

作業環境における低濃度の発がん性物質の分析法の開発に関する研究

小野 真理子*¹ 菅野 誠一郎*¹
萩原 正義*¹ 古瀬 三也*¹

化学物質は、危険・有害な物質に対する規制対象外の物質でも使用量や使用法によっては労働者の安全や健康に害を及ぼすおそれがある。厚生労働省はこれまでも発がん性が疑われる物質に対してリスク評価を行い、過剰発がんリスクレベルが一定値以下となるような値を基に、管理濃度あるいは管理の目標とすべき指標値を設定してきている。発がんリスクを考慮した場合、管理濃度等は低い値になることが想定される。すなわち、多くの化学物質の管理濃度はppmレベルであるが、発がん性物質については2~3桁低くなる可能性がある。本研究では、低い管理濃度が設定されて、低濃度で管理することが求められ、かつガスクロマトグラフ法で測定可能な物質について、作業環境で使用可能な分析方法を開発する際に重要となる視点について、実験データと既存の情報を整理した。低濃度分析のための感度向上に関わる重要な視点は、1)適切な捕集法、2)加熱脱着法の導入、3)溶媒脱着を適用する際の注意点、4)感度向上のために質量分析装置を導入する際の注意点、の4点である。本研究の成果として、試料捕集時にろ過捕集法と固体捕集法を同時に使用することの重要性と、低濃度測定に使用する捕集剤として活性炭は適当でないことが明らかとなった。最終的には本研究の成果と既知の重要な情報をまとめてガイダンスとして公開することにより、より広範囲の物質を低濃度で測定する際に有用な情報を提供可能である。

キーワード: ガスクロマトグラフ法, GC/MS, 作業環境, 有機化合物, 発がん性物質

1 はじめに

化学物質の作業環境管理では、作業環境測定を実施して得られた評価値を用い、管理濃度を指標として対象となる作業環境を評価して種々の対策をとる。その際に使用される管理濃度は、管理対象の化学物質の有害性と管理の実効性を考慮して設定されてきた。一方、一般環境においては、発がん物質について別途リスク評価を行って、過剰発がんリスクレベルが一定値以下となるようなばく露の指標値の設定がなされている例がある。

厚生労働省は、「労働安全衛生法第28条第3項の規定に基づき厚生労働大臣が定める化学物質による健康障害を防止するための指針」(平成24年10月28日健康障害を防止するための指針公示第23号¹⁾) (以下、指針)を発出し、26種の化学物質について、その製造・取扱い等の際に、事業者が講ずべき措置について新たに定めている。発がん性が疑われる物質に対してリスク評価を行い、過剰発がんリスクレベルが一定値以下となるような値を基に、管理濃度あるいは作業環境を管理するための目標とすべき指標値(管理濃度等)を設定している。発がんリスクを考慮した場合、管理濃度等は低い値になることが想定される。すなわち、これまで多くの化学物質の管理濃度がppm(mg/m³)レベルであったものが、数十~数百ppb(μg/m³)レベルになる可能性がある。更に、作業環境測定に使用する分析手法は、管理濃度の1/10の濃度まで測定できることが求められていることから、従来の分析法では感度が不足することが起こるため、新たな測定法が求められる。

また、平成26年6月には労働安全衛生法の一部改正²⁾がなされ、危険・有害な物質に対する個別規制対象以外の物質でも、使用量や使用法によっては労働者の安全や健康に害を及ぼすおそれがあることから、一定の危険性・有害性が確認されている化学物質(安全データシート(SDS)の交付が義務づけられている640物質)について、事業者には危険性又は有害性等の調査(リスクアセスメント)を義務付けることとなった¹⁾。従って、今後はより広汎な物質を、より低濃度で測定する方法が求められる可能性がある。そのようなニーズに対応するため、新たに有機化合物の分析法を開発する場合に検討すべき項目を整理し、周知していく必要がある。

