抽出液調製までのフローの例を示す。

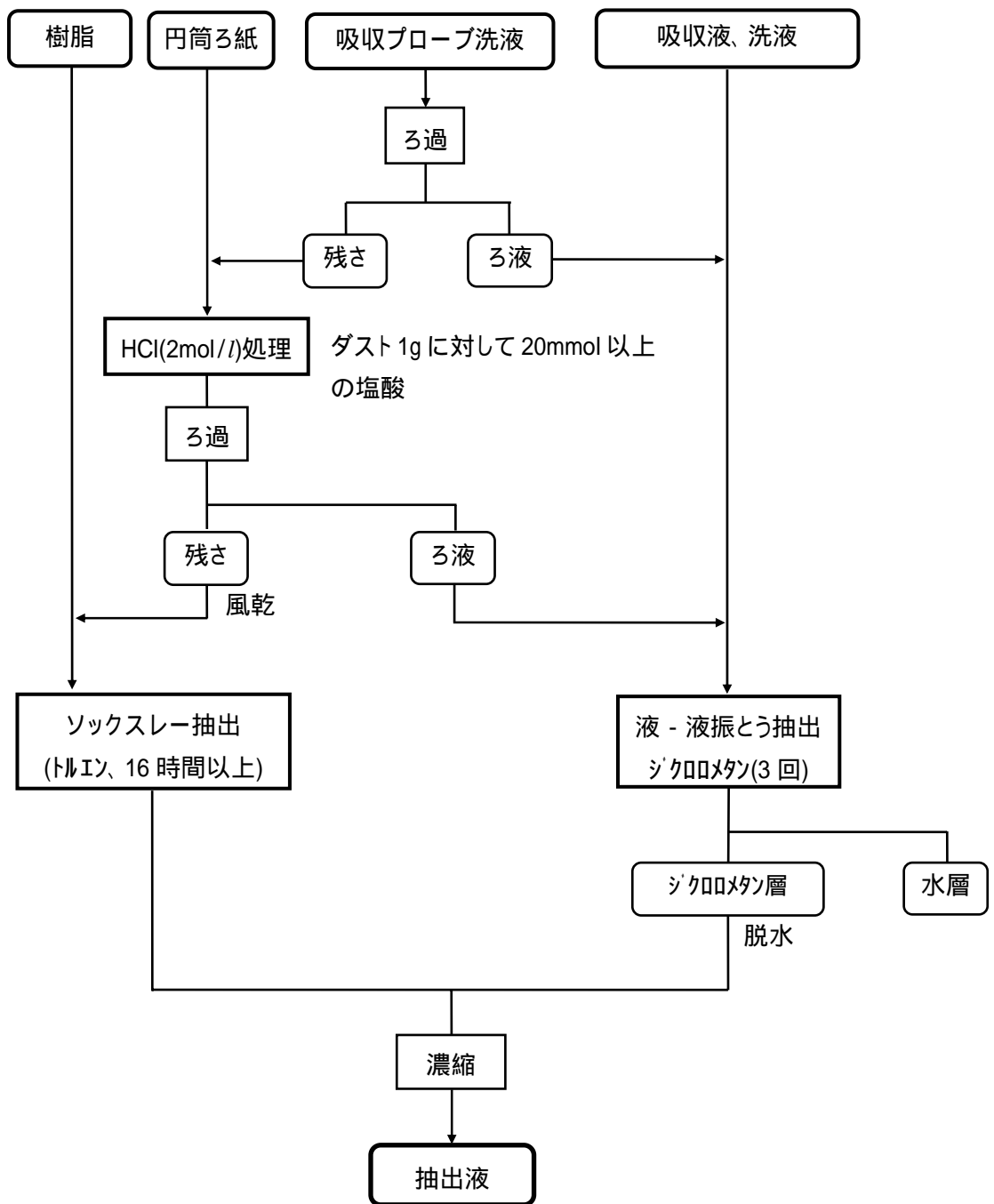


図 4-1-3 排出ガス試料の抽出液調製フローの例

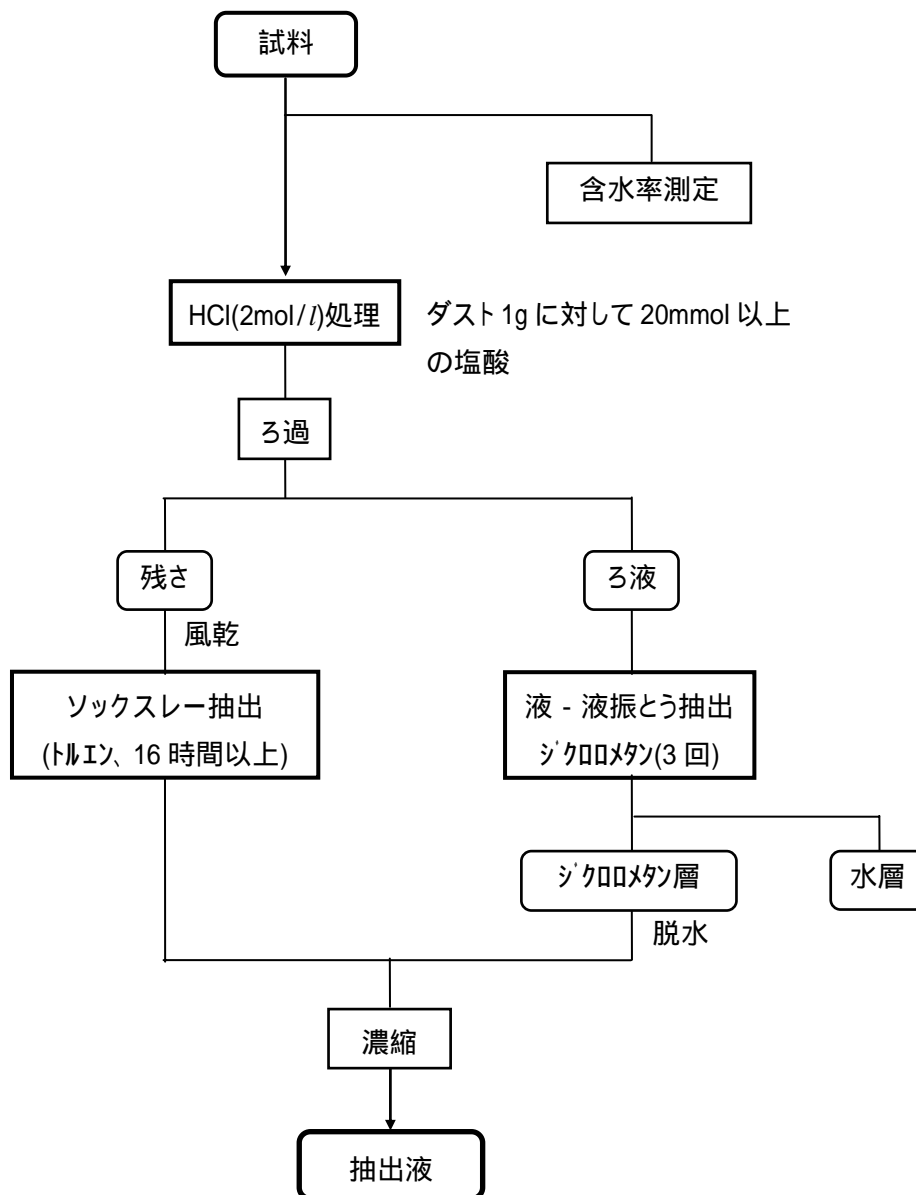


図 4-1-4 燃え殻・ばいじん試料の抽出液調製フローの例

4.3 クリーンアップ

1) 抽出液の分取

抽出液を濃縮し、溶媒を加えて 20ml に定容する。採取した試料の量及び試料中の予想されるダイオキシン類濃度から下式を用いて分取量を算出する。最終的に DMSO 溶液中のダイオキシン類濃度が 20 ~ 1000pg-TEQ/ml の範囲内となるように分取量を決定する。

$$V'_E = C_1 \times v \times V_E \times \frac{1}{C_2 \times x \times 1000}$$

ここに、 V'_E : 抽出液分取量(ml)

C_1 : キット測定用試料(DMSO 溶液)中のダイオキシン類濃度
(20 ~ 1000pg-TEQ/ml の範囲内が望ましい)

v : キット測定用試料(DMSO 溶液)の液量(ml)

V_E : 抽出液量(ml)

C_2 : 試料中の予想ダイオキシン類濃度(ng-TEQ/g 又は ng-TEQ/m³)

x : 試料採取量(g 又は m³)

(例)ダイオキシン類濃度が1ng-TEQ/gと予想されるばいじん試料5gを抽出し、20mlの抽出液を得て、約250pg-TEQ/mlのキット測定用試料を1ml調製する場合の抽出液分取量は、以下の通りとなる。

$$V'_E = 250 \times 1 \times 20 \times \frac{1}{1 \times 5 \times 1000} = 1$$

2) 精製カラムの作成

JIS K0311 に規定された方法に準拠して、多層シリカゲルカラム及び活性炭カラムを作成する。ただし、ダイオキシン類のクリーンアップ用として市販されているものの中で、本法に適用して良好な結果が得られることが確認されているものを使用する場合は、この限りではない。

