

Table 1. Serum and Indoor Air Concentrations of *p*-Dichlorobenzene Sampled from Patient A

Time point	Date	Concentration	
		Serum (ng/ml)	Indoor air (ppm) ^{a)}
1	January 2002	25.4	— ^{b)}
2	May 2002	— ^{b)}	0.35
3	September 2002	8.0	0.10
4	December 2002	12.0	0.036
5	June 2003	19.3	0.008

a) Samples were collected in the bedroom. b) Not measured.

as possible. At time point 3, the concentrations of *p*-dichlorobenzene in her serum and her bedroom decreased to 8.0 ng/ml and 0.10 ppm, levels 1/3.2 and 1/3.5 of those at time point 2, respectively. Some improvement in her symptoms was observed at time point 3. The concentration of *p*-dichlorobenzene in her bedroom still exceeded the GLV at that time.

As further countermeasures, clothes in drawers were aired together with facilitating the ventilation of the living room and her bedroom. At time point 4, the concentration of *p*-dichlorobenzene in her bedroom decreased to 0.036 ppm, a level 1/2.8 of that at time point 3, and less than the GLV, whereas the serum level was 12.0 ng/ml, 1.5-fold higher than at time point 3. Recovery continued at time point 4. At time point 5, she reported a relapse. The concentration of *p*-dichlorobenzene in her serum again increased to 19.3 ng/ml, although that in her bedroom decreased to 0.008 ppm. It became apparent that she had frequently visited a friend's house to babysit for 2 or 3 months before time point 5. When she entered the house, she always developed a headache due to the strong odor. The elevation of serum *p*-dichlorobenzene level was presumably caused by exposure at the friend's house. We advised her not to enter the house.

As *p*-dichlorobenzene is used widely in moth repellent, air fresheners, and deodorizers, elevated serum *p*-dichlorobenzene levels may be caused by the common use of these products. The excretion of *p*-dichlorobenzene may be slower than that of other VOCs, such as toluene, xylene, *etc.* At time point 4, the serum *p*-dichlorobenzene level was still high (12.0 ng/ml) although the level of *p*-dichlorobenzene in her bedroom was greatly decreased (from 0.35 to 0.036 ppm). One of the reasons for the elevation of her serum *p*-dichlorobenzene level is that she may be a poor metabolizer. Additionally, she was suspected of having multiple chemical sensitivity because her condition was unstable due to the occasional and accidental

exposure to nonspecific odors. Multiple chemical sensitivity shows diverse symptoms triggered by extremely small quantities of variable chemicals in indoor air.

It has been reported that *p*-dichlorobenzene causes adverse effects among exposed populations, particularly in those with occupational exposure.⁸⁾ The Japan Society for Occupational Health recommends the Occupational Exposure Limits (OELs) as reference values for preventing adverse health effects on workers caused by occupational exposure to chemical substances, continuous or intermittent noise, *etc.*, in which the OEL of *p*-dichlorobenzene is 10 ppm.⁹⁾ On the other hand, nonoccupational GLV for an indoor concentration of *p*-dichlorobenzene in Japan is 0.04 ppm.⁴⁾ The relationship between SBS symptoms and *p*-dichlorobenzene exposure or serum level of *p*-dichlorobenzene has not been reported. The widespread exposure of populations to *p*-dichlorobenzene requires more detailed investigation.

Case 2

Table 2 shows the summary results of serum VOC concentrations in patient B together with those of four other patients with other onsets such as moving into a new or newly remodeled house. The serum 2-ethyl-1-hexanol concentration of patient B was 4.6 ng/ml, the highest of the seven VOCs analyzed in this study, and was more than 7.7-fold higher than in the other four patients. Table 3 shows the summary results of sample analysis of patient B's breathing-zone air, and indoor air in an office and a seminar room mainly used by patient B together with her home, for seven of the 41 VOCs examined. 2-Ethyl-1-hexanol was detected in her breathing-zone air (18 µg/m³), indoor air in her office (13 µg/m³), and a seminar room (44 µg/m³), while 2-ethyl-1-hexanol was not detected in indoor air in her home. These results suggest that her el-

Table 2. Serum VOC Concentrations of Patient B and Four Other Patients

VOCs	Concentration (ng/ml)				
	Patient B ^{a)}	Other patients			
		1	2	3	4
2-Ethyl-1-hexanol	4.6	0.6	<0.5	0.5	0.6
<i>p</i> -Dichlorobenzene	1.9	<0.5	<0.5	1.0	<0.5
Toluene	0.4	0.2	0.5	0.1	0.1
Benzene	0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Xylene	<0.1	<0.1	0.2	0.1	0.1
Ethylbenzene	<0.1	<0.1	0.1	<0.1	0.1
Styrene	<0.1	<0.1	0.1	<0.1	<0.1

a) Blood was drawn after the sampling of breathing-zone air and indoor air were finished.

Table 3. Selected VOC Concentrations of Patient B's Breathing-zone Air, and Indoor Air in an Office, a Seminar Room and Her Home

VOCs	Concentration ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)			
	Breathing-zone air	Indoor air		
		Office	Seminar room	Home (living)
2-Ethyl-1-hexanol	18	13	44	<2.8
<i>p</i> -Dichlorobenzene	20	<2.8	3.8	110
Toluene	54	49	49	23
Benzene	6.7	5.1	5.4	6.6
Xylene	10	9.9	9.8	18
Ethylbenzene	9.5	9.2	9.6	9.0
Styrene	<2.8	<2.8	<2.8	<2.8

evated serum 2-ethyl-1-hexanol level was due to daily exposure in the university building.

The increase in 2-ethyl-1-hexanol in indoor air is a sign of dampness-related alkaline degradation of di-(2-ethylhexyl) phthalate used in building material for glue or in carpets with a polyvinyl chloride backing.¹⁰⁾ The presence of 2-ethyl-1-hexanol is recognized in European countries and the U.S.A. as an indoor air pollutant.⁷⁾ A possible relationship between SBS symptoms and indoor air 2-ethyl-1-hexanol has been reported, although the maximum indoor air concentration of 2-ethyl-1-hexanol was relatively low (20–30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$).^{11,12)} Additionally, *p*-dichlorobenzene was detected both in patient B's serum (1.9 ng/ml) and indoor air in her home (110 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) but not in indoor air in the university building. It is assumed that *p*-dichlorobenzene is not responsible for her symptoms because she does not usually experience from respiratory symptoms while at home.

Measuring chemicals in blood is advantageous because we can calculate the body burden precisely. Blood levels of VOCs are known to be good predictors of VOC exposure, even though metabolism and excretion decrease levels over time.¹³⁾ It should also be noted that the half-life of VOCs in blood

is generally short, indicating that the data reflect only recent exposure.¹⁴⁾ We found no relationship between serum VOC levels and SBS symptoms in the patients studied in our previous report.⁶⁾ In the present study, we found two sensitive patients who had elevated serum levels of *p*-dichlorobenzene and 2-ethyl-2-hexanol; however, it is not an indoor environmental evaluation as such. At present, there is no universally accepted clinical definition of SBS and no adequate theory for its occurrence, although there are several theories.¹⁵⁾ It is likely that SBS is multifactorial in origin, related to various factors and exposures.¹⁾ Further investigations are needed to evaluate the relationship between serum VOC levels and SBS symptoms.

Acknowledgements This study was supported by Health Sciences Research grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. The authors are very grateful to Dr. K. Watanabe, Watanabe Kazuhiko Pediatrics Clinic, Sapporo, Japan, for collecting blood samples.