本研究で対象とする化学物質は、法・指針に示される物質のうち、ガスクロマトグラフ(GC)により分析可能な有機化合物とした。揮発性・半揮発性の有機化合物の作業環境測定では、活性炭等の捕集剤による固体捕集を行ったのち、溶媒によって脱着し、ガスクロマトグラフ/水素炎イオン化検出器(GC/FID)で測定するのが一般的である。しかし、このような測定法を低濃度領域での測定に応用するためには幾つかの改善が必要であり、改善に伴う注意点がある。すなわち、適切な捕集剤を選択すること、分析装置になるべく多くの試料を導入し感度を向上させるために加熱脱着による試料導入を使用すること、従来の溶媒脱着を行って低濃度試料を分析する際に注意すべきこと、検出器を質量分析装置(MS)に変更して分離度や感度向上を図る際に注意すべきこと等の項目について、新たに検討する必要がある。これらの項目について実験データが示されることは少なく、分析法の開発者に対して注意を十分喚起しない可能性がある。本研究では必要に応じてこれらの項目に関わる実験データを示し、既存の情報がある場合には情報を整理することとした。

*1 (独)労働安全衛生総合研究所 環境計測管理研究グループ
連絡先: 〒214-8585 川崎市多摩区長尾6-21-1
(独)労働安全衛生総合研究所 環境計測管理研究グループ
小野真理子*¹ E-mail: ono@h.jniosh.go.jp

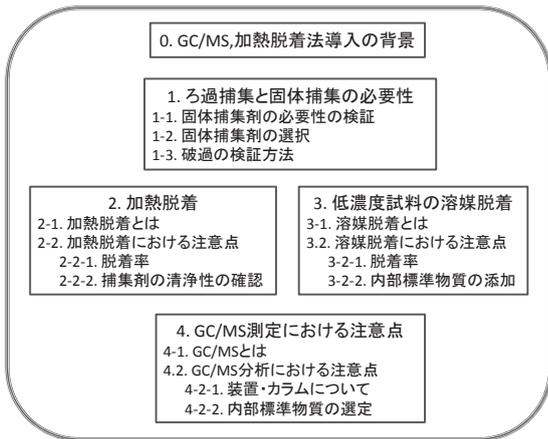


図1 ガイダンス(手引き書)に盛り込む内容

最終的には図1に目次を示すような「有機化合物の低濃度分析の手引き(仮題)」(以下、ガイダンス)を作成することを目的とする。感度向上に関わる重要な視点としてガイダンスに入れるのは次の4点であり、()内はガイダンス中の対応する章を示す。

- 1) 気体と固体との両方の性状で存在する可能性のある物質の捕集法の改良(1章)
- 2) 加熱脱着による試料のGCへの導入(2章)
- 3) 低濃度における溶媒脱着の脱着率(3章)
- 4) MSを使用するために検討すべき注意点(4章)

以下、項目1, 3, 4)に関わる実験結果について説明する。なお、項目2)については個別の分析法を検討する際に必要事項の確認を行うにとどめた。

2 気体と固体との両方の性状で存在する可能性のある物質の捕集法の改良

2.1 顕微鏡観察による経時的昇華の確認(1章1-1)

1)背景と目的 作業環境測定では試料の捕集方法として蒸気には固体捕集法が、固体にはろ過捕集法が用いられている。しかし有機化合物では常温で固体であっても昇華が起こり、ろ過捕集では捕集した試料の大部分が失われる可能性がある。それ故、試料採取にろ過捕集法+固体捕集法を採用すべきであるが、現時点では広く用いられているとは言い難い。空气中に存在する有機化合物の粒子は、昇華により粒径が小さくなり、やがてすべて蒸気となるが、粒径ごとの蒸発速度についての知見は少なく、蒸気を捕集するための固体捕集法の必要性に対する理解を得るために検証を行う。検討する有機化合物は、発がん性を考慮して低濃度で管理することが求められ、かつ、昇華が濃度測定にとって問題となる物質を選定した。

