

9. 大阪市水道局におけるノンターゲットスクリーニング分析の変遷と今後の展望

中野 耕太
山田 圭一
吉村 誠司

1. はじめに

大阪市水道局（以下、当局）は、淀川の最下流域から取水しているため、上・中流域の水源地水質変動の影響を受けやすい事業環境下にある。そのため、万が一の水質異常の発生に備え、その原因物質の検知・特定に関する技術を確立することで、事業の持続性を高めることが求められる。このような背景の下、当局水質管理研究センター（以下、当センター）は従来の水質検査で汎用的に用いられる質量分析計（以下、MS）よりも、高感度かつ高分解能を有する高分解能質量分析計（以下、HRMS）が、上記課題解決の一助になるものと判断し、液体クロマトグラフ-高分解能質量分析計（以下、LC-HRMS）を導入した。本発表では、当センターがLC-HRMSを用いたスクリーニング手法について、水道事業に適する形に進化させた変遷を、具体的に対処した事例を交えて振り返り、今後のあるべき姿について報告する。

2. スクリーニング分析の構成要素

2. 1 LC-HRMS

HRMSは高い質量精度でピークを高感度、網羅的に取得できるという特徴から、一度の分析でより多くの物質を感度よく検出できる。さらに、データの取りこぼしが少ないため、一度データを取得しておけば、データを遡って照合することも可能である。また、後述するが、水道事業における測定対象は当然に水試料であることから、水中に含まれるごく微量の物質を測定することになる。すなわち、水試料をそのまま注入でき、測定できることで効率化が図られると考えられるため、必然的にLC-HRMSの組み合わせが有力候補となる。

こうしたLC-HRMSの利点を活かしたノンターゲットスクリーニング分析は、近年、多くの研究機関や事業体で試みられている¹⁾。試料に含まれる物質の網羅的な探索により得られた情報をデータベース（以下、DB）の情報と照合することで、標準物質を用いなくても試料に含まれる物質の検出及び推定が可能となる。さらに、平常時にデータを蓄積し、水質事故発生時に平常時との差異を解析することで、水質事故原因物質を特定することも可能と考えられる。

なお、当センターのLC-HRMSは、LC部としてVanquish Flex UHPLC（Thermo Fisher Scientific製）、HRMS部としてQ Exactive Focus（Thermo Fisher Scientific製）を使用している。

2. 2 スクリーニング分析の種類

スクリーニング分析は、表-1のように大別できる²⁾。ターゲットスクリーニングは、対象物質を予め定め、測定時に都度標準物質を測定することで、未知試料のピークを標準試料のピークと照合させて、その存在有無を把握する。標準物質を同時に測定することから定量性も確保しやすいこ

表-1 スクリーニング分析の種類

	ターゲットスクリーニング	サスペクトスクリーニング	ノンターゲットスクリーニング
特徴	・標準物質を毎回使用 ・未知試料のピークを都度標準物質とのピーク面積値を比較する	・あらかじめ測定したい物質のデータを取得し、そのデータと未知試料を照合 ・測定の際には標準物質を使用しない	測定対象を定めず、すべてのピークをデータベースと照合
対象	対象物質のピークのみ	対象物質のピークのみ	すべてのピーク
長所	定量性に優れる 解析が容易	測定時に標準物質を必要としない 事前に対象物質の検量線を作成しておけば簡易な定量も可能 データベース内の物質は網羅できる	網羅性が高く、データの取りこぼしが少ない 測定対象物質以外にもモニタリングできる
短所	測定対象物質に限られる 測定時に標準物質が必要	データベースにない物質は測定不可 定量精度が低い	解析が難しい 定量はできない

とが利点として挙げられるが、一方で迅速性に欠けるとともに、対象外の物質は検出できない。サスペクトスクリーニングは、ターゲット分析から派生した手法であり、予め標準物質等で保持時間やプロダクトイオンを把握し、そのDBから照合することで、該当の物質を検索することを期待する。利点としては、測定時に標準物質を必要としないことにある。一方で、DBに未登録の物質は特定できない。ノンターゲットスクリーニングは、測定対象を指定せずすべてのデータを取得し、検出されたピークを網羅的にDBと照合することを特徴とする。水質異常が発生した際には原因物質の標準試料がない場合が多いため、DBと照合することで特定できることが最大の強みである。

