

高感度分析に忍び寄る水の脅威

2000年代以降、PPCPs (Pharmaceuticals and personal care products: 医薬品および生活関連物質) による水環境汚染が数多く報告されており、ヒトの健康や水生生物への潜在的な影響が危惧されている。一方、水は分析の分野においても必要不可欠であり、その汚染は分析に重大な支障を及ぼす要因となり得る。本稿では、頭髮中の薬物を対象とした超高感度分析において、超純水中に含まれるごく微量の不純物が引き起こした弊害を紹介するとともに、その影響回避に向けての対策について展望する。

新田 篤志, 志摩 典明, 片木 宗弘

1 はじめに

ヒトが生きていくうえで不可欠な水を水道水から摂れる国は世界でわずか15か国といわれ、日本はそのうちのひとつに数えられる。水道水は原水(河川水・湖水・地下水など)を浄化・消毒することにより供給されるが、日本の水が安全に当たり前のように飲めるのは「高い浄水技術」と水道法によって「水質基準」が厳しく定められているからである。また、検査義務が課せられている水質基準(51項目)と共に、水質管理目標設定項目(水質上留意すべき27項目)や要検討項目(毒性・浄水中の存在量などが不明な46項目)も設定されており、令和2年には、残留性有機汚染物質(POPs)として国際的に問題視されているパーフルオロオクタンスルホン酸(PFOS)およびパーフルオロオクタン酸(PFOA)が水質管理目標設定項目に加えられるなど、生活環境の変化や最新の科学的知見に基づいて逐次それらの見直しも行われている¹⁾。

一方、分析の分野においても水は必要不可欠である。分析に用いる水は、分析に干渉しないように、不純物ができる限り除去されていることが望ましい。そのため分析機関のほとんどが、水道水中の不純物を除去するための純水装置あるいは超純水装置を備えているはずである。特に高感度分析では不純物の影響を受けやすいため、薬物の微量分析に汎用される液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析(LC-MS/MS)では、水系の移動相を用いる場合に超純水の使用が推奨されている。超純水は、活性炭やイオン交換樹脂、紫外線(UV)ランプ、ろ過フィルターなどの組み合わせにより、水道水に含まれる不純物を可能な限り除去し精製したもので、一般に比抵抗値は18.0 MΩ・cm以上、またTOC(Total Organic Carbon)は1~3 ppb程度にまで低減されている。したがって、通常のLC-MS/MSを用いた薬物分

析では水中の残存有機物が大きな問題となることはない。しかしながら、著者らの研究室で最近取り組み始めた頭髮中睡眠薬の超高感度分析では、超純水中の不純物が要因と考えられる弊害が生じている。

本稿では分析用の超純水に含まれる不純物(特に有機物)の影響を再認識させられた頭髮中睡眠薬鑑定の概要を紹介するとともに、今後の高感度分析への対策について展望する。

2 頭髮中睡眠薬の超微量分析

大阪府警科学捜査研究所では、頭髮中睡眠薬の超高感度分析法を確立し、睡眠薬(いわゆるデートレイプドラッグ)が悪用された性犯罪被害者の頭髮中から、その薬物を検出することにより、性犯罪における睡眠薬使用の立証に取り組んでいる²⁾。性犯罪では、事件の性質上、警察への被害申告が遅れ、薬物摂取証明に汎用される尿からでは睡眠薬の検出が困難となることが多い。そのような場合、頭髮中に取り込まれた睡眠薬を対象に分析を実施する。

頭髮中睡眠薬の分析は極めて高感度な条件下で実施する必要がある。こうした薬物の微量分析にはLC-MS/MSが汎用される。LC-MS/MSはその優れた選択性(S/N)によって、ng/Lレベル(検出絶対量としてfgレベル)の薬物を検出することが可能である。当研究所では、最高感度レベルの性能を有するLC-MS/MS装置を備えており、さらにその最適化により超高感度分析システムを確立させ、1本の頭髮、さらにはその微少断片から薬物を検出し、頭髮中の薬物分布を詳細に測定する手法の実用化に成功した^{3)~7)}。これにより、摂取後数ヶ月以上経過した睡眠薬の検出およびその摂取歴の推定が可能となっている。