2)方法 固体の有機化合物の微粒子をスライドガラス上に載せ、一定の時間間隔で光学顕微鏡による観察像を撮影し、粒径の時間変化を観察した。実験室の気温は20-25°Cであったが、試料温度は制御せずに実験を行った(図2)。

有機化合物の結晶をボールミルにより粉碎し、スライ

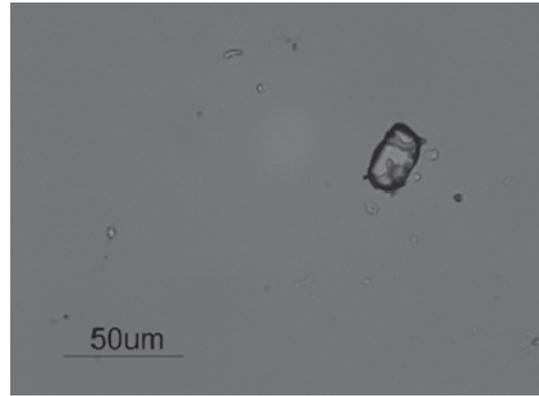


図2 m-ニトロアニソールの顕微鏡観察像

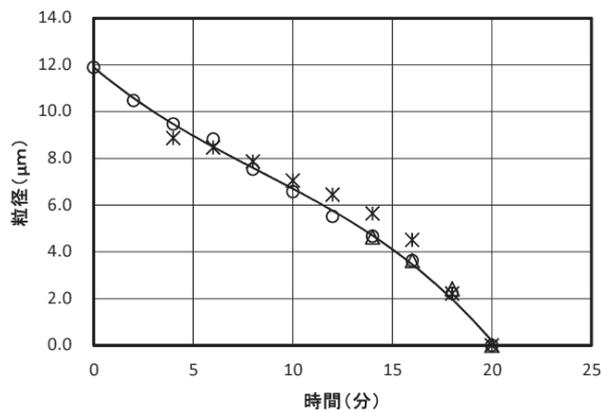


図3 m-ニトロアニソールの粒径変化

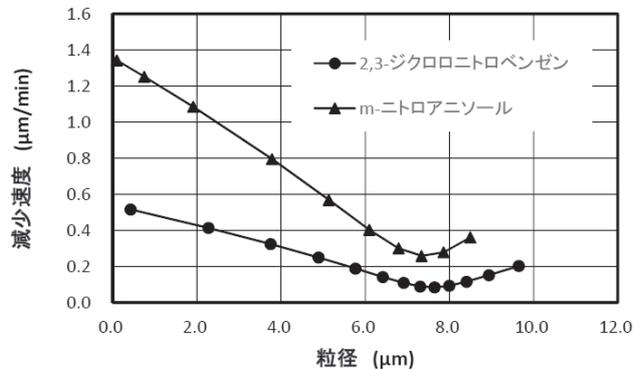


図4 粒径の減少速度

ドガラス上に載せ、粒径を観察し、その中から直径が10 μm程度の粒子を選択して、400倍の視野で視野内に入る粒子数が、粒子径計測に適する程度に分散したものを観察試料とした。

