キャニスター捕集・マイクロパージトラップGC/MSによる微生物由来揮発性有機化合物(MVOC)測定とカビ汚染調査方法の検討

浅野勝佳¹⁾, 陰地義樹¹⁾, 小川里恵¹⁾, 中島大介²⁾, 影山志保³⁾, 白石不二雄²⁾, 高鳥浩介⁴⁾, 後藤純雄⁵⁾

¹⁾奈良県保健環境研究センター, ²⁾国立環境研究所, ³⁾郡山女子大学, ⁴⁾NPO法人カビ相談センター, ⁵⁾麻布大学

Analysis of microbial volatile organic compounds (MVOCs) with canister sampling and microscale purge & trap GC/MS for chemical screening of mold growing

Katsuyoshi ASANO¹⁾, Yoshiki ONJI¹⁾, Rie OGAWA¹⁾, Daisuke NAKAJIMA²⁾, Shiho KAGEYAMA³⁾, Fujio SHIRAISHI²⁾, Kosuke TAKATORI⁴⁾ and Sumio GOTO⁵⁾

¹⁾Nara Prefectural Institute for Hygiene and Environment, ²⁾National Institute for Environmental Studies, ³⁾Koriyama Women's University

⁴⁾Center for fungal Consultation Japan, ⁵⁾Azabu University

要 旨

微生物由来揮発性有機化合物(MVOCs)をカビ汚染の指標物質とする分析方法の開発を試みた。MVOCとしては200以上の物質が報告されており、検出頻度の高い約15物質がカビ汚染の指標として利用できると考えられている。MVOCは広範囲な揮発性物質群で構成されているため、測定は容易ではなく様々な工夫が必要とされる。現在のところ、分析方法をはじめとしてサンプリング方法にも標準的な方法は存在しない。キャニスターサンプリングはサンプリング時間の柔軟性、サンプリング時の静寂性等で固相吸着法よりも優れている。本研究では2-MIB及びジェオスミンを含む典型的な15化合物の分析を試みた。

ガラスビーズとテナックスを組み合わせたシステムでは低沸点化合物に対して有効であり、ガラスビーズとテナックスを積層したトラップを2連に配したシステムではVVOCからSVOCまでの広範な化合物において満足な結果が得られた。両システムでの15化合物の定量限界は0.0088-0.16 ngであった。

本法は、住居で発生するカビとMVOCによる居住者への健康影響を調べるための手段として開発した。この方法を用いて、いくつかの住居でのMVOC測定によるカビ調査を行なった。その結果、6住居すべてで1-オクテン-3-オールが1.34-10.2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の範囲(平均4.09 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)で検出された。その他5物質もわずかに検出され、トータルMVOCとしては2.43-16.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の範囲(平均6.95 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)であった。

Abstract

This research was performed in order to analyze microbial volatile organic compounds (MVOCs) as indicators of growing or hidden mold damage in indoor area of residence. More than 200 compounds have been reported as MVOCs. Among these MVOCs, 15 most often reported compounds are considered to be probable indicators for mold growing.

MVOCs, wide range volatile compounds classified into from VVOC to SVOC, require various modifications of operating conditions of the apparatus. There are no standard method for sampling and analyzing MVOCs. Canister sampling can accommodate both long and short term sampling of MVOCs and it does not make much noise during operation. From this point, canister sampling is more practical than the traditional solid phase adsorption methods followed by thermal desorption or solvent extraction of VOCs. After canister sampling, automated microscale purge & trap coupled with gas chromatography / mass spectrometry (GC/MS) analysis has been employed for the analysis of typical 15 compounds, including 2-MIB and geosmin. While a conventional system coupled glass beads trap with Tenax trap adopted in EPA TO-14 method for outdoor VOCs was restrictively successful, sufficient result was obtained using double traps piled glass beads with Tenax. The quantitation limit ranged between 0.0088 and 0.16 ng in both cryotrap systems.