3 超純水が怪しい?~ブランク試験におけるジフェンヒドラミンの検出とその原因

当研究所では、前述のとおり、頭髮中睡眠薬の分析に

超高感度分析仕様に改良した LC-MS/MS システムを利用している。薬物鑑定において、このように用いる分析法が高感度なものであるほど、そのブランク試験は慎重に行う必要がある。ブランク試験では、鑑定試料から検出された成分が、同じ操作を行ったブランク試料からは検出されないことを確認し、器具や試薬、分析装置など、分析環境に由来するコンタミネーションが起きていないことを保証する。薬物鑑定の結果は、法廷において決定的な効果を有するだけに、試料のコンタミネーションにはとりわけ注意が必要であり、適切なブランク試験の結果を以て、その信頼性を示す必要がある。

ところが著者らは、LC-MS/MS を用いて睡眠薬の高感度分析を行う際、ブランク試験において、ジフェンヒドラミン (DPH) が毎回僅かに検出されるという事例を経験した。DPH は抗ヒスタミン作用を有し、アレルギー性症状を抑える薬剤として古くから使われてきたほか、2003 年以降にはその副作用である眠気を利用して睡眠改善薬 (エスエス製薬製ドリエルなど) としてドラッグストアなどで市販されていることから、性犯罪などへの悪用が危惧され、当研究所において分析対象薬物の一つとなっている。したがって、著者は上記問題を解決すべく、その原因を探索することとした。

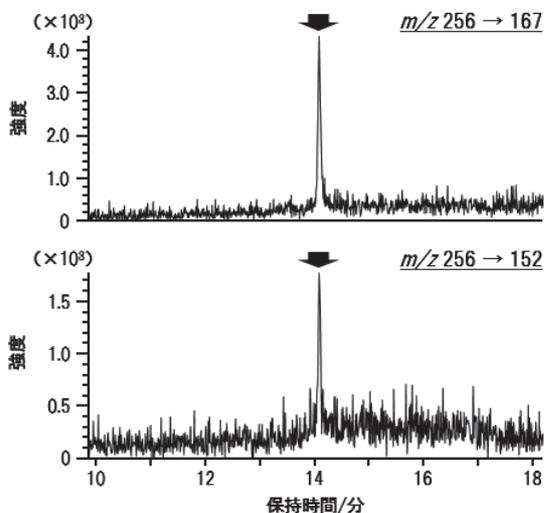
高感度 LC-MS/MS のブランク試験における DPH の検出例、および DPH 標準品の分析結果を図 1 に示す。なお、LC の移動相条件は水/メタノール系のグラジエント (逆相モード) とし、DPH のプロトン付加分子 (m/z 256) をプリカーサとした選択反応モニタリング (SRM) により測定を行った。ブランク試験における DPH は、試料の注入/非注入にかかわらず、分析の度に標準品と同じ保持時間に検出された。そのためこの DPH は、試料の前処理とは無関係でありながら、LC-MS/MS システム内の、分析カラムより上流で混入して

いると予想された。またその後、原因の解明に向け種々の検討を重ねた結果、LC 装置の汚染によるキャリーオーバーなどではなく、LC の移動相に用いる超純水中に DPH が含まれる可能性が示唆された。仮に移動相 (超純水) 中に DPH が含まれる場合、その DPH は LC のグラジエント条件 (カラムの平衡化を含む) により分析カラムの先端で濃縮され、やがてメタノール濃度の上昇に伴いカラム出口へと移動し、DPH 標準品を分析した場合と同じ保持時間にピークを形成し検出されると考えられる。

そこで著者らは、この可能性を検証するため、超純水中の DPH の存在について以下の手順により調査を行った。超純水 1 L について、LC 装置 (島津製作所製 Prominence) を用いて、あらかじめメタノール 3 mL および超純水 2 mL で洗浄した化学物質評価機構製 L-column2 ODS (長さ 50 mm, 内径 1 mm, 粒子径 3 μ m) に通液した (流速 0.3 mL/min で約 56 時間)。その後、メタノール 3 mL で溶出し、回収した溶液に 5% 塩酸メタノール 100 μ L を加え、窒素気流下で溶媒を除去した。得られた残渣に 10% メタノール 100 μ L を加え、遠心分離した後、上清 10 μ L を LC-MS/MS に供した。その結果、図 2 に示すように、プロダクトイオンスペクトルによりはつきりと確認出来るレベルの DPH が検出された。なお、この分析は、後述するインピュリティディレイ法を導入した LC-MS/MS システムを用いて行った。さらに、同システムを用いて標準添加法による DPH の定量を行ったところ、超純水中の DPH 濃度は 2.3 pg/L と算出された。