予備実験から写真撮影間隔を決定し、2分間隔で写真撮影し、粒子の長径と短径を計測した。粒子の直径は長径と短径の平均値とし、粒子の体積は、球と仮定して計算した。

3)結果 m-ニトロアニソールの粒径の時間変化を図3(3回の繰り返し実験)に示す。粒径の減少度は粒径が小さ

いほど大きい。すでに水滴の場合については実測例³⁾があるが、本実験においても同様の現象を示している。m-ニトロアニソールの粒子径減少のグラフを3次式で近似し、時間で微分することにより粒子径とその減少速度を求めた(図4)。実験開始直後は、粒子の球近似が荒くグラフが曲がっているが、ある程度時間が経過すると、粒子径の減少速度は粒径が小さいほど速くなることが明瞭に認められる。粒子径を減少速度で割った値は、粒子の寿命の指標とすることができる。粒子の寿命は粒径が小さいほど短くなり m-ニトロアニソール(蒸気圧 1.3×10^2 torr)は、8 μm で15分、1 μm で0.8分、2,3-ジクロロニトロベンゼン(蒸気圧 8.3×10^3 torr)では、8 μm で80分、1 μm で7分であった。10 μm の粒子の質量は1 ng (= 0.001 μg)程度である。測定した昇華速度はスライドガラス上の実験であり通気したフィルター上での昇華より昇華速度はかなり小さい可能性が高い。

4)まとめ 空気中に放出された有機化合物粒子は昇華により粒径が減少し、かつ粒径の小さい粒子ほど存在時間が短くなるため、空気中に一定時間、例えば1分間存在できる粒子の径には下限があることを示している。直径数 μm の粒子は測定対象であり、ろ過捕集の後段で固体捕集を行う必要性を示している。

2.2 固体捕集による昇華による損失の確認(1章1-1)

1)目的 昇華による試料の損失の程度をより実際に近い条件で実験的に検討した。

2)方法 試料採取に用いる固体捕集管の前に、グラスファイバーフィルターを取り付けた捕集管2本を直列に接続し、初めのフィルターにクロロニトロベンゼン類等の異性体16種を混合溶液として添加し、ポンプで空気を吸引した後、2本の捕集管に残る試料をそれぞれ分析し、フィルターからの蒸発量を求めた。

3)結果 固体捕集管に吸着した量を昇華量とすると空気吸引225 mL/min、10分間の吸引により、400 ng 添加時に50-200 ngの昇華が認められ、また添加量が増えると昇華量が増加した。昇華速度と蒸気圧の間には明瞭な相関は得られなかったが、これは、混合溶液として添加したためと思われる。

4)まとめ 管理すべき濃度が0.1 mg/m³より低いレベルである場合、ろ過捕集法による試料採取では、昇華により失われる試料の量が無視できず、ろ過捕集法と固体捕集法を同時に用いることが必要であることを示唆している。

3 溶媒脱着における試料の脱着率(3章3-2)

1)背景と目的 溶媒脱着で低濃度を分析する際には、捕集剤から溶媒への脱着率を確認しなくてはならない。本研究では、低濃度での管理が求められる可能性のある4物質とその異性体を対象として、脱着率について検討した。

2)方法 ①クロロニトロベンゼン、ニトロアニソール、フタロニトリルのそれぞれの異性体の9種類と2,4-ジク

ロロニトロベンゼンについて検討した。標準原液は10種の化合物の混合液として調製した。脱着率測定には、それぞれを溶媒で適宜希釈して使用した。捕集剤としては合成樹脂からなるXAD2種と、合成樹脂活性炭およびヤシ殻炭の活性炭2種について検討した。②脱着率は相平衡法で求めた。捕集剤と標準液との組み合わせは、XAD-アセトニトリル溶液、活性炭-二硫化炭素溶液とした。分析はGC/MSで行い、質量分析の感度補正用内部標準として重水素化ニトロベンゼン(d₅-NB)溶液を添加してから分析した。

3)結果 1Lの空気を捕集し2mLの溶媒で対象物質を溶解すると仮定すると、溶液の濃度1 $\mu\text{g/mL}$ は空気中の濃度として概ね0.1 ppmオーダーに対応する。①XADの系では溶液濃度が0.1 $\mu\text{g/mL}$ まで各化合物が定量的に脱着された。②活性炭の系では溶液濃度が10 $\mu\text{g/mL}$ で脱着率が80%未満であった。また、化合物により脱着率は異なったが、一般に濃度が低くなると脱着率が低下した。

