

表2-1 細菌による好氣的分解

物質	濃度	分解率	菌種	文献
DD	0.5g/L	1,2-ジヒドロキシジベンゾダイオキシンの確認	<i>Pseudomonas</i> sp. N.C.I.B.9816	Klecka and Gibson (1979) ⁸⁾
ビフェニル DD 1-MCDD 2-MCDD 2,3-MCDD 2,7-MCDD 2,8-MCDD 1,2,4-MCDD	0.05% 0.05% 0.05% 0.05% 0.05% 0.05% 0.05%	12時間: 100% 12時間: 41.2% 12時間: 72.6% 12時間: 72.7% 12時間: 15.5% 12時間: 11.8% 12時間: 11.8% 12時間: 8.9%	<i>Beijerinckia</i> sp B8/36	Klecka and Gibson (1980) ⁹⁾
2,3,7,8-TCDD	53.7ppt	12ヶ月: 50.3% 25ヶ月: 70.6%	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Nocardiosis</i> sp.	F. Matsumura et al. (1983) ¹⁰⁾
DF			<i>Alcaligenes</i> sp. JB1	Parsons et al (1989) ¹¹⁾
DF 2,8-DCDF 3,6-DCDF DD 1-MCDD 2-DCDD 2,6-DCDD 1,2,3,4-TCDD		3日: 80%、5日: 90日 3日: 14%、5日: 25% 3日: 3%、5日: 50% 3日: 50% 3日: 75% 5日: 34% 5日: 15% 3日: 31%、5日: 84%	<i>Pseudomonas seruginosa</i>	石黒ら(1990) ¹²⁾
DF		2,2',3-トリヒドロキシビフェニルの確認	<i>Pseudomonas</i> sp. HH69	P.Fortnagel et al. (1990) ¹³⁾
DF	DFを単一炭素源	2,2',3-トリヒドロキシビフェニルの確認	<i>Brevibacterium</i> sp. DPO1361	V. Strubel et al. (1991) ¹⁴⁾
2-MCDF 3-MCDF			<i>Spingomonas</i> sp. RW16	Harms et al. (1991) ¹⁵⁾
2,3,7,8-TCDF 2,3,7,8-TCDD	1nM, 100nM	84日: 64% 2日: 100%	<i>Burkholderia</i> sp strain PS12	Sander et al. (1991) ¹⁶⁾
1価、or2価のDE			<i>Sphingomonas</i> sp. SS3	Schmidt et al. (1992) ¹⁷⁾
DD			<i>Sphingomonas</i> sp. RW1	R.M. Wittich et al. (1992) ¹⁸⁾
1価、or2価のDE			<i>Sphingomonas</i> sp. SS33	Schmidt et al. (1993) ¹⁹⁾
DF DD		2,2',3-トリヒドロキシビフェニルの確認 1-ヒドロキシジベンゾ-p-ダイオキシシンに変換	<i>Staphylococcus auricularis</i> DBF63	L.Monna et al. (1993) ²⁰⁾
DD 1-MCDD 2-MCDD 2,3-DCDD 2,7-DCDD 1,2,4-TCDD DF 2-MCDF 3-MCDF 4-MCDF 2,3-MCDF 2,8-MCDF 3,7-MCDF 2,4,8-TCDF	250 μM 250 μM 250 μM 250 μM 250 μM 250 μM 250 μM 250 μM 250 μM 250 μM 250 μM 250 μM 250 μM 250 μM 250 μM	16h: 100% 16h: 96% 16h: 72% 16h: 100% 16h: 84% 16h: 64% 16h: 12% 16h: 0% 16h: 92% 16h: 52% 16h: 40% 16h: 24% 16h: 0% 16h: 4%	<i>Sphingomonas</i> sp. RW1	H. Wilkes et al. (1996) ²¹⁾
2,3,7,8-TCDF 2,3,7,8-TCDD		84日: 31% 84日: 15%	<i>Sphingomonas</i> sp. HH69	Schreiner et al. (1997) ²²⁾
2,3,7,8-TCDD		分解せず	<i>Sphingomonas</i> sp. RW1	R.-M. Wittich (1998) ²³⁾

