

LC/MS/MSによるトータルマイクロシスチンの 迅速分析法の検討*

田 中 義 人**・飛 石 和 大**・村 田 さつき**
永 島 聡 子**・高 木 博 夫***・佐 野 友 春***

キーワード ①マイクロシスチン ②アオコ ③LC/MS/MS ④MMPB

要 旨

従来、全マイクロシスチンの定量には2段階の固相抽出が必要であったため時間と煩雑な操作が求められた。本報告では全マイクロシスチンを水試料から直接マイクロシスチン共通骨格部に分解し、1段階の固相抽出で迅速かつ簡易に分析できる方法を検討した。検量線の作製、再現性試験、標準添加法や認証標準物質を用いた回収率の検討などを行い、それぞれ良好な結果が得られた。20mlのサンプルを用いた場合、定量下限値は0.3ng/mlであった。本研究の結果、水試料中の全マイクロシスチンを簡易に分析することが可能となり、マイクロシスチンのモニタリングの効率化が図れると考えられる。

1. はじめに

富栄養化した湖沼やため池などではアオコと呼ばれる藍藻類の大発生がしばしば見られる。このアオコを形成する一部の藍藻類が強力な肝臓毒で、肝臓がんのプロモーター活性を持つマイクロシスチン(MCs)¹⁾を生産することが知られている。MCsは7個のアミノ酸からなる環状ペプチド(図1)で、主にR₁とR₂の位置にあるアミノ酸の種類によって70種類以上が報告されている²⁾。一般的に、これらR₁およびR₂位のL-アミノ酸が、ロイシンとアルギニンの場合、MC-LR、2つともアルギニンの場合、MC-RRなどとアミノ酸の一文字表記を使って表記されている³⁾。わが国の湖沼ではMC-RRやMC-LRが主に検出されてい

るが、その他MC-YR(R₁およびR₂がチロシンとアルギニン)、MC-WR(同トリプトファンとアルギニン)などのMCが検出されている例も報告されている⁴⁾。

一方、わが国における湖沼の水質改善は河川と比較して進んでいないのが現状である⁵⁾。また、今後地球温暖化が進み、湖沼などの水温が上昇することにより、有毒藍藻の出現頻度が増加することや、その発生期間が長期化することが懸念されているため、MCs汚染に対する懸念も高まっている。MCsは現在、環境基準の要調査項目と水道法の要検討項目に指定されており、分析法として、各MCsを個別に定量する方法とトータルのMCs量(T-MCs)を分析する方法が示されてい

*Rapid Analytical Method of Total Microcystins by LC/MS/MS

**Yoshito TANAKA, Kazuhiro TOBIISHI, Satsuki MURATA, Satoko NAGASHIMA (福岡県保健環境研究所) Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences

***Hiroo TAKAGI, Tomoharu SANO (国立環境研究所) National Institute for Environmental Studies

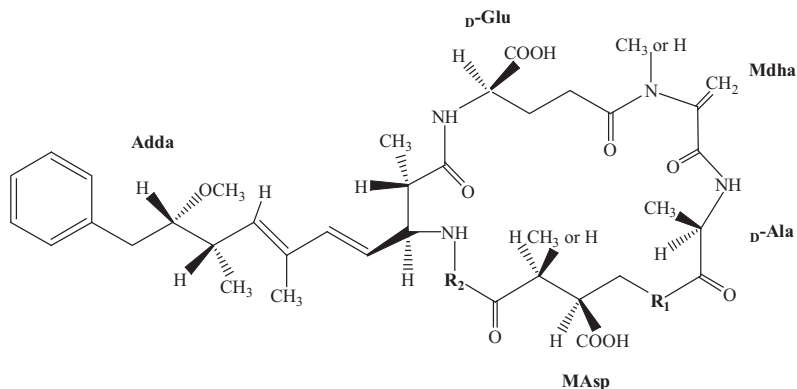


図1 ミクロシスチンの構造

る。個別定量法は毒性の異なる MC をそれぞれ定量できる長所はあるが、現在のところ入手可能な標準品は数種に限られていることから、そのリスク把握に懸念がある。この個別定量法では、MCs は HPLC でそれぞれ分離され LC/MS 等で定量される。一方、T-MCs の定量は MCs の共通骨格 Adda 残基の 2-Methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid (MMPB) に着目したものである⁶⁾。MCs は過ヨウ素酸ナトリウム下の過マンガン酸カリウムより MMPB に分解され、誘導体化 GC/MS あるいは LC/MS 等で定量される。しかし、従来の T-MCs の分析は予め個別分析用に前処理したサンプルを用いて MMPB への分解操作を行うようになってきているため、結果的に 2 段階の抽出が必要となっていた。このことから、煩雑で多大な操作とそれに伴う時間を要することとなっていた。今後、MCs のリスクを迅速に把握するためには、MC 全量を簡易に測定することが必要である。このため、今回、水試料から直接分解を行う T-MCs の分析方法を検討したので報告する。