このように、スクリーニング分析は技術的難易度が異なるため、目的に適した形で導入することが肝要である。なお当センターでは、水質異常時の原因物質特定を目的としているため、ノンターゲットスクリーニングの体制構築を目指して要素技術の開発に取り組んだ。

3. 当センターにおけるスクリーニング分析の変遷

当センターにおけるスクリーニング分析の検討の時系列を図-1に示す。令和元年12月の導入以来、段階的に検討を進めて現在のノンターゲットスクリーニングの体制を構築した。

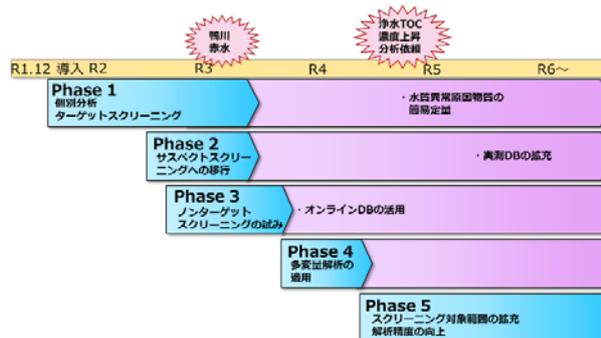


図-1 当センターにおける検討の過程

3. 1 Phase 1：個別分析・ターゲットスクリーニングの確立（令和元～3年度）

当センターではPhase 1として、従来のLC-MSで測定している物質を対象にLC-HRMSの分析性能を評価した。個別に標準物質を各々の物質に適したLC条件およびMS条件で測定することで、従来と遜色なく検出できることを確認した。また、フルスキャンのデータからも十分高感度に対象物質を検出できることを確認した。さらに、ターゲットスクリーニングを念頭に、多成分が一斉に検出できることを確認するため、農薬類の混合標準液を測定したところ、供試した187種類中165種類の農薬を検出できた³⁾。

3. 2 Phase 2：サスペクトスクリーニングへの移行（令和2～3年度）

Phase 2として、標準物質を都度測定することなく検出できるようにするため、Phase 1で測定した標準物質の保持時間や構造情報、およびプロダクトイオンスペクトルをDBに登録し、次回以降の測定で未知試料から得られたピークをDBの情報と照合することで検出できる状態にした。このDBを用いて柴島浄水場原水および淀川本川・支川における農薬類の存在実態をサスペクトスクリーニングにより調査したところ、保持時間およびプロダクトイオンスペクトルが一致したピークを検出することができた³⁾。

3. 3 Phase 3：ノンターゲットスクリーニングの試み（令和2～3年度）

3. 3. 1 農薬類のノンターゲットスクリーニング

Phase 3として、標準物質を所有していない物質についても検出できるようにするため、構造情報をあらかじめDBに登録し、未知ピークと照合することで検出が可能か検討した。これまで監視対象外だった農薬類を調査対象とし、フルスキャンで取得したデータを照合した結果、浄水場原水や水源河川水から複数の農薬が検出された⁴⁾。これらについて標準物質を入手し未知ピークと照合したところ、保持時間およびプロダクトイオンスペクトルが一致した。このことから、標準物質を用いずに農薬類のノンターゲットスクリーニングが達成されたと評価できた。

3. 3. 2 オンラインDBの活用によるノンターゲットスクリーニング（令和3年度）

前述の取り組みを通じて、当センターのスクリーニング技術は、検出ピークを確実に把握できた場合にはDBとの照合により精度よく物質を特定できる技術水準に達した。一方で、DB内に候補がないピークは精密質量や組成式の候補が提示されるのみで、そこから候補物質を絞り込むのは非常に困難だった。なお、本調査時期に後述4. 1の鴨川における水質異常が発生し、ノンターゲットスクリーニングにより原因物質特定を試みたものの、当時は特定には至らなかった。実際の水質異常においては想定していない物質が原因となる場合が多く、その特定にはさらに広範囲の物質を網羅する必要があるという教訓が得られた。