The purpose and goal of this study was to examine the relation between the exposure to MVOCs owing to indoor mold growth and the prevalence of adverse health effects on the residents. The procedure has been tentatively applied in the context of a field study to measure the indoor MVOCs in several houses. 1-octen-3-ol detected in all houses ranged from 1.34-10.2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, with an average in 6 houses of 4.09 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, and a slight amount of five MVOCs was also detected. The total MVOCs was detected at 2.43-16.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ with an average of 6.95 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

1. 緒言

健康で快適な住環境を維持するためには、室内の空気質を良好な状態に保つことが欠かせないと考えられている。我が国に限っていえば、この認識は旧

来からあったものではなく、高気密、高断熱構造の住居の普及と化学物質を原因とするシックハウス症候群という疾病を経験することが端緒になったと考えられる¹⁻³⁾。その後、建材の改良、換気装置の導入等の対策が採られてこの問題は解決されたかと考えられているが、シックハウス症候群の原因として新

受付: 8月31日 (Received: 31 August 2011)

受理: 10月22日 (Accepted: 22 October 2011)

たにカビが注目されるようになってきた⁴⁾。カビは自然界では有機物の分解者として物質循環に組み込まれた重要な生物種であるが、時としてアレルギー、真菌症の原因となったりすることからカビ汚染に関する市民の関心は非常に高い^{5,6)}。

住居内のカビ汚染を調査する方法として、一般的には、捕集したカビ胞子をカウントする種々の方法が取られている⁷⁻¹⁰⁾。しかし、こうした方法では、サンプリング時における生菌への物理的、機械的ダメージやサンプリング時間や培養条件等検討すべき事は多く、さらに孢子形成前のカビや壁の内部等見えないところに発生したカビを検知することは困難である。これに対して、カビ等が増殖する過程で発生する揮発性有機化合物(MVOC)を指標としてカビの発生を検知する試みがなされている^{11,12)}。

MVOCは、それ自体が有害物質であるもの^{13,14)}を含め、これまでに200あまりの物質が報告され¹⁵⁾、そのうちカビの発生を検知する目的に適した約15種類の物質が知られている^{15,16)}。一般的なVOCの捕集、分析方法としてはヘッドスペースSPME法^{17,18)}、吸着管(Tenax, 活性炭)^{19,20)}、キャニスター¹⁶⁾を使用する方法が報告されている。これらは、それぞれに長所短所を有するが、住居、特に居室でのVOCサンプリングには様々な制限が加わるため、サンプリングに際しての静寂性、簡便性、時間設定の柔軟性からキャニスター捕集が他に勝ると考えられる。さらに、MVOCはVVOCからSVOCに相当する広範囲な化合物群であるため、それぞれに適したサンプリング、分析条件が要求される。本研究では、キャニスター捕集・マイクロパージトラップ・ガスクロマトグラフ質量分析(GC/MS)測定における装置、操作の最適化を行い、家屋内での調査を試みた。

2. 方法

2.1 MVOCの捕集

室内および屋外では、あらかじめ減圧した6Lキャニスターにマスフローコントローラーを取り付けて3.3 mL/分で24時間、あるいはバルブを開放して瞬時に大気圧まで採取した。壁の内部等の捕集には、6Lキャニスターにフィルターを介して接続した1/16"シリコステールチューブの先に横穴付注射針を取り付け、壁内部に挿入して瞬時に大気圧まで採取した。

空気を採取したキャニスターを実験室に持ち帰り、

内圧測定後、超高純度窒素を0.2Mpaまで充填して測定に供した。

2.2 試薬及び標準ガスの調製

2-butanone(和光純薬製・特級)、3-methylfuran(和光純薬製・特級)、2-methyl-1-propanol(和光純薬製・悪臭物質試験標準品)、1-butanol(和光純薬製・分子生物学用)、2-pentanone(東京化成製・特級)、3-methyl-2-butanol(東京化成製・特級)、2-pentanol(和光純薬製・1級)、3-methyl-1-butanol(ナカライテスク製・特級)、1-pentanol(和光純薬製・特級)、2-hexanone(和光純薬製・1級)、2-heptanone(和光純薬製・特級)、1-octen-3-ol(和光純薬製・特級)、3-octanone(和光純薬製・特級)、2MIB(和光純薬製・水質試験標準品)、geosmin(和光純薬製・水質試験標準品)をMVOC標準品として使用した。