REFERENCES

- 1) Redlich, C. A., Sparer, J. and Cullen, M. R. (1997) Sick-building syndrome. *Lancet*, **349**, 1013–1016.
- 2) Hodgson, M. (2002) Indoor environmental exposures and symptoms. *Environ. Health Perspect.*, **110**, 663–667.
- 3) Torii, S. (2002) Sick house syndrome (in Japanese). *Nippon Rinsho*, **60** (Suppl 1), 621–627.
- 4) Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (2001) Committee on sick house syndrome: indoor air pollution progress report no. 3.
- 5) Saijo, Y., Kishi, R., Sata, F., Katakura, Y., Urashima, Y., Hatakeyama, A., Kobayashi, S., Jin, K., Kurahashi, N., Kondo, T., Gong, Y. Y. and Umemura, T. (2004) Symptoms in relation to chemicals and dampness in newly built dwellings. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **77**, 461–470.
- 6) Kondo, F., Ikai, Y., Goto, T., Ito, Y., Oka, H., Nakazawa, H., Odajima, Y., Kamijima, M., Shibata, E., Torii, S. and Miyazaki, Y. (2006) Serum levels of volatile organic compounds in patients with sick building syndrome. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **77**, 331–337.
- 7) Kamijima, M., Sakai, K., Shibata, E., Yamada, T., Ito, S., Ohno, H., Hayakawa, R., Sugiura, M., Yamaki, K. and Takeuchi, Y. (2002) 2-Ethyl-1-hexanol in indoor air as a possible cause of sick building symptoms. *J. Occup. Health*, **44**, 186–191.
- 8) Hill, R. H. Jr., Ashley, D. L., Head, S. L., Needham, L. L. and Pirkle, J. L. (1995) *p*-Dichlorobenzene exposure among 1000 adults in the United States. *Arch. Environ. Health*, **50**, 277–280.
- 9) Japan Society for Occupational Health (2004) Recommendation of occupational exposure limits. *J. Occup. Health*, **46**, 329–344.
- 10) Hodgson, A. T., Wooley, J. D. and Daisey, J. M. (1993) Emissions of volatile organic compounds from new carpets measured in a large-scale environmental chamber. *Air Waste*, **43**, 316–324.
- 11) Wieslander, G., Norbäck, D., Nordström, K., Wälinder, R. and Venge, P. (1999) Nasal and ocular symptoms, tear film stability and biomarkers in nasal lavage, in relation to building-dampness and building design in hospitals. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **72**, 451–461.
- 12) Norbäck, D., Wieslander, G., Nordström, K. and Wälinder, R. (2000) Asthma symptoms in relation to measured building dampness in upper concrete floor construction, and 2-ethyl-1-hexanol in indoor air. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, **4**, 1016–1025.
- 13) Mannino, D., Schreiber, J., Aldous, K., Ashley, D., Moolenaar, R. and Almaguer, D. (1995) Human exposure to volatile organic compounds: a comparison of organic vapor monitoring badge levels with blood levels. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **67**, 59–64.
- 14) Etzel, R. A. and Ashley, D. L. (1994) Volatile organic compounds in the blood of persons in Kuwait during the oil fires. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **66**, 125–129.
- 15) Mandell, M. J. (1993) Non-specific symptoms in office workers: a review and summary of the literature. *Indoor Air*, **4**, 227–236.

特集 ホルモン療法 UP TO DATE

内分泌かく乱化学物質による女性への影響

Endocrine disruptors and female reproductive function

牧野 恒久

MAKINO Tsunehisa

医療法人社団不二芳静会東部病院 院長 / 東海大学医学部産婦人科 元教授

つい10年ほど前まで耳目をそばだてた内分泌かく乱化学物質、いわゆる環境ホルモンの話題は、今日終焉を迎えたような感がある。しかしながら真に信頼しうる再現性のある測定法を開発して新たに検討してみると、従来の報告とは異なる結果がしばしば得られる。これら正確な生体暴露量に基づいた生体への影響の研究は、この意味では端緒についたばかりとも言える。

Key Words

内分泌かく乱化学物質, 環境ホルモン, ビスフェノールA, フタル酸エステル, ノニルフェノール, イソフラボン

はじめに

20世紀の後半から、有機塩素系農薬、プラスチック容器の可塑剤、洗浄剤中の界面活性剤などが生体の内分泌系をかく乱して、人の健康に影響を及ぼすことが懸念されてきた。しかしながら内分泌かく乱化学物質いわゆる環境ホルモンに対する社会の関心は、今世紀に入ってやや薄れた印象を持つ。かつてのように、われわれの周囲を取り巻くすべての物質があたかも生殖現象に深刻なホルモン影響をもたらすという懸念は徐々に払拭され始めた結果だろう。内分泌かく乱化学物質としてリストされた膨大な物質群も次第に整理されてきた。

内分泌かく乱化学物質については、世論の沈静化とは別に、科学的に未解明の点も多く残されており、健康影響への懸念が完全に払拭されたわけではない。このなかで現在もいくつかの物質についてはそのリストから外されることなく、着実な

研究が継続されている。

内分泌かく乱化学物質とは

内分泌かく乱化学物質をどのように定義するか議論が多い。その理由の一つに、化学物質と内分泌系の相互作用が必ずしも明らかになっていないことがあげられる。そのなかで、世界保健機構・国際化学物質安全性計画（WHO/PCS）では「内分泌系の機能をを変化させることにより、健全な生物固体やその子孫、あるいは集団の健康に有害な影響を及ぼす外因性化学物質または混合物」と定義している。

また、1997年2月に開催されたスミソニアン・ワークショップでは「生体の恒常性、生殖、発生あるいは行動に関与する種々の生体内ホルモンの合成、分泌、体内輸送、結合、そしてそのホルモン作用そのもの、あるいはそのクリアランスなどの諸過程を阻害する性質を持つ外来物質」とも定義されてきた。

その代表的な物質の一つがビスフェノールAである。本物質は衆知のようにプラスチックの原料としてわが国でも年間数十万トンの工業生産があるものと見なされている。プラスチックそのものが日常の生活に欠くことの出来ないものでありいまだ重要視されている。

プラスチックはさまざまな形に整形されて使用に供されるが、プラスチックの可塑剤としてフタル酸は欠かせない。この物質もわが国の年間の工業生産は数十万トンを下らない。

われわれの日常使用する生活器具のなかで、界面活性剤の存在は欠かせない。その中心的な物質として、ノニルフェノールは年間数万との工業生産が記録されている。

工業生産物質ではないが、日常の食生活、とくに日本人の食事に欠かせない大豆ならびにその食製品に含まれるいわゆる植物エストロゲンとくにイソフラボンについては社会の関心は高い。

数ある内分泌かく乱化学物質のなかで、本稿ではこれらの物質について女性の体内動態を中心に考えてみたい。

■ ■ ■ まず最初に測定法ありき

かつて内分泌かく乱化学物質が社会の耳目を集めた現象の背景には、動物・魚類の性器の奇形、

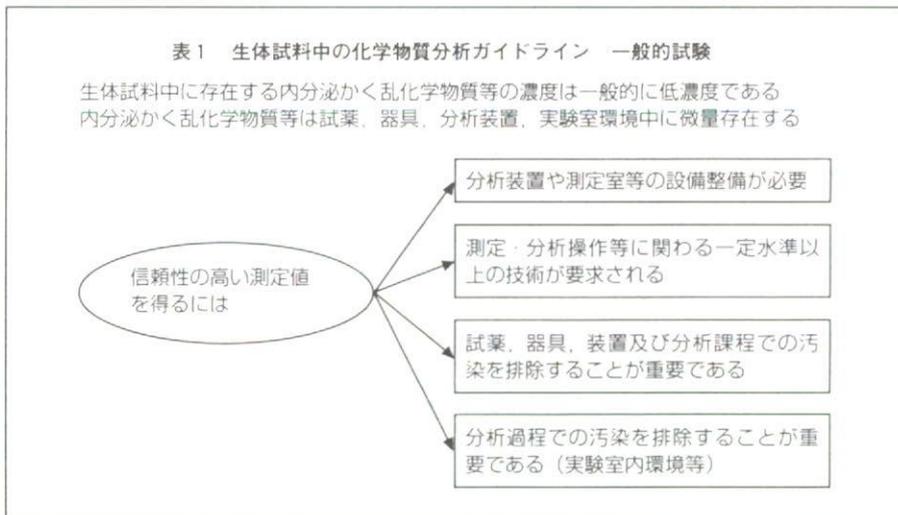
一方に偏った性比の報告などがあった。あたかも工業製品のまっただなかにいる人類の次世代が、滅びかねない印象をマスコミが書き立てた結果である。

世論の沈静化はそれぞれの報告の再現性が意外と乏しいことから始まったと思われる。具体的には生体に存在すると言われた内分泌かく乱化学物質を再測定してみると必ずしも報告された濃度と一致しない事例が続出した。また一方で、測定感度以下とされた物質が、新しい測定法では全例に認められるケースも出てきた。

このように、内分泌かく乱化学物質と女性の健康を議論の前に、まず感度と特異性に優れたスタンダードな測定法を開発する必要がある。続いて、生体周囲の暴露量、生体内濃度、出来得れば母児間の濃度勾配など慎重な検討が必要だろう。われわれは内分泌かく乱化学物質の測定に際して、これまで第1表のような注意を払ってきたのでここに掲げた。

■ ■ ■ 信頼性の高い測定法の開発と測定結果¹⁾

われわれは内分泌かく乱化学物質の女性への影響を検討するに当たり、平成11年度より国の厚生科学研究としてまずいくつかの物質の測定にあたり、真に信頼性のある測定法を開発して、厚生労



