

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21310020

研究課題名（和文）酵素阻害反応を用いた有機リン化合物放散量測定器の開発

研究課題名（英文）Development of measuring instrument for organophosphorous compounds emission amount by using enzyme inhibition reaction

研究代表者 柳澤 幸雄 (YANAGISAWA YUKIO)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任教授

研究者番号：30313042

## 研究成果の概要（和文）：

有機リン化合物は、殺虫剤や難燃剤として汎用されているが、遅延性の神経障害をもつことがわかり、化学物質過敏症の原因としても懸念されている。そこで、本研究では、実環境で有機リン化合物の放散量がわかる測定器を開発した。有機リン化合物の毒性メカニズムである酵素阻害反応を利用し、発色させて視覚的に放散量を把握できるものとした。6 時間サンプリングで吸光度測定による検出が可能であり、24 時間サンプリングで目視による判定が可能である。

## 研究成果の概要（英文）：

Organophosphorous compounds, which are used as insecticide and flame retardant, have delayed neurological toxicity and are suggested to be a cause of Chemical Sensitivity. In this study, the apparatus which can measure the emission amount of organophosphorous compounds in a real environment was developed. Emission amount can be known visually by enzyme inhibition reaction and color reaction. Detection by absorbance measurement is possible by 6-hour sampling, and visual judgment is possible by 24-hour sampling.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011 年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：環境影響評価・環境政策

科研費の分科・細目：環境影響評価・環境政策

キーワード：環境分析、影響評価手法、有機リン化合物

## 1. 研究開始当初の背景

有機リン化合物は、殺虫剤や難燃剤として汎用されており、室内空気中に検出されることが報告されている。近年、遅延性の神経障害をもつことがわかり、化学物質過敏症の原因物質としても懸念されている。このような有機リン化合物曝露による健康被害を防ぐ

ためには、発生源を把握することが重要であり、実環境で有機リン化合物の放散を確認できる測定器が必要となる。これまでの研究では、実験室で建材試験片を用いて放散量を測定する方法（マイクロチャンバー法）が確立されている。しかし、実環境で有機リン化合物の放散量を測定できる機器はなかった。

## 2. 研究の目的

有機リン化合物の放散量を実環境で測定できる簡便な測定器を開発することを目的とした。すなわち、有機リン化合物の毒性メカニズムである酵素阻害反応を利用し、発色による視覚的な放散量を把握するための測定器開発を目指した。

## 3. 研究の方法

研究のフローを Fig. 1 に示す。

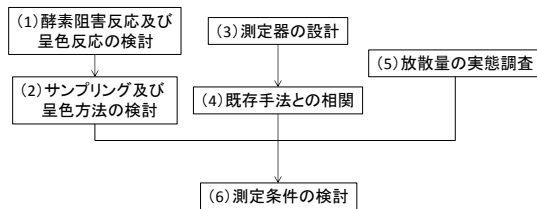


Fig. 1 研究のフロー

### (1) 酵素阻害反応及び呈色反応の検討

有機リン化合物測定に利用する酵素阻害反応及び呈色反応を検討した。使用する酵素や呈色試薬等を選定し、液相系にて有機リン化合物との呈色反応を確認した。

### (2) サンプルング及び呈色方法の検討

気中の有機リン化合物のサンプルングのための試験紙と、サンプルング後 (1) に決定した反応系により呈色する方法を検討した。

### (3) サンプラーの設計

有機リン化合物をサンプルングするためのサンプラーを設計した。また、測定器の形状 (拡散長) と放散量の関係を調査した。

### (4) 既存手法との相関

設計したサンプラーを用いて建材サンプルの放散量を測定し、既存手法であるマイクロチャンバー法による測定値との比較を行った。

### (5) 放散量の実態調査

パッシブフラックスサンプラー (PFS) を用いて、建材等試験片サンプルや実際の住宅における建材等からの放散量の実態調査を行った。

### (6) 実環境測定条件の検討

(1) ~ (5) で確立した測定方法に関して、実環境で測定を行う場合の条件を決定した。

## 4. 研究成果

### (1) 酵素阻害反応及び呈色反応の検討

酵素阻害反応に用いる試薬は、基質をブチリルチオコリン、酵素をコリンエステラーゼ、呈色反応に用いる試薬は、DTNB (5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸)) とした。それぞれの投入量を Table 1 に示す。

Table 1 薬品投入量 (μl)

