

厚生労働行政推進調査事業費補助金 (化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

室内濃度指針値見直しスキーム・曝露情報の収集に資する
室内空气中化学物質測定方法の開発

室内空气中準揮発性有機化合物試験法の妥当性評価

研究分担者	香川(田中) 聡子	横浜薬科大学薬学部	教授
研究協力者	神野 透人	名城大学薬学部	教授

シックハウス対策としてホルムアルデヒドやトルエン等 13 物質に室内濃度指針値、総揮発性有機化合物に暫定目標値が定められている。室内空気質がこれら化学物質の指針値あるいは暫定目標値を満たしているか否かを厳密に評価するためには、標準化された室内空気の試験法(試料採取方法ならびにその分析方法)により得られる定量結果に基づいて判断する必要がある。そこで、本研究では、室内濃度指針値が定められている準揮発性有機化合物、すなわちフタル酸ジ-n-ブチルおよびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルを対象に、詳細曝露評価に必要な試験法の確立を目的として、厚生労働省のシックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会の中間報告書に基づいて試験方法を整備し、昨年度までに標準試験法の構築を完了した。最終年度となる本年度は、構築した標準試験法について4機関5研究室の協力を得て妥当性評価を実施した。その結果、前年度までに構築した試験法の妥当性が確認され、2種類のフタル酸エステル可塑剤に対する標準試験法の作成が完了した。

研究協力者：

埴岡伸光, 大河原 晋, 磯部隆史(横浜薬科大学薬学部), 千葉真弘, 大泉詩織(北海道立衛生研究所), 斎藤育江, 大貫 文(東京都健康安全研究センター), 酒井信夫, 河上強志, 田原麻衣子(国立医薬品食品衛生研究所), 上村仁(神奈川県衛生研究所)

A. 目的

ヒトが一日の大部分を過ごす「室内」の空気は化学物質の曝露媒体としても極めて重要であり、慢性的な化学物質曝露の観点からも室内空気質に注目が集まっている。さらに、室内空气中の化学物質はシックハウス症候群や喘息などの疾病の病因あるいは増悪因子となることが知られており、健康影響の観点から室内空気質には強い関心が寄せられている。現在、室内空気汚染対策としてホルムアルデヒドやトルエン等 13 物質に室内濃

度指針値が、総揮発性有機化合物に暫定目標値が定められている。居住環境の室内の室内空気質がこれら化学物質の指針値あるいは暫定目標値を満たしているか否かを厳密に評価するためには、標準化された室内空気の測定法、すなわち採取方法ならびにその分析方法によって得られた結果に基づいて判断することが必要不可欠である。本研究では、室内濃度指針値が設定されている準揮発性有機化合物、すなわちフタル酸ジ-n-ブチルおよびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルを対象として、これまでに厚生労働省のシックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会(以下シックハウス検討会)の中間報告書¹⁾の内容に基づいて測定方法を整備/確立することを目的とし、詳細曝露評価に適用可能な比較的簡便な試験法を構築してきた。今年度、平成29年4月19日に開催された第21回シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会

2)で、フタル酸ジ-n-ブチルおよびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの改訂指針値案として、それぞれ 17 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ が提案された。そこで、指針値(案)の 1/10 ~ 1/100 の濃度を検出できる試験法として、定量下限値を 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ とする試験法を構築した。最終年度となる本年度は、これまでに構築した試験法の妥当性評価を目的として、4 研究機関 5 研究室の協力の下に、選択性、真度、精度ならびに定量下限値について検討した。

B. 用語の定義：

水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン(平成 24 年 9 月 6 日付け健水発 0906 第 1 号別添)(最終改正：平成 29 年 10 月 18 日付け薬生水発 1018 第 1 号)³⁾による