働省の測定法のガイドラインとして報告してきた。測定法開発中に判明したことは、分析装置を含め、測定室そのものの整備が重要で、しばしば測定室の外側にある廊下、隣室などの影響を受けることが判明した。測定室内でも、試薬、器具類、測定装置など測定過程での汚染の排除も信頼しうる測定値を得るためには必要である。血液、尿などの測定試料採取の際、採取器具や採取現場からの汚染に十分注意を払う。

1. ビスフェノール A (BPA)

従来のエチル誘導体化 GC/MS 測定法を用いて、45人のボランティアの母乳、末梢血、腹水、臍帯血など105試料を測定してみるとすべて測定感度以下であった。一方、いわゆる ELISA を用いる

と、極めて高い濃度で検出される。

そこで新たに試料を臭化ペンタフロロベンジルを用いてベンジル化し、LC/MS および GC/MS を用いる方法を開発し、感度・特異性に優れる測定結果を得た。

その結果、第2表にまとめたように、ヒトの血清を中心とした試料の測定の場合、必要サンプル量は約1 ml、この LC/MS/MS による検出限界は0.1ppb、定量限界は0.5ppb となった。

既知濃度の摂取検討では、ビスフェノール A は消化管からすみやかに吸収され、摂取量の80～97%が24時間以内に尿中へ排泄された。したがって、本物質の人体への暴露を評価する場合、血中濃度よりは尿中濃度のほうが意義があるものと思われる。また本物質の遊離体のみ測定ではなく、

表2 生体由来試料中 BPA, DEHP, NP 測定
基礎データ用ヒトサンプル

	基礎データ				
	必要サンプル量	測定法	ブランク値	検出限界	定量限界
BPA	1 ml	LC/MS/MS	1.5ppb (n = 8)	0.1	0.5
DEHP	1 ml	GC/MS	5 ppb (n = 20)	3	10
NP	1 ml	LC/MS	< 5 ppb	2	5

(牧野ら)

表3 生体由来試料中 BPA, DEHP, NP 測定
非妊娠女性サンプル

	血清		腹水	
	検出頻度	検出範囲	検出頻度	検出範囲
BPA	2/118	N. D. ~1.7ppb	0 /118	N. D.
DEHP	12/118	N. D. ~32ppb	4 /118	N. D. ~35ppb
NP	38/118	N. D. ~25ppb	9 /118	N. D. ~19ppb

妊娠関連

	母体血		臍帯血	
	検出頻度	検出範囲	検出頻度	検出範囲
BPA	0/51	N. D.	0 /51	N. D.
DEHP	4/51	N. D. ~41ppb	1 /41	N. D. ~29ppb
NP	1/51	N. D. ~8.2ppb	7 /41	N. D. ~15ppb

(牧野ら)

抱合体を含めた総量での意味付けが重要であることも判明した。

以上の結果、本物質は第3表に示すように非妊婦血中にわずか2例に検出されたのみで、妊娠時の母体血、臍帯血、腹水には検出されなかった。

2. フタル酸

フタル酸はヒトの体内で、各種のエステル類に分解されるため、対象測定物質の選択がまず重要である。われわれの研究のなかから、ここではフタル酸ジ2-エチルヘキシル (DEHP) を中心に解説する。

フタル酸エステル類は測定室を含めて生活環境のなかで数多く存在するため、その測定過程に容易に混入し、分析値のバックグラウンド値に影響し、しばしば過剰評価の落とし穴がある。したがって本物質の測定には測定・分析過程でのコンタミネーションの低減化をはからなければ信頼しうる値は得られない。

われわれは GC/MS 法を用いて極めて精度の高い測定法を開発した。DEHP の場合、第2表に示すように、血清試料は約1 ml で、検出限界3 ppb、定量限界10ppb である。

本法を用いた測定結果を第3表にまとめた。DEHP は非妊婦の血清、腹水、母体血、臍帯血いずれにおいても、数例ずつ検出されたが、いずれの例も40ppb 以下であった。

3. ノニルフェノール (NP)

アルキルフェノール類とくに4-ノニルフェノールは界面活性剤として広く日常生活のなかで用いられ、環境ならびに生体への汚染が進行しているものと推定される。

前2物質と同じく測定のバリデーションすなわち精度管理を一層厳しくしたカラムスイッチング LC/MS 法を開発して検討した結果、ヒト試料約1 ml に対して、検出限界2 ppb、定量限界5 ppb の測定法が得られた (第2表)。

NP の測定結果を第3表に示した。非妊婦血清、腹水、母体血、臍帯血いずれからも41ppb 以下の

値で本物質は検出された。

植物エストロジェン (とくにイソフラボン)

大豆は日本人にとって長い間摂取してきた欠かせない食品の一つである。大豆ならびに大豆食品はその長い食経験から、通常の範囲で摂取する限り、有用で安全な食品と目されてきた。大豆のなかには、いわゆる植物エストロジェンとして、ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテインならびにそれぞれのアセチル体、サクニル体、マロニル体など10種以上の成分が含まれる。最近の健康食品ブームに乗って、大豆イソフラボンアグリコンを含む特定保健用食品、大豆イソフラボンを濃縮、強化した食品、錠剤、カプセルなどが市場に氾濫してきて、平成18年5月11日に内閣府食品安全委員会から「大豆イソフラボンを含む特定健康食品の安全評価の基本的な考え方」が通知された。

イソフラボンの測定には、HPLC と LC/MS の2法がある。前者は多量のイソフラボンを含む食品の分析には良いが、ヒトの血中、尿中の微量なイソフラボンまで測定するには後者の方が遙かに優れている。

われわれは平成11年に感度・特異性に優れた LC/MS 法を開発し²⁾、食品ならびに生体試料について広く検討した。その結果、平成8～10年の4年間にそれぞれ検討したトータルダイエット法にもとづく分析では、日本人は一日平均約35mg のイソフラボンを摂取していることを見いだした。

イソフラボンの体内動態をこの方法で測定・分析すると尿中からはダイゼイン、ゲニステイン、グリシテインが比較的高い濃度で検出され、血清中からは数例にごく微量 (1 ppb 以下) が検出されたのみであった。

おわりに

以上、内分泌かく乱化学物質の中から代表的な4物質について、最も信頼しうる測定法を用いた測定結果を示した。これらの生体内濃度が女性の

健康へどのような影響を及ぼすか、これら暴露量に基づいた研究はこれからの課題である。Epi-

netic な手法を用いた検討結果は別の機会にその詳細を述べたい。

文 献

- 1) 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
平成15年度総括・分担研究報告書 「試料分析の信頼性確保と生体暴露量のモニタリングに関する研究」 主任研究者 牧野恒久
- 2) 厚生労働省科学研究補助金 生活安全総合研究事業

平成11年度研究成果報告書 「内分泌かく乱化学物質に関する生体試料分析法の開発とその実試料分析結果に基づくヒト健康についての研究」 主任研究者 牧野恒久

報 文

超臨界流体抽出-高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法によるハウスダスト中パーフルオロ化合物の定量

勝又 常信¹, 中田 彩子¹, 岩崎 雄介¹, 伊藤 里恵¹,
齊藤 貢一¹, 中澤 裕之¹*

パーフルオロ化合物 (PFCs) は、テフロン加工や撥水剤などとして日常で広く使われているが、催奇形性や甲状腺ホルモン攪乱作用などが報告されており、ヒトへの暴露影響が懸念されている。本研究では、PFCs のヒトへの暴露源としてハウスダストに着目し、超臨界流体抽出法と高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による、パーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) など 4 種類を測定対象とした高感度分析法の構築を検討した。本法によるハウスダスト中 PFCs の検出限界は、0.58~0.72 ng/g であった。また添加回収試験の結果は、平均回収率 97.9% 以上 (相対標準偏差 < 5.8%) と良好な結果が得られた。本法を一般家庭で得られたハウスダスト 20 検体の分析に適用したところ、PFOS、パーフルオロオクタン酸及びパーフルオロノナン酸がすべての検体から検出された。

1 緒 言

パーフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) やパーフルオロオクタン酸 (PFOA) を代表とする、パーフルオロ化合物 (PFCs) は直鎖状に並んだ炭素原子すべてにフッ素原子が結合しており、末端にスルホン酸基又はカルボン酸基を有する構造をしている (Fig. 1)。PFCs は「水を弾くと同時に油も弾く」という特殊な性質を持っており、PFOS は、界面活性剤、撥水剤及び消泡剤等として用いられている。このように、PFCs は我々の生活環境中に広く利用されてきたが、近年、環境汚染報告^{1)~3)}や生物への影響^{4)~6)}などが報告され、新たな環境汚染物質として注目されている。