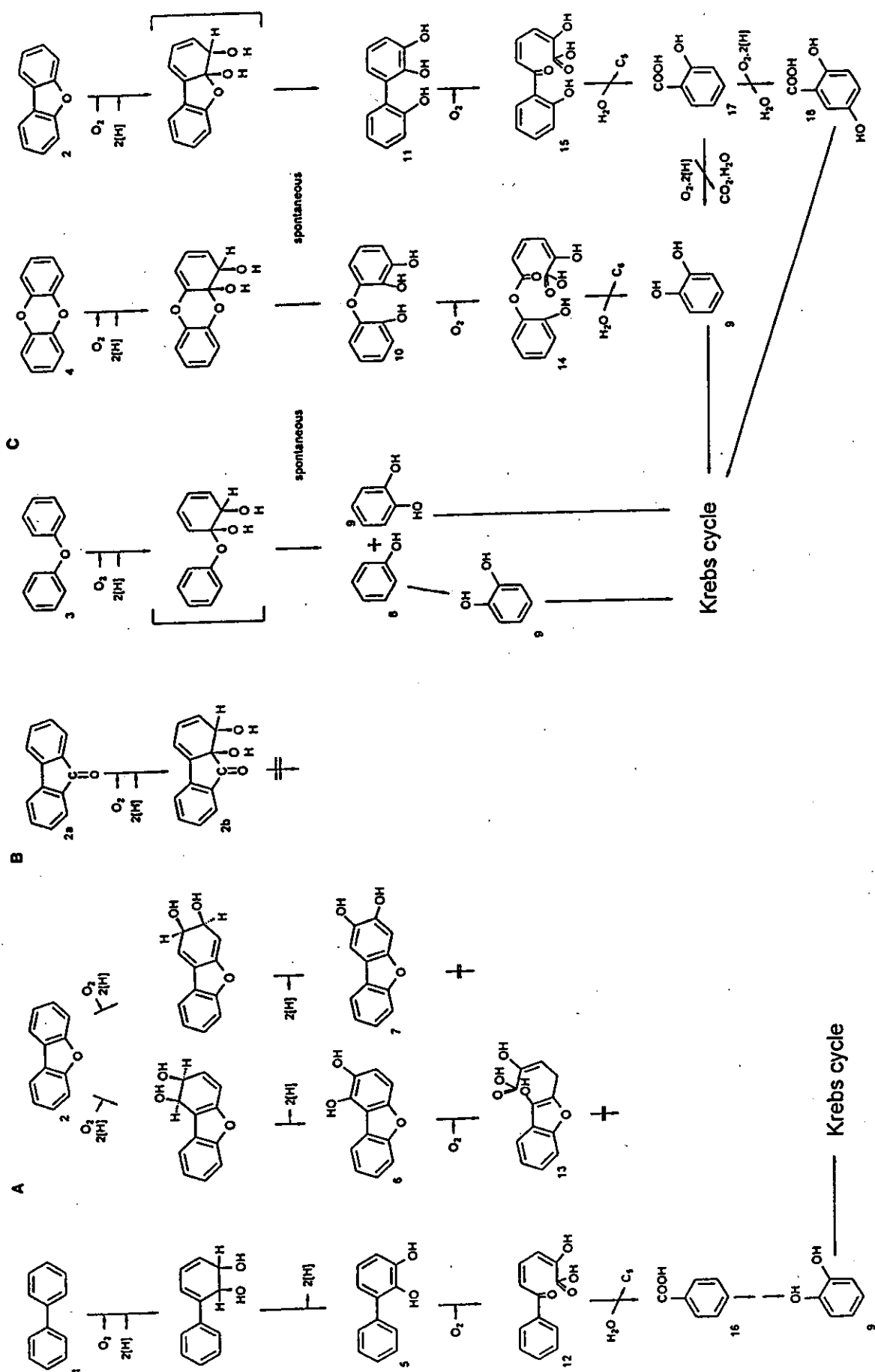
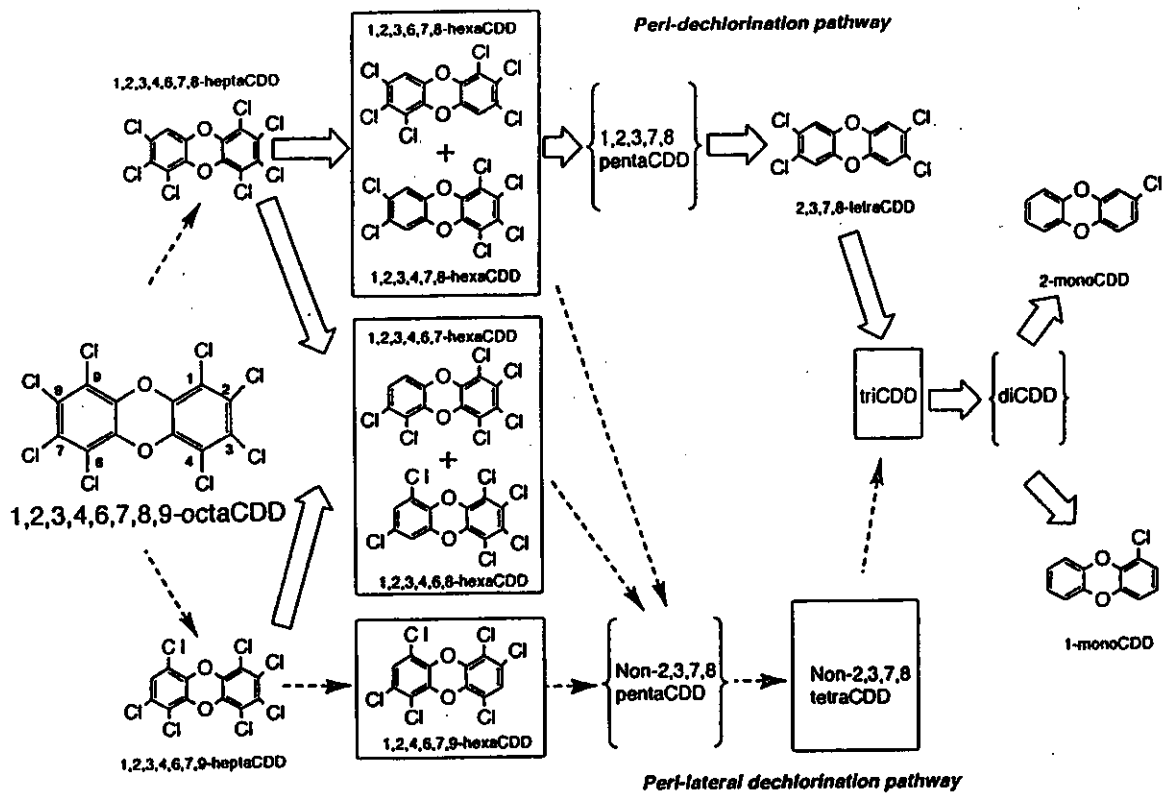


Fig. 2-1. Degradative pathways for (A) the mineralization of biphenyl (1) and the co-oxidation of fluorenone (2) and the co-oxidation of fluorenone (2a) and (C) the mineralization of diphenyl ether (3), dibenzo-p-dioxin (4), and dibenzofuran (2). Bacterial dioxygenation furnishes the *cis*-dihydrodiols shown in the second row; unstable dihydrodiols (hemiacetals) are shown in brackets. The other intermediates are as follows: the dihydrodiol of fluorenone (5), 1,2-dihydroxydibenzofuran (6), 2,3-dihydroxydibenzofuran (7), phenol (8), catechol (9), 2,2',3-trihydroxydiphenyl ether (10), 2,2',3-trihydroxydiphenyl ether (11), 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid (12), 4-[2-(3'-hydroxy)benzofuranyl]-2-oxobut-3-enoic acid (13), 2-hydroxy-6-oxo-6-(2-hydroxyphenoxy)hexa-2,4-dienoic acid (14), 2-hydroxy-6-oxo-6-(2-hydroxyphenoxy)hexa-2,4-dienoic acid (15), benzoic acid (16), salicylic acid (17), gentisic acid (18), 2-hydroxy-6-oxo-6-(2-hydroxyphenoxy)hexa-2,4-dienoic acid (9).

表2-2 土壤中微生物による嫌氣的分解

物質	濃度	分解率	菌種	文献
2,3,7,8-TCDD	1,10,100ppm	1年:37~44%		P.C.Kearney et al. (1972) ²⁵⁾
DD 1,2,3,4,7,8-HCDD 1,2,3,4,6,7,8-HCDD		400日:約10% 400日:約10% 400日:約10%		Peter et al (1995) ²⁶⁾
DF 1,2,4,6,8-PCDF 1,2,3,4,6,7,8-HCDF		400日:約10% 400日:約10%		
2,3,7,8-TCDD OCDD		トリ、モノCDDを検出 ヘプタ、ヘキサ、ペンタ テトラ、トリ、ジ、モノ のCDDを検出		A.L. Barkovskii et al. (1996) ²⁷⁾
H7CDD PCDD		脱塩素過程を追従		A.L. Barkovskii et al. (1998) ²⁸⁾



☒ 2-2 Branched pathway of PCDD microbial dechlorination. Broad, open arrows designate dechlorination caused by activity of nonmethanogenic, non-spore-forming microorganisms. Intermediates in braces were found in trace concentrations.