- 1)「添加試料」とは、水道水や精製水等に一定濃度の検査対象物を添加したものをいう。
- 2)「ブランク試料」とは、検査対象物を添加しない標準試料をいう。
- 3)「キャリアオーバー」とは、検査対象物が分析機器の内部に残留し、その後の測定値に影響を与えることをいう。
- 4)「定量下限」とは、適切な精確さをもって定量できる検査対象物の最低濃度をいう。
- 5)「選択性」とは、検査対象物と他の物質を区別して測定できる能力をいう。
- 6)「真度」とは、十分多数の検査結果から得た平均値と標準試料や添加試料の調製濃度との一致の程度をいう。
- 7)「精度」とは、指定された条件下で繰り返された独立した検査結果間の一致の程度をいう。
- 8)「併行精度」とは、併行条件(同一とみなせる試料において、同一の検査方法を用いて、同一の検査室で、同一の検査員が、同一の装置を用いて、短時間のうちに独立した検査結果を得る条件)下の精度をいう。
- 9)「室内精度」とは、室内条件(同一とみなせる試料において、同一の検査方法を用い、同一の検査室で、独立した検査結果を得る条件)下の精度をいう。

10)「自由度」とは、独立に動かせる変数の数をいう。

C. 評価方法

C-1. 概要

真度ならびに精度に関する評価として、先ず横浜薬科大学薬学部環境科学研究室において、2 種類の捕集剤(Empore Disk C18 Fast flow 直径 47 mm、3M 製 AERO Cartridge SDB-400HF, GL サイエンス製)に既知量の 2 種類のフタル酸エステル(フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル)を負荷して検体とした。なお、Empore Disk C18 Fast flow, 3M 製, 直径 47 mm については、フタル酸エステル添加前にあらかじめアセトン洗浄し風乾したものをを用いた。これらの検体を宅配便で協力研究室に移送し、各協力研究室でアセトン抽出により測定試料を調製し、各研究室の分析法によって GC/MS 分析を実施した。

なお、各研究室に配付した妥当性評価用検体の試料負荷精度、ならびにブランク試料調製の精度を確認するために、試料負荷検体ならびにブランク試料としてアセトン洗浄した Empore Disk C18 Fast flow 及び AERO Cartridge SDB-400HF から無作為に 5 検体抽出して GC/MS による定量を実施した。

また、評価協力機関研究室における“汚染を低減した捕集剤調製の精度”を評価する目的で、未洗浄の Empore Disk C18 Fast flow, 3M 製およびフィルターフォルダー(EMO-47, GL サイエンス社製を)を各協力研究室において洗浄後風乾し、洗浄済みフィルターをフォルダーへ装着、回収後アセトン抽出の工程を経て、操作空試験試料を調製し、各研究室において GC/MS 分析を実施した。

C-2. 妥当性評価協力機関(協力者)

北海道立衛生研究所(千葉真弘, 大泉詩織), 東京都健康安全研究センター(斎藤育江, 大貫文), 国立医薬品食品衛生研究所(酒井信夫, 河上強志, 田原麻衣子), 神奈川県衛生研究所(上村仁)

C-3. 試薬、器具及び装置

平成 28 年度報告書⁴⁾参照。

使用する器具、フィルターフォルダー等は、使用直前にアセトンで 10 分間超音波洗浄を行い、さらに清浄なアセトンですすいで風乾した。Empore Disk C18 Fast flow は 1 枚につき 20mL のアセトンで 5 回浸漬洗浄し 5 分間風乾した。フタル酸の汚染を低減した捕集部材として市販されている AERO Cartridge SDB-400HF は購入後 2 週間以内に試験に供した。

C-4. ブランクならびにフタル酸エステル負荷捕集剤の調製

C-4-1. ブランク試験用検体の調製

ブランク試験用として、上記の方法でアセトン洗浄した Empore Disk C18 Fast flow をアセトン洗浄済みの共線付き試験管にピンセットを用いて格納し、共栓をアルミホイルおよびテフロンテープで巻いて密栓した。購入した AERO Cartridge SDB-400HF はそのままブランク試験用の検体とした。