PFOS 及び PFOA は自然環境において PFCs 類縁物質の最終分解物であるとされ、非常に安定であることが報告されている^{7)~9)}。PFCs のヒト血清中での半減期は PFOS が 8.70 年、PFOA が 4.37 年と長く¹⁰⁾、血しょうタンパク質と結合して血液中に蓄積しているという報告がされている¹¹⁾¹²⁾。実験動物に対する影響としては、催奇形性、甲状腺ホルモンへの影響⁴⁾⁵⁾及び脂肪酸代謝障害の誘発⁶⁾があり、ヒト臍帯血を介しての胎児移行性が報告¹³⁾されている。そのため、ヒトへの影響が懸念されており、血液試料 (血しょう、血清)^{14)~16)}や肝臓¹⁷⁾といったヒト生体試料を用いた、PFCs のヒト暴露量評価が行われてきた。特に PFOS は報告されているほぼすべてのヒト血液から検出さ

れており、PFOA も高頻度に検出されることが報告されている^{14)~16)}。そのため、ヒト暴露源の解明が求められている。

現在、PFCs の環境汚染報告としては、汚泥¹⁾、環境水²⁾、大気³⁾などがあるが、PFCs は非常に低濃度であり、暴露源として評価するのは困難である。そこで本研究では、日常生活環境に常に存在し、クロロピリホスやジクロロホスなどを含むハウスダスト¹⁸⁾に着目し、ハウスダスト中 PFCs を測定することとした。ハウスダスト中の PFCs の測定と

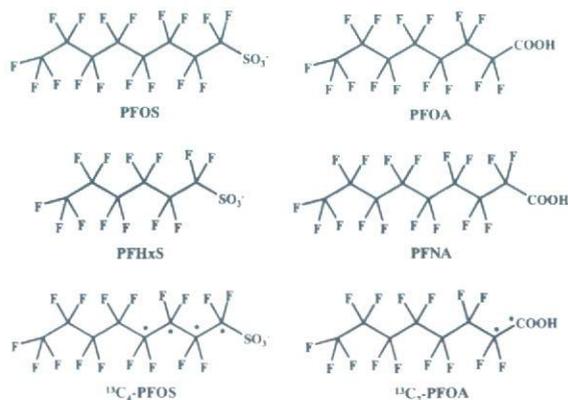


Fig. 1 Structures of analytes and the internal standard
PFOS: Perfluorooctanesulfonate; PFOA: Perfluorooctanoic acid; PFNA: Perfluorononanoic acid; PFHxS: Perfluorohexanesulfonate; ¹³C₄-PFOS: Perfluoro-[1, 2, 3, 4-¹³C₄]octanesulfonic acid; ¹³C₂-PFOA: Perfluoro-[1, 2-¹³C₂]octanoic acid (*: stable carbon isotope, ¹³C)

¹ 星薬科大学薬品分析化学教室: 142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

Table 1 Mass transitions monitored and MS/MS conditions

Compound	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Cone voltage /(-V)	Collision energy /eV
PFOS	499	80	60	65
PFOA	413	369	14	11
PFNA	463	419	18	10
PFHxS	399	80	48	40
¹³ C ₄ -PFOS	503	80	60	65
¹³ C ₂ -PFOA	415	370	14	11

してMoriwakiらの報告¹⁹⁾があり、これは、集塵¹⁾バックに集めたダストからプラスチックや髪の毛などを除外したものを測定試料とし、メタノールにて超音波抽出を行っている。回収率はPFOSが89%、PFOAが73%となっており、検出値はPFOSが11~2500 ng/g、PFOAが70~3700 ng/gと報告している。本研究での抽出には食品中残留農薬の抽出に応用²⁰⁾されており、抽出溶媒に二酸化炭素を用いるため、労働衛生や測定環境に対し、非常に衛生的な超臨界流体抽出法を使用することとした。

環境及び生体試料中のPFCs測定には、高速液体クロマトグラフィー/質量分析法(LC/MS)²¹⁾²²⁾及び高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC/MS/MS)^{11)~13)23)}が用いられている。ハウスダスト中には多くの化学物質が存在するため、測定法にLC/MS/MSを使用し、内標準物質に¹³C₄-PFOS及び¹³C₂-PFOAを用いることにより、高精度かつ高感度な分析法を構築する。

2 実 験

2.1 試 薬

パーフルオロオクタンスルホン酸カリウム塩(PFOS⁻K⁺, >98%), パーフルオロオクタン酸(PFOA, >90%), パーフルオロノナン酸(PFNA, >98%)はFulka製, パーフルオロヘキサンスルホン酸ナトリウム塩(PFHxS⁻Na⁺, >98%)はWELLINGTON製を用いた。内標準物質として用いた¹³C₂-PFOA(98.1%)はPerkin Elmer製, ¹³C₄-PFOS⁻Na⁺(>98%)はWELLINGTON製を用いた。超純水は日本ミリポア製Milli-Qの超純水装置で調製したものを、アセトニトリル, メタノール, 2-プロパノールは、和光純薬製HPLC用及び残留農薬試験用を使用した。ナイロンメンブランフィルター(0.2µm, 13mm)は、日本ボール製を用いた。

2.2 標準溶液の調製

PFOS, PFOA, PFNAの標準液はそれぞれの標準品をアセトニトリルに溶解させ、1.0 mg/mlの溶液を調製した。PFHxSは0.05 mg/mlのメタノール溶液を用いた。標準溶液を水/メタノール=50/50(v/v)で適宜希釈して、0.50~100 ng/mlの範囲で測定用試料を調製した。

2.3 装置及び分析条件

LC/MS/MSは、Waters製Quattro microシステムを用いた。注入量を20µlとし、ガードカラムに関東化学製のMightysil RP-18 GPプレカラム(2.0×5mm, 5µm)を用い、分析カラムにGLサイエンス製Inertsil ODS-3(2.1×50mm, 5µm)を使用した。また、カラム恒温相は40℃に設定した。

超臨界流体抽出装置は、日本分光製SFC system SUPER 201型(送液ポンプ:SFE/C-201, カラム恒温相:CO-965, 冷却器:CH-201, 背圧制御装置:880-81)を用いた。また、カラム恒温相は40℃に設定した。

MS/MSのイオン化法は、エレクトロスプレーイオン化法(ESI)のネガティブイオンモードを採用し、検量線及び実試料の測定は、Multiple Reaction Monitoring(MRM)モードで行った。MS/MS条件としては、デソルベーション温度及びソース温度をそれぞれ350℃, 100℃とし、コーンガス流量及びデソルベーションガス流量を50 l/hr, 350 l/hrとした。また、キャピラリー電圧を-600Vに設定した。コーン電圧及びコリジョンエネルギーをPFOS:-60V, 65eV, PFOA:-14V, 11eV, PFNA:-18V, 10eV, PFHxS:-48V, 40eV, ¹³C₄-PFOS:-60V, 65eV, ¹³C₂-PFOA:-14V, 11eVに設定した時、モニタリングイオンはそれぞれ、PFOS:*m/z* 499→80, PFOA:*m/z* 413→369, PFNA:*m/z* 463→419, PFHxS:*m/z* 399→80, ¹³C₄-PFOS:*m/z* 503→80, ¹³C₂-PFOA:*m/z* 415→370であった。測定条件の概要をTable 1に示す。

移動相は1 mM酢酸アンモニウムを添加した水/アセトニトリル(v/v)混液を用い、流量0.2 ml/minで送液し、測定時間0~9分にかけて、アセトニトリル含量を10~70%にグラジエント溶出して行った。

2.4 測定試料の調製法

ハウスダスト試料は、一般家庭の掃除機により、集塵バックに集められたダストを用いた。得られたダストを1 mmふるいと75 µmふるいにて分け、粒子径75 µm~1.0 mmの領域を使用した。ハウスダストの定義として、生物学上ではダニの住む範囲と決められており、1 µm~1 mmの範囲となっている²⁴⁾。しかしながら、75 µm以下の

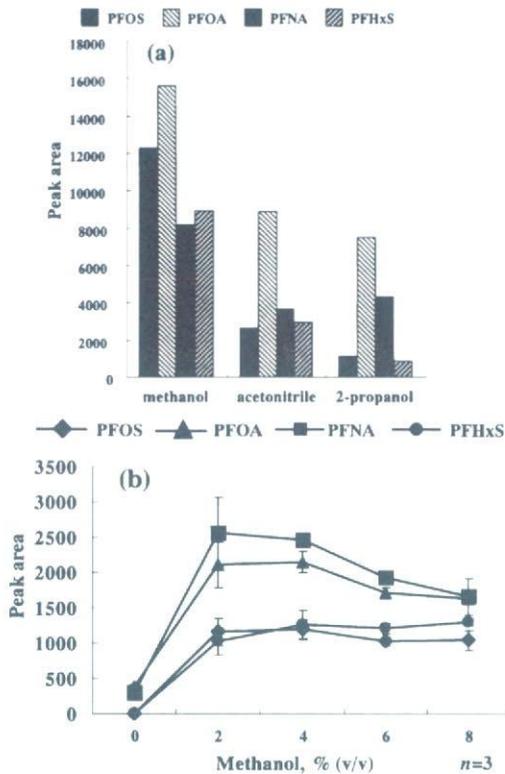


Fig. 2 Effect of (a) modifiers and (b) modifier concentration on extraction of PFCs for house dust