超高純度窒素は、太陽日産株式会社製(99.99995%以上)のものを使用した。キャニスターは、ステンレス製で内面をフューズドシリカコーティング不活性化処理されているEntech社製のものを使用した。

標準ガスの調製は、上記の標準品をそれぞれ100 mgずつ正確に秤量してメタノール(和光純薬製・特級)に溶解し、10 mLに定容してMVOC混合標準原液とした。この原液をメタノールで100倍希釈して保存用標準液(100 μ g/mL)とした。さらにこれを100倍希釈して標準液(1 μ g/mL)とした。超純水200 μ Lを注入した6Lキャニスターに標準液を10 μ L注入して直ちに超高純度窒素を0.2Mpaまで充填して0.83 ng/L(N₂)標準ガスを作製した。

内部標準ガス作製は、和光純薬製toluene-d₈をマイクロシリンジを用い超高純度窒素0.1Mpaで充填した1Lガラス容器に1 μ Lを注入して、完全に気化させた。そのガラス容器からガスタイトシリンジを用い500 μ Lを6Lキャニスターに注入して直ちに超高純度窒素を0.3Mpaまで充填し26.7 ng/L(N₂)内部標準ガスを作製した。この内部標準ガスを試料測定毎に2.5 ng注入した。

2.3 装置及び操作

装置の構成はサンプル、標準ガス、内部標準ガス用キャニスターとマイクロパージトラップ装置、GC/MSとをシリコステールチューブで接続して、これらのコントロールはPCワークステーションから行なった(Fig.1)。マイクロパージトラップ装置

Fig.1 Schematic diagram of micro scale purge & trap GC/MS system installed with canisters.

(a) G/T×2 system

(b) G&T system

Fig.2 Cold trap systems for focusing and introduction of air sample to GC/MS.

(a) G/T×2 system: consist of double cryotrap piled glass beads with Tenax.

(b) G&T system: consist of glass beads cryotrap coupled with Tenax cryotrap.

にはEntech社製7100A型自動濃縮装置を使用し、2段で構成されるコールドトラップには以下の2種類の方法を採用した(Fig.2)。

G/T×2法：グラスビーズ/テナックスのマルチベドトラップを2連で使用した(Fig.2a)。

G&T法：大気VOC測定で一般的に採用されているEPA-TO14メソッド²¹⁾用のグラスビーズトラップ(1段目)とテナックストラップ(2段目)を組み合わせたものを使用した(Fig.2b)。

分析時には、キャニスター、キャニスターと7100A型自動濃縮装置の間も80℃に保温した。GC/MSはAgilent社製7890/5975C(カラムDB-1, 内径0.32 mm, 長さ60 m, 膜厚1 μm: Agilent社製)を使用した。

MVOCの測定にあたっては、マイクロパージトラップに標準ガスを各50 mL, 100 mL, 200 mL, 400 mLを導入して0.0416~0.333 ngの検量線を作製した。実試料は、400 mLを同様に操作して測定し、高濃度で検出したサンプルは適宜希釈し再度定量した。

3. 結果と考察

3.1 操作条件の検討

室内空気中には、特に近年の我国の高気密高断熱構造の住居においては、年間を通して、VOCのコールドトラップ時に無視できない多量の水蒸気を含んでいるのが普通である²²⁾。よってGC/MSで測定を行うためには、空気成分の窒素、酸素、二酸化炭素などとともに水を除去する必要がある。そのためにマイクロパージトラップ装置には様々な工夫がこらされているが、目的成分と多様な気象条件に応じた操作条件を決めることが必須となる。

G/T×2法の場合は、1段目トラップにテナックスが使用されているため、低温冷却は必要でなくメーカー推奨のトラップ時10℃、脱離時180℃で、我国の気候にあわせた温度条件でも検討した8物質の良好な結果が得られた。

G&T法を使用する場合、1段目ガラスビーズトラップを-140℃に冷却して窒素、酸素を除去後、水をトラップしてVOCだけを2段目トラップに移行させる必要がある。この1段目のトラップ脱離温度を10℃から段階的に変化させると40℃までは温度上昇とともにレスポンスの改善が見られたが、50℃を超え60℃になると急減し、40℃が最適であることがわかった(Fig.3)。この原因としては2通りのメカニズムが推察される。ひとつは温度を上昇させることによる水蒸気の移行による水と2段目トラップであるテナックスとの測定対象物質における親和性の問題であり、もうひとつは測定対象物質と水蒸気の移行速度の問題である。以上から、本法の運用上のキーポイント

Fig.3 Optimization of desorb temperature of G&T system cryotrap1. (conditions: see Table1)

Table 1 List of optimized conditions for the two cold trap systems.