基質	ブチリルチオコリン	100
酵素	コリンエステラーゼ (1/3 倍)	30
緩衝液	リン酸バッファ	1800
呈色剤	DTNB	100

### (2) サンプルング及び呈色方法の検討

有機リン化合物をサンプルングするための媒体として、2種類の吸着シート (C18 (47 mm of diameter, 3M, USA) 及びろ紙) を用いた。呈色方法として、湿式 (吸着シートを吸光セルに入れ、その中に投入した呈色溶液を発色させる方法) と半湿式 (吸着シート上に呈色溶液等を染み込ませ、シートを発色させる方法) を検討した (Fig. 2)。

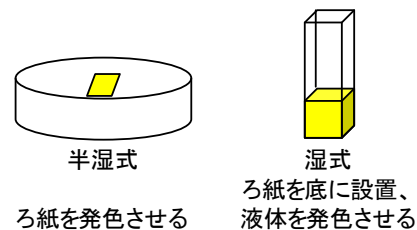


Fig. 2 半湿式と湿式

その結果、C18 については呈色溶液を染み込ませることができず、張力で表面に浮いた形で溶液が残った。また、ろ紙の場合、ろ紙上での発色は鈍く (半湿式の場合)、液体の場合 (湿式) のような鮮やかな黄発色を示さなかった。そこで、サンプルング及び呈色は、ろ紙を用いて湿式で行うこととした。

次に、ろ紙から有機リン化合物を抽出するための溶媒を検討したところ、高濃度エタノールやアセトンでは呈色反応に用いる酵素阻害効果が大きかったが、5%エタノールは阻害の影響はみられなかったため、抽出溶媒として5%エタノールを用いることとした。

また、TPP を用いた添加回収試験を行った (Table 2)。その結果、リン酸トリフェニル (TPP) を添加した条件では全て TPP を添加しない場合より発色速度が低下しており、ろ紙に担持された TPP が、超音波により抽出されていることがわかった (Fig. 3)。なお、グラフの傾きから TPP の9割前後が抽出できていると考えられた。

Table 2 添加回収試験条件 (μl)

名称	担持媒体	阻害剤	超音波
1 blank	なし	なし	-
2 TPPのみ	なし	+20	-
3 15min抽出	ろ紙	+20	あり
4 30min抽出	ろ紙	+20	あり

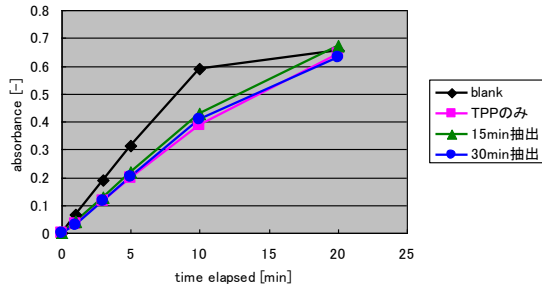


Fig. 3 超音波条件と吸光度の関係

### (3) サンプラーの設計

70 mmのディスク状のPFSで内側のくぼみに47 mmの市販の吸着剤固相膜を固定し、ピン等で材料に貼り付けることができるものとした。拡散長(深さ)は、0.5, 2.5, 5, 7.5 mmの4通りとした(Fig. 4)。素材には、抽出試験により有機リン化合物が検出されないことを確認したPET樹脂を使用した。



Fig. 4 有機リン化合物用PFS(拡散長4種)

### (4) 既存手法との相関

研究報告例の多いフタル酸ビス(2エチルヘキシル)(DEHP)を対象とし、2種類の塩ビフローリングから放散されるDEHPの放散速度をPFSによる捕集測定とマイクロチャンバー法を用いて求め、両測定値の比較を行った。PFSで測定したDEHPの放散量は拡散長の逆数に比例し(Fig. 5)、サンプリング時間に比例した(Fig. 6)。2種類のフローリング材からの放散量の比は1.33となり、マイクロチャンバー法で測定した放散量の比(1.34)と一致した結果が得られた。