2. 実験方法

2.1 試薬および装置

本研究では、国内で報告例が多い MC-LR、MC-RR および MC-YR の 3 種類を T-MCs 定量の対象として検討した。標準溶液は関東化学(株)製の水質試験用を、20%メタノール溶液で適宜希釈し用いた。また、MCs の共通骨格 MMPB および MMPB-*d*3 の標準溶液は和光純薬(株)製水質試

験用を、メタノール溶液で適宜希釈して用いた。固相抽出には GL サイエンス社製 InertSep RP-1 (250mg/6 ml) 用いた。LC/MS/MS の移動相溶媒に用いたアセトニトリルおよび精製水は和光純薬(株)製 LC/MS 用試薬を用い、抽出や試薬調製に用いたメタノールは同社製残留農薬試験用を用いた。その他の試薬は同社の特級試薬を用いた。

2.2 前処理方法および LC/MS/MS 条件

LC/MS/MS 分析装置は Waters 社製の Alliance 2695-Quattro micro API を用いた。HPLC および MS/MS の分析条件を表 1 に示す。また、前処理方法の概要を図 2 に示す。まず、採取した水試料をよく攪拌したのち、20ml を共栓遠沈管 (50ml) に取り、凍結融解を 1 回あるいは超音波処理 5 分を 2 回行うことによって藍藻細胞を破壊し細胞内の MCs を遊離させた。このサンプルにサロゲートとして 5 ng の MMPB-*d*3 を添加した (0.1mg/ml サロゲート溶液を 50ml 添加)。共栓試験管を氷水中に移し 5 M 炭酸カリウム溶液 1.8ml、0.025M 過マンガン酸カリウム溶液 2.5ml および過飽和過ヨウ素酸カリウム溶液 (1g の過ヨウ素酸カリウムを 9 ml の蒸留水に溶解) 1 ml を添加し 1 時間静置した。その後、37°C 水浴中で 3 時間、時折攪拌しながら MCs を MMPB に分解した。分解中に過マンガン酸カリウムの色が消える場合は、適宜過マンガン酸カリウム溶液を添加して十分に分解を行った。分解後、20%亜硫酸水素ナトリウムで過剰な KMnO₄ を分解後、2 M リン酸で溶液を pH3 以下とした。その後、予めメタノール 5 ml と精製水 5 ml でコンディ

表1 LC/MS/MS 分析条件

LC条件	機種：Waters Alliance 2695 カラム：(勸化学物質評価研究機構 L-カラム ODS, 2.1×150mm, 5 μm 移動相：アセトニトリル：水(0.01% 酢酸) 流量：0.2ml/min. 温度：40℃, 注入量：10 μl
検出器	機種：Waters Quattro micro API イオン化法：ESI-Negative キャピラリー電圧：0.5kV, Cone 電圧：25V ガス流量：Cone 50L/hr. Collision energy：Ar 12.0eV 温度：イオン源 120℃ モニターイオン 207→131(ターゲット) 210→131(サロゲート)

水試料	20ml
	↓ ←凍結融解或いは超音波処理
	↓ ←サロゲート 50ng
氷水中	
	↓ ←5M K ₂ CO ₃ , 1.8ml
	↓ ←0.025M KMnO ₄ , 2.5ml
	↓ ←過飽和 NaIO ₄ , 1ml
氷水中	1時間静置
	↓
40℃水浴中	3時間静置(時折攪拌)
	↓ (過マンガン酸カリウムが不足の場合、適宜添加)
	↓ ←20%NaHSO ₃ , 5~6ml
	↓ ←2M H ₃ PO ₄ , 5ml
	↓ (pH3以下)
InertSep RP-1 (250mg/6ml)	←メタノール 5ml
	↓ 精製水 5ml
	↓ 水洗 コンディショニング
90%CH ₃ OH 5ml,	溶出
	↓
N ₂ 気流下で濃縮	
	↓
	1ml 定容
	↓
	LC/MS/MS

図2 前処理の概要

ショニングした Inert Sep RP-1で MMPB を捕集し、水洗後、90%メタノール 5 ml で溶出させた。その後、窒素気流下で濃縮し 1 ml に定容した。

2.3 検量線の直線性、低濃度測定時の再現性、標準添加法による回収率および同族体による回収率への影響検討

本研究では T-MCs の定量結果を MC-LR 換算として算出するため、MC-LR を用いて検量線を作成した。すなわち、MC-LR を 1.25ng/ml~40ng/ml まで段階的に調製して前述の前処理を行った。