C-4-2. フタル酸エステル負荷捕集剤の調製

フタル酸ジ-n-ブチルおよびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルがそれぞれ $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ の濃度で存在する空気を、 $3 \text{ L}/\text{min}$ で 24 時間捕集することを想定すると、フィルターには各フタル酸エステルが約 $4 \mu\text{g}$ 捕集されることになる。そこで、アセトン洗浄した Empore Disk C18 Fast flow、または AERO Cartridge SDB-400HF にフタル酸エステル類の添加量が $4 \mu\text{g}$ となるようにフタル酸ジ-n-ブチル、およびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルをそれぞれ $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で含むアセトン溶液 $10 \mu\text{L}$ をそれぞれの捕集剤に添加した。フタル酸エステルを添加した Empore Disk C18 Fast flow はアセトン洗浄済みの共線付き試験管の底部にピンセットで格納し、共栓をアルミホイルおよびテフロンテープで巻いて密栓した。フタル酸エステルを添加した AERO Cartridge SDB-400HF はアルミホイルに包んで検体とした。

上記試料を各研究室あたりそれぞれ 5 検体

ずつ無作為に抽出して宅配便にて移送した。

C-5. 調製試料の精度評価

C-5-1. 分析試料の調製

C-4-1. および C-4-2. で調製した試料の精度を評価する目的で、調製した試料から無作為に 5 検体を選定した。妥当性評価協力研究室には検体を宅配便で移送する行程が入ることから、宅配便による移送の条件を同じにするために、無作為に選定した 5 検体を名城大学薬学部衛生化学研究室に宅配便により移送した。

移送先において、Empore Disk C18 Fast flow についてはフィルターが格納された共線付き試験管にアセトン 5 mL を添加した。AERO Cartridge SDB-400HF については、固定のための O-リングをアセトン洗浄した治具を用いて外し、ろ紙と SDB を共栓付き試験管に回収し、アセトン 5 mL を添加した。アセトン添加した共栓試験管は、アルミホイルで共栓の上部を覆い、10 分間超音波処理した後、軽く攪拌して静置し、上清を GC/MS 分析試料とした。

C-5-2. GC/MS による分析

ガスクロマトグラフ/タンデム質量分析計 (Shimadzu GCMA-TQ8030) により、各試料を定量分析し、操作ブランク、添加したフタル酸エステル類の回収率、ならびに測定値のばらつきを評価した。

分析条件を以下に示す。

【GC/MS 分析条件】

カラム : Rtx-5MS

30 m x 0.25 mm, 膜厚 0.25 μm

キャリアガス : He, 線速度 40 cm/sec

注入口温度 : 280

カラム温度 : 50 (1 min) - 50 /min -
200 - 5 /min - 300

インターフェース温度 : 250

イオン源温度 : 200

測定モード : Q3 SIM

モニターイオン :

Di-n-butyl Phthalate:

定量イオン：m/z 149,
確認イオン：m/z 223
Bis (2-Ethylhexyl) Phthalate:
定量イオン：m/z 149,
確認イオン：m/z 279

C-6. 妥当性評価協力研究室における評価用試料の調製と分析

C-6-1. 分析試料の調製

上述の C-5-1. に示す方法で GC/MS 分析試料を調製した。

C-6-2. 試料の分析

それぞれの研究室所有の分析機器、分析方法、それぞれの研究室で調達した標準試薬を含む試薬を用いて内部標準法で分析定量を行った。

分析条件の一例を表 1 に示す。

D. 実験結果と考察

D-1. 妥当性評価用調製試料の精度

実験方法 C-5 に従って、妥当性評価協力研究室に送付した検体について、捕集部材に添加したフタル酸エステル類のばらつき等について評価した。その結果、操作ブランク試料からは、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルいずれについても、定量の妨害となるピークは検出されなかった。また、添加回収試験用のフタル酸エステル負荷試料については、相対標準偏差として 4.4% (Empore Disk に負荷フタル酸ジ-n-ブチル) 5.6% (Empore Disk に負荷フタル酸ジ-2-エチルヘキシル) 2.3%(AERO Cartridge 負荷フタル酸ジ-n-ブチル) 3.0% (AERO Cartridge フタル酸ジ-2-エチルヘキシル) であった。以上の結果から、協力研究室に送付したフタル酸エステル負荷試料は妥当性評価に供するに適切な試料であることが確認できた。