以上の検証を通して、ブランク試験で検出される DPH の由来は、移動相に用いる超純水であることが示された。

ブランク試験



DPH標準品

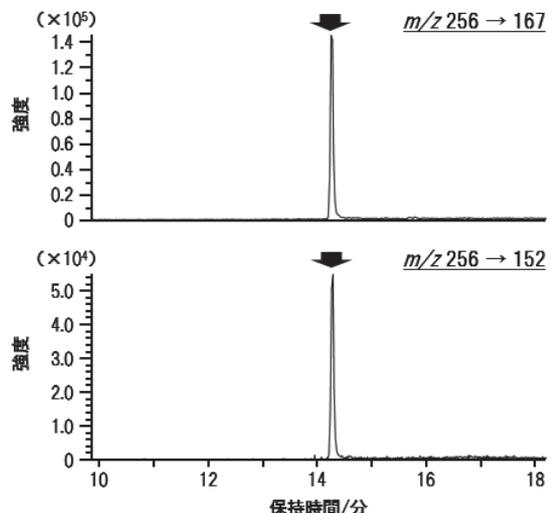
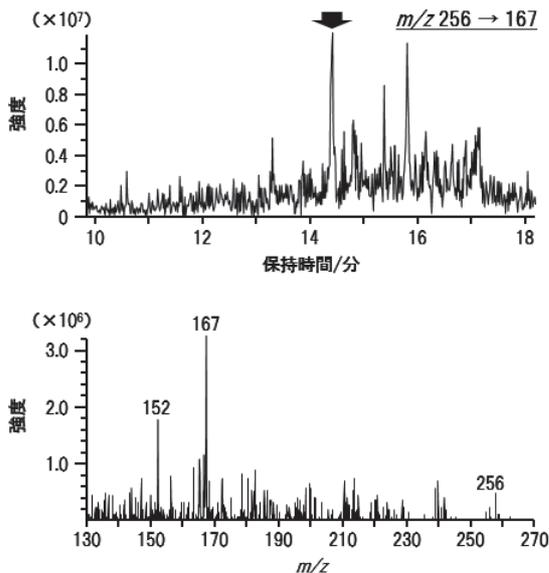


図 1 高感度 LC-MS/MS システム (従来型) における SRM クロマトグラム

超純水



DPH標準品

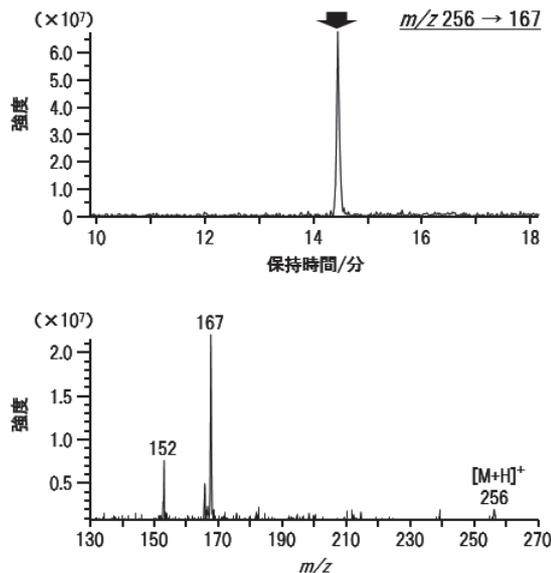


図2 DPHのプロトン付加分子 (m/z 256) をプリカーサとした m/z 167 の抽出イオンクロマトグラム (上段) および図中に矢印で示すピークのプロダクトイオンスペクトル (下段)

4 PPCPs による水環境汚染と高感度薬物分析

当研究所における高感度薬物分析のブランク試験を端緒に、超純水中にはごく微量の DPH が含まれることが明らかになった。ではこの DPH はいつ・どこで混入したのだろうか。考えられる原因として、PPCPs (Pharmaceuticals and personal care products: 医薬品および生活関連物質) による水環境汚染が挙げられる。

我が国では 2000 年代以降、分析技術の発展・普及に伴い、河川水など環境水中における PPCPs の検出事例が数多く報告されている。PPCPs には、ヒトおよび動物用医薬品、また生活関連物質として、医薬部外品、化粧品などが含まれ、これらは何らかの生理活性を持つことから、ヒトの健康や水生生物への潜在的な影響が危惧されている。汚染物質としての PPCPs は、製品使用者の排泄物や、手洗い・入浴時の廃水、あるいは製品自体の廃棄などを由来とし、処方量や生産量、用法用量、生体内の動態、水処理過程における除去率、環境中の分解性・残留性など様々な要因の影響を受け、水環境中に存在している^{8)~11)}。

