

厚生労働行政推進調査事業補助金（化学物質リスク研究事業）
（総合）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、平成 27～28 年度におい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、標準試験法の構築を完了した。平成 28 年度は、整備した標準試験法の妥当性評価手法を構築し、平成 29 年度において 4 機関 5 研究室の協力を得て妥当性を検証した。その結果、本研究において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固相吸着-溶媒抽出法によ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」の空気は化学物質への曝露の観点から極めて重要な曝露媒体である。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から室内空気質に強い関心が寄せられている。また、室内環境における慢性的な化学物質曝露という点からも、室内空気質に対する注目が高まっている。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。居住環境の室内空気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、室内濃度指針値の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、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⁾に記載されている従来の暫定試験法を改良するとともに、妥当性が検証されたフタル酸エステル類試験法を確立することを目的として一連の研究を実施した。平成 29 年 4 月 19 日に開催された第 21 回シックハウス検討会²⁾では、フタル酸ジ-n-ブチルおよびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの指針値改訂案として、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、この指針値案の 1/10 ないし 1/100 の濃度を検出できる試験法として、定量下限値を 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ とする試験法を確立し、妥当性評価を行った。

B. 現行のフタル酸エステル類暫定試験法の

問題点

フタル酸ジ-n-ブチルおよびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの採取方法と測定法に関しては、「シックハウス検討会中間報告書—第6回～第7回のまとめ(別添2)(別添3-4)」(平成13年7月5日)¹⁾に暫定案として示されている。この暫定案に概ね則った方法を用いて、平成26年度に全国の50家屋を対象に実施した実態調査(厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業「室内環境における準揮発性有機化合物の多経路曝露評価に関する研究」(研究代表者 神野透人))³⁾の結果では、室内空気中のフタル酸ジ-n-ブチルの最高濃度は3.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、中央値は0.65 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの最高濃度は1.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、中央値は0.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった³⁾。現行の室内濃度指針値では、フタル酸ジ-n-ブチルは220 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルについては120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ に設定されているものの、実際の室内空気汚染状況としては、上記実態調査の最高濃度でもフタル酸ジ-n-ブチルは室内濃度指針値の1/60、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルについては1/90の濃度であり、指針値と比較して極めて低い値となっている。

このような極低濃度のフタル酸ジ-n-ブチルおよびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルを正確に定量するためには極めて感度の高い分析法を構築する必要があるが、その場合には、普遍的な汚染物質であるフタル酸エステル類による装置・器具の汚染を、前処理を含む全工程において厳密にコントロールしなければならない。また、試料採取量の増大によって必要な定量下限値を得る場合には、十分な量の空気を採取するために大型の空気吸引ポンプを用いて、比較的長時間にわたって空気採取を行う必要がある。空気吸引ポンプが大型化するほどその可搬性は低下し、騒音・振動によって居住者の生活が妨げられ、「通常の生活を営みながら24時間空気を採取する」ことが困難となるおそれもある。

このような背景から、本研究で確立するフタル酸エステル類試験法としては、その目的を「室内濃度指針値を満たしているか否かを正確に判定するための試験法」に限定し、目標とする定量下限値を指針値案の100分の1ないし10分の1程度、すなわち1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ に設定することとした。

C. フタル酸エステル類試験法の確立(平成

27-28年度)

既存の分析方法をレビューし、最終的に下記の試験法を確立した。

[試験方法の概要]

固相吸着 溶媒抽出法による試験法として、先ず吸着剤を充填した捕集部に室内空気および外気を一定流速で吸引して、測定対象物質を捕集する。捕集部から測定対象物質を溶媒で溶出させ、これをキャピラリー-カラムに導入してガスクロマトグラフィー/質量分析法(GC/MS)により分離・定量することを基本とする。

[試薬]

1. アセトン: 1 μL 程度をGC/MSに注入したとき、測定対象物質および内部標準物質のクロマトグラムに妨害を生じないもの。(例として、残留農薬・PCB試験用)。フタル酸エステル類による汚染を低減するために、1 L程度の容量のものを購入し、開栓後1週間以内のものを使用する。
2. 標準物質: 原則としてフタル酸エステル分析用として市販されているもの。
3. 標準原液 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$): フタル酸ジ-n-ブチルまたはフタル酸ジ-2-エチルヘキシル100 mgを100 mLのメスフラスコに精秤し、アセトンを加えて100 mLとする。この溶液1 mLはそれぞれの標準物質1000 μg を含む。
4. 標準溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 標準原液の一定量をアセトンを用いて10倍に希釈する。この1 mL溶液はそれぞれの標準物質100 μg を含む。
5. 内標準原液 (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 内標準物質(フタル酸ジ-n-ブチル- d_4 , フタル酸ジ-2-エチルヘキシル- d_4) 100 mgを100 mLのメスフラスコに精秤し、アセトンを加えて100 mLとする。
6. 内標準溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 内標準物質をアセトンで10倍に希釈する。この溶液1 mLは内標準物質100 μg を含む。
7. 高純度窒素ガス: 測定対象物質のクロマトグラムに妨害を生じないもの。