また、低濃度測定時における再現性試験として、MC-LR 1.25ng/ml の試料を調整し (n=5)、前述の方法に従い前処理を行った。さらに、標準添加法による回収率の検討として、未知の環境試料に MC-LR を 5.0ng/ml となるように添加し、MC-LR の回収率を検討した (n=3)。環境試料は福岡県筑後地方にある富栄養化したため池から採取した試料を用いた。MCs 同族体の違いによる回収率への影響を検討するために、MC-RR, MC-YR の標準液 1.25, 5.0, 20ng/ml について同様な抽出および分析を行い、MC-LR で作製した検量線によって定量した、このとき、MC-LR, MC-RR, MC-YR の分子量をそれぞれ 994, 1037, 1044 としてモル濃度による回収率の算出を行った。

2.4 認証標準物質および環境試料への適用

MCs の分析に対しては国立環境研究所より「アオコ」の認証標準物質が頒布されている。この認証標準物質には MC-LR, MC-RR, MC-YR 以外の MCs 7 種が含まれ、その含有率が認証されている。この認証標準物質を用いて、本分析方法の実用性について検討を行った。実験はまず、認証標準物質 20.6mg を 100ml の精製水に懸濁し、この溶液 0.2ml を精製水 20ml に添加しサンプルとした。このとき、T-MC の設定濃度は 9.27ng/ml とした。このサンプルに対して同様な前処理および分析を行い (n=2)、認証値との比較を行った。さらに、環境実試料への活用を検討のため、県内の湖沼などを対象として MCs の測定を行った。対象とした湖沼は 1000m³ を超える大規模な 3 カ所の湖沼と規模の小さい 3 カ所のため池とした。各地点の位置を図 3 に示す。これらの表層水を採取し、前述のとおり前処理および分析を行った。



図3 調査対象湖沼等の位置

3. 結果および考察

標準物質とサロゲート物質のクロマトグラムを 図 4 に示す。標準物質に対しては MMPB の [M-H] の質量数207の前駆イオンから質量数135のプロダクトイオンをモニターした。一方、d3体のサロゲート物質の前駆イオンについては質量数210からプロダクトイオン135をモニターした。保持時間7.1分に良好な形状のピークが検出された。検量線を MC-LR 換算で1.25ng/ml から20ng/ml の間で作成した結果を 図 5 に示す。5点の検量線で相関係数0.9996と良好な直線性が得られた。

また、検量線作製時のもっとも低濃度である MC-LR 1.25ng/ml の試料を対象として再現性試験を行った。測定は5つのサンプルを調製し分析した。その結果を 表 2 に示す。その結果、設定値 1.25ng/ml に対して平均検出値1.258ng/ml (n = 5)、変動係数2.5%と良好な結果であった。このとき、試料の平均 S/N 比は41.92であったため、定量限界を0.3ng/ml (S/N=10)とした。環境試料中での回収率を検討するために標準添加試験を行った。その結果を 表 3 に示す、その結果、標準添加試験においても、回収率98%と良好な結果が得られた。さらに、MCs 同族体の違いによる回収率について検討を行った。MC-LR で作製した検量線による MC-RR と MC-YR の定量結果を 表 4 に示す。その結果、各濃度で良好な回収が得られ、各濃度の回収率の平均で MC-RR は 92.6%、MC-YR も96.2%と良好な回収結果が得られた。MC-LR、MC-RR および MC-YR はわ