4)まとめ 今回検討を行った化合物について固体捕集-溶媒脱着により低濃度での分析をする際は、活性炭を捕集剤として使用することは不適切であると言える。ppmオーダーの分析では十分に使用可能な活性炭であるが、化合物や濃度範囲によって脱着率が異なることから、溶媒脱着を用いる際には分析を行う濃度範囲における最低濃度で脱着率の検討を行うべきである。合成樹脂捕集剤では低濃度でも十分な脱着率がある。しかし、合成樹脂捕集剤は一般に吸着能が低いと言われており、高濃度の測定時には、吸着破過実験を事前に行ってから使用することが望ましい。

内部標準として添加したd₅-NBも活性炭に吸着し濃度が低下した。低下後の値を補正の基準値として計算すると、脱着率を実際より高く見積もることになる。内部標準物質は質量分析の再現性向上のために使用するの、分析の直前に添加することにより捕集剤の影響を受けずに分析することが可能となる。

4 質量分析装置を使用する際の条件の検討(4章4-2)

1)背景と目的 新たな物質の測定法、特に低濃度分析に対応するための測定法を開発するのに必要な情報を提供するため、GC/MS分析の感度に影響を与える因子として、特に真空度に着目し、検討を行った。

2)方法 標準試料溶液として、下記の化合物それぞれを約8 ng/ μL ずつ含むアセトニトリル溶液を調製した。

- ・クロロニトロベンゼン(CNB)全異性体3種
- ・ジクロロニトロベンゼン(DCNB)全異性体6種
- ・ニトロアニソール(NA)全異性体3種
- ・フタロニトリル(PN)全異性体3種中の2種

標準試料を同一条件で繰り返しGC/MS測定を行い、得られた結果(ピーク面積・高さ・幅など)を比較した。ただし、キャリアガスの流量を0.5~3.5 mL/分の間で変えて測定することで、質量分析計(真空系)に流れ込むガスの量を変化させ、真空度に違いを生じさせた。

GC/MSの分析条件を表1に示す。

3)結果と考察 キャリアガスの流量以外の条件は一定にして同一試料を測定した結果、ピークの高さ・面積・幅（面積と高さの比）が大きく変化した。キャリアガス流量 3.5 mL/分のときの結果を基準として、キャリアガス流量を減少させたとき、ピークの高さ・面積がそれぞれ何倍になったか、相対的な比を図 5, 6 に示す。キャリアガス流量が 1.3 mL/分程度まではキャリアガスが少ないほどピークの高さと面積は増大する傾向となった。またそれぞれの変化の割合は化合物によらず、ほぼ同じであった。しかしキャリアガス流量を少なくし過ぎると、逆にピークの幅が広くなり（図 7）、望ましくない。高感度で分析するのに最適なキャリアガスの流量があると考えられる。

4)まとめ より高感度に測定するためには、質量分析計内をより高真空に保つべきであり、そのためには適切なサイズ（内径・長さ）のカラムを用いるべきである。内径の大きなカラムはより多くのキャリアガスを必要とし、質量分析計内の真空度を下げるので、出来るだけ細かいカラムを用いるのが望ましい。

5 ガイダンスについて

作業環境測定において、諸外国では有機化合物の加熱脱着導入法や質量分析が広く利用されているが、我が国では一部の物質について使用されているに過ぎない。また、発がん性の物質の低濃度での管理の必要性を考慮すると、低濃度での分析を可能にする加熱脱着導入や質量分析を再現性よく実施するために統一的理解が必要である。そのためには、例えば、英国安全衛生庁（HSE: Health and safety executive）から出版されている加熱脱着法のガイダンス文書 4) のようなものを参考とし、場の測定が中心である国内の作業環境測定の状況に合致するようなガイダンスを作成する必要があると考えられる。