[装置および器具]

1. 空気吸引ポンプ: 捕集剤装着時に1~10 L/min程度の流量で吸引できる能力を持ち、流量調節機能を有し、設定流量に対し

- て±10%以内の制御精度を有するもの。24時間以上連続的に使用でき、規定の流量が測定できる積算流量計を備えているもの。
2. 空気捕集部：空気の採取には、四フッ化エチレン樹脂製のろ紙フォルダーを用いる。フィルター装着前にアセトンで洗浄し、風乾後、直径 47 mm、円形の ODS フィルターをセットする。なお、フタル酸エステル類による汚染を低減する目的で、ODS フィルターはアセトン(20 mL/Filter、5回)で浸漬洗浄し、風乾したものを使用する。ただし、ガス状あるいは粒子状で存在するフタル酸エステル類を存在形態別に測定する必要がある場合は、ODS フィルター前段に粒子状物質捕集用として直径 47 mm、厚さ 0.25 mm の円形の石英繊維製のフィルターを装着する。フタル酸エステル類による汚染を低減する目的で、400 で 3 時間加熱処理したものをを用いる。また、スチレンビニルベンゼンポリマー 400 mg を内径 15 mm、長さ 20 mm のガラスカートリッジに充填し、その上部にガラス繊維フィルターを配置し、O-リングで固定した構造の捕集部材が市販されている。この捕集剤については、洗浄済みの状態で市販されているためアセトン等による洗浄の工程を経ることなく、開封後、手指からの汚染のないようにフォルダーに装着してそのまま空気捕集が出来る^{4,5)}。
 3. 共線付き遠沈管あるいはスクリュウキャップバイアル：容量 10 mL 程度。捕集剤として用いる後述の直径 47 mm のフィルター 2 枚とアセトン 10 mL を入れて栓の出来るもの。
 4. マイクロシリンジ：容量 1～10 μL または、10～100 μL が計りとれるもの。

【試料の採取】

1. 空気捕集部と吸引ポンプを連結した採取装置によって、正確に試料を計量して試料捕集部に導入する。
2. 空気試料の採取は、室内では居間と寝室の 2 カ所、ならびに外気 1 カ所についてそれぞれ 2 回ずつ採取する。試料採取に際しては、トラベルブランクとして捕集装置を密封したままの状態を試料採取と同様に持ち運ぶ。
3. 新築住宅においては試料採取装置を用いて 10 L/min 程度の流量で概ね 100 分間採取する。また、居住住宅においては 3

- L/min の流量で 24 時間採取する。
4. 試料は、室内の 2 カ所および外気 1 カ所でそれぞれ 2 回ずつ採取し、2 重測定 (n=2) の意味を持たせる。2 重測定のための試料採取は一住宅の室内試料採取において一試料もしくは一連の試料採取において試料数の 10% の頻度で行う。
 5. 素手で器具に触れることにより、フタル酸エステル類の汚染が引き起こされるため、採取装置を取り扱う際は、フタル酸エステル類を素材に含まない手袋を着用する。
 6. 各装置の接続にはフタル酸エステル類の汚染を引き起こすシールテープは使用せず、テフロンコネクタなどを使用する。
 7. 試料採取に当たって装置を組み立てた後、漏れのないことを確認する。

【トラベルブランク】

1. トラベルブランク試験用として未使用の密封した捕集部を用い、試料採取操作を除いて、室内空気の試料採取用の捕集部と同様に持ち運び、取り扱う。密封した捕集部では試料の採取時に開封後、密栓して分析時まで同様に保存する。
2. この操作は、一住宅の室内試料採取において一試料もしくは一連の試料採取において試料数の 10% 程度の頻度で実施する。