D-2. 試験法の妥当性評価

D-2-1. 選択性

今回協力を依頼した 5 研究室においては、定量の妨害となるシグナルが検出されないことが確認された。

D-2-2. 真度 (回収率) および精度

分析法に関する妥当性評価ガイドラインにおいて、「真度 (回収率)」とは、十分多数の試験結果から得た平均値と承認された標準値 (添加濃度) との一致の程度、「精度」とは、指定された条件下で繰り返された独立した試験結果間の一致の程度、とされている。

今回の評価では、フタル酸ジ-n-ブチルおよびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルそれぞれ 4 µg を 2 種類の捕集剤 Empore Disk C18 Fast flow、AERO Cartridge SDB-400HF に負荷し、各研究室で 5 mL のアセトンによって抽出後 (分析試料溶液の濃度としては 0.8 µg/mL) に GC/MS 分析を実施した。

添加回収試験における室内再現精度の結果を表 2 に示す。フタル酸ジ-n-ブチルの場合は、回収率は 85.3% ~ 107.9% (Empore Disk C18 Fast flow) 92.1% ~ 105.0% (AERO Cartridge SDB-400HF) であった。フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの場合は、回収率は 84.5% ~ 107.3% (Empore Disk C18 Fast flow) 73.3% ~ 103.3% (AERO Cartridge SDB-400HF) であった。室内再現精度として相対標準偏差は、フタル酸ジ-n-ブチルについては、Empore Disk C18 Fast flow の場合で最高値 8.3%、AERO Cartridge SDB-400HF の場合は最高値 7.5% であった。フタル酸ジ-2-エチルヘキシルについては、Empore Disk C18 Fast flow の場合で最高値 20.7%、AERO Cartridge SDB-400HF の場合は最高値 8.1% であった。

添加回収試験における研究室間の再現精度の結果を表 3 に示す。フタル酸ジ-n-ブチルについては、Empore Disk C18 Fast flow の場合、回収率は 99.9%、相対標準偏差は 8.6%、AERO Cartridge SDB-400HF の場合、回収率は 99.1%、相対標準偏差は 5.1% であった。フタル酸ジ-2-エチルヘキシルについては、Empore Disk C18 Fast flow の場合、回収率は 96.7%、相対標準偏差は 9.7%、AERO Cartridge SDB-400HF の場合、回収率は 91.3%、相対標準偏差は 13.1% であった。

水道水質検査方法の妥当性評価ガイドラ

インでは、真度及び精度の目標が参考表 1 のように示されている。この評価基準を今回の評価に適用するならば、今回の添加回収試験における真度、室内再現精度、室間再現精度について目標値に適合しているといえる。以上の結果は、昨年度までに構築した試験法の妥当性が確認されたことを示すものである。

D-3. 汚染を低減した捕集剤調製の精度

フタル酸エステル類は環境中に普遍的に存在するために、操作空試験値の低減が困難であることが知られており、操作空試験値を低減できれば、定量下限値を低くすることが可能になる。本研究では汚染を低減した捕集剤調製の精度を評価する目的で、未洗浄の Empore Disk C18 Fast flow, 3M 製およびフィルターフォルダー(EMO-47, GLサイエンス社製)を各協力研究室において洗浄、風乾後、フィルターをフォルダーへ装着、回収後アセトン抽出の工程を経て、操作空試験試料を調製して GC/MS 分析を実施した。なお、フィルターのアセトン抽出操作は、C-5-1. 「分析試料の調製」に示す方法で行った。