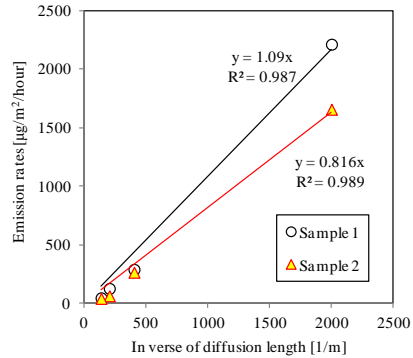


Fig. 5 拡散長の逆数と放散量の関係

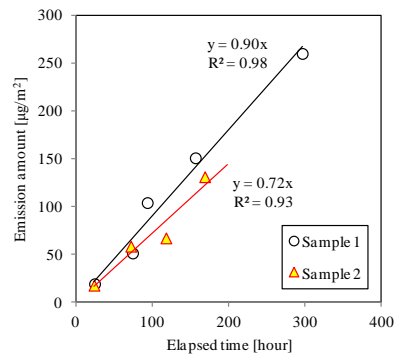


Fig. 6 経過時間と放散量の関係

### (5) 放散量の実態調査

建材メーカーから入手した23種類の木材・建材及び市販の24種類の繊維製品を対象とし、サンプル中の有機リン化合物を溶媒で抽出し、GC-FPD、GC/MSによって分析し、検出されたものについてPFSを用いた放散量測定を行った。その結果、塗装された木材・建材や一部の繊維製品で有機リン酸エステル類が検出されたが、放散量は検出下限以下であった( $<1.2 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$ )。また、実際の住宅において床、壁、カーテン、机、TV、タイルなど各2点ずつPFSを用いて1週間のサンプリングを行い、GC-FPDで分析したところ、全てのサンプルで検出下限以下であった。

### (6) 測定条件の検討

呈色試薬の定量下限は、吸光度測定の場合 $0.03 \text{ mg}/\text{ml}$ 、目視の場合 $0.22 \text{ mg}/\text{ml}$ であった。この場合、試料からの放散量を $1000 \mu\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$ とすると、6時間捕集で吸光度による有機リン化合物の検出が可能であり、24時間捕集で目視による有機リン化合物の放散の判定が可能である。

#### (7) まとめと今後の展望

本研究により、現場で簡便に有機リン化合物の放散の判定が可能な測定器を開発することができた。今後、開発した測定器を用いて、実環境における放散量調査を行うことで、有機リン化合物の放散の実態を把握できると考えられる。また、設計したサンプラーは、その他の SVOC にも適用可能性があるため、フタル酸エステルの放散量測定器としても期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kudo H, Wang X, Suzuki Y, Ye M, Yamashita T, Gessei T, Miyajima K, Arakawa T, Mitsubayashi K. Fiber-optic biochemical gas sensor (bio-sniffer) for sub-ppb monitoring of formaldehyde vapor, Sens. Actuators B Chem, reviewed, 161, 2012, 486-492
- ② Arakawa T, Koshida T, Gessei T, Miyajima K, Takahashi D, Kudo H, Yano K, Mitsubayashi K. Biosensor for L-phenylalanine based on the optical detection of NADH using a UV light emitting diode, Microchimica acta, reviewed, 173, 2011, 199-205

[学会発表] (計 3 件)

- ① Ye M, Yamashita T, Itabashi G, Gessei T, Wang X, Arakawa T, Kudo H, Mitsubayashi K, Fiber optic biosensor with UV LED for assessment of formaldehyde vapor in indoor environment, 9th Asian Conference on Chemical Sensors, 2011/11/15, 台北市, 台湾
- ② 西村 知, 水越 厚史, 徳村 雅弘, 野口美由貴, 山崎 章弘, 柳沢 幸雄, リン系難燃剤の酵素阻害強度の評価, 化学工学会第 76 年会, 2011/03/22-24, 東京農工大学
- ③ 篠原直秀, 水越厚史, 野口美由貴, 柳澤幸雄, 室内の家具, 建材等からの有機リン酸エステル類の放散量, 平成 22 年度室内環境学会学術大会, 2010/12/9-10, 横浜

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

柳澤幸雄 (YANAGISAWA YUKIO)  
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任教授  
研究者番号：30313042

##### (2) 研究分担者

野口 美由貴 (NOGUCHI MIYUKI)  
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員  
研究者番号：00431809  
三林 浩二 (MITSUBAYASHI KOHJI)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授  
研究者番号：40307236  
工藤 寛之 (KUDO HIROYUKI)  
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・講師  
研究者番号：70329118  
齊藤 浩一 (SAITO HIROKAZU)  
東京工業高等専門学校・機械工学科・准教授  
研究者番号：00205668  
篠原直秀 (SHINOHARA NAOHIDE)  
独立行政法人産業技術総合研究所・安全科学研究部門・研究員  
研究者番号：50415692

##### (3) 研究協力者

水越厚史 (MIZUKOSHI ATSUSHI)  
東京都立産業技術研究センター・開発第二部・副主任研究員  
研究者番号：50520318  
落合聖史 (OCHIAI SEIJI)  
宇都宮大学・システム創成工学専攻・博士後期課程