【試験液の調製】

1. 試料空気試験液の調製：空気採取後のフィルターは、ピンセットで筒状に丸めて 1 枚を遠沈管底部に入れ、アセトン 5 mL を加えて 10 分間超音波抽出する。超音波処理後静置し、その上清を GC/MS による分析試料とする。この場合、内標準液はアセトン 5 mL 添加後に加える。なお、試料を濃縮して測定する場合、抽出液は遠心分離 (2,500 回転、10 分) 後、上清 5 mL を濃縮管にとり、内標準液を加えて高純度窒素ガスを穏やかに吹き付けることにより 10 倍濃縮して GC/MS による分析試料とする。空試験については未使用のフィルターを用いて同様の操作を行う。
2. 操作ブランク試験液の調製：試料空気用の捕集部と同一の洗浄済み捕集部について 1. 試料空気試験液の調製と同様の操作を一連の操作の中で一回以上行い、操作ブランク試験液を調製する。
3. トラベルブランク試験液の調製：トラベルブランク試験用の捕集装置について 1. 試

料空気試験液の調製と同様の操作を行い、トラベルブランク試験液を調製する。

4. 二重測定用試験液の調製:二重測定用の捕集部について 1. 試料空気試験液の調製と同様の操作を行い、二重測定用試験液を調製する。

[検出下限値及び定量下限値の求め方]

操作ブランクが未検出の場合は、検量線作成時の最低濃度(定量下限値付近)の混合標準濃度系列について、GC/MSによる分析を行って測定値(ng)を求め、その値を捕集空気体積で除して空気濃度を算出する。ただし、 $t=20$ 、 $P=101.3$ kPa とする。

操作ブランク値のある物質では、操作ブランク試験液 5 試料以上を測定して求めた標準偏差(s)から次式により、各測定対象物質の検出下限値及び定量下限値を算出する。混合標準濃度系列と操作ブランク値のうち、大きい方の標準偏差を用いて計算する。測定対象物質のいずれかの定量下限値が、目標下限値より大きい場合には、試薬、器具、機器等をチェックして、目標定量下限値以下になるように調整する。

この測定は、機器の分析条件を設定した場合など必要に応じて必ず 1 回以上行う。

検出下限値 = $3s$ (mg/m^3)

定量下限値 = $10s$ (mg/m^3)

目標定量下限値は指針値の 1/10 とする。

[濃度の算出]

GC/MS 分析によって得られた結果から、次式を用いて空気中の各測定対象物質の濃度を算出する。

$$C = \frac{(As-At) \times E \times 1000}{v \times V \times 293/(273+t) \times P/101.3}$$

C: 20 における空気中の各測定対象物質の濃度 (mg/m^3)

As:GC/MS に注入した試料中の各測定対象物質の重量 (ng)

At:各測定対象物質のトラベルブランク値(ng)

E:試験液量 (mL)

v:GC/MS への注入液量

V:空気捕集量 (L)

t:試料採取時の平均気温()、湿式型積算流量計を使用している時には、積算流量計の平均水温()

P:試料採取時の平均大気圧(kPa)、湿式型積算

流量計の場合には(P-Pw)を用いる。ここで、Pwは試料採取時の平均気温tでの飽和水蒸気圧(kPa)

結果には、個々の測定値と各場所における平均値の両方を記載する。

[フタル酸エステルの測定に係る注意事項]

1. 全操作を通じてビニール手袋等は使用しない。
2. プラスチック製品など、フタル酸エステル類を含むものに触れた場合は、必ず石けんで手洗いを行う。
3. 試験溶液が触れる部分に触れる場合はなるべくピンセット等を用いる。もしくは十分に石けんを用いて手を洗い、フタル酸エステル類を素材に含まない綿製の手袋を着用する。
4. 使用する器具はガラス製、テフロン製、金属製のものを用いる。
5. 各器具は使用直前に残留農薬分析用クラスのアセトンで超音波洗浄する。これらの溶媒は開封後は速やかに使い切る必要がある。
6. 器具は使用直前まで、開口部をアルミホイルでパッキングし、空気との接触を避けるようにする。
7. 記録用紙等の記入に際しては油性マジックやボールペンは使用しない。
8. 粘着テープの使用は極力避ける。
9. 装置のブランクを必ず確認する。
10. 機器内部が汚染されていないかチェックする。
11. GCの注入口のインサートやシールはアセトンで超音波洗浄してから使用する。
12. インサートはこまめに交換する。
13. 各部に使用されているOリングは劣化によりブランクを発生するので留意する。
14. セプタムは耐熱性の良い汚染の少ないものを選ぶ。新品のものはコンディショニングしてから用いる。

D. 試験法妥当性評価のための基礎的事項の検討 (平成 28 年度)

D-1. 概要

基礎的検討として、既知量のフタル酸ジ-n-ブチルおよびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルを添加した捕集部材、ならびにトラベルブランクとしてクリーンアップした捕集部材について

抽出・分析を実施し、回収率、測定値のばらつきについて検証した。なお、実際の実態調査を想定して、「クリーンアップした捕集部材を宅配便で移送」する工程を加えた。

D-2. 方法

[トラベルブランクならびにフタル酸添加捕集剤の調製]