	G&T	G/T×2
Sample temperature	80 °C	80 °C
Inlet Line temperature	150 °C	150 °C
Valves temperature	150 °C	150 °C
Cryotrap temperature 1	-140 °C	10 °C
Dry Purge Volume	50 mL	200 mL
Desorption temperature 1	40 °C	180 °C
Desorption Volume	50 mL	100 mL
Cryotrap temperature 2	-30 °C	-30 °C
Desorption temperature 2	180 °C	180 °C
Cryofocus temperature	-160 °C	-100 °C
GC Line temperature	150 °C	150 °C

は1段目トラップの温度コントロールであることが判明した。次に、室内MVOCを対象とした両システムでの操作条件の最適化を行った結果をTable 1に示した。

3.2 トラップ方法の評価

両トラップ方法の性能を評価するために、全量カラム注入可能なクールオンカラム(on-column)注入法を用いて8種混合のMVOC標準液を測定した。それを基準として、マイクロパージトラップ装置を使用して測定した両トラップ方法でのそれぞれの物質のピーク面積を比較した(Table 2)。G/T×2法ではon-columnの1.3倍を超えるものが3成分認められたが、両者での分析時における検出器の感度変動の予想範囲内に収まる結果が得られ、低沸点から高沸点まで8成分すべての物質が測定可能であると考えられた。また、G&T法では2-hexanoneでは1.3倍と最大であり、3-octanoneを含む6成分が1.0倍以上、2-MIBで

Table 2 Comparison of the peak area ratios for the two coldtrap systems for the typical eight MVOCs(10 ng).

	ratio*	ratio*
	G&T	G/T×2
3-methylfuran	1.18	1.11
2-pentanol	1.08	1.19
2-hexanone	1.32	1.40
2-heptanone	1.18	1.37
1-octen-3-ol	1.00	1.12
3-octanone	1.00	1.23
2MIB	0.83	1.34
geosmin	0.35	0.97

* ratio to cool on-column injection.

0.83倍, geosminでは0.35倍であった。G&T法でgeosminが0.35倍と低かったのは、高沸点化合物の場合、1段目トラップでの脱離条件が不十分なことに起因するディスクリミネーションがみられ感度が低下したものと考えられた。しかし、このG&T法は一般大気環境測定において常用されているEPA TO-14メソッド²¹⁾と同一のトラップ構成であり、トラップ管の変更無しにVOC測定が可能であるため、MVOCを対象とする場合には、比較的低沸点化合物に限定して使用すれば有用な方法であると考えられた。

3.3 検量線と定量下限

G/T×2, G&Tの両方法を使用して、標準ガスの検量線と定量下限を検討した。その結果をTable 3, Fig.4に示した。検量線作製には、G/T×2の場合は、標準ガス(0.83 ng/L)を50 mL, 100 mL, 200 mL, 400 mL注入し測定した。G&Tの場合は、標準ガス(0.83 ng/L)を50 mL, 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL注入し測定した。今回測定対象としたMVOCは極性物質が多く、特にG&T法では曲線回帰での検量線が妥当であった。次に標準ガス(0.83 ng/L)50 mL注入する測定を5回繰り返し、その標準偏差の10倍を定量下限とした結果、両方法での定量下限は、0.0088-0.16 ngであった。G/T×2法では、2 MIB, geosminで若干変動が大きいものの良好な結果が得られた。G&T法では、2MIBでピークの消失が見られ、geosminにおいても感度不足であったが、この2物質以外の物質には、十分な感度を有しており、カビ由来のMVOC調査には十分実用に耐え得るものであった。

Table 3 Limits of determination of the MVOCs using the two cold trap systems.