3) クリーンアップ

図 4-1-5 にクリーンアップのフローの例を示す。

(1) 硫酸処理

JIS K 0311 「6.4.4 硫酸処理 / - シリカゲルカラムクロマトグラフ操作又は多層シリカゲルカラムクロマトグラフ操作」に準拠した方法。

(2) 多層シリカゲルカラムクロマトグラフ / 活性炭カラムクロマトグラフ操作(注 1)

- a) 多層シリカゲルカラムと活性炭カラムを図 4-1-6 に示す通りに連結し、最初にトルエン 100ml で洗浄する。続いてヘキサン 100ml で洗浄する。なお、カラムの空気抜きには吸引ポンプを使用すること。
- b) 溶媒リザーバーをはずし、コックを閉じてヘキサンを多層シリカゲルカラムの上面まで充填する。
- c) 多層シリカゲルカラムの上面に試料を充填し、溶媒リザーバーにヘキサン 60ml を入れ、多層シリカゲルに再度セットする。
- d) ヘキサンを滴下(2ml/min)する。
- e) 多層シリカゲルカラムを取り外し、活性炭カラムを逆向きにして上端に溶媒リザーバーをセットする。
- f) 溶媒リザーバーにトルエン 60ml を入れ、コックを開いてトルエンを自然滴下させ、得られた溶出液を 2ml 程度まで濃縮する。

(注 1) 多層シリカゲルカラム及び活性炭カラムのプレ洗浄の際に、トルエンがカラム内に残存していると試料中のダイオキシン類が流出し、回収率が著しく低下するため、ヘキサンで十分置換すること。