そのようなガイダンスを作成するために本プロジェクト研究において必要な実験的検証を行った。次章には本研究の成果と既知の情報を含めてガイダンスの内容をまとめる。

表 1 GC/MS の分析条件

ガスクロマトグラフ	PerkinElmer, Clarus 680 GC
キャピラリーカラム	DB-17, 長さ 30 m, 内径 0.25 mm, 膜厚 0.5 μm
試料注入方法	スプリットレス注入法 (2 分間)
注入口温度	250°C
キャリアガス (ヘリウム) 流量	1.0 mL/分 (スプリットレス, 2 分保持) → 1.0 mL/分 (スプリット開始, 2 分保持) → 0.5, 0.6, 0.7, ... 3.5 mL/分 (流量一定モード)
カラム槽温度	50°C (4 分保持) → <10°C/min> → 140°C → <2°C/min> → 170°C → <25°C/min> → 250°C
MS インターフェイス	250°C
質量分析計	PerkinElmer, Clarus SQ8T
イオン源	200°C, 電子衝撃イオン化法 (EI+), 70 eV
検出方法	選択イオン検出法 (SIM) m/z = 157 (CNB), 191 (DCNB), 153 (NA), 128 (PN)

6 ガイダンスの概要

1 章：ろ過捕集と固体捕集の必要性

作業環境測定においては、常温で気体や蒸気の物質の捕集には固体捕集法を使用し、常温で固体の物質はろ過捕集のみを使用することが多い。しかしながら、微小粒子は昇華してガス状になるため、ろ紙捕集では捕集率が下がり濃度を過小評価する可能性がある。本研究では粒子径が減少すると短時間で物質のロスが起こる可能性を明らかにした。この結果より、ろ過捕集と固体捕集を組