SFE conditions; (a) flow rate of CO_2 : 4.80 ml/min, modifier: 0.20 ml/min (4 v/v%), pressure: 190 kg/cm², extraction time: 60 min; (b) flow rate of CO_2 and methanol: 5.0 ml/min, pressure: 190 kg/cm², extraction time: 60 min

ダストは大気中に浮遊している可能性があり、回収は困難であることと、屋外由来の塵が多く含まれることから75 μm 以下のダストは対象外とした。また、1 mm以上のダストにはプラスチック、ガラス、木くずや虫などが入っている可能性があり、0.5 gを採取した場合、粒子径のバラツキが考えられ、本研究では上限と下限を設けた。ハウスダスト試料を0.5 g採取し、超臨界流体抽出用セルに充填し、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製した内標準物質を0.5 ml添加した。抽出溶媒である二酸化炭素とモディファイヤーであるメタノールを4 v/v%添加し、合わせて流量5.0 ml/minで1時間送液することで抽出した。抽出液を55℃の水浴上にて窒素気流下で蒸発乾固を行い、水/メタノール=50/50 (v/v)、2.5 mlにて再溶解をした。ナイロンメンブランフィルター(0.2 μm)で濾過し、測定試料とした。

3 結果及び考察

3.1 超臨界流体抽出法の抽出条件の検討

3.1.1 モディファイヤーの影響

本研究では、抽出

溶媒として超臨界二酸化炭素を用いた。メタノール、2-プロパノール、アセトニトリルから、適したモディファイヤーの検討を行った。それぞれ、4 v/v%添加し、超臨界二酸化炭素と合わせて流量5.0 ml/minで1時間送液し、PFCsの抽出率を比較した。結果より、モディファイヤーにメタノールを用いた場合が、抽出率が最大となった[Fig. 2 (a)]。他の溶媒に比べ、極性が高いメタノールを用いることにより、超臨界流体の溶解度が最適化されたと考えられる。次に、二酸化炭素に対するモディファイヤーの体積比の影響を検討した。メタノールを0~8 v/v%添加し、超臨界二酸化炭素と合わせて流量5.0 ml/minになるように設定し、1時間送液した。その結果、二酸化炭素とメタノールの体積比が96:4 (v/v)のとき、最大の抽出が得られた[Fig. 2 (b)]。メタノールの体積比の増加に伴うピーク面積の減少は、溶解度の上昇により抽出溶媒に他の夾雑成分が溶解し、マトリックス効果が起きたと考えられる。

3.1.2 抽出圧力及び抽出時間の最適化 抽出圧力を150~220 kg/cm²の間に設定し、抽出量を比較した。190 kg/cm²以上はほぼ平衡に達し、バラツキも少ないため、抽出圧力は190 kg/cm²とした[Fig. 3 (a)]。得られた条件をもとに、抽出時間を検討した。60分以上にて平衡に達しているため、最適抽出時間は60分とした[Fig. 3 (b)]。

3.2 MS/MS測定条件の検討

PFCs 4種類の標準品を用いて、MS/MSのイオン化について検討した。イオン化法にESIを採用し、ネガティブイオンモードで測定したところ、PFOSにおいては[M-K]⁻イオンの m/z 499、PFHxS及び¹³C₄-PFOSに関しては[M-Na]⁻イオンである m/z 399及び504の分子量関連イオンピークがそれぞれ確認され、PFOS、PFHxS及び¹³C₄-PFOSに関しては、 m/z 499、399、504をプレカーサーイオンとした。PFOA、PFNA及び¹³C₂-PFOAでは、[M-H]⁻イオンである m/z 413、463、415と[M-COOH]⁻イオンである m/z 369、419、370が存在する。しかし、¹³C₂-PFOAは1位の炭素が同位体原子に置換されているため、PFOA、PFNA及び¹³C₂-PFOAに関しては、[M-H]⁻イオンである m/z 413、463、415に設定した。またプレカーサーイオンが開裂することで生じるプロダクトイオンは、それぞれPFOS: m/z 499 → 80、PFOA: m/z 413 → 369、PFNA: m/z 463 → 419、PFHxS: m/z 399 → 80、¹³C₄-PFOS: m/z 503 → 80、PFOA: m/z 415 → 370とした。

酢酸アンモニウム添加量及びキャピラリー電圧の設定は、仲田らの報告²⁰⁾に基づき、酢酸アンモニウム添加量を1 mMとし、キャピラリー電圧は-600 Vに設定した。

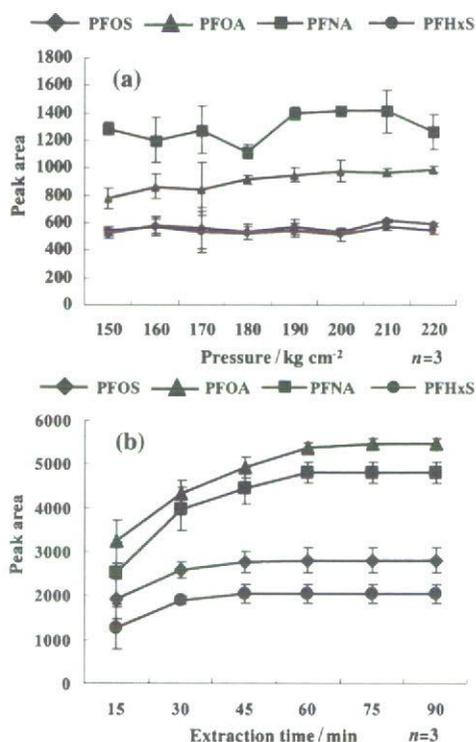


Fig. 3 Optimization of extraction (a) pressure and (b) time of PFCs for house dust

SFE conditions; (a) flow rate of CO₂: 4.80 ml/min, methanol: 0.20 ml/min (4 v/v%), extraction time: 60 min; (b) flow rate of CO₂: 4.80 ml/min, modifier: 0.20 ml/min (4 v/v%), pressure: 190 kg/cm²

3.3 LC/MS/MS 測定条件の検討

PFCs4 種類の標準品を測定したところ、Fig. 4 (a) に示したクロマトグラムのようにすべての化合物が 15 分以内に良好に分離された。ハウスダスト試料をセルに詰め、50 ng/ml の標準溶液とサロゲート物質を加え、抽出を行った。クロマトグラムにおいても、他の夾雑物質の影響を受けることなく良好に相互分離することが可能であった [Fig. 4 (b)]。また、ハウスダスト試料における検出限界を繰り返し測定 ($n = 8$) にて求めたところ、PFOS: 0.58 ng/g, PFOA: 0.72 ng/g, PFNA: 0.65 ng/g, PFHxS: 0.63 ng/g となり、定量範囲は、2.5~500 ng/g であった。

3.4 添加回収試験

添加回収試験は、各測定対象化合物を異なる濃度レベルで添加したハウスダスト試料 0.5 g に 100 ng/ml の内標準物質溶液を 0.5 ml 加え、超臨界抽出を行った。得られた抽出液を窒素気流下で蒸発乾固させ、水/メタノール = 50/50 (v/v), 2.5 ml で再溶解した。再溶解液 1 ml をナイロンメンブランフィルター (0.2 μm) に通し、測定に供した。絶対検量線法にて回収率を求めたところ、56.1~

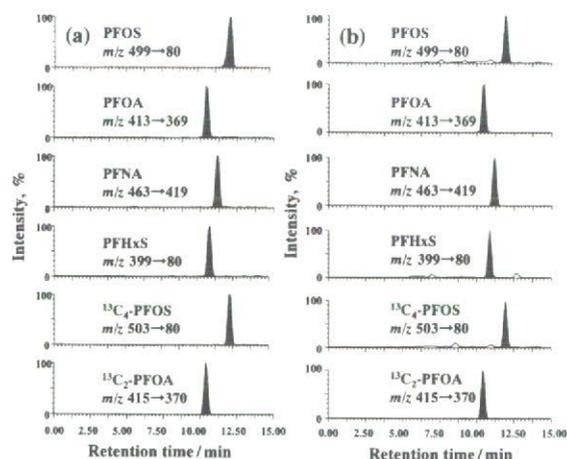


Fig. 4 MRM chromatograms of (a) a mixture of 5 ng/ml PFCs standards (PFOS, PFOA, PFNA, PFHxS) and internal standards; (b) house dust sample with addition of 50 ng/g PFCs