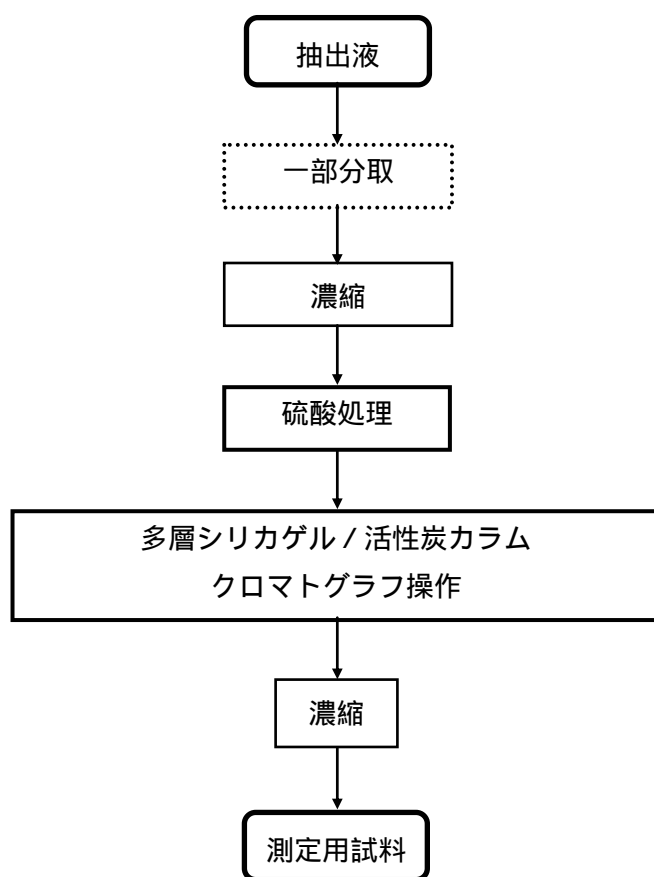


図 4-1-5 クリーンアップのフローの例

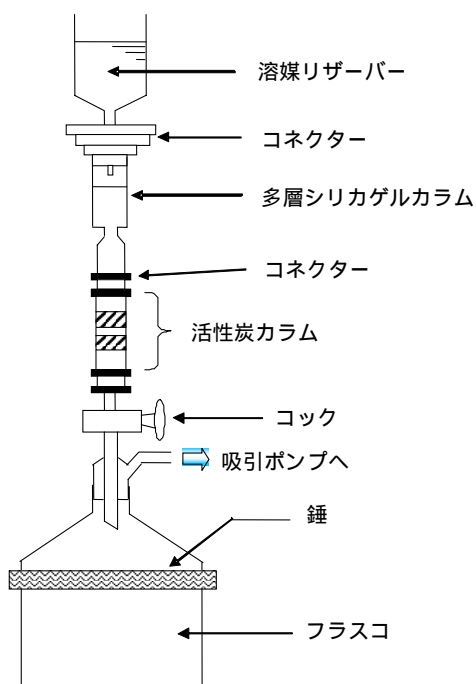


図 4-1-6 多層シリカゲルカラムと活性炭カラムの組み立て例

4) DMSO への置換操作及び測定用試料の保存

- (1) 3)の操作により得られた濃縮液を窒素気流下で試験管壁をヘキサンで洗い込みながら乾固寸前まで濃縮する。
- (2) 濃縮後、試験管にすばやく DMSO 溶液 0.5ml を加え、攪拌する。
- (3) (2)の DMSO 溶液をパスツールピペットでメスフラスコに移す。
- (4) 少量の DMSO 溶液で試験管内を洗浄し、その洗液も先のメスフラスコに移す。最終的に DMSO 溶液で一定量に定容する。(通常 1ml に定容する。試料中の予想ダイオキシン類濃度により定容量を変更しても良い。)
- (5) 定容した DMSO 溶液を所定の褐色バイアル瓶に移し、密栓後、室温で暗所に保存する。

第5節 測定

1. 測定の概要

本方法は、ダイオキシン類の毒性等量(TEQ)と相関性が高い、五塩化及び六塩化ジベンゾフラン類と特異的に反応する抗ダイオキシン類抗体を用いた酵素免疫測定法を利用するものである。

2,4,5-トリクロロフェノールグリシルグリシン(TCP)により検量線を作成し、試料の吸光度から実測濃度を算出する。排出ガス、ばいじん及び燃え殻について定められた換算係数を実測濃度に乗じることにより測定量(毒性等量)を算出する。

2. 使用キット、試薬、器具及び装置

2.1 使用キット

酵素免疫測定法キット(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)(注2)

(注2)排出ガス測定用キットとばいじん・燃え殻測定用キットがあり、用途に応じて使い分けること。

キットの内容物の例を以下に示す。

- 1) 抗原固相マイクロプレート 1枚
- 2) 二次抗体希釈液 15ml
- 3) 2,4,5 トリクロロフェノール-グリシルグリシン(TCP)濃縮標準溶液 1ml
- 4) 発色基質液 15ml
- 5) 試料希釈用 DMSO 10ml
- 6) 反応停止液 15ml
- 7) 一次免疫反应用緩衝液 10ml
- 8) 10 倍濃縮洗浄液 50ml
- 9) 一次抗体溶液 15ml
- 10) 二次抗体濃縮溶液 0.15ml
- 11) プレート密閉用シール 1枚

2.2 試薬

測定に用いる試薬は、次による。

1)水 JIS K 0557 に規定する A4(又は A3)の水

2.3 器具及び装置

測定に用いる器具及び装置は、次による。

- 1) 吸光マイクロプレートリーダー 分光光度計、測定波長 450 nm、温度制御機能は不要
- 2) プレートウォッシャー
- 3) 試験管ミキサー
- 4) 冷蔵庫
- 5) マイクロピペット 10~100 μ l
- 6) マイクロピペット 100~1000 μ l
- 7) マイクロピペット 1~10ml
- 8) マルチチャンネルピペット 8チャンネル 30~300 μ l
- 9) マルチチャンネルピペット 12チャンネル 30~300 μ l (8チャンネルで代用可)
- 10) 分注用電子ピペット マイクロピペットで代用可
- 11) ピペットチップ
- 12) ピペッティングリザーバー
- 13) マイクロチューブ 1.5ml
- 14) マイクロチューブ用ラック マルチチャンネルピペットに対応したもの
- 15) キャップ付マイクロチューブ 1.5ml 程度の容量
- 16) 遠沈管 15ml 容量より大きいもの
- 17) ストップウォッチ
- 18) 金属トレイ 氷でも代用可、一次免疫反応時のプレート分注操作で使用
- 19) ペーパータオル

3 . キットの取り扱い

以下の取り扱い上の注意点を遵守すること。

- 1) 冷蔵庫(2~8)にて保管すること。
- 2) 別便にて送付する TCP 標準液は常温で保管すること。
- 3) キットの有効期間は、未開封の状態では製造より1年間。
- 4) キットの内容物である「試料希釈用 DMSO」が凍っている場合があるが、品質に影響しない。ただし、使用前に常温で解凍すること。