サスペクト及びノンターゲットともに、候補化合物の探索にはDBの充実が鍵となる。そこで、導入当初はオフラインでの使用を想定していた解析PCをネットワーク接続に耐えうるものに変更し、オンラインDB（mzCloud、Chemspider）との照合によりさらに広範囲のDBとの照合を可能とした。その結果、柴島浄水場原水から医薬品成分や工業品原料等、これまで監視していなかった物質が候補物質として提示されるようになった。さらに、提示された候補物質ピークのプロダクトイオンスペクトルとの照合による詳細な推定や、標準物質を用いた同定ができた⁵⁾。このように、取得したデータをオンラインDBと照合する環境を構築することで、網羅的なノンターゲットスクリーニングができる状態になった。

3. 4 Phase 4：網羅分析結果への多変量解析の適用（令和3～4年度）

オンラインDBとの照合による網羅的なノンターゲットスクリーニングが可能になったことで、数多くの物質が検出できるようになった。一方で、解析結果には常在成分やノイズなど試料に関係しないピークも多数存在し、確認すべき物質の抽出が煩雑であった。そこで、この問題解決のため、Phase 4として多変量解析を用いて試料ごとに特徴的な物質を抽出した。

主成分分析は試料間の類似度や特徴的な物質を視覚化することができ、本調査において淀川上流三川（木津川、宇治川、桂川）の測定結果に適用したところ、桂川の水が他の河川水と大きな差があること、また桂川の上流部に存在する下水処理場の排水に由来する界面活性剤や医薬品成分などが影響していることが識別された（図-2）⁶⁾。また、2つの試料の一方にどの物質が有意に多く含まれるかを網羅的に可視化するボルケーノプロットにより、後述4. 2の浄水TOC濃度上昇および臭気異常の原因物質を識別できた⁶⁾。

3. 5 Phase 5:スクリーニング対象範囲の拡充と解析精度の向上 (令和4年度~現在)

ここまでの取り組みによりLC-HRMSを用いたノンターゲットスクリーニングの体制が確立され、多くの物質が標準品を用いずに検出できるようになった。しかし、調査を続けていくと検出できない物質の存在や構造異性体や精密質量が近い物質同士の識別、分析の安定性確保など、様々な課題が浮かび上がってきた。そこで、Phase 5として、さらにスクリーニング技術を改良し、これらの解決を試みた。

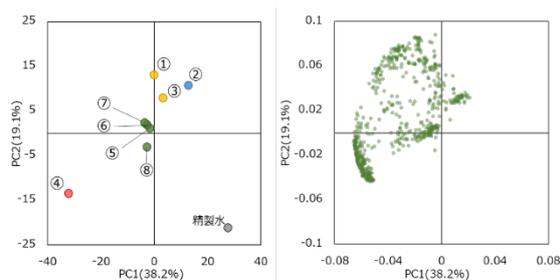


図-2 本川試料の主成分得点プロット(左)及び因子負荷量プロット(右)

3. 5. 1 親水性物質への対応

親水性が高い物質も水質異常の原因となる場合が考えられるが、当時の逆相カラムで試料を直接注入する方法では検出が難しかった。そこで、水道事業において必要な物質を網羅でき、かつ分析精度を向上させるために、次に示す取り組みを進め、現在、表-2に示す物質群が検出可能である。

主成分得点プロットの番号は採水場所を表す。①瀬田川、②木津川、③宇治川、④桂川、⑤~⑧淀川。

1) 誘導体化による官能基選択的スクリーニング

逆相カラムに保持されない物質やイオン化されにくい物質、MSの測定範囲外の低分子は、水質検査に関する告示法や通知法で採用されている誘導体化法(図-3)に着目し、それらの検出を試みた^{6,7)}。これらにより、表-2に示す親水性化合物や低分子化合物が検出できるようになった。現在、誘導体化をより簡便に進められるよう他の試薬の選定や添加方法等の検討を進めている。

2) 分析カラムの変更

当時の分析法では、親水性化合物のピーク形状が悪く、全く保持されないために検出できない物質もあった。これらの課題解決のため、より親水性の化合物も保持可能なカラムを使用し、移動相も有機溶媒比率を下げた初期条件とすることで検出できる物質が増え、さらにピーク形状も改善した。さらに、逆相-イオン交換ミックスモードカラムを併用することで、移動相の割合の変更のみでさらに親水性が強いイオン性化合物も検出できた。