79.6% [相対標準偏差 (RSD) ≤ 15.8%] という結果になった。これは、試料として用いたハウスダストは様々な化学物質が入っているため、絶対検量線法にて定量した場合、マトリックス効果により、回収率や再現性の低下などを引き起こしたと考えられる。そのため、本研究においては内標準法による定量を行った。PFOS 及び PFHxS のサロゲート物質として ¹³C₄-PFOS を用い、PFOA 及び PFNA の補正には ¹³C₂-PFOA を使用した。サロゲート物質で補正した回収率を算出した結果、平均回収率 97.9% 以上 (RSD ≤ 5.8%) となった (Table 2)。

また、Moriwaki らの報告に従い、ハウスダスト 0.5 g を 50 ml のポリプロピレンチューブに詰め、メタノール 10 ml とサロゲート 0.5 ml を添加し、1 時間超音波にて抽出を行った。本研究と同じ測定条件下で添加回収を行った結果、平均回収率 91.5~116.7% (RSD ≤ 8.3%, $n = 3$) となった。著者らの研究においても同等の回収率が得られているため、本分析法の有用性及び正確性が確認できた。

3.5 実試料の測定

本法を一般家庭から得られたハウスダスト試料、20 検体に適用し、ハウスダスト中の PFCs を測定した (Table 3)。すべての検体から PFOS、PFOA 及び PFNA が検出され、検出範囲は PFOS: 7.0~41 ng/g, PFOA: 18~89 ng/ml 及び PFNA: 5.5~69 ng/g であった。また、PFHxS についても 8 検体から 2.5~5.5 ng/ml の範囲で検出された。PFCs 間の相関は確認できなかったが、ほとんどのハウスダスト試料において、PFOA 濃度が PFOS 濃度より高いことが明らかとなった。一方、ヒト生体試料中では PFOS 濃度が PFOA 濃度よりも一般に高いと報告され

Table 2 Recovery levels of PFOS, PFOA, PFNA and PFHxS in house dust

Analyte	Spiked amount /ng g ⁻¹	Concentration /ng g ⁻¹	Average recovery %	RSD %
PFOS	50	64 ± 2.7	101.7	5.4
	250	278 ± 7.1	106.0	2.7
	0	13 ± 0.8		
PFOA	50	78 ± 2.2	102.1	4.4
	250	280 ± 8.3	101.5	3.3
	0	27 ± 0.9		
PFNA	50	55 ± 0.5	99.9	1.1
	250	257 ± 2.2	100.8	1.1
	0	5.5 ± 0.3		
PFHxS	50	53 ± 1.1	99.4	2.2
	250	248 ± 14.2	97.9	5.8
	0	3.0 ± 0.2		

n = 6

Table 3 Concentration of PFOS, PFOA, PFNA and PFHxS in house dust

Sample number	PFOS	PFOA	PFNA	PFHxS
1	41	89	35	ND
2	38	46	18	ND
3	37	20	6.0	ND
4	32	40	69	ND
5	29	64	11	3.0
6	28	51	43	ND
7	28	45	69	5.5
8	22	28	28	ND
9	21	53	9.0	2.5
10	20	40	13	ND
11	18	29	49	3.0
12	17	33	11	ND
13	17	33	8.0	ND
14	17	23	9.5	ND
15	14	26	14	ND
16	13	56	63	ND
17	13	34	8.0	ND
18	13	29	21	3.5
19	13	27	5.5	3.0
20	7.0	18	6.5	4.5

(ng/g, ND < 2.5 ng/g)

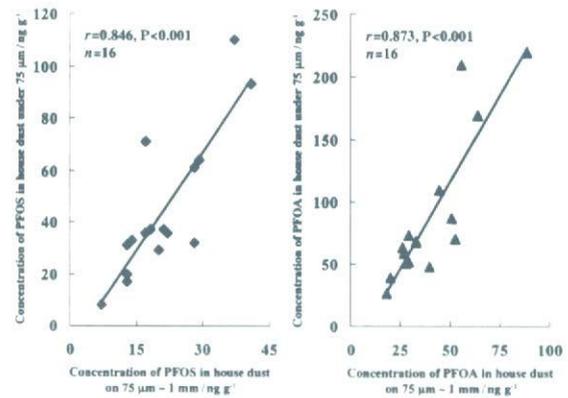


Fig. 5 Comparison of the PFCs concentration between particles

ている。これは、PFOSの方が体内半減期が長い¹⁰⁾ことや、最終分解物がPFOAとなるPFCsが多い⁹⁾ことが考えられる。また、Moriwakiらの報告と比較すると、PFOS、PFOAに関して、本分析法はハウスダスト中濃度が低い、これは、Moriwakiらの研究では髪の毛や、プラスチックなどを取り除いたものを測定試料としており、粒子径の小さなハウスダストも同時に分析していると考えられる。そのため、ハウスダストのサンプリング時に得られた粒子径75 μm以下のハウスダストにおいても本分析法を適用し、定量を行った。PFOS及びPFOAの濃度について比較した結果 (Fig. 5)、粒子径の大きいものと小さいもので高い相関が得られ、粒子径75 μm以下のハウスダストは、高濃

度にPFCsを含んでいることが確認された。これは、粒子径が縮小することにより、表面積は増大し、付着している化学物質の量が増大したと考えられる。そのため、Moriwakiらの報告と比較すると、ハウスダストに含まれるPFCs濃度に差が生じたと考えられる。

4 結 言

本分析法では、前処理に超臨界流体抽出法を行い、測定機器にLC/MS/MSを用いることによりハウスダスト中PFCsの定量が可能となった。本研究で得られた結果より、本分析法はハウスダスト中PFCs濃度の定量法として有用であることが示唆された。また、本分析法によるハウスダスト中PFCsの濃度は、環境水²⁾、大気³⁾といった環境試料と比較すると非常に高濃度であることが確認された。このことより、ハウスダストはPFCsのヒト暴露源として考えられる。今後、本分析法を用いて、ハウスダストからの暴露量評価が望まれる。

文 献

- 1) H. F. Schroder: *J. Chromatogr. A*, **1020**, 131 (2003).
- 2) K. J. Hansen, H. O. Johnson, J. S. Eldridge, J. L. Butenhoff, L. A. Dick: *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 1681 (2002).
- 3) K. Sasaki, K. Harada, N. Saito, T. Tsutsui, S. Nakanishi, H. Tsuzuki, A. Koizumi: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **71**, 408 (2002).
- 4) J. R. Thibodeaux, R. G. Hanson, J. M. Rogers, B. E. Grey, B. D. Barbee, J. H. Richards, J. L. Butenhoff, L. A. Stevenson, C. Lau: *Toxicol. Sci.*, **74**, 369 (2003).
- 5) C. Lau, J. R. Thibodeaux, R. G. Hanson, J. M. Rogers, B. E. Grey, M. E. Stanton, J. L. Butenhoff, L. A. Stevenson: *Toxicol. Sci.*, **74**, 382 (2003).
- 6) J. W. Davis (II), J. P. Vanden Heuvel, R. E. Peterson: *Lipids*, **26**, 857 (1991).
- 7) J. P. Giesy, K. Kannan: *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 1339 (2001).
- 8) K. Kannan, S. Corsolini, J. Falandysz, G. Oehme, S. Focardi, J. P. Giesy: *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 3210 (2002).
- 9) C. C. Lange: "The Aerobic Biodegradation of *N*-EtFOSSA Alcohol by the Microbial Activity Present in Municipal Waster Treatment Sludge", Biodegradation Study Report, (2001), (Study Sponsor: 3M Company, US).
- 10) J. M. Burris, J. K. Lundberg, G. Olsen, C. Simpson, J. Mandel: "Determination of serum half-life of several fluorochemicals, Interim Report #2.", (2002), (Study Sponsor: 3M Company, US).
- 11) X. Han, P. M. Hinderliter, T. A. Show, G. W. Jepson: *Drug. Chem. Toxicol.*, **27**, 341 (2004).
- 12) X. Han, T. A. Show, R. A. Kemper, G. W. Jepson: *Chem. Res. Toxicol.*, **16**, 775 (2003).
- 13) K. Inoue, F. Okada, R. Ito, S. Kato, S. Sasaki, S. Nakajima, A. Uno, Y. Saijo, F. Sata, Y. Yoshimura, R. Kishi, H. Nakazawa: *Environ. Health Perspect.*, **112**, 1204 (2004).
- 14) G. W. Olsen, J. M. Burris, J. H. Mandel, L. R. Zobel: *J. Occup. Environ. Med.*, **41**, 799 (1999).
- 15) K. J. Hansen, L. A. Clemen, M. E. Ellefson, H. O. Johnson: *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 766 (2001).
- 16) G. W. Olsen, T. R. Church, J. P. Miller, J. M. Burris, K. J. Hansen, J. K. Lundberg, J. B. Armitage, R. M. Herron, Z. Medhdizadehkashi, J. B. Nobiletti, E. M. O'Neill, J. H. Mandel, L. R. Zobel: *Environ. Health Perspect.*, **111**, 1892 (2003).
- 17) H. F. Schroder: *J. Chromatogr. A*, **1020**, 131 (2003).
- 18) K. Roinestad, J. Louis, J. Rozen: *J. AOAC int.*, **76**, 1121 (1993).
- 19) H. Moriwaki, Y. Takata, R. Arakawa: *J. Environ. Monit.*, **5**, 753 (2003).
- 20) A. Aguilera, M. Rodriguez, M. Brotons, M. Boulaïd, A. Valverde: *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 9374 (2005).
- 21) C. Tseng, L. Liu, C. Chen, W. Ding: *J. Chromatogr. A*, **1**, 119 (2005).
- 22) A. Karrman, B. B. Van, U. Jarnberg, L. Hardell, G. Lindstrom: *Anal. Chem.*, **77**, 864 (2005).
- 23) 仲田尚夫, 中田彩子, 岡田文雄, 伊藤里恵, 井之上浩一, 齊藤貞一, 中澤裕之: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **54**, 877 (2005).
- 24) 森谷清樹訳: "ハウス・ダストの生物学 虫, ダニ, カビの生態・居住環境の衛生のために", (1990), (西村書店); Johanna E. M. H. van Bronswijk: "House Dust Biology for allergists, acarologists, and mycologists", (1981), (NIB Publishers, Zeist, The Netherlands).