4 . 測定操作

4.1 抗体溶液の調製

- 1) 一次抗体溶液の調製
調製不要。
- 2) 二次抗体溶液の調製

二次抗体濃縮液を二次抗体希釈用緩衝液で 150 倍に希釈して使用する。二次抗体溶液は、二次抗体の安定性確保の観点から、二次免疫反応を行うまでの2時間以内に調製することが望ましい。

分割使用の場合は、二次抗体濃縮液を必要に応じて量り取り調製すること。また、希釈調製した二

次抗体溶液は使用するまで冷蔵保管すること。

4.2 標準溶液の調製

以下の操作はキャップ付マイクロチューブを用いて行う。

試料希釈用 DMSO を用いて「TCP 標準溶液(1mg/ml)」を 5 倍に希釈し、200 µg/ml 標準溶液を調製する(例:TCP 標準液 0.2ml に希釈用 DMSO を 0.8ml 加え混和する)。その後、希釈調製した TCP 溶液(200 µg/ml)を試料希釈用 DMSO で 4 倍ずつ希釈し、50、12.5、3.13、0.78、0.20、0.05 µg/ml 濃度になるようにそれぞれ調製する(例: TCP 標準溶液 0.2ml に希釈用 DMSO 0.6ml を加え混和する)。最終的に、200 µg/ml から 7 段の希釈系列を調製する。

マイクロチューブを 8 本用意し、希釈調製した各 TCP 標準溶液を、濃度系列に従って 80 µl ずつマイクロチューブに移す。TCP 濃度が 0.05 µg/ml の次のマイクロチューブには試料希釈用 DMSO 80 µl を入れる。

4.3 試料希釈系列の調製

DMSO に転溶した試料から、希釈用 DMSO を用いて 4~8 水準の 2 倍希釈系列を調製する。

(例: 8 水準の希釈系列で n=2 で測定する場合)

- 1) マイクロチューブ 8 本を用意し、1 本目のチューブに原液 80 µl を加え、残り 7 本の各チューブに希釈用 DMSO 80 µl を加える。
- 2) 更に 2 本目のチューブに原液 80 µl を加え、攪拌後にその混合液 80 µl を分取して 3 本目のチューブに加えて攪拌する。同様の操作を 8 本目のチューブまで行う。
- 3) 8 本目のチューブ(残量 160 µl)から 80 µl を抜き取り、廃棄する。

4.4 混合溶液の調製

マイクロチューブに調製した(a)TCP 標準溶液及び試料に、(b)一次免疫反应用緩衝液及び(c)一次抗体溶液を 1:1:2 の割合で添加する(表 4-1-1)。試薬を添加する順番は(a) (b) (c)とする。試薬を添加後、すばやくマイクロチューブを試験管ミキサー等で攪拌混合する。混合後、4 で 10 分間静置する。

表 4-1-1 混合溶液の調製

	試薬	添加量	添加順
(a)	標準溶液及び試料	80 µl	
(b)	一次免疫反应用緩衝液	80 µl	
(c)	一次抗体溶液	160 µl	

4.5 一次免疫反応

4 で 10 分間静置後、抗原固相マイクロプレートに混合溶液を 100 µl/well ずつ分注する。分注操作は冷却した金属プレート上(又は氷上)で行うこと。分注後、軽く抗原固相マイクロプレートを振とうし、密閉シールで抗原固相マイクロプレートを密閉して 4 (注 3)で 60 分間静置する。

一次反応終了後、プレートウォッシャー等で反応液を除去し、各ウェルを洗浄液 300 µl で 4 回洗浄する。洗浄後、ペーパータオル上で抗原固相マイクロプレートを数回叩き、洗浄液を完全に除去する。

(注 3) 反応温度が高くなる(8 以上)と感度が低下する場合がある。

4.6 二次免疫反応

洗浄した抗原固相マイクロプレートに希釈調製した二次抗体溶液を 100 μ l/well ずつ分注する。分注後、プレート密閉シールで抗原固相マイクロプレートを密閉し、室温(25 前後)で 60 分間反応させる。

二次免疫反応終了後、各ウェルを洗浄液 300 μ l で 6 回洗浄する。洗浄後、ペーパータオル上で抗原固相マイクロプレートを数回叩き、洗浄液を完全に除去する。

4.7 発色反応

洗浄した抗原固相マイクロプレートに発色基質液を 100 μ l 添加し、室温(25 前後)で 30 分間反応させる(要遮光)。試料数が多いときは、各試料の発色反応時間が一定になるようにすばやく分注操作を行うことが望ましい。発色反応後、反応停止液を各ウェルに 100 μ l 添加し、反応を停止させる。