DPH についても、国内の水道原水から ng/L レベルの濃度で検出された報告がある¹¹⁾。前述のとおり、DPH は睡眠改善薬や乗り物酔い防止薬、風邪薬などの内服薬のほか、かゆみ止めの軟膏剤や目薬、育毛剤など、多種多様な外用薬にも配合されており、少なくともこの点において環境水中に流出しやすい医薬品成分と考えられる。今回、上記報告の 1/1000 以下の濃度で検出された超純水中の DPH は、こうした汚染物質のごく一部が除去されずに残存した可能性がある。

また、島崎らの報告によると、国内の 4 浄水場を対

象とした水質調査の結果、浄水中から 5 物質の医薬品またはその代謝物が、おおむね ng/L レベルで検出されている (表 1)¹¹⁾。この濃度では、水道水を通じた摂取量はごく僅かであると推定され、ヒトの健康影響上、直ちに対策が必要なものではないと考えられている。一方、分析分野における水の汚染は、ごく低濃度の汚染レベルであっても分析に何らかの支障を及ぼす恐れがある。本稿もその一例であり、特に高感度 LC-MS/MS に用いる移動相は、PPCPs などの不純物を全く含まない状態が理想的である。

著者らは、超純水製造装置の設定を最適化することによって、不純物としての DPH を除去できるのではないかと考えた。具体的には、有機物の酸化分解を亢進させるため、精製過程内の UV 照射時間を延長した。しかしながら、DPH は相変わらず LC-MS/MS のブランク試験で検出され、その検出強度についても顕著な減少は観察されなかった。そこで著者らは、不純物を取り除くのではなく、不純物と測定試料由来の成分とを分離するための手法であるインピュリティディレイ法の導入を試みた。本法は根本的な解決策ではないものの、DPH に限

表 1 国内の 4 浄水場を調査対象とした浄水中の医薬品類の存在状況¹¹⁾

医薬品類	用途	濃度 (最高値) [ng/L]
イオパミドール	X 線造影剤	2400
イブプロフェン	解熱鎮痛消炎剤	6
エピナスチン	解熱鎮痛消炎剤	8
オセルタミビルカルボキシレート	抗インフルエンザ薬代謝物	38
カルバマゼピン	抗てんかん薬	38

らず他の不純物に対しても有効であると期待される。

5 インピュリティディレイ法

インピュリティディレイ法は元来、PFOS・PFOAなどの有機フッ素化合物やフタル酸エステル類、リン酸エステル類などを測定対象とした、高感度 LC-MS/MS による環境試料分析に用いられる手法として知られており、測定試料由来の成分と、LC システム（移動相や装置の部品など）由来の成分を分離することにより、MS 部における夾雑物の悪影響を抑えることを目的とする。その概略図は図 3 に示す通りで、ミキサーと試料注入部の間に取り付けられたディレイカラムによって、注入部より上流の LC システムから溶出する成分を保持し、注入部で注入した成分よりも MS 部への到達を遅らせることができる。なお、その遅延時間の長さは、ディレイカラムの長さや保持機構などに依存して変化するため、LC システムの圧力の上限などに注意して、適切なカラムを選択する必要がある¹²⁾¹³⁾。

本検討においては、従来の LC-MS/MS システムに対し、圧力の上昇を抑えるため、分析カラムの粒子径を 3 μm から 5 μm に変更するとともに、それと同じ規格のカラムをディレイカラムとして用いた。この改良した LC-MS/MS システムにより得られたブランク試験の結果および DPH 標準品の分析結果を図 4 に示す。ブランク試験では、従来のシステムで検出されていた DPH の

ピーク（図 1）が消失した。また、DPH 標準品の分析においても、検出されたピークは標準品由来のもののみであった。したがって、本来は測定試料由来の DPH より遅れて溶出するはずの“ディレイカラムにより分離された移動相由来の DPH”は検出されなかったものの、ブランク試験で DPH が検出されるという根本的な問題は解消された。移動相由来の DPH が検出されなかった原因として、カラムの粒子径を大きくしたことによる理論段数の低下や、一旦ディレイカラムで保持・濃縮された移動相由来の DPH が、その後分析カラムを含む LC 流路内で拡散したことによって、ピークがブロードになった可能性が考えられる。

