

原著

¹⁵N標識同位体を用いた分析法によるミクロシスチン調査とアオコ抑制手法の検討

田中義人・飛石和大・藤川和浩・古閑豊和・永島聡子・熊谷博史*・佐野友春**

本報では藍藻類が生産するミクロシスチン汚染の実態調査とアオコ抑制及びミクロシスチン汚染対策を検討した。汚染の実態調査では、従来法を改善し、共同研究機関と分析手法の標準化及び精度管理を行った上、ミクロシスチン汚染の実態を明らかにした。また、ミクロシスチンを生産するアオコ対策として、簡易な過酸化水素或いはオゾン添加による手法を検討した。実験では、室内実験を基に、野外実験及び遠賀町の蟹喰池においてオニバス再生への一助となるよう検討を行った。実験の結果、過酸化水素添加による藍藻類の増殖抑制の効果が示唆された。

[キーワード：ミクロシスチン、富栄養化、過酸化水素、LC/MS/MS、¹⁵N同位体]

1 はじめに

福岡県を含む北部九州の一人当たりの水資源は全国平均と比較して少なく¹⁾、その多くをダムなどの閉鎖性水域に依存している。しかし、我が国における閉鎖性水域の水質改善は河川や海域と比較して低いまま推移しており²⁾、このため各地の湖沼では富栄養化による藍藻類の発生（アオコ）が種々の問題の原因となっている。問題の一つはアオコを形成する藍藻類の一部が生産するミクロシスチン（MCs）汚染である。MCsは肝臓毒であるとともに肝臓ガンのプロモーター活性をもつ環状ペプチド（図1）で、現在80種類以上の同族体が知られている³⁾⁴⁾。MCsによる被害例は古くから報告されており⁵⁾、多くは家畜や野生動物に対してであるが、人への健康影響を報告した例も複数ある。例えば、1995年にブラジルの病院で発生した混入事例では透析患者100人以上に被害を出した⁶⁾。また、2014年米国のオハイオ州で水道水にMCsが混入し、周辺地域の広範囲にわたって給水停止となった例などがある。WHOは飲料水中のMCsに対する暫定ガイドラインとして1.0 µg/Lを設定しており、各国ではMCs汚染の実態把握も広く行われている。しかし、我が国においては現在まで全国的な規模での実態調査例は少ない。理由の一つとして、精度の高い確立された分析法がないことがある。質量分析には一般的に安定同位体を用いた内部標準物質が利用されるが、従来のMCsの

LC/MS/MS分析には、有効な内部標準物質がなく、その精度向上には安定同位体の開発が求められていた。このため、佐野らは¹⁵Nで標識したMCsを開発した⁷⁾。そこで、本研究では国立環境研究所及び他自治体と協力して、分析方法を検討し、開発された分析手法の精度管理により妥当性を評価した。さらに、精度管理及び評価された手法を用いて、各地域のMCs濃度の実態調査を実施した。また、アオコに関する別の問題として、生態系への影響があげられる。その一つの例として福岡県遠賀町にある蟹喰池（ガニハミイケ）のオニバスへの影響がある。オニバスは遠賀町の天然記念物として町民に親しまれていたが、水質の悪化やアオコの発生による透明度の低下や外来種であるセイヨウスイレンの繁茂によって近年、観察されなくなり、福岡県の絶滅危惧種に指定されていた。このため、蟹喰池では水質改善対策やアオコ対策が求められていた。一方で現在、ひろく行われているアオコ対策はMCs汚染への影響が検討されていないものが多い。安易な対策の実施は、藍藻細胞内MCsの放出を引き起こし、水環境への汚染を拡大させることが懸念される。このため本研究では、MCs汚染を拡大させないアオコ抑制対策を検討し、蟹喰池のオニバス再生を目指した。具体的にはフリーラジカル生成によるアオコ抑制技術として過酸化水素（H₂O₂）及びオゾン（O₃）によるアオコ抑制効果を実験室レベル、屋外レベルで検証し、最終的に蟹喰池における隔離水塊での実証実験を行った。本報ではこれらについて報告する。