☒ 2-3 A, B Anoxic reductive dehalogenations of PCDD by mixed-sediment cultures. Further dehalogenations of (A) the upper hexachlorodibenzo-*p*-dioxins (*HxCDD*) (Adriaens and Grbić-Galić 1994) have to be expected, but were not demonstrated. Almost identical results for identified intermediates from 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (*1,2,3,4-TCDD*) (B) were obtained by Beurskens et al. (1995) and Ballerstedt et al. (1997)

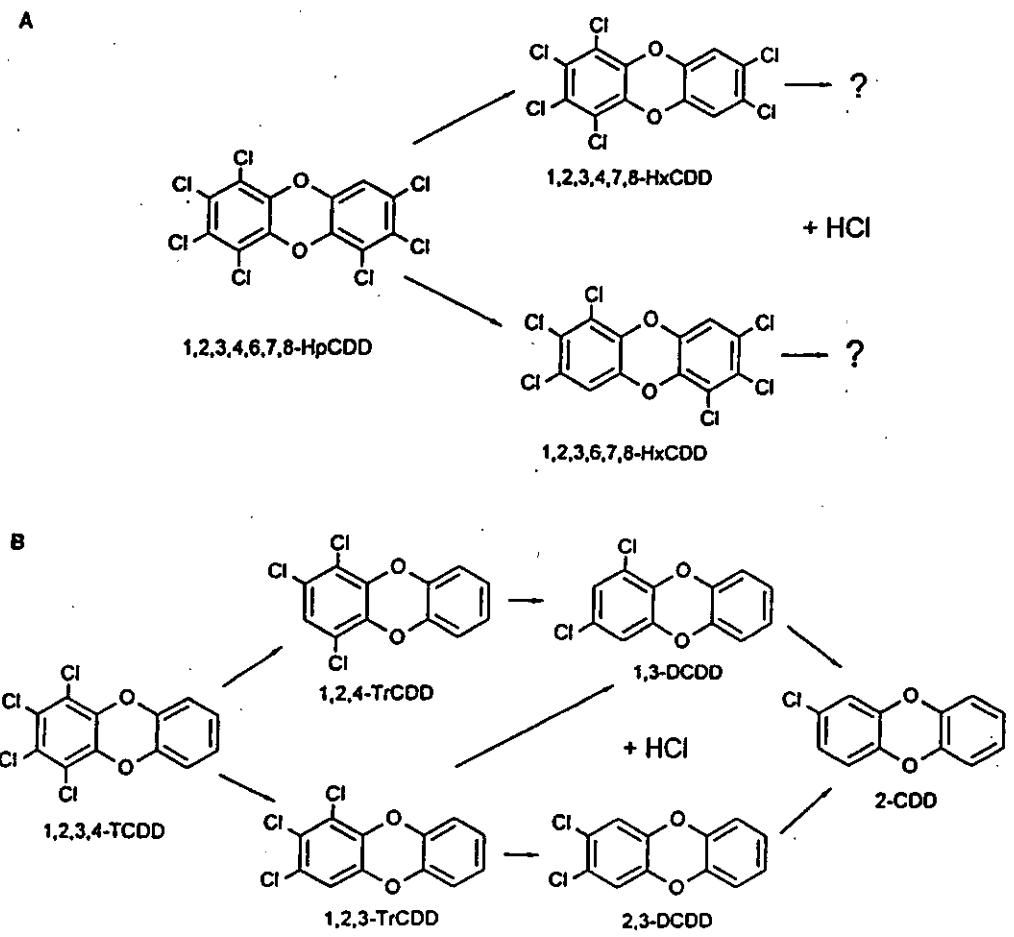


表2-3 白色腐朽菌による好氣的分解

物質	濃度	分解率	菌種	文献
2,3,7,8-TCDD	1.25nM	60日: 4%	Phanerochaete chrysosporium,	Bumpus.J.A et al (1985) ²⁹⁾ Bnmpus .J.A et al (1987) ³⁰⁾
2,7-DCDD	25 μ M	27日: 50%	Phanerochaete chrysosporium,	K. Valli et al (1992) ³¹⁾
2,7-DCDD	0.25mM	15日: 80.2%、30日: 76.7%	Phanerochaete chrysosporiumr	橘(1996) ³²⁾
	1.25mM	15日: 58.5%、30日: 65.87%		
	0.25mM	15日: 69.5%、30日: 69.1%	Coriolus versicolor	
	1.25mM	15日: 51.5%、30日: 50.1%	Fusarium solani	
	0.25mM	15日: 57.1%、30日: 63.8%	Fungus 563	
	1.25mM	15日: 24.1%、30日: 48.5%	V1(抽出された菌)	
	0.25mM	15日: 50.3%、30日: 57.3%	V2(抽出された菌)	
	1.25mM	15日: 45.5%、30日: 46.5%		
	0.25mM	15日: 71.3%、30日: 72.4%		
	1.25mM	15日: 50.1%、30日: 53.6%		
	0.25mM	15日: 83.1%、30日: 79.7%		
	1.25mM	15日: 61.8%、30日: 53.9%		
2,3,7,8-TCDD		10日: 45%	Phanerochaete sordida YK-624	S.Takada (1996) ³³⁾
1,2,3,7,8-PCDD		10日: 55%		
1,2,3,6,7,8-HCDD		14日: 80%		
1,2,3,4,6,7,8-HCDD	2.74ng/ μ L	14日: 60%		
OCDD	0.74ng/ μ L	14日: 40%		
2,3,7,8-TCDF		10日: 45%		
1,2,3,7,8-PCDF		10日: 50%		
1,2,3,6,7,8-HCDF	1.8ng/ μ L	14日: 70%		
1,2,3,4,6,7,8-HCDF	0.87ng/ μ L	14日: 60%		
OCDF		14日: 60%		
DD		70日: 50%	Phanerochaete chrysosporium,	P. Rosenbrock et al.
			Pleurotus sp. Florida,	(1997) ³⁴⁾
			Dichomitus squalens	
2,4,8-TCDF	0.25mM	30日: 60%	抽出された菌	大川(1997) ³⁵⁾
	1.25mM	30日: 60~80%		

TCDD 及び OCDD の代謝物として、4,5-ジクロロカテコールとテトラクロロカテコールをそれぞれ確認している。

2. 2. 2 微生物分解処理技術

ダイオキシン類の分解処理技術に関する報告は極めて少ない。石黒³⁾が Frahne らの固定床式バイオリアクターを用いた実験を紹介しているが詳細は不明である。本研究プロジェクトでの調査範囲では、現段階では微生物を用いたダイオキシン類の処理技術は開発されていない。Mohammed³⁷⁾らが行っている微生物処理技術に関する米国のレビューにおいても、微生物によってダイオキシン類が分解されることは明らかにしているが、処理技術として確立されているとは述べていない。

2. 3 まとめ

これまでの文献調査により、自然界の土壌や河川等の堆積物中のダイオキシン類は好氣的、あるいは嫌氣的な条件いずれの場合も微生物により分解されることは確認されているが、分解速度は遅く、分解率も低いことが分かった。つまり、これまで自然界でほとんど分解されないと考えられていたダイオキシン類が微生物によって分解されるという事実を確かめた。

一方、実験室レベルの微生物実験では、細菌を用いた好氣性分解の場合、低塩素化のダイオキシン類に関しては高い分解効率を示しているが、3,4 価以上の高塩素化のダイオキシン類に関しては、効率が悪く、ほとんど分解を示さないという報告例さえある。嫌氣的な条件では、脱塩素反応が起こることが分かっているが、反応速度は好氣的分解よりは著しく遅いことを確認した。白色腐朽菌を用いた実験の場合は、低塩素化、高塩素化両方のダイオキシン類を分解することが、試験管レベルで確かめられているが、その処理プロセス化までには至っていない。

ダイオキシン類の微生物処理技術に関しては、本調査の及ぶ限りにおいては未だ確立されておらず、研究開発段階にあると言える。ダイオキシンで汚染された土壌や浸出液、地下水の処理を念頭にした場合、現在確立された技術として存在するのが、熱処理技術、そして低濃度の汚染水に関しては UV オゾン酸化分解技術が存在する。しかし、大量の土壌の処理を念頭にした場合、熱処理を用いるのは、コスト、二次汚染、新たな資源の消費、温暖化ガスといった観点から必ずしも適当な技術であるとは言えない。低コストで、安全で、大量処理を可能にする処理技術が求められていると言える。