表-2 本法で検出できる物質群と検出法

分子量	~ 50	100	200	300	500 ~	物質例
脂肪族炭化水素						油類
芳香族炭化水素						ベンゼン
有機ハロゲン化物						トリハロメタン
エーテル類		DMT誘導体化				ジオキサン・界面活性剤
エステル類						酢酸エチル
フェノール類						オクチルフェノール
アルデヒド・ケトン類		DNPH誘導体化				ホルムアルデヒド
三級アミン類						ヘキサメチレンテトラミン
アミド化合物						ジメチルホルムアミド
アルコール類						エタノール
一級・二級アミン類						ジメチルアミン
カルボン酸・ハロ酢酸類						クロロ酢酸
スルホン酸化合物						陰イオン界面活性剤
陰イオン類						塩素酸・臭素酸
金属類						Na, K, Ca, Mg, Mn

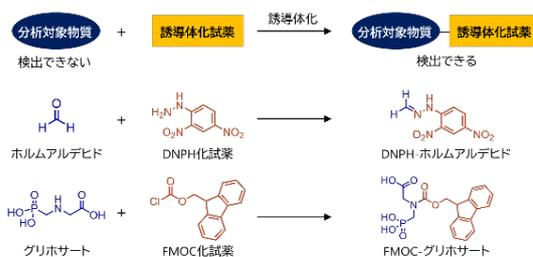


図-3 誘導体化のイメージ

3. 5. 2 標準試料の実測によるDBの拡充と特定確度の向上

これまでの取り組みを通じて、DBから推定される物質が増えた一方、構造異性体や精密質量が非常に近い物質はいずれも候補物質として検出されるため、擬陽性が多くなるという課題が生じた。そこで、網羅分析によって検出された物質のうち、特に頻繁に検出された物質については標準物質を入手しピークを同定することとした。この操作により同定できた物質に関しては構造情報、保持時間と精密質量およびプロダクトイオンスペクトルをDBに登録し、次回以降に検出された際に優先的に表示させるようにした。これにより、目的の物質と構造異性体や精密質量が非常に近い物質とを判別し、誤同定を防ぐことができた。

4. 取り組み成果 (一例)

4. 1 鴨川赤水に含まれる物質の特定

令和3年、淀川水系桂川支川鴨川の勧進橋右岸下流に流入している下水道の雨水放流渠から赤く着色した水が流出していることが判明したため、スクリーニング分析により原因物質の特定を試みた。当時はPhase 2からPhase 3への過渡期であったため、所有していたDBに加えてアゾ染料151種類および特定芳香族アミン24種類について新たに登録したDBを検索したが、照合された物質はなく、提示された組成式候補からも有力な情報は得られなかった(図-4)。

ノンターゲットスクリーニングの体制が構築された現在、当時の測定データに対して再解析及び再評価したところ、最も大きなピークに赤色の顔料であるパーマネントレッド FRL (C₂₃H₂₃C₁₂N₃O₂、図-5)が候補として提示された。この物質の組成は予想された組成式候補になく、オンラインDBとの照合ではじめて認識できた。さらにこの赤水からは、N,N-ジメチルドデシルアミンなどの界面活性剤が複数検出された。この結果は、赤水の原因が染色工場由来の排水であるという報道と矛盾しない。このように、オンラインDB検索による網羅的なノンターゲットスクリーニングにより、原因物質の候補が容易に得られることがわかった。

なおこの技術は、現在は水道水源に対して、例えば工場排水が通常時の10倍程度流入した際に差異を検知できるレベルで確立している⁷⁾。

4. 2 浄水 TOC 濃度上昇原因物質の特定

令和4年11月、水道事業体Aで浄水TOC濃度が水質基準値を超過する事例が発生し、その原因物質の特定依頼を受けた。臭気試験で原水及び浄水に甘味臭が確認され、有機物の流入による原水の汚染が疑われたことから原因物質の究明を試みた結果、TOC濃度上昇原因物質がエタノールであることを、依頼を受けてから3日間で特定することができた⁶⁾。