6 おわりに

今回の検証を通して、LC の移動相に用いる超純水中には極めて低い濃度で DPH が含まれており、それが LC のグラジエント条件により分析カラム内で濃縮され、最終的に質量分析部で検出されることが明らかになった。発見の端緒となったのは、偶然 DPH を分析対象として行った頭髪中睡眠薬の超高感度分析である。しかしながら、PPCPs による水環境汚染が問題視されはじめた 2000 年代以降、我が国では DPH に限らず多種多様な汚染物質の存在が報告されており、それらの汚染物質についても DPH に準ずる濃度レベルで超純水中に含まれている可能性がある。さらに、今後も高感度な分

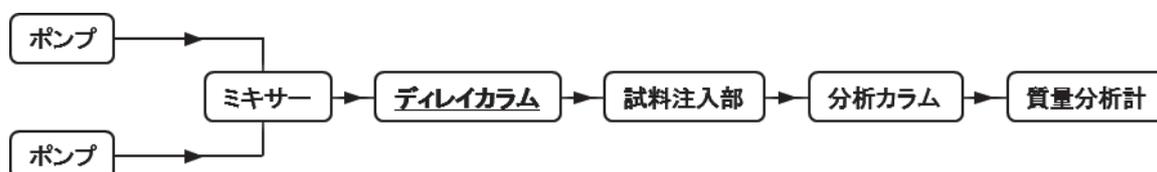
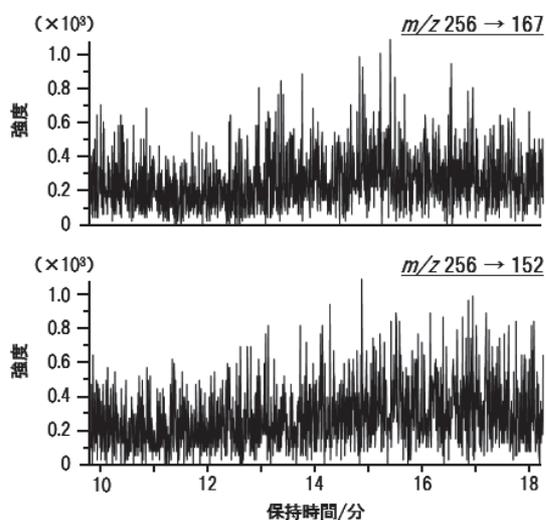


図 3 インピュリティディレイ法を用いた LC-MS/MS システム

ブランク試験



DPH 標準品

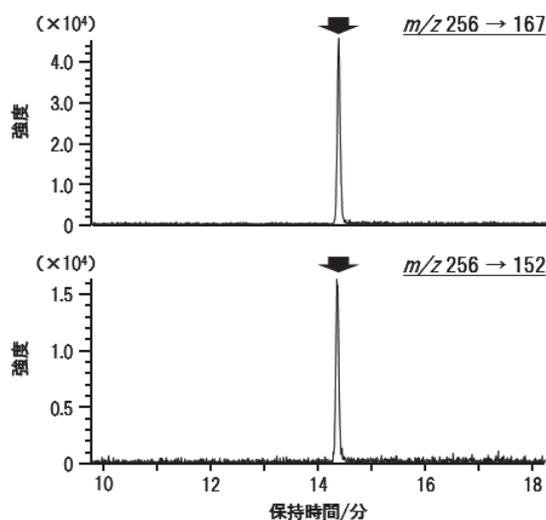


図 4 高感度 LC-MS/MS システム（インピュリティディレイ法を導入した改良型）における SRM クロマトグラム

析技術の開発およびその普及が進むと予想される一方、国内外において新規に製造・使用される化学物質の種類は増え続けており、特に我が国では、高齢化社会に伴って今後医薬品の使用が増加していくと予想されていることから、近い将来、ますます本稿で取り上げたような問題が生じ得ると危惧される。今回、対策の一つとしてインピュリティディレイ法の活用を紹介したが、今後頭髮分析に代表される超高感度薬物分析を実施する際には、試料の前処理や移動相に使用する超純水中にごく微量の不純物が含まれている可能性について十分に考慮する必要がある。