参考文献

- 1)石黒智彦 (担当) : ダイオキシン汚染問題解決への展望, 研修社・工業技術会, pp.227-253(1992)
- 2)Palauschek, N., and Scholz, B., *Chemosphere*, 16, pp.1857-1863(1987)
- 3)Botre, C., Memoli, A., and Alhaique, F., *Environ.Sci. Technol.*, 13, pp.228-231(1979)
- 4)Lissel, M., and Kottmann, J., *Chemosphere*, 19, pp.1449-1502(1989)
- 5)Paul, E.d., *Chemosphere*, 18, pp.343-353(1989)
- 6)廃棄物処理におけるダイオキシン等の発生メカニズム等に関する研究、平成 3 年度報告書
- 7) 堀井安雄、田中信壽 : 焼却残渣埋立率の高いごみ埋立地の浸出水処理における最近の技術課題, 廃棄物学会誌, Vol.8, No.1, pp.64-75(1997)
- 8)G.M.Klecka and D.T.Gibson: Metabolism of Dibenzo[1,4]dioxan by a *Pseudomonas* Species, *Biochem. J.*, 180, pp639-645(1979)
- 9)G.M.Klecka and D.T.Gibson: Metabolism of Dibenzo-p-Dioxin and Chlorinated Dibenzo-p-Dioxins by a *Beijerinckia* Species, *Applied and Environmental Microbiology*, pp288-296(1980)
- 10)F. Matsumura, John Quensen and G. Tsumimoto: Microbial Degradation of TCDD in a Model Ecosystem, *Environ.Sci.Res.*, 26, pp191-219(1983)
- 11)Parsons JR., Storms MCM: Biodegradation of chlorinated dibenzo-p-dioxins in batch and continuous cultures of strain JB1, *Chemosphere*, 19, pp1297-1308(1989)
- 12)石黒智彦 : (財) ヒューマンサイエンス振興財団シンポジウム講演要旨集(1990)
- 13)P.Fortnagel, H.Harms, R.-M.Wittich, S.Krohn, H.Meyer, V.Sinnwell, H. Wilkes and W.Francke: Metabolism of Dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. Strain HH69 and the Mixed Culture HH27 *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, pp.1148-1156(1990)
- 14)V.Strubel, K.-H.Engesser, P.Fischer and H.-J.Knackmuss, *J.Bacteriol.*, 173, 1932 (1991)
- 15)Harms H, Wilkes H. Sinnwell V, Wittich R-M, Figge K, Francke W, Fortnagel P, Transformation of 3-chlorodibenzofuran by *Pseudomonas* sp. HH69, *FEMS Microbiol Lett* 81, 25-30(1991)
- 16)Sander P, Wittich R-M, Fortnagel P, Wilkes H, Francke W: Degradation of 1,2,4-trichloro- and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, pp1430-1440(1991)
- 17)Schmidt S, Wittich R-M, Erdmann D, Wilkes H, Francke W, Fortnagel P: Biodegradation of diphenyl ether and its monohalogenated derivatives by *Sphingomonas* sp. strain SS3, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, pp2744-2750(1992)
- 18)Wittich R-M, Wilkes H, Sinnwell V, Francke W, Fortnagel P, Metabolism of dibenzo-

- p-dioxin by *Sphingomonas* sp. strain RW1, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, pp1005-1010 (1992)
- 19) Schmidt S, Fortnagel P, Wittich R-M, Biodegradation and transformation of 4,4'- and 2,4-diphenyl ethers by *Sphingomonas* sp. strain SS33, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, pp3931-3933(1993)
 - 20) L. Monna, T. Omori and T. Kodama: Microbial Degradation of Dibenzofuran, Fluorene, and Dibenzo-p-Dioxin by *Stahylococcus auriculans* DBF63 *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, pp285-289(1993)
 - 21) Wilkes H, Wittich R-M, Timmis KN, Fortnagel P, Francke W, Dgradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-p-dioxins by *Sphingomonas* sp. strain RW1, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, pp367-371(1996)
 - 22) Schreiner G, Wiedmann T, Schimmel H, Ballschmitter K, Influence of the substitution pattern on the microbial degradation of mono- to tetrachlorinated dibenzo-p-dioxins and divenzofurans, *Chemosphere*, 34, pp1315-1331(1997)
 - 23) R.-M. Wittich: Degradation of dioxin-like compounds by microorganisms, *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, pp489-499(1998)
 - 24) A.L. Barkovskii, I.D. Albrecht, Q. Fu, and P. Adriaens: Degradation of Dioxins Under Aerobic and Anaerobic Conditions: state-of-the Art and Implications for Bioremediation, *Organohalogen compounds*, Vol. 36, pp429-432(1998)
 - 25) P.C. Kearney, E.A. Woolson, C.P. Ellington, Jr.: Percistence and Metabolism of Chlorodioxins in Soils, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 6, No. 12, pp1017-(1972)
 - 26) P. Adriaens, Q. Fu, and D. Grabic-Galic: Bioavailability and Transformation of Highly Chlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans in Anaerobic Soils and Sediments, *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 29, pp2252-2260(1995)
 - 27) A. Barkovskii and P. Adriaens: Microbial Dechlorination of Historically Present and Freshly Spiked Chlorinated Dioxins and Diversity of Dioxin-Dechlorinating Populations, *Appl. Environ. Microbiol.*, pp4556-4562(1996)
 - 28) A. Barkovskii and P. Adriaens: Impact of Humic Constituents on Microbial dechlorination of Polychlorinated Dioxins, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 17, No. 6, pp1013-1020(1998)
 - 29) Bumpus J.A et al.: Oxidation of Persistent Environmental Pollutions by a White Rot Fungus, *Science*, 288(4706)1434(1985)
 - 30) Bumpus J.A et al.: Biodegradation of Chlorinated Organic Compounds by *Phanerochaete chrysosporium*, a Wood-Rotting Fungus, *American Chem. Society*, 338, 340(1987)
 - 31) K. Valli, H. Wariishi, M.H. Gold: Degradation of 2,7-Dichlorodibenzo-p-Dioxin by the

- Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Bacteriology*, 174(7), 2131(1992)
- 32) 橋燦郎、大川浩樹、伊藤和貴、沖妙、平林達也：木材腐朽菌によるバイオレメディエーション(I) ダイオキシン分解能を有する菌のスクリーニング及び選抜した菌と数種の木材腐朽菌による 2,7-ジクロロジベンゾ-p-ダイオキシンの分解, 紙パ技協誌, Vol.50, No.12, pp1806-1815(1996)
- 33) S.Takada, M.Nakamura, T.Matcueda, R.Kondo, and K.Sakai: Degradation of Polychlorinated Dibenzop-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans by the White Rot Fungus *Phanerochaete sordida* YK-624, *Appl. Environ. Microbiol.*, pp4323-4328(1996)
- 34) P.Rosenbrock, R.Martens, F.Buscot, F.Zadrazil, J.C.Munch: Enhancing the mineralization of [U-¹⁴C]dibenzo-p-dioxin in three different soils by addition of organic substrate or inoculation with white-rot fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol.48, pp665-670(1997)
- 35) 大川浩樹他：第 47 回日本木材学会大会研究発表要旨集, p381(1997)
- 36) 橋燦郎：木材腐朽菌によるダイオキシンの分解と実用化への課題, 資源環境対策, Vol.34, No.8, pp745-749(1998)
- 37) N.Mohammed, R.I.Alayla, G.F.Nakhla, S.Farooq, and T.Husain: State-of-art Reriew of Bioremediation Studies, *J. Environ. Sci. Health*, A31(7), pp1547-1574(1996)