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。直径47mmのODSフィルター(Empore Disk C18 Fast flow, 3M製)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。洗浄したフィルターを同じくアセトン洗浄したフィルターフォルダー(EMO-47、GLサイエンス社製)に装着し、アルミホイルで包み、トラベルブランクとした。

室内空中の濃度を $1\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ と仮定し、3L/minで24時間空気を捕集した場合、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ODSフィルターを、アセトン洗浄済みのピーカーに載せ、ODSフィルター一枚あたりの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 $10\ \mu\text{L}$ をマイクロシリンジでフィルター上5箇所へ滴下し、アセトン洗浄済みのフィルターフォルダーに装着して、アルミホイルで包んで検体とした。

フタル酸の汚染を低減した捕集部材としてAEROカートリッジ(AERO Cartridge SDB-400HF, GLサイエンス製)を購入した。これは、アルミホイルで包まれた状態で納品されるが、そのアルミホイルを剥がし取り除き、新たにアルミホイルで覆い包みトラベルブランクとした。また、アルミホイルを剥がし取り除いたAEROカートリッジの前段のろ紙上に、フタル酸エステル類の添加量がそれぞれ $4\ \mu\text{g}$ 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 $10\ \mu\text{L}$ をマイクロシリンジで5箇所へ滴下し、アルミホイルで覆い包んだ。それとは別に、アルミホイルを剥がし取り除いたAEROカートリッジのSDB部分にフタル酸エステル類の添加量がそれぞれ $4\ \mu\text{g}$ 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 $10\ \mu\text{L}$ をマイクロシリンジでSDB部分に注入し

たのち、アルミホイルで覆い包んで検体とした。これらの捕集剤を宅配便で移送し、一週間以内に抽出操作を行った。

[捕集剤からの抽出方法]

フォルダーに装着されたフィルターをピンセットを用いてアセトン洗浄済みの共栓付き試験管の底部に回収した。AEROカートリッジについては、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た。アセトン5mLを添加し、共栓をしてさらに超音波処理中に共栓が浮かないようアルミホイルで共栓の上部を覆い被せた。10分間超音波処理した後に軽く攪拌し、静置したのちに、上清をGC/MS分析試料とした。

[GC/MSによる分析方法]

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、添加量の回収率、ならびに測定値のばらつきを評価した。

D-3. 結果と考察

[トラベルブランク試験結果]

トラベルブランクとして回収した47mm ODSフィルターまたはSDB Cartridgeから回収したろ紙とSDBのアセトン抽出液をフタル酸エステルの $0.1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ アセトン溶液と比較した。GC/MSクロマトグラムを図1に示す。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。この結果から、今回提案する器具、フィルター等の洗浄方法によってフタル酸エステルの汚染が極めて低レベルに抑えられること、また捕集剤の宅配便移送によるフタル酸エステルの汚染は回避できる可能性が高いことが明らかになった。

フタル酸エステルの $0.1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ アセトン溶液は、本研究で提案する方法で空気を捕集し(捕集量 $4\ \text{m}^3$)捕集剤をアセトン5mLで抽出して分析する条件では、捕集空気 $1\ \text{m}^3$ あたり、各フタル酸エステル約 $0.1\ \mu\text{g}$ すなわち約 $0.1\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ 空気に相当する。

$$\frac{0.1\ \mu\text{g}/\text{mL} \times 5\ \text{mL}}{4\ \text{m}^3} = 0.125\ \mu\text{g}/\text{m}^3$$

図1に示すトラベルブランクのマスクロマトグラムは $0.12\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ よりはるかに低い。平成26年度に実施した全国の50家屋を対象に

した実態調査結果では、室内空気中の フタル酸ジ-n-ブチルおよびフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの中央値はいずれも約 0.6 µg/m³であった³⁾ことから、本試験法に則って測定器具や、捕集剤の洗浄、抽出過程までをフタル酸エステルの汚染なく実施することによって、定量下限値をより低く設定することが可能となり、詳細曝露評価結果として有用な情報が得られることが期待できる。

[試料添加回収試験結果]

GC/MS クロマトグラムを図 2 に示す。また、添加回収率を表 1 に示す。

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も、本研究で検証に用いた 2 種捕集剤間で顕著な差は認められず添加した量の 97%以上が回収され、その 5 回のばらつきも 5%以下であった。直径 47 mm の ODS フィルターを本報告書で示す洗浄法でクリーンアップした場合でも、市販の SDB カートリッジを使用した場合でも、いずれも良好に添加した検討対象物質を回収できること、また、そのばらつきが低いことが明らかになった。この結果から、本報告書に示す捕集剤の洗浄方法ならびに抽出法が適切であること、また、市販のクリーンアップ済み捕集剤が適用できることが明らかになった。