結果を表 4 に示す。操作空試験値は最高でも 0.049 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で、空气中濃度が 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ すなわち、改訂指針値案の 10 分の 1 の濃度であっても、操作・分析の過程で生じる汚染は最大で約 6%にとどまることが判明し、昨年度までに構築した試験法において捕集剤調製の精度についても妥当性が確認された。

D-4. 定量下限値

操作空試験値に 3 を乗じた数値を定量下限値として表 5 に示す。フタル酸ジ-n-ブチルおよびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルについて最大でも分析試料の濃度として 0.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、空気捕集条件として流速 3 L/min で 24 時間捕集時の空气中濃度に換算すると、いずれも 0.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 濃度まで測定可能であることが判明した。ただし、今回の妥当性評価結果は、フタル酸エステル類の分析の経験が豊富で、分析に熟練している研究者によって実施されたことを考慮し、指針値

(案)の 1/10 ~ 1/100 の濃度を検出できる試験法・定量下限値として 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ が妥当であると考える。

環境省による有害大気汚染物質測定方法マニュアル(平成 23 年 3 月改訂)⁵⁾においては、定量下限値や操作ブランク値等の許容性を判断する基準として、「目標定量下限値」が導入されている。目標定量下限値は、測定の目的等に照らして決定されるが、原則として、環境基準や指針値の設定されている物質では環境基準や指針値の 1/10、それ以外の物質では参考値(EPA 発がん性 10^{-5} リスク濃度や WHO 欧州事務局ガイドライン濃度)の 1/10 の濃度とされている。しかし、分析上の感度が不十分であったり、ブランク値の低減が極めて困難なために目標定量下限値の達成が厳しい物質では、別途暫定値が設定されている。また、同マニュアルでは、環境濃度の実態把握をより正確に行い、将来の濃度変化を見るために、定量下限値をできるだけ小さくして低濃度まで測定すべきであるとされていることから、室内空気注化学物質についても、今回提案する指針値超過率を把握する試験法と、実態把握をより正確に行うための試験法とは別に確立する必要があると考ええる。

E. 結論

室内空気注中フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルに関する詳細曝露評価を可能にする調査者にも協力者にも負担の少ない試験方法を構築し、その妥当性を確認できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 引用文献

- 1) 「シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会中間報告書—第 6 回~第 7 回のまとめについて」
<http://www.mhlw.go.jp/houdou/0107/h0724-1.html>

- 2) 第21回シックハウス(室内空気汚染)問題に関する検討会、配付資料
<http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000164092.html>
- 3) 水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン(平成24年9月6日付け健水発0906第1号別添)最終改正:平成29年10月18日付け薬生水発1018第1号)
- 4) 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業「室内濃度指針値見直しスキーム・曝露情報の収集に資する室内空气中化学物質測定方法の開発」平成28年度 総括・分担研究報告書 研究代表者 奥田晴宏 平成29年(2017)年3月. 研究分担報告書 室内空气中準揮発性有機化合物試験法の妥当性評価 研究分担者 香川聡子
- 5) 有害大気汚染物質測定方法マニュアル(平成23年3月改訂)
<https://www.env.go.jp/air/osen/manual.html>

H. 研究発表

なし

表 1 フタル酸エステル類分析条件の一例

Gas Chromatograph	Agilent Technologies 7890B	
Column	DB-5 30 m×0.32mm i.d.×0.25 μm	
Oven temperature	70°C (2 min)-15°C/min-170°C-5°C/min-220°C- 20°C /min-280°C (10 min)	
Carrier gas	Helium, 70 kPa(constant pressure mode)	
Inlet temperature	280°C	
Injection volume	1 μL, splitless mode (purge on time 3 min)	
Mass spectral detector	Agilent Technologies 5977A MSD	
Detector temperature	260°C	
Acquisition mode	SIM	
Compounds	Quantification Ion	Confirmation Ion
DnBP	149	223
DEHP	149	167
DnBP- <i>d</i> 4	153	