3章 ダイオキシン類の分析方法

(分担研究者 郷田浩志 東和科学株式会社 技術研究所 主任研究員
研究協力者 宮地和夫 同 技術センター)

3.1 研究背景及び目的

日本国内で、ダイオキシンに関する問題が深刻化するに伴い、ダイオキシン類の分析手法の信頼性を確保すべく、関係省庁からダイオキシン類の分析手法についてのマニュアル化が行なわれている。

厚生省より平成9年2月に発表された「廃棄物処理におけるダイオキシン類標準測定分析マニュアル」(表3-1)は、廃棄物処理施設より排出される焼却灰、排ガス、排水を対象サンプルとし、毒性の高い四から八塩素化のジベンゾパラダイオキシン(PCDDs)とジベンゾフラン(PCDFs)を定性・定量するマニュアルである。これは平成2年12月に示された「廃棄物処理におけるダイオキシン類測定標準法」に基づいて作成され、この改定にあたっては、特に排ガスについて毒性等量0.1ng-TEQ/Nm³に対応可能な内容にされた。

表3-1 ダイオキシン類測定分析マニュアル一覧

年 月	名 称	担 当
平成9年2月	廃棄物処理におけるダイオキシン類標準測定マニュアル	厚生省生活衛生局水道環境部環境整備課
平成9年10月	有害大気汚染物質測定方法マニュアル	環境庁大気保全局大気規制課
平成10年1月	ダイオキシン類に係る土壌調査暫定マニュアル	環境庁水質保全局土壌農業課
平成10年7月	ダイオキシン類に係る底質調査暫定マニュアル	環境庁水質保全局水質管理課
平成10年7月	ダイオキシン類に係る水質調査マニュアル	環境庁水質保全局水質規制課
平成10年7月	野生生物のダイオキシン類汚染状況調査マニュアル	財団法人自然環境研究センター (環境庁保健部環境安全課)
平成10年9月	ダイオキシン類に係る水生生物調査暫定マニュアル	環境庁水質保全局水質管理

底質、水質、野生生物、水生生物のサンプルに適応する分析マニュアルについても、昨年、環境庁より発表された(表1参照)。底質、水質、土壌等のマニュアルについては、本論のはじめに「今後科学的知見の集積などにより、必要に応じ本マニュアルの改定があり得る」と付記され、今後、前処理・分析技術面での変法の可能性が示唆されている。また、技術的には確立した感のある、他のサンプルを対象としたマニュアルについても各分析データの統一化の流れを受けJIS化、ISO化が行われる動きもある。

これら手法は、煩雑さ、コスト、時間的な問題が指摘され、現在、その簡素化について検討がなされている。我々は、焼却灰、土壌サンプル中のダイオキシン類の毒性と、OCDD/Fとの間に

相関性を示唆する結果を得ており、今後、前処理の簡素化へ向け役立つ結果であると考えている。これら一連のマニュアル(表 3-1)も四塩化以上のダイオキシンが対象とされている。

一方で公定法と位置付けられる、いずれのマニュアルも、無塩化または一～三塩化のダイオキシン類に適應するために作られたマニュアルではない。しかしながら、微生物分解の分野における基礎的な研究ベースでは、これらの低塩素化のダイオキシンが比較的毒性が小さく扱いやすく、そして微生物分解しやすい等の理由から分解をスムーズに評価できるためよく使われている。低塩化のダイオキシンについて Parson¹⁾らは、2位の位置にある塩素を有する 2-モノクロロジベンゾ-p-ダイオキシン、2-モノクロロジベンゾフランを基質とする分解実験を行っている。抽出溶媒としてペンタンを用い、シリカゲルカラムにて夾雑物を除去、GC-ECDにて測定分析を行ったと報告している。

また、同様にダイオキシン類の生分解について検討している分析事例として、高塩化のダイオキシンでは、Takeda²⁾らが四塩化以上のダイオキシンについて生物分解実験及び分析を行っている。抽出溶媒にはヘキサンを使用し、抽出溶液を水洗した後、濃縮し、シリカゲルカラムにより夾雑物を除き、その後溶出液を高分解能ガスクロマトグラフィ-質量分析装置(HRGC-HRMS)に注入し、選択イオン検出法(SIM)にて測定が行われた。いずれの場合も内部標準物質を添加、回収率より対象とする異性体が定量されている。このように研究ベースでは、必ずしも公定法に従っているわけではないが、研究の際には回収率を示し、さらに同様の実験を数回繰り返すことで、その再現性を確かなものとしている。

本研究で用いたサンプルは、単離微生物の培養液と活性汚泥である。対象としたダイオキシン類は、塩素化されていない基本骨格、ダイベンゾ-p-ダイオキシン、ダイベンゾフラン、四塩化までのダイオキシン類をそれぞれの異性体の単体として、そしてそれ以上の高塩化のダイオキシン類混合物を使用した。分析用のクリーンアップには、四塩素以上のダイオキシン類については、環境分析マニュアルに準じて後述の通り行い、三塩素以下のダイオキシン類については分析マニュアルが無い場合 Parson¹⁾、Takeda²⁾の例に習い、迅速な測定分析に主眼を置く測定方法を選択し、最終的に内部標準物質を添加することにより、その回収率を確認した、なお定量の際、回収率を用いて、対象物質量の補正を行なった。

3. 2 分析方法

3. 2. 1 無塩素化、低塩素化ダイオキシンを基質として用いたサンプル

本研究における培養実験は、全てスクリーキャップ付きの試験管で行った。サンプルの容量は 1 mL であり、この全量からダイオキシン類を抽出した。

前処理として、菌体を取り込んでいる、あるいは付着しているダイオキシン類を菌体から分離させるために、基質には塩酸を 20mmol-H⁺以上になるように添加し、20 分おきにふりまぜながら 1 時間放置した。

それから、塩酸処理が終わった培地に蒸留水を加え、全量で 4 mL 程度になるように調整した。

この溶液にクリーンアップスパイクとして $^{37}\text{Cl}_4$ -2,3,7,8-TCDD を添加した。添加量は絶対量として 10ng とした。そしてクリーンアップスパイクを添加した試料溶液にトルエンを 500 μL 加え、密栓した後に 10 分間振とう抽出を行った。抽出後、トルエン層をパスツールピペットで分取し、3 ml 容量のミニバイアルに移し入れた。抽出は 3 回行い、それぞれのトルエン層は同じバイアルに集めた。さらに窒素気流下でトルエンを除去し、トルエン 100 μL で定容した。定容量は分析対象物質の濃度に応じて適宜濃縮（低濃度の場合）、あるいは希釈（高濃度の場合）した。最後に定容した抽出液の 2 μL を四重極質量分析計に注入し、対象物質を定量した。