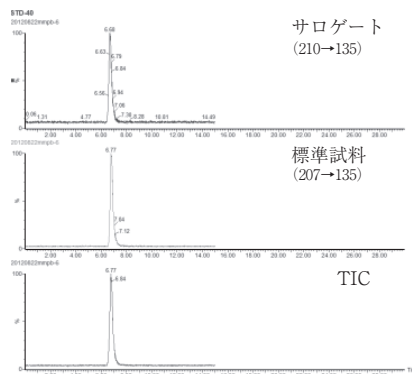


図4 標準物質のクロマトグラム

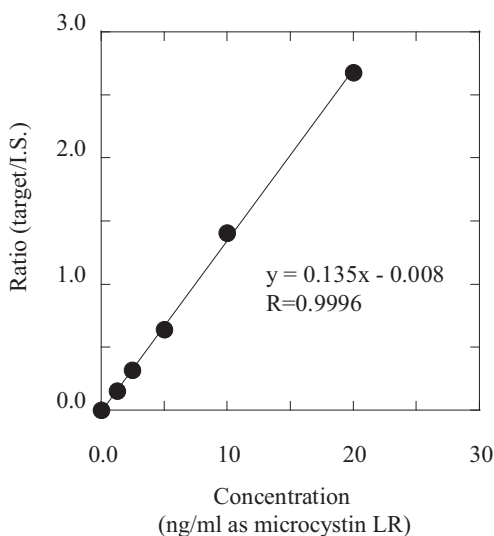


図5 検量線の一例

表2 再現性試験

サンプル	MMPB (Area)	IS (Area)	RATIO	濃度 (ng/ml)	S/N
1	138	1044	0.132	1.24	46.56
2	162	1164	0.139	1.30	40.93
3	156	1169	0.133	1.25	36.81
4	157	1204	0.130	1.22	37.04
5	149	1091	0.137	1.28	48.26
平均	152	1134	0.134	1.26	41.92

が国で検出報告例が多い MCs であり、これら MCs に対して本方法は有効であると考えられた。さらに、国立環境研究所が頒布している認証標準物質「アオコ」を用いた回収実験の結果、回収率は平均で89.7%であった。認証標準物質のアオコには MC-LR, MC-RR, MC-YR 3種以外の7

表3 添加回収試験の結果

サンプル	AREA	IS	RATIO	Conc. (ng/ml)	AVERAGE (ng/ml)
環境水 (ため池)	1992.5	1261.8	1.6	13.3	13.5
	2184.5	1316.3	1.7	14.0	
	1877.7	1202.1	1.6	13.2	
環境水 + 5ng	3098.8	1410.0	2.2	18.5	18.4
	2714.6	1295.7	2.1	17.6	
	3111.5	1374.0	2.3	19.1	

表4 同族体による回収率への影響検討

MCs	設定濃度		分析結果		回収率	
	(ng/ml)	(pmol/ml)	RATIO	(pmol/ml)	(%)	(%)
MC-RR	1.25	1.21	0.142	1.12	92.6	92.6
	5.00	4.82	0.592	4.46	92.5	
	20.0	19.3	2.400	17.9	92.6	
MC-YR	1.25	1.20	0.148	1.16	96.9	96.2
	5.00	4.79	0.609	4.58	95.7	
	20.0	19.2	2.470	18.4	96.0	

表5 トータルマイクロシスチン分析結果

	A 湖	B 湖	C 湖	D 池	E 池	F 池
MCs($\mu\text{g/L}$)	<0.3	<0.3	<0.3	2.0	2.3	<0.3
Chl-a(mg/m^3)	16	3.2	20	160	63	7.7
COD(mg/L)	3.4	1.8	6.9	7.4	5.0	19

種の MCs で構成されている⁷⁾。このことから本法は種々の MCs が混在するサンプルにおいても有効であると考えられる。

最後に、環境実試料への適用を検討するために、福岡県内の湖沼、ため池の水試料について分析を行った。その測定結果を表5にそれぞれ示す。県内の大規模な湖沼からは MCs は検出されなかったが、比較的富栄養化が進み *Microcystis* 属の藍藻が観察されたため池からは MCs が検出された。また、クロマトグラムにおけるピークの形状やサロゲートの強度なども良好な結果であり、一般的な環境試料分析においても本法は有効であると考えられた。

今回検討した方法は、従来法と比較して、水試料から一回の固相抽出により簡易に T-MC を定量できる方法である。水試料から直接 MCs を簡易に定量する方法として、ELISA 法がある。ELISA 法は毒性に関与する Adda 残基を認識するモノクローナル抗体により特異的に MCs を測定できるとされている。ただし、交差反応や妨害物質の影響による誤差が指摘されている。一方、本法は ELISA 法より前処理および分析に時間は必要とするが、従来と比較して分析操作および分

析時間が短縮され、比較的精度の高い測定結果が期待できる点で有効であると考えられる。通常、MCs のモニタリングでは、その湖沼における優占種の藍藻が変化しない場合、MCs 同族体の組成が変化することはないと考えられる。よって、常に数種類には限られる個別定量法と T-MCs 定量法の両方を行う必要はなく個別定量法と本法を必要に応じて組み合わせたモニタリングが効率的であると考えられる。また、佐野らは MCs の質量分析に対して、¹⁵N で標識した MCs を開発し、個別定量法におけるサロゲート物質として使用することを提案している⁸⁾。この提案は個別定量法において信頼性を向上させるものと考えられるが、まず採取した水試料にサロゲート物質を添加することから、個別定量後の T-MC 分析には使用できなくなる。このことから本法は独立した総量分析方法として有効なものとなると考えられる。

謝辞 本研究の一部は、2012年度公益財団法人住友財団環境研究助成を受けて実施したものです。ここに記して謝意を表します。