Determination of Perfluorochemicals in House-Dust by LC/MS/MS after Supercritical Fluid Extraction

Tsunenobu KATSUMATA¹, Ayako NAKATA¹, Yusuke IWASAKI¹, Rie ITO¹,
Koichi SAITO¹ and Hiroyuki NAKAZAWA¹

¹Department of Analytical Chemistry, Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501

(Received 21 July 2006, Accepted 18 October 2006)

The purpose of this study is to find the exposure sources of perfluorochemicals (PFCs). We have developed a method for measuring 4 PFCs (perfluorooctanesulfonate; PFOS, perfluorooctanoic acid; PFOA, perfluorononanoic acid; PFNA and perfluorohexanesulfonate; PFHxS) in house dust using supercritical fluid extraction (SFE) and based on high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. The mean extracted recovery assessed at two different concentrations (50 and 250 ng/g in house dust) was more than 97.9%. The assay was linear over the range 2.5~500 ng/g. The method detection limits were assessed as being 0.58 ng/g to 0.72 ng/g. We determined the concentrations of PFCs in 20 house-dust samples for investigating of the exposure source. The compounds were detected in all dust samples and the ranges were 7.0~41 ng/g for PFOS, 18~89 ng/g for PFOA and 5.5~69 ng/g for PFNA. PFHxS was determined in 8 samples (2.5~5.5 ng/g). Based on our experiments, house-dust might be one of the human exposure sources for PFCs. The developed method can be applied to the determination of PFCs in house dust samples for monitoring human exposure sources.

Keywords : perfluorooctanesulfonate; perfluorooctanoic acid; perfluorochemicals; MS/MS; house dust; supercritical fluid extraction; exposure sources.

Serum Levels of Volatile Organic Compounds in Patients with Sick Building Syndrome

F. Kondo,¹ Y. Ikai,¹ T. Goto,¹ Y. Ito,¹ H. Oka,¹ H. Nakazawa,² Y. Odajima,³ M. Kamijima,⁴ E. Shibata,⁵ S. Torii,⁶ Y. Miyazaki¹

¹ Department of Toxicology, Aichi Prefectural Institute of Public Health, 7-6 Nagare, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya 462-8576, Japan

² Department of Analytical Chemistry, Hoshi University, 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan

³ Department of Pediatrics, Showa University, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8666, Japan

⁴ Department of Occupational and Environmental Health, Nagoya University, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466-8550, Japan

⁵ Department of Health and Psychosocial Medicine, Aichi Medical University, Nagakute, Aichi 480-1195, Japan

⁶ Department of Domestic Science, Aichigakusen University, Okazaki, Aichi 444-0902, Japan

Received: 27 March 2006/Accepted: 23 July 2006

Volatile organic compounds (VOCs) pose possible health risks that could result from exposure to indoor airborne VOCs as suggested by the causal associations with symptoms of sick building syndrome (SBS) (Hodgson 2002). People can be exposed to VOCs through various products and processes, including building materials, paints, cleaning agents, pesticides, tobacco smoke, and personal care products in addition to the traditional sources of exposure such as occupation and ambient air pollution (Ashley et al. 1996). There is no universally accepted clinical definition of SBS and no adequate theory for its occurrence (Redlich et al. 1997). The characteristics of SBS are non-specific symptoms which include dryness and irritation of skin, eyes and air-ways and general symptoms. In Japan, SBS symptoms associated with indoor air VOCs in new or newly remodeled houses have been increasingly highlighted, and they are called 'sick house syndrome'.

Although past researchers have tried to understand the causes of SBS, they did not generally succeed in showing direct evidence that elucidates the relationship between SBS and VOCs (Hodgson 2002). For example, information concerning serum levels of VOCs in patients with SBS symptoms is not available because measuring sub ng levels of VOCs in serum with the exclusion of experimental contamination is very difficult. To address this issue, we examined (1) whether headspace gas chromatography/mass spectrometry (HS-GC/MS) was applicable to the measurement of serum VOC concentrations in SBS patients and volunteer controls, and (2) whether the elevation of serum VOC levels correlated with SBS symptoms.

MATERIALS AND METHODS

For contamination control, blood-collecting equipment was treated as described below. Glass syringe barrels were sterilized in an autoclave and dried in a drying oven. Test tubes and screw caps were washed with detergent, water and methanol, and then heated at 180 °C for 5 hours. They were fitted with screw caps and then stored. A saturated saline solution was prepared by mixing sodium chloride and distilled water, which was subsequently subjected to aeration using helium gas and to degassing in an ultrasonic bath under reduced pressure. The prepared solution

Correspondence to: F. Kondo

Table 1. Retention times, quantification and confirmation ions.

Analyte	Retention time (min)	Quantification ion	Confirmation ion	Quantification ion (internal standard)
Benzene	12.7	78	51	84
Toluene	15.3	91	92	98
Ethylbenzene	17.3	91	106	98
m,p-Xylene	17.4	91	106	98
o-Xylene	18.2	91	106	98
Styrene	18.3	104	78	112
p-Dichlorobenzene	21.2	111	146	115
Naphthalene	25.1	128	127	136

was immediately placed in headspace vials previously treated as for test tubes. Internal air space in the vial was replaced with helium gas. The headspace vials were sealed with Teflon-backed septa and crimp caps.

Fortified sample recovery was carried out using pig serum. Although human blood is easily available in hospitals, it is difficult to obtain it in quantity without contamination problems when baseline levels are measured. We therefore procured pig serum using the contamination control described above.

For the measurement of VOCs in serum, 1 mL of serum was diluted with 14 mL of saturated saline solution and analyzed by HS-GC/MS. VOCs were quantified using deuterated compounds as internal standards. Target VOCs (benzene, toluene, *o*-, *m*-, *p*-xylene, ethylbenzene, styrene, *p*-dichlorobenzene and naphthalene) were selected for analysis because they are frequently found in indoor air in Japan (Saijo et al. 2004). HS-GC/MS analysis was carried out under the following conditions:

Headspace sampler: Tekmar 7000 (Tekmar, USA), vial size: 22 mL, sample temperature: 60 °C, sample equilibrium time: 20 min, mixer: on (power 5, 3 min), sample loop size: 1 mL, sample loop temperature: 150 °C, transfer line temperature: 160 °C. GC/MS: AUTO MASS SYSTEM II (Jeol, Japan), Column: Vocol (60 m x 0.25 mm i.d., 0.1 µm film thickness, Supelco, USA), oven temperature: initial temperature 40 °C with 4 min hold, then 10 °C /min to 230 °C and post run at 230 °C for 5 min, ion source temperature: 210 °C, EI voltage: 70 eV, scan range: m/z 46-260. Table 1 shows the retention times and quantification masses used for each of the analytes and internal standards.