福岡県保健環境研究所（〒818-0135 太宰府市大字向佐野39）

*福岡県環境部環境保全課（〒812-8577 福岡市博多区東公園7-7）

**国立環境研究所環境計測研究センター環境計測化学研究室
（〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2）

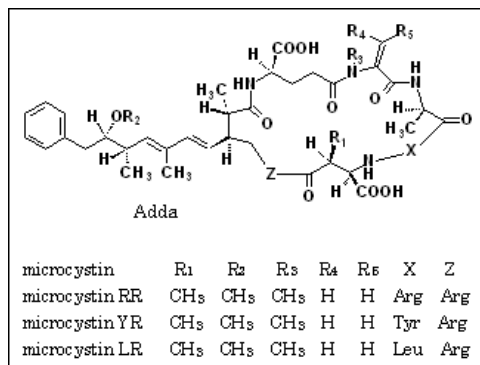


図1 ミクロシスチンの構造例

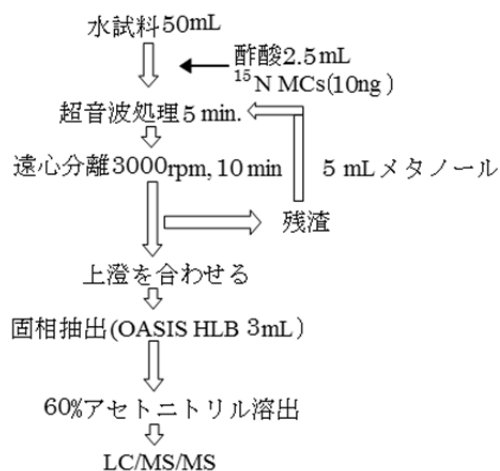


図2 分析法の概要

表1 MCs分析のLC/MS/MS条件

LC条件	機種：Waters社 Alliance2695
	カラム：Supelco製 Ascentis Express C18 2.1×100mm, 2.7μm
移動相：0.1%酢酸 + 10mM酢酸アンモニウム：メタノール	70：30→55：45→45：55→20：80→70：30
	流量：0.3mL/min.
温度：50℃，注入量：20μL	
検出器条件	機種：Water社 Quatro microAPI
	イオン化法：ESI-positive
キャピラリー電圧：0.5kV	
	Cone電圧：15～35V，ガス流量：50L/hr
イオン源温度：100℃	
	Desolvation温度：300℃，ガス流量：600L/hr

表2 MCs分析におけるモニターイオン

MC名	測定対象 (¹⁴ N-MC)	内部標準 (¹⁵ N-MC)
MC-LR	498-->135	503-->135
MC-RR	519-->135	526-->135
MC-YR	523-->135	528-->135
MC-FR	515-->135	520-->135
MC-WR	534-->135	540-->135
MC-7dmLR	491-->135	496-->135

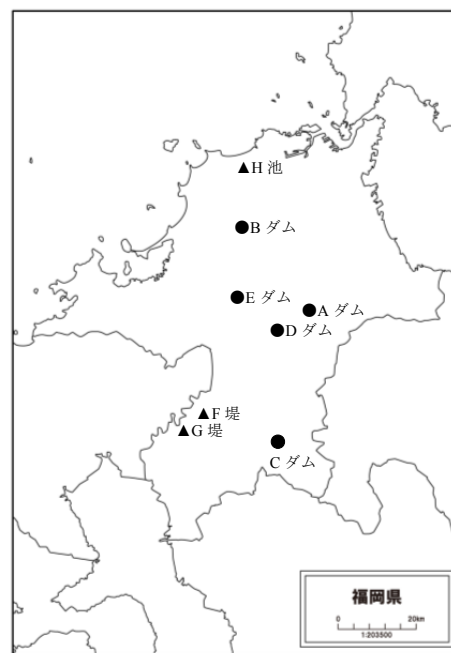


図3 福島県内における調査地点

●：大規模湖沼、▲：ため池など

2 研究方法

2・1 ¹⁵N標識MCsを用いた分析法の検討

現在までMCsには80を越える同族体が報告されている。本研究では、我が国でよく検出されるMC-RR、MC-LR、MC-YR、MC-WR、MC-FR、MC-7dmLRの6成分を分析の対象とした⁸⁾。分析方法の概要を図2に示す。水試料50 mLに酢酸2.5 mLと¹⁵Nで標識した各MCsをサロゲート物質として加え、藍藻細胞を破壊するために超音波処理を5分間、2回行った。水中に遊離したMCsをあらかじめメタノールと超純水でコンディショニングしたWaters社製OASIS HLBに、20 mL/min.で通水し、20%メタノールで洗浄後、60%アセトニトリルで溶出を行った。得られた溶液は1 mLに定容した後、LC/MS/MSによる分析に用いた。表1及び表2にLC/MS/MSの分析条件を示す。本分析方法の妥当性と各機関の分析精度を評価するために、共同研究を実施している3機関（千葉県環境研究センター、奈良県景観環境総合センター及び国立環境研究所）と室間精度管理を行った。精度管理は国立環境研究所により1.2 μg/Lに調製されたMCs含有試料を、未知試料として各機関に配布し、前述の方法に準じて分析を行った。分析結果は集計し、調製値に対する真度や精度について検討した。