E. 試験法の妥当性評価 (平成 29 年度)

E-1. 概要

先ず、分析法の性能評価として真度ならびに精度を評価した。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 (1. Empore Disk C18 Fast flow 直径 47 mm、3M 製 2. AERO Cartridge SDB-400HF, GLサイエンス製) に既知量の 2 種フタル酸エステル (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。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 GCMS 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 GCMS による定量を実施した。

さらに、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、かく研究室において GCMS 分析を実施した。

E-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)

E-3. 方法

[試薬、器具及び装置]

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 20 mL 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。

[ブランクならびにフタル酸エステル負荷捕集剤の調製]

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。
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 µg/m³ の濃度で存在する空気を、3 L/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 µg 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 4µg 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 μ g/mL の濃度で含むアセトン溶液 10 μ 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。

[妥当性評価用試料の精度評価]

1. 分析試料の調製: 調製した妥当性評価用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ため、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 5mL 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 5mL 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。
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。

[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]

1. 分析試料の調製: [妥当性評価用調製試料の精度評価]1.分析試料の調製に示す方法で GC/MS 分析試料を調製した。
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 2 に示す。

E-4. 評価結果と考察

[妥当性評価用試料の精度]

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。

[試験法の妥当性評価]

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。
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⁶⁾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 μ g 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 μ g/mL) に GCMS 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 3 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 4 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。

[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 GCMS 分析を実施した。結果を表 5 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、平成 28 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。

[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 6 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)⁷⁾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、本マニュアルでは、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。

F. 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。

G. 健康危険情報

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特許取得

なし

実用新案登録

なし

I. 研究発表 学会発表

- 1) Azuma K, Tanaka-Kagawa T, Jinno H. Health risk assessment of inhalation exposure to 2-ethylhexanol, 2,2,4-trimethyl-1,3-pentanediol diisobutyrate, and texanol in indoor environment. 14th International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Ghent, Belgium, 3–8 July, 2016.
- 2) Azuma K, Tanaka-Kagawa T, Jinno H. Health risk assessment of inhalation exposure to cyclic dimethylsiloxanes, glycols, and acetic esters in indoor environments. 28th Annual International Society for Environmental Epidemiology Conference, Rome, Italy, 1-4 September 2016.
- 3) 秋月真梨子, 田原麻衣子, 遠山友紀, 青木明, 岡本誉士典, 植田康次, 榎本孝紀, 埴岡伸光, 五十嵐良明, 香川(田中)聡子, 酒井信夫, 神野透人: 間欠サンプリング法による室内空気中総揮発性有機化合物測定法の開発. 日本薬学会第 137 年会 (2017.3)
- 4) 鳥羽陽, 中島大介, 遠藤治, 香川(田中)聡子, 神野透人, 齋藤育江, 杉田和俊, 酒井信夫, 星純也: 衛生試験法・注解 空気試験法 多環芳香族炭化水素 (新規). 日本薬学会第 137 年会 (2017.3)
- 5) 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気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 室内空気中準揮発性有機化合物試験法の妥当性評価 研究分担者 酒井信夫 研究協力者 齋藤育江
- 6) 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)
- 7) 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>

J. 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) 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業 「室内環境における準揮発性有機化合物の多経路曝露評価に関する研究」平成 24-26 年度 総合研究報告書 研究代表者 神野透人 平成 27 (2015) 年 3 月
- 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気中化学物質測定方法の開発」平成 27 年度 総