The study participants were 18 patients with SBS and 32 volunteer controls. Seven patients live in Sapporo, and 11 live in Aichi Prefecture, Japan. The patients were diagnosed according to the following criteria: 1) a typical setting for symptoms is a new or newly remodeled house; 2) symptoms generally improve when the patient is away from the house. The possible factors of SBS onset were moving into a new or remodeled house (56%, 10/18), use of chemicals such as insecticides, mothballs and bleach (33%, 6/18), exposure to organophosphorus pesticides (6%, 1/18) and unknown (6%, 1/18). The volunteer controls were recruited from the staff of Aichi Prefectural Institute of Public Health, Nagoya, Japan. All volunteer controls live in Aichi Prefecture, Japan. Five volunteer controls were excluded because they are smokers. Elevated serum VOC levels due to smoking have been reported

previously (Mannino et al. 1995), and smoking is the largest confounder in discerning the influence of other environmental exposure (Ashley et al. 1996). In fact, the detection rates and levels of toluene, styrene and benzene in the smokers' serum were higher than in nonsmoker volunteer controls (data not shown).

Of the patients, 89% (16/18) were women and 11% (2/18) were men. Previous studies have shown the same pattern (Stenberg et al. 1995). Among patients, 22% (4/18) were under 29 years of age, 44% (8/18) were 30-49 years of age, and 33% (6/18) were over 50 years of age. Representative symptoms were classified into 10 categories as follows: eye (irritation, dry eyes, eye congestion); nose (stuffy or runny nose); throat (sore throat, itchy throat); respiratory system (cough, shortness of breath); skin (itching and dry skin); general symptoms (fatigue, headache, dizziness); psychological symptoms (difficulty concentrating, insomnia, depression); musculoskeletal system (joint pain, numbness in the hands or feet); gastrointestinal system (nausea, stomachache, diarrhea); genitourinary system (increased urinary frequency, menstrual pain, menorrhagia). The prevalence of patients' symptoms was significantly greater than for controls as follows: (patients vs controls) eye, 67% vs 16%; nose, 83% vs 16%; throat, 56% vs 3%; respiratory system, 50% vs 3%; skin, 44% vs 9%; general symptoms, 72% vs 9%; psychological symptoms, 56% vs 3%; musculoskeletal system, 44% vs 0%; gastrointestinal system, 44% vs 0%; genitourinary system, 50% vs 0%. The data analyzed in this paper were collected in 2001 and 2002 in Japan. This study was conducted according to the Declaration of Helsinki and signed informed consent was obtained from all subjects.

For statistical evaluation of the prevalence of symptoms between patients and controls, the proportions of positive symptoms were compared using the Chi-square test or Fisher's exact test for the resulting 2x2 contingency table. To compare VOC concentrations between patients and controls, Mann-Whitney's U-test was used. Differences in the mean number of symptoms within the patient group and between the two groups dichotomized at the limit of quantification of serum VOCs were evaluated using Mann-Whitney's U-test. In all statistical analysis, a 5% level of significance was applied.

RESULTS AND DISCUSSION

Reproducible calibration curves for all target VOCs were obtained with correlation coefficients greater than 0.998 (known concentration vs analyte/internal standard ratio) by HS-GC/MS analysis of standard VOCs. The method was sensitive with limits of detection between 0.1 and 0.5 ng in 1 mL of serum for all analytes. The method does not require complicated sample preparation procedures and takes only 1 hour to complete all procedures starting from sample dilution to quantification by HS-GC/MS analysis.

In order to examine the applicability of this method to real sample analysis, VOC recoveries were determined. The recoveries from blank pig serum spiked with target VOCs and their internal standards are summarized in Table 2. Spiked VOCs

Table 2. Recovery of VOCs from serum.^a

VOCs	Scan mode (with IS) ^b			SIM mode (with IS) ^b			Scan mode (No IS) ^c
	LOQ ^d (ng/mL)	Recovery (%)	CV ^e (%)	LOQ ^d (ng/mL)	Recovery (%)	CV ^e (%)	Recovery (%)
Benzene	0.5	106	2.8	0.1	104	4.7	85.1
Toluene	0.5	103	1.4	0.1	101	6.0	65.6
Ethylbenzene	0.5	101	2.2	0.1	96.6	4.4	44.3
<i>m,p</i> -Xylene	0.5	97.3	1.7	0.1	100	4.5	42.1
<i>o</i> -Xylene	0.5	100	2.7	0.1	89.8	4.3	44.8
Styrene	0.5	101	1.9	0.1	105	4.9	48.6
<i>p</i> -Dichloro- benzene	2.0	98	6.4	0.5	114	6.3	35.2
Naphthalene	2.0	101	0.4	0.5	105	3.2	24.8

^aA mixture of VOCs was added at 15 and 1.5 ng/mL for scan and SIM mode analysis, respectively.

^bResults are the means of five replicate determinations. With IS; with internal standard correction

^cResults were obtained from a single set of measurement. No IS: without internal standard correction

^dLOQ, limit of quantification (S/N>5)

^eCV, coefficients of variation

were satisfactorily recovered with the internal standard correction (scan mode; 97.3-106.3%, selected ion monitoring mode; 89.8-114%), whereas they were poorly recovered without the correction (24.8-85.1%). The coefficients of variation values were acceptable with the internal standard correction (scan mode; 0.4-6.4%, selected ion monitoring mode; 3.2-6.3%). The selected ion monitoring mode had greater recovery and coefficients of variation values than in scan mode, which might be derived from lower concentrations in the selected ion monitoring mode. These results indicate that internal standard correction is indispensable for the headspace analysis of VOCs in biological samples because headspace analysis tends to show less reproducibility than direct measurement procedures.

Measuring low levels of VOCs in human biological samples is very difficult because highly sophisticated techniques and contamination control are required (Ashley et al. 1996). VOCs are ubiquitous components in many consumer products and the laboratory environment. Thus, for contamination control, we carefully washed the blood-collecting equipment and removed VOCs from saturated saline solution as described in MATERIALS AND METHODS. These treatments reduced the VOC background to sub ng/mL level (data not shown).

Table 3 shows a summary of the serum VOC levels of 18 patients with SBS symptoms and 27 controls. Three of the most often detected VOCs among these 45 subjects were *p*-dichlorobenzene, toluene, and xylene which were found in 61%, 44%, and 44% of the patients, and 85%, 67%, and 15% of the controls, respectively.

Table 3. Serum VOC levels in patients (n=18) and controls (n=27).

	No. of participants with indicated levels of VOCs (ng/mL)				No. of positives ^b	Mean conc. in positives (ng/mL)	Maximum conc. (ng/mL)	
	<0.1	0.1-0.4	0.5-1.0	>1.0				
Toluene								
Patients	10	6	2	0	8 (44) ^c	0.3	0.8	
Controls	11	13	3	0	18 (67)	0.4	1.3	
Xylene^a								
Patients	10	7	1	0	8 (44)	0.3	0.8	
Controls	23	4	0	0	4 (15)	0.3	0.4	
Benzene								
Patients	16	1	1	0	2 (11)	0.4	0.7	
Controls	26	1	0	0	1 (4)	-	0.1	
Ethylbenzene								
Patients	16	2	0	0	2 (11)	0.1	0.1	
Controls	27	0	0	0	0 (0)	-	-	
Styrene								
Patients	17	1	0	0	1 (6)	-	0.1	
Controls	25	2	0	0	2 (7)	0.2	0.2	
	No. of participants with indicated levels of VOCs (ng/mL)					No. of positives ^b	Mean conc. in positives (ng/mL)	Maximum conc. (ng/mL)
	<0.5	0.5-0.9	1.0-4.9	5.0-10	>10			
<i>p</i>-Dichlorobenzene								
Patients	7	4	5	0	2	11 (61)	5.1	25.4
Controls	4	3	9	4	7	23 (85)	16.8	171
Naphthalene								
Patients	18	0	0	0	0	0 (0)	-	-
Controls	27	0	0	0	0	0 (0)	-	-

^aResults are expressed as the sum of *o*-, *m*-, *p*-xylenes.

^b*p*-Dichlorobenzene and naphthalene; >0.5 ng/mL, toluene, xylene, benzene,

^cNumber in parentheses indicate percentages. There is a significant difference in the ratio of positive samples of xylene ($P < 0.05$).

Among the most often detected VOCs, only xylene was significantly more prevalent in the patients. The positive rates of *p*-dichlorobenzene and toluene in the patients showed lower frequency than in the controls although there were no significant differences. The mean concentrations of *p*-dichlorobenzene, toluene and xylene in positive cases were 5.1, 0.3 and 0.3 ng/mL for the patients and 16.8, 0.4 and 0.3 ng/mL for the controls, respectively. The differences in the concentrations of *p*-dichlorobenzene and toluene were not statistically significant between the patients and controls. The low positive rates of other VOCs did not allow us to perform statistical analyses.