2・2 MCs汚染の実態調査方法

福島県では、県内5地点の大規模な湖沼（1千万立方

メートル超)と小規模なため池3地点を対象として実態調査を行った(図3)。調査は2014年春から初秋まで各湖沼等の表層水を採取してMCs濃度を分析した。併せて、化学的酸素要求量(COD)やクロロフィルa(Chl-a)などの一般的な水質項目も測定した。また、共同研究機関がその地域にある富栄養化した池や湖沼について行ったMCsの実態調査結果と福岡県内の結果を比較し、地域性や同族体組成の相違などの検討を行った。

2・3 アオコ抑制効果の検討

H₂O₂及びO₃によるアオコ抑制効果を実験室内の単純培養系と屋外の大容量混合培養系で検討した。室内実験は無菌的に10Lの大型透明丸型瓶にMA培地⁹⁾5Lを入れ、H₂O₂濃度を2 mg/L 或いはO₃濃度を0.2 mg/L になるようにそれぞれ添加し、無菌的に培養した。H₂O₂は和光純薬工業株式会社、特級試薬(30%)を用い、O₃の添加はマルチオゾナイザ RMO-150AC-A(南北産業株式会社、O₃発生量能力:182 mg/h)にエアープンプを接続し、エアストーンを用いて曝気した。培養は23℃、12時間明暗条件下で行った。室内実験では単純培養系として、国立環境研究所から供与された藻類の標準菌株 *Microcystis aeruginosa* NIES-90(有毒)株を用いた。培養中は経時的に採水し、Chl-a及びMCs濃度を測定した。一方、屋外における大容量混合培養系実験は平成15年4月15日(最高気温の平均23.2℃)から2週間、500L槽(サミット樹脂工業株式会社、CPE-500)にMA培地を満たし、屋外開放系で培養を行った。アオコの接種液は藍藻類の増殖しているため池から採取してきた実試料を用いた。実験は、H₂O₂添加槽、O₃添加槽、H₂O₂+O₃添加槽および無処理槽に分けて実験を行った。H₂O₂処理は、1日に1回H₂O₂を2 mg/Lになるように添加し、よく攪拌した。また、O₃添加はマルチオゾナイザ RMO-150AC-Aにエアープンプで通気し、槽中で1日6時間曝気した。実験は2週間行い、期間中、Chl-a及びMCs濃度を経時的に測定した。

2・4 遠賀町蟹喰池の隔離水塊における実験

遠賀町の蟹喰池に直径約10mの半円形の隔離水塊を作製し、その内部でH₂O₂の添加によるアオコ抑制実験を行った。H₂O₂の添加は1Lタンクを装備した直径90cmのフロート上に、太陽電池セットA200(Elekit社、1.4V)を2枚とマイクロリングポンプRP-Q(株式会社アクアテック社製、最大能力0.45 mL/min.)を装着し、実施した(図4)。また、オニバスの再生のために、隔離水塊外では、オニバス種子の採取やセイヨウスイレンの除去及び池干しなどを行った。

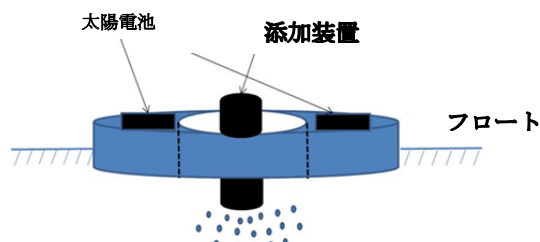


図4 H₂O₂添加装置の概要

3 結果及び考察

3・1 分析法の検討

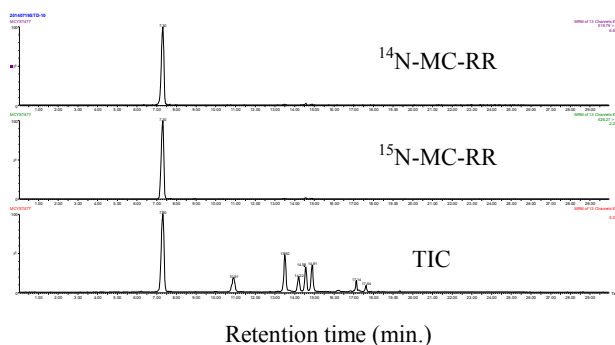


図5 MCsのクロマトグラム(MC-RR)