5. 課題と今後の展望

物質の特定に膨大な労力を要し、さらに属人的要素が強かったこれまでのノンターゲットスクリーニング分析を、多変量解析手法を組み込むことで平常時と水質異常時の差異を統計的に評価でき、汎用性を高めることができた。しかし、汎用的なMSとは異なる機器の取り扱いや多変量解析のノウハウ、構造解析に関する知識など、依然として担当者の力量に頼る部分もある。また、多変量解析も万能ではなく、最も大きな課題としては「異常時における平常時試料の確保、またどの試料を平常時試料と定義するか」という課題がある。さらに、検査担当者の引継ぎに備え、人材育成の体制をいかに確立するかも課題としてある。これらに対処すべく、誰でも安定した解析結果が出せるような解析法の標準化およびマニュアル作成に取り組んでいくとともに、誘導体化効率や作業性の向上を目的とした測定法の開発を進める予定である。

また、これまででは水源水質異常対応を主目的としていたが、浄水場の工程監視や、給配水過程における水質異常への対応も考えられることから、これらへの対処についても検討を進める予定である。

【参考文献】

- 1) 石井淑大、栗栖太、畠山準、春日郁朗、古米弘明：入間川へ流入する有機汚濁物質と浄水処理後の残留状況のノンターゲットスクリーニング分析、環境科学会誌、33(5)、79-89 (2020)。
- 2) Schymanski, E. L. *et al.*: Non-target screening with high-resolution mass spectrometry: critical review using a collaborative trial on water analysis, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 407(21), 6237-6255 (2015)。
- 3) 外山義隆、平林達也、今中壮一：高分解能液体クロマトグラフ質量分析計によるスクリーニング分析調査に関する報告、大阪市水道局水質試験所調査研究ならびに試験成績、72、37-43 (2020)。
- 4) 中野耕太、外山義隆、今中壮一：高分解能液体クロマトグラフ質量分析計によるスクリーニング分析調査に関する報告(その2)、大阪市水道局水質試験所調査研究ならびに試験成績、73、29-36 (2021)。
- 5) 中野耕太、外山義隆、今中壮一：高分解能質量分析計を用いた淀川水系における微量有機物のスクリーニング調査、令和4年度水道研究発表会講演集、日本水道協会、638-639 (2022)。
- 6) 山田圭一、中野耕太、今中壮一：誘導体化ノンターゲットスクリーニング法を活用した水質異常原因物質の特定、水道協会雑誌、92(11)、2-13 (2023)。
- 7) 山田圭一、中野耕太、今中壮一：高分解能質量分析計と多変量解析を用いた水質異常の検知および原因物質特定手法の検討、令和6年度水道研究発表会講演集、日本水道協会、698-699 (2024)。

本報告は、日本水道協会関西地方支部研究発表会にて発表したものである。

(中野耕太、山田圭一、吉村誠司：大阪市水道局におけるノンターゲットスクリーニング分析の変遷と今後の展望、第68回研究発表会概要集、日本水道協会関西地方支部、44-47 (2024).)

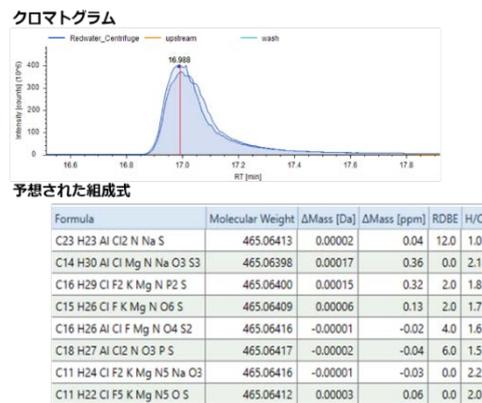


図-4 鴨川赤水から検出された面積値最大のピークと予測された組成式

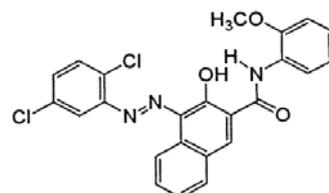


図-5 パーマネントレッドFRLの構造