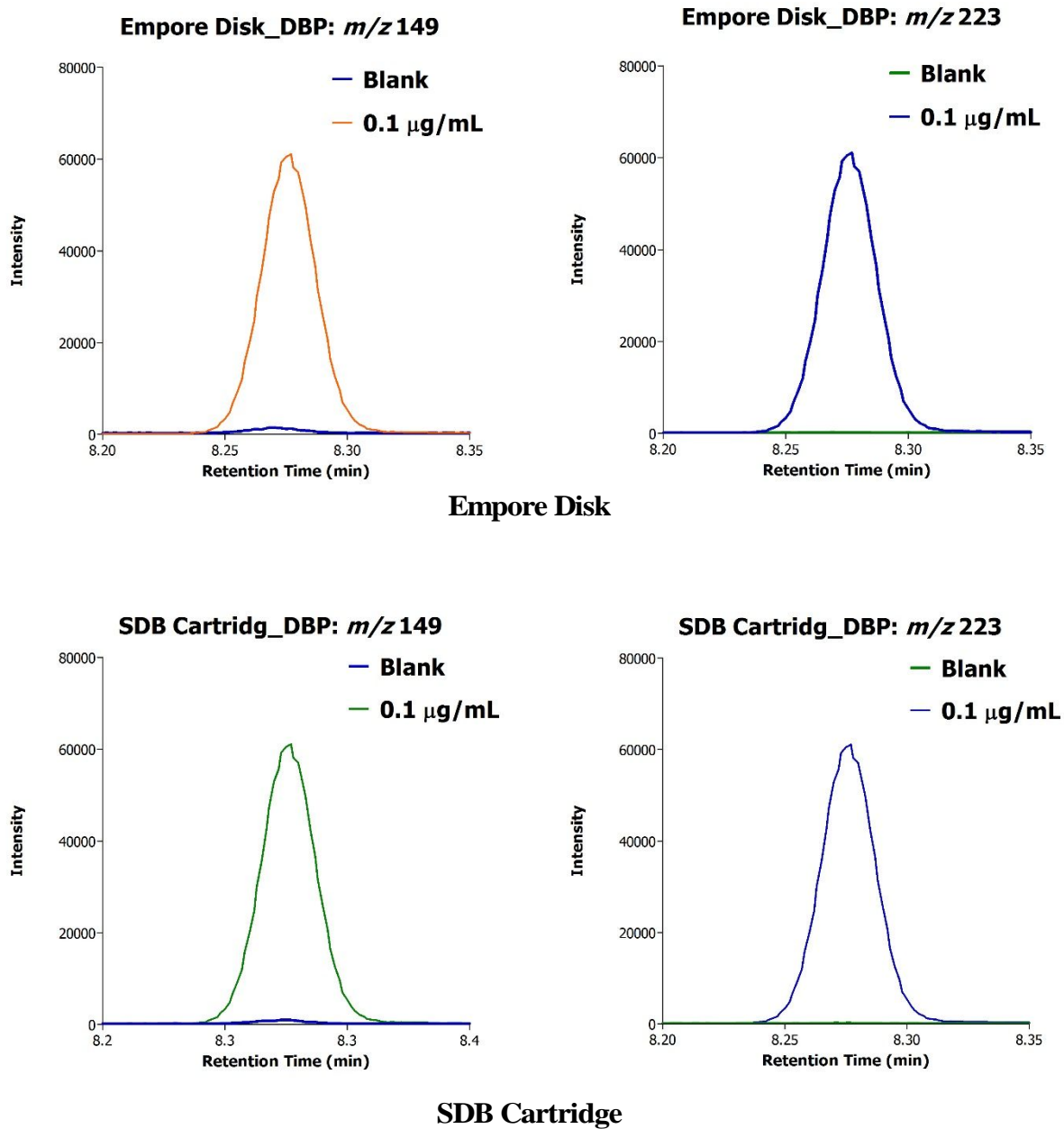
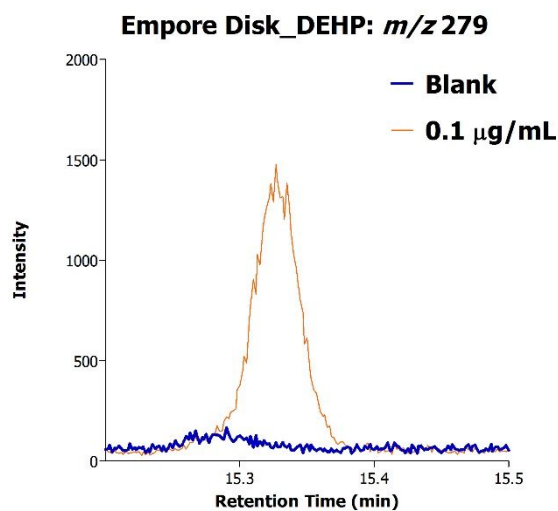
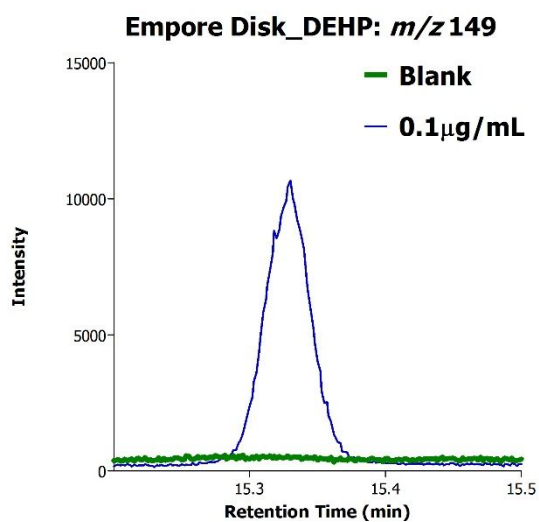