4.8 吸光度測定

抗原固相マイクロプレート外側の底面に付着した汚れや水分を、柔らかなペーパータオル等できれいに拭き取った後、波長 450nm における吸光度を吸光マイクロプレートリーダーで測定する(注 4)。

(注 4) 吸光度測定は反応停止後、速やかに行うこと(5 分以内が望ましい)。

4.9 測定操作時の留意事項

- 1) 一次免疫反応、二次免疫反応、発色反応の反応時間及び反応温度は所定の条件で必ず行うこと。
- 2) 一次抗体溶液をマイクロチューブに分注した後は、速やかに混合攪拌すること。
- 3) マイクロチューブから抗原固相マイクロプレートへの分注操作は素早く行い、室温で長時間(5 分以上)放置することがないように注意すること。
- 4) 抗原固相マイクロプレートの洗浄後は、次の試薬を分注する前に、残液が極力少なくなるようにタッピング(軽くたたくこと)を行い、残液を除去すること。
- 5) 発色反応の際に異常発色が認められる場合は、二次抗体による非特異反応が考えられる。抗原固相マイクロプレートの洗浄条件を再検討し、ウェル内の二次抗体が十分除去できる洗浄条件に設定すること。
- 6) 反応停止液を分注した後は、5 分以内に吸光度を測定することが望ましい。

5. 定量

5.1 検量線の作成

標準品(TCP)の濃度に対して吸光度をプロットし、検量線を作成する。

- 1) 標準物質
2,4,5 トリクロロフェノール-グリシルグリシン (略称 TCP 標準品)
- 2) 濃度設定

表 4-1-2 に濃度設定の例を示す。

表 4-1-2 濃度設定

単位	1	2	3	4	5	6	7	8
ng/well	0	1.22	4.88	19.5	78.1	313	1250	5000

3) 作成方法

各濃度に調製した TCP 標準溶液のキット測定を行い、吸光マイクロプレートリーダーにより波長 450nm における吸光度を測定する。TCP 標準溶液の吸光度測定は、必ず試料測定と同一の抗原固相マイクロプレートで同時に行うこと。TCP 標準品設定濃度及び吸光度から、下記に示す 4-Parameter の式の各係数(A~D)を算出(吸光マイクロプレートリーダーコントロールソフトを用いても良い)する。

$$y = \frac{(A - D)}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} + D$$

ここに、x：実測濃度(ng/ml)

y：吸光度

A：0 濃度の吸光度

B：曲線部分の傾き

C：50%阻害濃度(ng/ml)

D：最小吸光度各係数

5.2 測定試料の定量

各試料の吸光度を検量線に内挿し、阻害率 20～80%の範囲でかつ希釈直線性が認められる範囲の濃度に各希釈倍率を掛けた値の平均値(濃度の平均値)を用いて、次式により実測濃度(排出ガスにおいては $\text{ng}/\text{m}^3_{\text{N}}$ 、ばいじん及び燃え殻においては ng/g)を算出する。

$$\text{実測濃度}(\text{ng}/\text{m}^3_{\text{N}} \text{ 又は } \text{ng}/\text{g}) = \frac{\text{濃度の平均値}(\text{ng}/\text{ml})}{\text{最終定容量}(\text{ml})} \times \frac{\text{総抽出液量}(\text{ml})}{\text{分取量}(\text{ml})} \times \frac{1}{\text{試料量}(\text{m}^3_{\text{N}} \text{ 又は } \text{g})}$$

(備考) 排出ガスの酸素濃度による補正が必要な場合には、次式によって所定の酸素濃度に換算する。

$$C = \frac{21 - O_n}{21 - O_s} \times C_s$$

ここに、C：酸素の濃度 O_n における実測濃度($\text{ng}/\text{m}^3_{\text{N}}$)

O_n ：換算する酸素の濃度(%)

O_s ：排出ガス中の酸素の濃度(注5)(%)

C_s ：排出ガス中の実測濃度($\text{ng}/\text{m}^3_{\text{N}}$)

(注5) 排出ガス中の酸素の濃度が 20%を超える場合は、 $O_s=20$ とする。

6. 検出下限及び定量下限

本測定方法における検量線のブランク吸光度の相対標準偏差は 2%以下であり、この時の標準偏差(s)は概ね 0.03 である。本測定方法では 3s を検出下限値とし、10s を定量下限値に設定しており、この 3s 及び 10s は検量線の最大吸光度(ブランク)の 90%及び 80%に相当する TCP 標準品濃度に相当する。