3. 2. 2 高塩素化ダイオキシンを基質として用いたサンプル

高分解能 GC/MS を用いた分析はジベンゾ-p-ダイオキシンおよびジベンゾフラン全異性体を含む混合標準溶液（過去のサンプルの抽出溶液を混合溶液にしたもの）を低濃度添加し、分解実験を行った基質あるいは媒体の定量分析に適用した。

高分解能 GC/MS を用いる分析では、ダイオキシン類以外のマトリックス成分をほぼ完全に除去する必要があるため、公定法（廃棄物処理におけるダイオキシン類標準測定分析マニュアル）に従ってクリーンアップを行った。ただし、今回実験に用いた標準溶液は過去の抽出溶液であり、これはすでにクリーンアップスパイクとして $^{13}\text{C}_{12}$ ラベルの 2,3,7,8 異性体 17 種が添加されているため、クリーンアップスパイクの添加は行わず、絶対検量線により定量を行った。

粗抽出液を n-ヘキサンで分液ロートに全て洗い込んだ。分液ロート内の粗抽出液に濃硫酸を数 mL 添加し、ゆるやかに攪拌して大部分の有機物を除去した。硫酸処理は硫酸層の着色がなくなるまで繰り返し行った。硫酸処理後の抽出液は蒸留水で洗浄した。洗浄は洗浄水が中性を示すまで繰り返し行った。洗浄後の抽出液は無水硫酸ナトリウムで脱水し、なす型フラスコに移し入れ、ロータリーエバポレーターで約 1mL 程度になるまで濃縮した。濃縮液はシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、残った有機物や着色成分を除去し、さらにアルミナカラムクロマトグラフィーによりダイオキシン類と PCB 類を分離した。それから、アルミナカラムクロマトグラフィーを行った溶液をロータリーエバポレーターで濃縮し、ミニバイアルに移し入れ、窒素気流により溶媒をほとんど除去した後にトルエンで正確に 100 μL に定容した。そして定容した抽出液の 1 μL を高分解能 GC/MS に注入し、ダイオキシン類を定量した。定量対象物質は 4～8 塩素のダイオキシンおよびジベンゾフランの全異性体で、各塩素化物ごとのダイオキシンおよびジベンゾフランの総量を算出した。

なお、測定に用いた試薬、器具、機器、分析条件などの詳細は、本報告書末の添付資料に付記する。

3. 3 結果

培地中のダイオキシン類の測定結果については、慈恵会医科大学、保科研究グループに報告、第 4 章 4-1 にて、全体の研究内容の中で述べられている。また、活性汚泥中のダイオキシン類の

測定については北海道大学、古市研究グループへ報告、第5章の研究報告中にまとめられた。

3.4 考察

通常、ダイオキシン類の測定では、同一条件について複数のサンプルを同時に処理し、測定分析を行う。また、公定法に従った方法でダイオキシン類の分析を行うと結果がでるのに1ヶ月近くの期間を要する。本年度研究では、実験条件、研究期間、費用的な制約から、一条件、一サンプルの測定分析にとどまった。また、迅速性を図るため、低塩化のダイオキシン類については、内部標準物質を添加することにより中分解能の質量分析装置を用いて測定した。

高塩化のダイオキシン類の測定を行うにあたり、基本骨格への塩素結合部位は、毒性の有無に重要な問題となる。その毒性異性体を個々に評価するためには、検出系に高分解能の質量分析装置を用いることが必須となる。本研究で高分解能の質量分析装置を駆使する際、相応の測定環境(施設、器具、技術者等)が要求された。

機器分析技術の発達により、pg、fg オーダのダイオキシン類が測定可能となった現在、今後、いかに、高価な施設や器具を必要としない手法で、迅速に毒性物質を定性、定量するかが課題となるであろう。

一方で毒性評価については、機器分析のみを用いる従来の手法そのものの限界が指摘されはじめている。ダイオキシンのように非意図的に発生する種々の化学物質の中で、未知の毒性物質や、類似した構造を持つにも関わらず、毒性が大きく異なる化学物質への毒性評価を機器分析のみ頼るのは非常に危険である。

毒性評価には本来、動物実験免疫学的データの蓄積が必要であるが、それには膨大な手間と費用がかかる。理論的には210種の異性体を有するといわれるダイオキシンとその類縁化合物の問題については、便宜的に毒性換算係数を使用、毒性評価を行っている。しかし、毒性の高い異性体と低いものとの間の係数は、1000倍も異なり、高塩化の異性体については、塩素が一つ脱離するごとに、毒性が10倍高まる場合があり、懸念される。また最近換算係数の小さな、または無いダイオキシンの汚染問題もクローズアップされている。このように機器で測定した化学物質質量が、そのままサンプルの包括的な毒性と相関していないため、今後、包括的な毒性評価のできる方法も必要とされるであろう。

参考文献

- 1) Parsons, J.R. et al.: Biodegradation Pathway of 2-chlorodibenzo-p-dioxin and 2-chlorodibenzofuran in the biphenyl-utilising strain JB1. *Chemosphere*, **16**, 1915-1922 (1998).
- 2) Takeda, S. et al.: Degradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the White rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624. *Appl. environ. Microbiol.*, **62**, 4323-4328 (1996).

4章 微生物によるダイオキシン分解実験

4. 1 好熱菌によるダイオキシン分解実験および遺伝子解析

(分担研究者 保科定頼 東京慈恵会医科大学 臨床検査医学講座 講師)

4. 1. 1 研究目的

好熱菌である *Bacillus midousuji* SH2A ATCC 55926, SH2B ATCC202050 は 62 度以上の発育温度域をもち、2 分裂時間が約 5 分であることから、難分解性物質に対する微生物分解の高い速度を得るのに有効な微生物と考えられる。土壌中には多くの微生物が存在することが明らかになっており、常識的にそれらの中には難分解性の化学合成物に対する基質適合酵素を有するものが存在すると考えられる。問題はいかに経済的に、工業的に応用可能な微生物を利用できるシステムが構築でき、それに適合する微生物を利用できるかにある。

2 株のうち的一方である SH2B HB1002 株はポリエチレンシートを紫外線照射後に高速に分解できることから (医療廃棄物研究 10 巻 2 号 1998 年) 難分解化学合成物 (ダイオキシン類、PCB) の分解を試み、その遺伝子を解明することを目的とした。この研究のダイオキシン分解遺伝子解析の一部は平成 10 年度生活安全総合研究推進事業の援助で米国コロンビア大学微生物学教室 (Prof. David H. Figurski) で行った。

4. 1. 2 研究方法

(1) ダイオキシン類分解実験

微生物分解条件:

滅菌した 10 mL ガラス試験管のトリプチケースソイブイオン 1 mL にマイクロシリンジで各種ダイオキシン類をそれぞれ 1 ppm になるように希釈し溶媒 (nonan, hexane) ごと加えた。それに *B. midousuji* SH2B をトリプチケースソイブイオンで一夜培養した菌液を 10^6 になるように加え、65 度 22 時間震盪培養した。

四重極型質量分析計による分析:

四重極型質量分析計には dioxin, dibenzofuran, mono-tetra chlorodioxin 等の特定の異性体を高濃度添加し分解実験に供したものを分析した。実験後の基質はスクリュウキャップ付きの試験管内に密閉された状態で送付した。試験管内の内容物すべてを分析対象にして定量した。(測定方法は第 3 章参照)