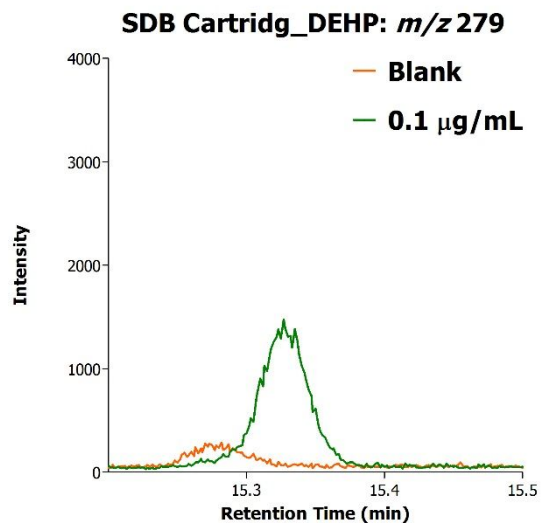
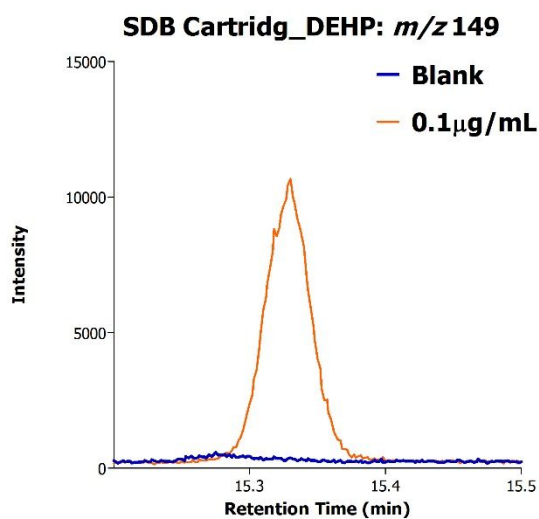