謝辞

本稿執筆にあたりご指導・ご協力いただいた、大阪健康安全基盤研究所高木総吉博士、公立鳥取環境大学山本敦史博士、およびオルガノ株式会社の方々に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 水道水質基準について, 厚生労働省, <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/index.html> (2021年6月30日, 最終確認).
- 2) 志摩典明, 片木宗弘: 日本法科学技術学会誌, **26**, 137 (2021).
- 3) A. Miki, M. Katagi, N. Shima, H. Kamata, M. Tatsuno, T. Nakanishi, H. Tsuchihashi, T. Takubo, K. Suzuki: *Forensic Toxicol.*, **29**, 111 (2011).
- 4) T. kamata, N. Shima, K. Sasaki, S. Matsuta, S. Takei, M. Katagi, A. Miki, K. Zaitso, T. Nakanishi, T. Sato, K. Suzuki, H. Tsuchihashi: *Anal. Chem.*, **87**, 5476 (2015).
- 5) N. Shima, K. Sasaki, T. Kamata, S. Matsuta, M. Katagi, A. Miki, K. Zaitso, T. Sato, T. Nakanishi, H. Tsuchihashi, K. Suzuki: *Forensic Toxicol.*, **33**, 122 (2015).
- 6) N. Shima, K. Sasaki, T. Kamata, S. Matsuta, M. Wada, H. Kakehashi, S. Nakano, H. Kamata, H. Nishioka, T. Sato, H. Tsuchihashi, A. Miki, M. Katagi: *Drug Metab. Dispos.*, **45**, 286 (2017).
- 7) A. Nitta, N. Shima, T. Kamata, K. Sasaki, S. Matsuta, A. Ishikawa, R. Asai, M. Wada, H. Kakehashi, S. Fujii, H. Kamata, H. Nishioka, T. Sato, H. Tsuchihashi, A. Miki, M. Katagi: *J. Anal. Toxicol.*, **45**, 1006 (2021).
- 8) K.Kümmerer: *J. Environ.Manag.*, **90**, 2354 (2009).

- 9) 清野敦子, 古荘早苗, 益永茂樹: 水環境学会誌, **27**, 685 (2004).
- 10) 鈴木俊也: 東京都健康安全研究センター研究年報, **63**, 69 (2012).
- 11) 島崎 大, 秋葉道宏, 国包章一: 環境システム計測制御学会 (The Society of Environmental Instrumentation Control and Automation), **17**, 45 (2013).
- 12) SHIMADZU APPLICATION NEWSNo. C81, 島津製作所, (2011), <https://www.an.shimadzu.co.jp/apl/an/c/c081.pdf> (2021年6月30日, 最終確認).
- 13) 中村 洋: “LC/MS, LC/MS/MS Q&A 100 獅子の巻”, 日本分析化学会液体クロマトグラフィー研究懇談会編, p. 232 (2018), (オーム社).



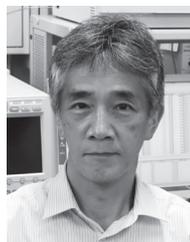
新田篤志 (Atsushi NITTA)

大阪府警察本部科学捜査研究所 (〒541-0053 大阪府大阪市中央区本町 1-3-18). 九州大学工学部物質科学工学科修士. 学士 (工学). 《現在の研究テーマ》毛髪中への薬物の取り込み挙動について. 《趣味》ランニング, バスケットボール.
E-mail: a.nittahja56@gmail.com



志摩典明 (Noriaki SHIMA)

大阪府警察本部科学捜査研究所 (〒541-0053 大阪府大阪市中央区本町 1-3-18). 富山医科薬科大学大学院薬学研究科修士. 博士 (薬学). 《現在の研究テーマ》性犯罪の立証に資する睡眠薬等の分析に関する研究. 《主な著書》“薬毒物試験法と注解 2017” (東京化学同人) (日本薬学会編) (分担執筆). 《趣味》フットサル, ジョギング.



片木宗弘 (Munehiro KATAGI)

大阪府警察本部科学捜査研究所 (〒541-0053 大阪府大阪市中央区本町 1-3-18). 岐阜薬科大学厚生薬学科修士. 博士 (薬学). 《現在の研究テーマ》質量分析による薬毒物の高感度分析. 《主な著書》“薬毒物試験法と注解 2017” (東京化学同人) (日本薬学会編) (分担執筆). 《趣味》園芸, テニス, 競馬観戦.
E-mail: Kataginohto@meth.biglobe.ne.jp