	G & T		G / T × 2	
	MQL (ng)	CV (%)	MQL (ng)	CV (%)
3-methylfuran	0.013	1.1	0.036	3.2
2-methyl-1-propanol	0.032	2.9	0.053	4.8
3-methyl-2-butanol	0.032	2.9	0.011	1.0
2-pentanol	0.033	2.9	0.012	1.1
3-methyl-1-butanol	0.044	3.9	0.028	2.5
2-hexanone	0.051	4.6	0.026	2.3
2-heptanone	0.048	4.3	0.0088	0.8
1-octen-3-ol	0.031	2.8	0.051	4.5
3-octanone	0.055	4.9	0.041	3.6
2MIB	-	-	0.16	14.2
geosmin	0.077	6.9	0.14	12.9

MQL: Method Quantitation Limit

G&T system

G/T×2 system

Fig.4 Standard curves of the MVOCs by the different cold trap systems.

本研究では、通常の住居でのMVOC濃度を想定して低い濃度で検討を行ったが、堆肥工場やゴミ処理場などの高濃度な環境^{15,23)}での測定にも適用するものであるが、サンプリング方法等も含め、別の機会に検討したい。

3.4 一般家屋のMVOC測定

G/T×2システムを使用して奈良県内の6家屋(居室とダイニングキッチン9地点、壁の中2地点、屋外1地点の合計12地点)でMVOCの測定を試みた。調査は、2010年9月から10月の秋季に行った。家屋Aは築50年戸建木造2階、家屋Bは築16年戸建木造2階、家屋Cは築35年戸建木造2階、家屋Dは築20年集合木造2階、家屋E, Fはともに築15年戸建木造2階であった。サンプリングは、家屋Aの壁の中については瞬時採取、その他はすべて24時間連続採取を行った。

Fig.5 Comparison of MVOC levels between indoor air and outdoor air in Nara.

今回の測定では、それぞれの家屋状況とMVOC検出状況とを関連付けることは困難であったが、今回測定対象としたMVOCの検出状況及びその検出濃度範囲を把握することができた。その結果をFig.5に示した。Bの家屋で1-octen-3-olが最高10.2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 検出され、他に5種のMVOCがわずかに検出された。今回調査の6家屋における1-octen-3-olの濃度は、1.34～10.2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均4.09 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)であった。MVOC総量は、2.34～16.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (平均6.95 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)であった。MVOC総量が多い家屋では、1-octen-3-olとそのケトン体である3-octanoneが高濃度で検出された。次に、家屋Aにおいて、家屋(室内)(ダイニングキッチン)と屋外(庭)のMVOC総量を比較した。その結果、家屋(室内)の方がMVOC総量は大きく(I/O比が高い)、発生源は家屋Aの場合、家屋(室内)に存在することが確認された。今回測定したMVOC総量が比較的小さい家屋において、家屋Cは1-octen-3-olと3-octanoneの比率が高く、家屋D～Fは1-octen-3-olを除くと2-methyl-1-propanolの比率が高かった。

一般家屋内のMVOCは単独で検出されることは少なく、カビの発生を検知する目的に適した約15種類の物質が知られており^{15,16)}、そのうちの複数種類の総量で評価することが妥当であると考えられている¹⁷⁾。1-octen-3-olについては、10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以上の家屋ではカビ臭等の何らかの問題を有するとされており¹⁹⁾、この家屋はこの範疇にはいるものでありエルゴステロール濃度をはじめとするカビ汚染調査を継続して、さらなる知見を得ることに努めたい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり貴重なご助言をいただき、器材の使用に当たっても便宜をはかっていただきました(株)西川計測分析事業部・古館肇氏に深謝いたします。