図 1-1 空気捕集剤のブランク試験結果 — フタル酸ジ-*n*-ブチル(DBP)

トラベルブランクとして回収した捕集剤のアセトン抽出液、ならびにフタル酸ジ-*n*-ブチル(DBP)0.1 µg/mL アセトン溶液の GC/MS クロマトグラム。



Empore Disk



SDB Cartridge

図 1-2 空気捕集剤のブランク試験結果 — フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)

トラベルブランクとして回収した捕集剤のアセトン抽出液、ならびにフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)0.1 μg/mL アセトン溶液の GC/MS クロマトグラム。

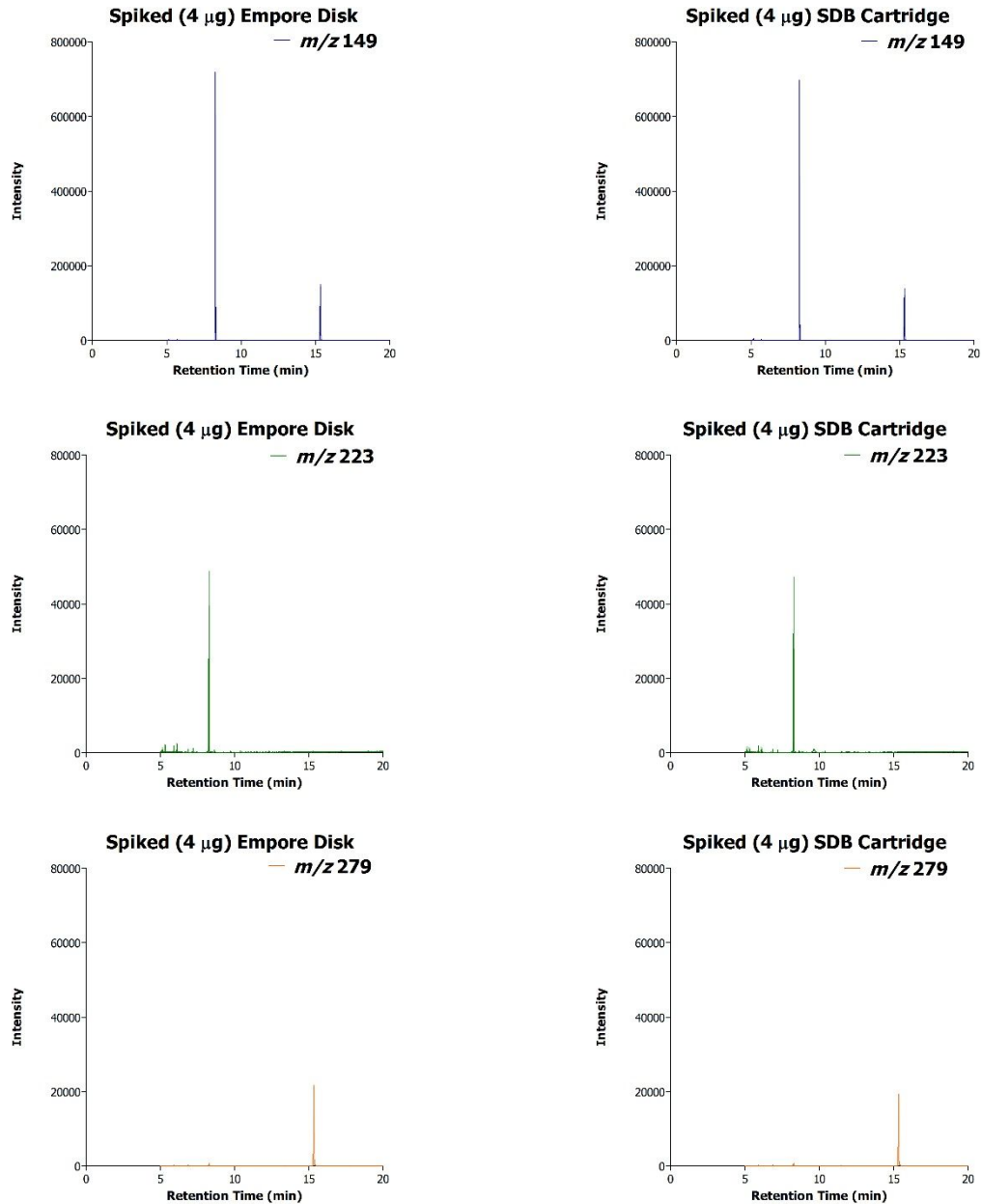


図2 フタル酸エステルの空気捕集剤から添加回収試験結果

フタル酸ジ-*n*-ブチル(DBP)、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)を各 4 μg 添加して、回収した捕集剤のアセトン抽出液の GC/MS クロマトグラム。本研究で提案する空気捕集ならびに抽出条件で試験した場合、各フタル酸エステル約 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 空気に相当。

表 1 捕集部材に添加したフタル酸エステル類の回収率とそのばらつき

Method	Dibutyl Phthalate				
	Extracts Conc. (ug/mL)	Amount (ug)	Calculated (ug/m ³)	Atmospheric Concentration	
				Average	SD
Empore	0.8779	4.3894	1.0161	0.9637	0.0372
	0.8419	4.2095	0.9744	104.1%	3.9%
	0.7907	3.9536	0.9152		
	0.8176	4.0882	0.9463		
	0.8351	4.1755	0.9666		
SDB (Dropped)	0.7432	3.7161	0.8602	0.8985	0.0420
	0.8380	4.1902	0.9700	97.0%	4.7%
	0.7721	3.8605	0.8936		
	0.7590	3.7951	0.8785		
	0.7694	3.8468	0.8905		
SDB (Injected)	0.8250	4.1248	0.9548	0.9473	0.0424
	0.8664	4.3318	1.0027	102.3%	4.5%
	0.8341	4.1705	0.9654		
	0.7706	3.8531	0.8919		
	0.7962	3.9808	0.9215		

Method	Bis(2-ethylhexyl) Phthalate				
	Extracts Conc. (ug/mL)	Amount (ug)	Calculated (ug/m ³)	Atmospheric Concentration	
				Average	SD
Empore	0.8316	4.1579	0.9625	0.9066	0.0378
	0.7832	3.9159	0.9065	97.9%	4.2%
	0.7395	3.6974	0.8559		
	0.7794	3.8968	0.9020		
	0.7831	3.9155	0.9064		
SDB (Dropped)	0.7494	3.7470	0.8673	0.9036	0.0474
	0.8505	4.2524	0.9843	97.6%	5.2%
	0.7794	3.8968	0.9020		
	0.7526	3.7632	0.8711		
	0.7718	3.8592	0.8933		
SDB (Injected)	0.8231	4.1157	0.9527	0.9329	0.0424
	0.8538	4.2688	0.9881	100.8%	4.5%
	0.7995	3.9973	0.9253		
	0.7541	3.7703	0.8727		
	0.7997	3.9986	0.9256		

表 2 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×0.32 mm 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 3 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 4 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 5 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 6 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⁶⁾

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