6.1 標準品についての検出下限及び定量下限

1) 検出下限

検量線の最大吸光度(ブランク)の 90%に相当する TCP 標準品濃度を検出下限値とする。

2) 定量下限

検量線の最大吸光度(ブランク)の 80%に相当する TCP 標準品濃度を定量下限値とする。

表 4-1-3 標準品についての検出下限

	検出下限	
	ng/well	ng/ml
排出ガス測定用キット	3	90
ばいじん・燃え殻測定用キット	20	700

表 4-1-4 標準品についての定量下限

	定量下限	
	ng/well	ng/ml
排出ガス測定用キット	5	200
ばいじん・燃え殻測定用キット	50	2000

6.2 試料についての検出下限及び定量下限

最終的に 1ml に定容した試料(DMSO 溶液)から 80 μ l を分取し、これに一次免疫反应用緩衝液 80 μ l 及び一次抗体溶液 160 μ l 加えて攪拌混合した溶液 100 μ l をウェルに分注する。したがって、1 ウェル当たりの試料の分注量は 25 μ l となる。本操作は測定媒体にかかわらず同じである。

1) 検出下限

検量線の最大吸光度(ブランク)の 90%に相当する実測濃度を各試料ベースに換算(希釈系列希釈倍数は考慮していない)した数値を検出下限値とする。表 4-1-5 に例を示す。

2) 定量下限

検量線の最大吸光度(ブランク)の 80%に相当する実測濃度を各試料ベースに換算(希釈系列希釈倍数は考慮していない)した数値を定量下限値とする。表 4-1-6 に例を示す。

7. 測定量(毒性等量)への換算

1) 排出ガス

希釈系列 1ml 当たりの実測濃度(ng/ml) \times 希釈系列希釈倍数(以下「Q」と表記)から相関式を用いて測定量(毒性等量、排出ガス総抽出液当たり)への換算を行う。

$$\text{測定値(毒性等量)}(\text{ng} - \text{TEQ}/\text{m}^3\text{N}) = 0.0744 \times \left(\frac{Q}{1000}\right)^{0.8351} \times \frac{\text{最終定容量}}{\text{分取量}} \times \frac{\text{総抽出液量}}{\text{ガス量}}$$

2) ばいじん

希釈系列 1ml 当たりの実測濃度(ng/ml) \times 希釈系列希釈倍数(以下「Q」と表記)から相関式を用いて測定量(毒性等量、ばいじん総抽出液当たり)への換算を行う。

$$\text{測定値(毒性等量)}(\text{ng} - \text{TEQ}/\text{g}) = 0.0038 \times \left(\frac{Q}{1000}\right)^{0.9779} \times \frac{\text{最終定容量}}{\text{分取量}} \times \frac{\text{総抽出液量}}{\text{ばいじん使用量}}$$

3) 燃え殻

希釈系列 1ml 当たりの実測濃度(ng/ml) \times 希釈系列希釈倍数(以下「Q」と表記)から相関式を用いて測

定量(毒性等量)、燃え殻総抽出液当たり)への換算を行う。

$$\text{測定値(毒性等量)}(\text{ng-TEQ/g}) = 0.0038 \times \left(\frac{Q}{1000} \right)^{0.9779} \times \frac{\text{最終定容量}}{\text{分取量}} \times \frac{\text{総抽出液量}}{\text{燃え殻使用量}}$$

なお、測定結果の報告様式については、第2章第2節「測定結果の報告」を参照すること。

表 4-1-5 試料についての検出下限

測定媒体	キット		サンプル調製					媒体中濃度
	検出下限値	分注量	ガス量	酸素濃度	分取量/総抽出液量	最終定容量	希釈倍数	実測濃度
	ng/well	μl/well	m ³ _N	%	ml/ml	ml	-	ng/m ³ _N
排出ガス	3	25	4.0	12.0	10/20	1.0	1.0	60
測定媒体	キット		サンプル調製				媒体中濃度	
	検出下限値	分注量	試料量	分取量/総抽出液量	最終定容量	希釈倍数	実測濃度	
	ng/well	μl/well	g	ml/ml	ml	-	ng/g	
ばいじん	20	25	10.0	10/20	1.0	1.0	200	
測定媒体	キット		サンプル調製				媒体中濃度	
	検出下限値	分注量	試料量	分取量/総抽出液量	最終定容量	希釈倍数	実測濃度	
	ng/well	μl/well	g	ml/ml	ml	-	ng/g	
燃え殻	20	25	50.0	10/20	1.0	1.0	40	