引用文献

- 1) 東 賢一：国内外における室内空気汚染の現状と対策，生活衛生，54，116-127(2010)。
- 2) 濱田信夫，池田浩己，高倉耕一，岩前 篤，上原裕之，永滝陽子，杉田隆博：シックハウス症候群患者宅の室内環境および症状の経時的変化，生活衛生，54，312-320(2010)。
- 3) 倉渕 隆：シックハウス対策としての24時間換気システムの現状，エアロゾル研究，23，235-240(2008)。
- 4) 高鳥浩介，大田利子，朴 秦柱：室内環境微生物としてのカビ，室内環境学会誌，9，3-10(2007)。
- 5) 秋山一男：室内環境におけるアレルギー疾患の現状：同上，9，11-16(2007)。
- 6) 濱田信夫：最近の浴室のカビ汚染の傾向，生活衛生，53，247-256(2009)。
- 7) 渋谷勝利：浮遊微生物の測定方法，エアロゾル研究，18，172-176(2003)。
- 8) Lee T., Grinshpun S. A., Kim K. Y., Iossifova Y., Adhikari A. and Reponen T.: Relationship between indoor and outdoor airborne fungal spores, pollen, and (1→3)- β -D-glucan in homes without visible mold growth, *Aerobiologia*, 22, 227-236(2006)。
- 9) Miller J. D. and Young J. C.: The use of ergosterol to measure exposure to fungal propagules in indoor air, *American Industrial Hygiene Association Journal*, 58, 39-43(1997)。
- 10) 陰地義樹，武田耕三，松浦洋文，芳賀敏実，中島大介，高木敬彦，後藤純雄：空气中真菌類の分子マーカーとしてのエルゴステロールの大量注入GC/MS分析，環境化学，47-52(2007)。
- 11) Schleibinger H., Laußmann D., Brattig C., Mangler M., Eis D. and Ruden H., Emission patterns and emission rates of MVOC and the possibility for predicting hidden mold damage?, *Indoor Air*, 15, 98-109(2005)。

- 12) 朴 俊錫：シックハウスと微生物由来揮発性有機化合物(MVOCs), エアロゾル研究, 18, 181-183(181-183).
- 13) Nakajima D., Ishii R., Kageyama S., Onji Y., Mineki S., Morooka N., Takatori K. and Goto S.: Genotoxicity of microbial volatile organic compound, *Journal of Health Science*, 52, 148-153(2006).
- 14) Kreja L. and Seidel HJ.: On the cytotoxicity of some microbial volatile organic compounds as studied in human lung cell line A549, *Chemosphere*, 49, 105-110 (2002).
- 15) Korpi A., Farnberg F. and Pasanen AL.: The Nordic Expert Group for Criteria Documentation of Health Risks from Chemicals, 138. Microbial volatile organic compounds (MVOCs). *Arbete och Halsa*; 13,1-78(2006).
- 16) Hung LL., Miller J. D. and Dillon H. K.: Field guide for the determination of biological contaminations in environmental Samples, 2nd Ed, American Industrial Hygiene Association, p162-171(2005).
- 17) Van Lancker F., Adams A., Delmulle B., De Saeger S., Van Peteghem C., De Kimpe N. and Moretti A.: Use of headspace SPME-GC-MS for the analysis of the volatiles produced by indoor molds grown on different substrates, *J. Environ. Monit.*, 10, 1127-1133(2008).
- 18) Wady L., Pehrson C., Larsson L. and Bunte A.: Use of gas chromatography-mass spectrometry/solid phase microextraction for the identification of MVOCs from moldy building materials, *J Microbiol Methods.*, 53, 325-332(2003).
- 19) Fischer G., Schwalbe R., Moeller M., Ostrowski R. and Dott W.: Species-specific production of microbial volatile organic compounds (MVOC) by airborne fungi from a compost facility, *Chemosphere.*, 39, 795-810(1999).
- 20) Keller R. and Soennichsen R.: Nachweis von mikrobiologisch produzierten kohlenwasserstoffen (MVOC), *VDI Ber (Ver Dtsch Ing).*, 1257, 127-132(1996).
- 21) U.S.EPA: Determination of volatile organic compounds (VOCs) in ambient air using SUMMA polished canister sampling and gas chromatographic analysis TO-14 (1988).
- 22) 西條泰明, 吉田貴彦, 岸 玲子：シックハウス症候群の湿度環境・生物学的汚染の影響, *日衛誌*, 64, 665-671(2009).
- 23) Fischer G., Albrecht A., Jackel U. and Kampfer P.: Analysis of airborne microorganisms, MVOC and odour in the surrounding of composting facilities and implications for future investigations, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211, 132-142(2008).