表 2 添加回収試験における室内再現精度

Di-*n*-butyl Phthalate

	ID 01	ID 02	ID 03	ID 04	ID 05
Empore disk C18FF					
Average (µg/mL)	0.83	0.81	0.86	0.68	0.81
Recovery (%)	103.5	101.1	107.9	85.3	101.6
SD	0.03	0.02	0.02	0.06	0.11
RSD (%)	3.0	2.1	2.8	8.4	13.6
AERO SDB 400HF					
Average (µg/mL)	0.77	0.82	0.80	0.74	0.84
Recovery (%)	96.3	102.0	100.1	92.1	105.0
SD	0.05	0.02	0.06	0.03	0.02
RSD (%)	6.9	2.0	7.5	4.5	2.3
(n=5)					

Bis (2-Ethylhexyl) Phthalate

	ID 01	ID 02	ID 03	ID 04	ID 05
Empore disk C18FF					
Average (µg/mL)	0.86	0.84	0.76	0.73	0.68
Recovery (%)	107.3	104.8	95.0	91.7	84.5
SD	0.04	0.03	0.04	0.05	0.14
RSD (%)	4.2	4.0	4.8	6.7	20.7
AERO SDB 400HF					
Average (µg/mL)	0.77	0.83	0.68	0.78	0.59
Recovery (%)	96.6	103.3	85.4	97.9	73.3
SD	0.05	0.02	0.06	0.02	0.00
RSD (%)	6.6	1.9	8.1	2.3	0.8
(n=5)					

表 3 添加回収試験における室間再現精度

	Empore disk C18FF		AERO SDB 400HF	
	DnBP	DEHP	DnBP	DEHP
Average (µg/mL)	0.80	0.77	0.79	0.73
Recovery (%)	99.9	96.7	99.1	91.3
SD	0.07	0.08	0.04	0.10
RSD (%)	8.6	9.7	5.1	13.1
				(n=5)

表 4 操作空試験値

	ID 01	ID 02	ID 03	ID 04	ID 05
DnBP					
Average (µg/mL)	0.016	0.008	<0.072	<0.0279	<0.0059
Background (%)*	2.0	1.0			
SD	0.001	0.002			
DEHP					
Average (µg/mL)	0.002	0.017	<0.072	<0.0079	0.049
Background (%) *	0.3	2.1			6.1
SD	0.0014	0.0002			0.0003
*室内空中濃度:1µg/m ³ の場合					(n=5)

表 5 定量下限値

	DnBP	DEHP	DnBP	DEHP
	Empore disk C18FF		AERO SDB 400HF	
ID 01				
Blank conc. × 3 (µg/mL)	0.045	0.006	0.045	0.012
Air conc. (µg/m ³)*	0.05	0.01	0.05	0.01
ID 02				
Blank conc. × 3 (µg/mL)	0.09	0.09	0.03	0.04
Air conc. (µg/m ³)*	0.10	0.10	0.03	0.05
*流速3L/minで24時間空気捕集した場合				

参考表 1 真度及び精度の目標

項目	真度 (%)	併行精度(RSD%)	室内精度(RSD%)
無機物 ^{*1}	70 ~ 130	10	15
有機物 ^{*2}	70 ~ 130	20	25
農薬類	70 ~ 130	30	35

^{*1} 通知において変動係数の目標が 10% 以下に定められている項目

^{*2} 通知において変動係数の目標が 20% 以下に定められている項目

水道水質検査方法の妥当性評価ガイドライン(平成 24 年 9 月 6 日付け健水発 0906 第 1 号別添)(最終改正:平成 29 年 10 月 18 日付け薬生水発 1018 第 1 号)より