(2) *Bacillus midousuji* 16S リボソーム RNA 塩基配列決定と相同性検索

使用した菌株と PCR プライマー:

J1= *Bacillus midousuji* SH2A HA1001

J3= *Bacillus midousuji* SH2B HB1030

U1= Universal primer for PCR amplification

5' cag cag ccg cgg taa tac 3'

U8= Universal Primer for PCR amplification

5' acg aca cga gct gac gac 3'

PCR 増幅は AmpliTaq DNA Polymerase, LD (Perkin-Elmer) を用い、その方法に準拠した。塩基配列決定は PCR 産物を直接片側プライマーを用いて dideoxy termination 法で行った (ABI PRISM)。相同性検索はデータ通信により Blast(Basic Local Arignment Search Tool) を用いて行った。

(3) *Bacillus midousuji* プラスミド DNA の精製、クローニング、塩基配列決定の方法

J1 plasmid (pSA101)(J1 strain (HA102)) の精製:

- 1) *B. midousuji* SH2A J1(HA102) の培養はトリプチケースソイブイオン 75 mL に 4 時間 65°C 新鮮培養菌を接種し 2 時間 65°C にて震盪培養した。
- 2) Sorvall GSA rotor にて 6,000 rpm(6,000x g) で遠心分離し細菌細胞を集菌する。
- 3) QIAGEN Midi Plasmid Purification protocol を用いて精製を行う。(QIAGEN Plasmid Purification Handbook, Velencia CA 91355)
- 4) プラスミド DNA の沈差を 100 μ L の精製水で溶解する。

pSA101 を *Sau* 3AI で部分消化する:

- 1) 10 μ L の pSA101 DNA, 20 μ L の NEB buffer No.1, 4 μ L の 5M NaCl, 2 μ L の酵素と 164 μ L の 精製水を混ぜる。
- 2) 15 分間 37°C でインキュベートする。
- 3) 200 μ L のエタノールを加え 15 分間、-80°C で静置する。
- 4) 12,000 rpm で 10 分間、遠心分離する。
- 5) Vacuum oven で沈差を乾燥する。
- 6) 10 μ L の 精製水で沈差を溶解する。

pUC19 の精製:

- 1) MU10 cells の新鮮培養菌液 200 μ L を 20mL の LB (50 μ g/mL Ampicillin) に加え 5 時間 37°C、恒温室で震盪培養する。
- 2) 6,000 x g で pSA101 プロトコルと同様に遠心分離する。

pUC19 の *Bam*HI 消化:

- 1) 5 μ L の pUC19 DNA, 2 μ L の NEB *Bam*HI buffer, 1 μ L の酵素と 12 μ L の精製水を混ぜる。
- 2) 1 時間 37°C でインキュベートする。

*Bam*HI で消化した pUC19 の Phosphatase 処理:

- 1) 5 μ L の *Bam*HI で消化した pUC 19, 2 μ L の NEB No.3 buffer, 1 μ L の 1/10X Calf Intestinal Phosphatase (1U), と 12 μ L の精製水を混ぜる。
- 2) 1時間 37°Cでインキュベートする。
- 3) 反応液に 1.5 μ L の 0.25M EDTA を加え 10分間 75°Cで培養し、反応を停止する。
- 4) Phosphatase 処理 *Bam*HI 消化の pUC19 をエタノール沈殿する。
- 5) それぞれのプラスミド DNA を真空乾燥しエタノール を除く。

Ligation (ライゲーション) :

- 1) 5 μ L の各 DNA, 2 μ L の Ligation buffer, 1 μ L の T4 ligase, と 7 μ L の 精製水を混ぜる。
- 2) 16°Cで一晩インキュベートする。

Transformation (トランスフォーメーション) :

- 1) 200 μ L の LB 一夜培養の DH5a 新鮮培養菌液をログ中期(O.D. 600=1.0) になるように 20mL の LB 液体培地に加え増殖する。以下のステップは氷上で行う。菌体温度がチルド状であることを常に確認する。
- 2) 菌体を 6,000 rpm、6分間、SS34 rotor で遠心分離する。
- 3) 菌体を液体培地の半量の 0.1M MgCl₂ 溶液で再懸濁する。遠心分離をくり返す。
- 4) 菌体を液体培地の半量の 0.1M CaCl₂ で再懸濁する。氷上に 20分間静置する。
- 5) 遠心分離をくり返す。菌体を液体培地の 1/10 の 0.1M CaCl₂ で再懸濁する。
- 6) 上記で作成した competent cells を数時間内で使用する。保存にあたっては滅菌 glycerol を 20% に加え、-70°Cに保つ。
- 7) 100 μ L competent cells と DNA を混ぜる。氷上に 1時間静置する。
- 8) 菌体を 90秒間、Heat shock (42°C) する。
- 9) 1-2 mL の LB を加え 1時間インキュベートし遺伝子を発現させる。
- 10) LB 寒天培地 (IPTG125mg, X-Gal20mg, Amp50 μ g/mL、500mL 培地あたり) に上記菌体を接種し(10 μ L-100 μ L プレートあたり)培養する。

4. 1. 3 研究結果

(1) ダイオキシン類分解実験

菌株 *Bacillus midousuji* SH2BJ4HB1040 を用いて行ったダイオキシン類の微生物分解試験について表 4-1 のような成績を得た。単位は pg/ μ l である。最初の投入量が 1ppm である。

Blank との相対比活性から、2 塩化体では分解活性があると考えられる。

表 4-1 ダイオキシシン類分解実験結果

基質	培養後	Blank	
NonCl-DF/1 ppm	576.9	1213.3	52.45%

基質	培養後	Blank	
2,3-DiCl-DD/SH2B/	22.5	494.8	95.4%
2,8-DiCl-DD/SH2B/	13.2	105.6	87.5%
2,8-DiCl-DD	328.4	1167	
2,3,7-TriCl-DD	12.5	31.6	60.45%
2,3,7,8-tetraCl-DD	50.4	57.5	12.35%

(2) *Bacillus midousuji* 16S リボソーム RNA 塩基配列決定と相同性検索

J1(HA1001)株は 1995 年に凍結保存された株であるが、16S ribosomal RNA の塩基配列の相同性は *Bacillus denitrificans* に近く、U1 プライマーからの塩基配列決定では 532 塩基中 528 塩基が一致した (99%: 別添資料 1-1)、U8 プライマーからの読み取りでは 534 塩基中 530 塩基が一致した (99%: 別添資料 1-2)。

一方 J3(HB1030)株は J1 を月 1 回トリプトソイ寒天培地に継代培養しつづけたもので 1998 年に凍結保存した株である。J3 株は U1 側が 303/304 (99%: 別添資料 1-3)、U8 側が 214/214 (100%: 別添資料 1-4)の一致率で、*Bacillus caldoolyolyticus* に近縁とされた。

このように、発見当時 (1995 年) の SH2A, SH2B 両株は 16S ribosomal RNA の塩基配列が同一であったものが、高温で継代培養をし続けることで、SH2B 株は塩基配列に変異を起こし、異なる菌種として誤認される可能性が確かめられた (別添資料 1-6.1-7)。そこで、発見当時の株を SH2AJ1HA1001, SH2BJ2 HB1002 とし、昨年 1998 年保存株を SH2BJ3HB1030 というように源株と変異株をデータベース化し、菌株名を系統的に統一した (別添資料 2)。ダイオキシシン類を微生物分解したのは SH2BJ4HB1040 の他、SH2BJ2HB1002, SH2BJ3HB1030 でもみられた。