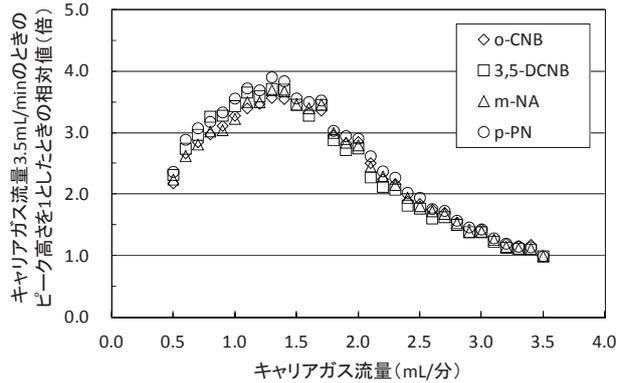


図 5 キャリアガス流量に対するピーク高さの変化

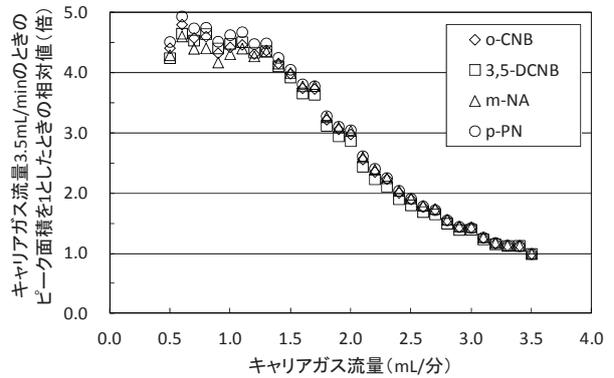


図 6 キャリアガス流量に対するピーク面積値の変化

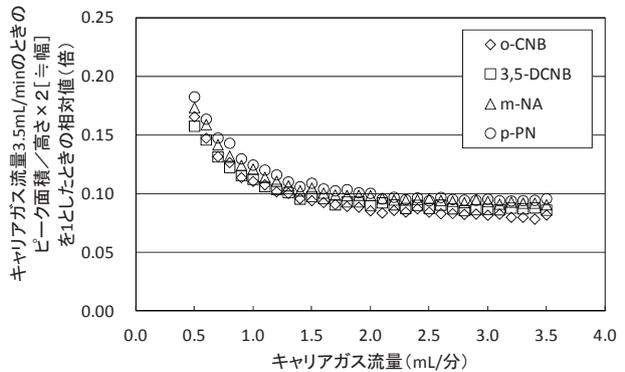


図 7 キャリアガス流量に対するピーク幅（ピーク面積と高さの比）の変化

み合わせる必要がある。

2章：加熱脱着

加熱脱着では捕集試料を全量 GC に導入できるため、測定感度が向上する。本研究では関係する化合物について加熱脱着を利用した測定法の開発を行って来た^{5,6)}が、加熱脱着を用いて再現性良く分析するために確認が必要な事項がある。まず、目的成分の捕集において破過がないこと、分析時に定量的な脱着ができることの二点である。前者は二段直列で捕集することにより後段に漏れがないことが確認できるが、低濃度環境で使用することから捕集時の破過が懸念される事例は少ないと考えられる。後者は分析後の試料を再測定して残存成分がないことを確認することで確認可能である。活性炭は合成樹脂捕集剤に比較して吸着力が強いことから、加熱脱着には適していない。

3章：低濃度試料の溶媒脱着

加熱脱着法は広く用いられているわけではない。低濃度分析に溶媒脱着を用いる場合には、吸着力の強い活性炭は捕集剤に適さないことがあり、合成樹脂捕集剤を使用することが推奨されている⁴⁾。試料の脱着が定量的に行われることを確認してから測定する必要がある。

4章：GC/MS 測定における注意点

GC/MS の感度には質量分析計の真空度が影響することを実験的に示した。質量分析計の真空が保たれる適切なカラムを選択することが必要である。また、内部標準物質には目的物質と溶出時間が近い物質を使用することで、分析の再現性を上げることができるが、溶出時間が離れていても内部標準物質を添加することで再現性が向上することから、内部標準物質を添加することが望ましい。ただし、内部標準物質は捕集剤に吸着しないものを選定するか、脱着後に捕集剤を取り除いた状態で GC 分析直前に内部標準物質を添加する必要がある。

参 考 文 献

- 1) 厚生労働省.「労働安全衛生法第 28 条第 3 項の規定に基づき厚生労働大臣が定める化学物質による健康障害を防止するための指針」.平成 24 年 10 月 10 日付け健康障害を防止するための指針公示第 23 号, <http://www.jaish.gr.jp/anken/hor/hombun/hor1-8/hor1-8-39-1-0.htm> (2014 年 7 月 18 日アクセス確認)
- 2) 厚生労働省, 労働安全衛生法の一部を改正する法律 (平成 26 年法律第 82 号) 概要 厚生労働省ホームページ: <http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-112-00000-Roudoukijunkyouku/0000049215.pdf>
- 3) 安井さおり, 山中 俊夫, 相良 和伸, 甲谷 寿史, 桃井 良尚(2011) 空気中における噴霧水粒子の挙動解析に関する基礎的研究, 日本建築学会近畿支部研究報告集 環境系. Vol.51, 77-80.
- 4) HSE, Health and Safety Executive: Methods for the Determination of Hazardous Substances (MDHS) guidance 72: Volatile organic compounds in air. Laboratory method using pumped solid sorbent tubes, thermal desorption and gas chromatography, 1993 [Online] Available at <http://www.hse.gov.uk/pubns/mdhs/pdfs/mdhs72.pdf>
- 5) 萩原正義, 小野真理子, 古瀬三也, 菅野誠一郎(2012) 加熱脱着—ガスクロマトグラフ法による塩化アリルの分析法. 作業環境 33, 65-68
- 6) 古瀬三也, 萩原正義, 小野真理子, 菅野誠一郎(2013) 加熱脱着—ガスクロマトグラフ法による 1,2-ジクロロプロパンの分析法, 労働安全衛生研究, 6, p.43-48.