表 4-1-6 試料についての定量下限

測定媒体	キット		サンプル調製					媒体中濃度
	定量下限値	分注量	ガス量	酸素濃度	分取量/総抽出液量	最終定容量	希釈倍数	実測濃度
	ng/well	μl/well	m ³ _N	%	ml/ml	ml	-	ng/m ³ _N
排出ガス	5	25	4.0	12.0	10/20	1.0	1.0	100
測定媒体	キット		サンプル調製				媒体中濃度	
	定量下限値	分注量	試料量	分取量/総抽出液量	最終定容量	希釈倍数	実測濃度	
	ng/well	μl/well	g	ml/ml	ml	-	ng/g	
ばいじん	50	25	10.0	10/20	1.0	1.0	400	
測定媒体	キット		サンプル調製				媒体中濃度	
	定量下限値	分注量	試料量	分取量/総抽出液量	最終定容量	希釈倍数	実測濃度	
	ng/well	μl/well	g	ml/ml	ml	-	ng/g	
燃え殻	50	25	50.0	10/20	1.0	1.0	80	

第6節 参考資料

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(排出ガス試料)」

濃度既知の試料を本測定方法により測定し、得られた実測濃度(ng/ml)と HRGC/HRMS 法により測定し、得られた試料中の毒性等量(ng-TEQ/ml)の関係から測定量(毒性等量)への換算式を算出した。

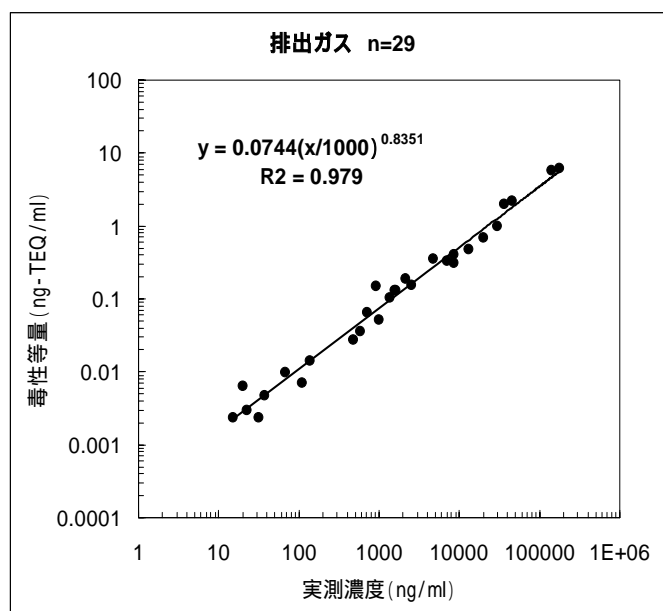


図 4-1-7 生物検定法による実測濃度と HRGC/HRMS 法による毒性等量の相関(例)(排出ガス)

「実測濃度から測定量(毒性等量)を求める際の換算係数の導出について(ばいじん及び燃え殻試料)」

濃度既知の試料を本測定方法により測定し、得られた実測濃度(ng/ml)と HRGC/HRMS 法により測定し、得られた試料中の毒性等量(ng-TEQ/ml)の関係から測定量(毒性等量)への換算式を算出した。

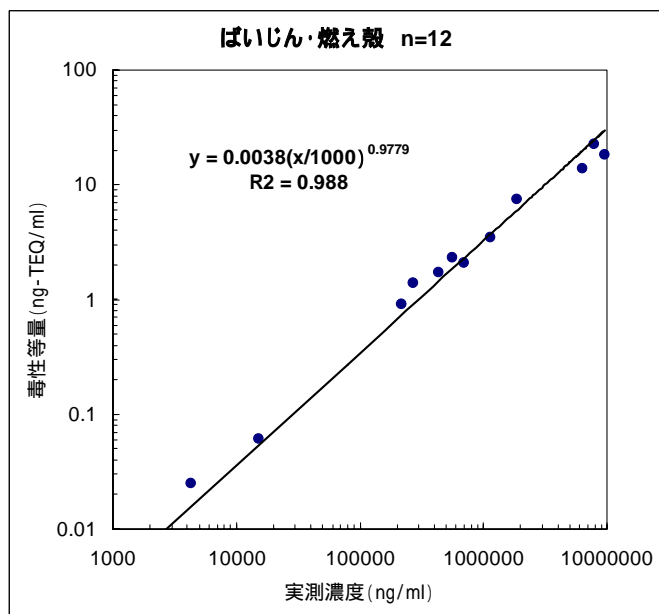


図 4-1-8 生物検定法による実測濃度と HRGC/HRMS 法による毒性等量の相関(例)(ばいじん及び燃え殻)