(3) *Bacillus midousuji* プラスミド DNA の精製、クローニング、塩基配列決定

両株 SH2AJ1HA1001, SH2BJ2HB1002, SH2BJ3HB1030 には 1 万 8 千塩基の長さをもつ大きさのプラスミドを確認した。それらを制限酵素 *EcoRI*, *HindIII* で切断しそのバンドパターンを見ると、両者が異なることが明かとなった (別添資料 3)。さらに J2HB1002 株と J3HB1030 株のプラスミドの大きさが違ってきており、継代培養によって同じ SH2B 株のプラスミド pSB102 と pSB103 の大きさが変化することが確認された。

そのプラスミド pSA101 の DNA を pUC19 ベクタープラスミドに組み込み、ライブラリーを作成し、各クローンの DNA 塩基配列を決定する作業を行った。それらの一部のデータ解析から当該プラスミドが好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* の耐熱性プラスミド pTB19 と 80%の相同性を

見出している (別添資料 4)。

また、SH2BJ2HB1002, SH2BJ3HB1030 には 40 万塩基と 4 万 5 千塩基のプラスミドを確認した。それらを制限酵素 *EcoRI*, *HindIII* で切断しそのバンドパターンを見ると、両者が異なることが明かとなった。さらに J2HB1002 株と J3HB1030 株のプラスミドの大きさが違っており、継代培養によって同じ SH2B 株であってもプラスミド pSB102 と pSB103 の大きさが変化することが確認された。

いづれにしても、ダイオキシン類分解能がみられ SH2 株に偏在する DNA 塩基配列がプラスミドに存在することが示唆されている。

4. 1. 4 結論

新規に発見された好熱菌 *Bacillus midousuji* SH2B 株はダイオキシン類を分解し、その特徴的なプラスミド上にその遺伝子塩基配列がコードされている可能性が示唆された。当該菌は 62 度以上の発育温度域をもち、実用化時の他の環境微生物に対して優性を維持できること、ヒトへの病原性が考えられないこと、また、2 分裂時間が約 5 分であることから難分解性物質に対する微生物分解の高い速度を得るのに有効な微生物と考えられた。

研究発表

1 論文発表

保科定頼 プラスチックの紫外線照射による微生物分解のメカニズム 医療廃棄物研究 10(2):81-85 (1998)

保科定頼、成田祥子 有機汚泥の好熱菌と凍結融解処理による脱水方法の研究 医療廃棄物研究 11(1):31-38 (1998)

2 学会発表

なし

知的所有権の取得状況

1 特許取得

Columbia Innovation Enterprise, Columbia University のホームページ (<http://www.cc.columbia.edu/cu/cie/>) 別添資料参照。

2 実用新案登録

なし

3 その他 (本報告書末に添付)

別添資料 1 *Bacillus midousuji* 16S リボソーム RNA 塩基配列決定成績と相同性検索結果

別添資料 2 *Bacillus midousuji* SH2A ATCC55926, SH2B ATCC202050 菌株データベース

- 別添資料 3 Bacillus midousuji のプラスミド電気泳動像写真(J1:B.midousuji SH2A HA1001,
J2:B.midousuji SH2B HB1002)
- 別添資料 4 Bacillus midousuji SH2A のプラスミド pSA101 の DNA 塩基配列と相同性検索
- 別添資料 5 Columbia Innovation Enterprise, Columbia University のホームページ
(<http://www.cc.columbia.edu/cu/cie/>)
- 別添資料 6 米国コロンビア大学地球環境研究所(Lamont Earth Observatory)でのニューヨ
ーク、ジャマイカ湿地帯環境改善計画(The Jamaica Bay Meeting)での口頭発
表抄録 1999年2月1日
座長 Dr. Arnold L. Gordon(agordon@ldeo.columbia.edu) Lamont Earth
Observatory, Columbia University

4. 2 コブラナPCB分解菌によるダイオキシン類の分解実験

(研究分担者 惣田昱夫 神奈川県環境科学センター環境工学部 専門研究員)

4. 2. 1 研究目的

ダイオキシン類の分解処理方法として安全で、安価な処理方法として期待されているのが微生物を用いて各種汚染土壌等を浄化するバイオレメディエーション技術である。このバイオレメディエーション技術を用いて、ダイオキシン類汚染土壌等の浄化を行いうる、しかも現場で利用できるための技術を開発するためダイオキシン類を分解する微生物を分離し、その特徴を明らかにするとともに、それらの分解菌を用いて広域的な汚染土壌を処理する技術とともに条件を解明し、ダイオキシン類を高濃度に含有する焼却灰や汚染土壌等をオンサイトで処理できる技術の開発を目指している。ここでは PCB 分解菌として先に分離した 11 種の菌種¹⁾を用いてノンクロルダイベンゾフラン及び PCB 異性体間の分解を調べダイオキシン類を効率よく分解するための考察を行った。

4. 2. 2 実験材料及び実験方法

(1)ダイオキシン類分解菌の選定

ダイオキシン類をよく分解する菌株を何種類か選別するため、PCB 分解菌としてこれまでに分離された 11 種類の菌株¹⁾を用いて、その分解力等について調べた。

(2)分解条件の検討及び分解化学物質の選定

ダイオキシン類の分解菌株の選定には、ダイオキシン類の骨格を持つノンクロルのダイベンゾフランとダイオキシン類似化学物質であるコブラナ PCB を多く含む KC-400 を用いた。

(3)培養及び分解条件

25°C、96 時間で前培養した 11 種類の菌を 12000rpm、10 分間で遠心した沈殿物を 50mL の培養フラスコに 25mL の PAS 培地²⁾に入れ、ノンクロルダイベンゾフラン及び KC-400 を最終濃度が 10ppm となるよう調整した培養液を 25°C、72 時間 100rpm で振とう培養した。培養後、12000rpm、10 分間で遠心分離し、上清液と沈殿物に分離した。上清液は等量のトルエンを分液ロートに入れ、5 分間で振とうさせ静置した後、トルエン層を分離した (3 回繰り返した)。沈殿物に純水を 10mL 入れ超音波で破碎後、硫酸と硝酸を適量入れ菌体を溶解させた。この試料に 10mL のトルエンを加え、5 分間で振とう抽出した (3 回繰り返した)。両抽出液を合量した後、エバポレーターで濃縮し 1mL に定容した。前記と同条件で回収率試験も行った。

(4)分析条件

上記試料の分析は DB-1 (J&W Science Co.) 付き GC-16A ECD-GC (島津製作所 (株)) 及び HP-5400 GC/MS (HP 製) を用いて行った。PCB の分析条件は、カラム温度 200°C、スプリットレスで分析した。ノンクロルダイベンゾフランの定量は FID-GC を用いた。分析条件は以下の通りとした。スプリットレス、40°C 2min 保持後、10°C/min で 200°C まで昇温した。

4. 2. 3 結果及び考察

(1)ノンクロルダイベンゾフランの分解能

PCB 分解菌 11 菌株を用いてノンクロルダイベンゾフラン及び PCB の分解を行った結果は表