表3 MCs同族体の定量下限値と報告下限値

	MC-RR	MC-LR	MC-YR	MC-FR	MC-WR	MC-7dmLR
定量下限値 (ng/mL)*	1.2	3.9	8.8	12.8	25	7.9
報告下限値 (ng/mL)**	0.02	0.08	0.2	0.2	0.5	0.2

* 20 μL注入の場合 **サンプル量50 mLの場合

¹⁵N標識MCs(¹⁵N-MCs)をサロゲート物質として用いる分析手法の検討を行った。LC/MS/MS分析時のクロマトグラムを図5に示す。また、各同族体の定量下限値(S/N=10)及び報告下限値を表3に示す。各MCsの感度は、同族体によって大きな差がみられ、最も高感度なMC-RRと最も低いMC-WRとは25倍近い差がみられた。一方、¹⁴N-MCsと¹⁵N-MCsの比の内部標準法による検量線は、各同族体とも良好な結果であった。分析法の検討後、各機関と共同で分析法の妥当性評価のため精度管理を行った。各機関におけるMCs分析の精度管理の結果を表4に示す。各成分の正確さ(回収率)は98.1~104%となり良好な結果であった。一方、変動係数(RSD)についてはMC-WR以外は10%以下で良好な結果が得られた。一方、MC-WRについては同族体中でもっとも感度が低く、さらに各機関で使用した分析機器でも感度に大きな差がみられたため、RSDが若干高めになった(RSD:13.1%)。しかし、本分析方法はおおむね妥当であると考えられたことから参加機関において湖沼等に

ける MCs の実態調査を行った。

3・2 福岡県内の MCs 実態調査と各地との比較

福岡県内及び共同研究各機関の地域において湖沼水等の分析を行った。福岡県では、大規模湖沼とため池を対象に調査を行い、その概要を表5に示す。今回の調査期間中、福岡県の大規模湖沼で MCs が検出されたのは A ダムで2回(9月及び10月)、B ダムで2回(7月と9月)及びCダムの1回(8月のみ)だった。検出された MCs は MC-RR と MC-LR だったが、調査対象の大規模湖沼では藍藻類の大発生が観られなかったことから、WHO の暫定基準未満の値だった(Total-MCs として最高検出濃度 0.018 µg/L)。一方、比較的富栄養化しているため池では、初夏のアオコ発生時期(chl-a:14 µg/m³~220 µg/m³)から継続的に MCs が検出された(Total-MCs として最高検出濃度 29 µg/L)。全体的には総サンプル数 40 に対して 17 のサンプルで MCs が検出され、検出された主な MCs は MC-RR 及び MC-LR であったが、ため池では、MC-YR 及び MC-7dmLR も微量ながら検出された。他機関の調査と比較した結果を表6に示す。他機関の調査結果でも富栄養化した湖沼などでは MCs が検出されており、MCs が我が国に広く存在することが明らかになった。また、各地で検出される MCs の組成については、福岡県内では検出されない MCs が継続的に検出され、福岡県の結果と異なって地域差がみられた。MCs は同族体によって毒性も異なることが報告されている⁸⁾。今回の調査では MCs の組成に地域差があることが示唆されたため、今後、さらに MCs の実態調査を進める必要があると考えられる。

表4 分析法の精度管理結果

	分析結果(µg/L)					変動係数 (%)	正確さ (%)
	機関A	機関B	機関C	機関D	平均		
MC-RR	1.18	1.22	1.15	1.18	1.18	2.4	98.5
MC-YR	1.18	1.25	1.11	1.17	1.18	4.9	98.1
MC-LR	1.17	1.23	1.15	1.27	1.21	4.6	100.4
MC-WR	1.19	1.44	1.13	-	1.25	13.1	104.4
MC-FR	1.29	1.34	1.15	1.21	1.25	6.8	104.0
MC-7dmLR	1.17	1.16	1.2	1.18	1.18	1.5	98.1

表5 福岡県における実態調査結果概要

	地点数	検体数	検出数	検出MCs
福岡県	8	40	17	RR, LR, YR, 7dmLR
A県	1	8	8	RR, LR, YR, 7dmLR, FR
B県	3	5	5	RR, LR, YR, 7dmLR, FR, WR

表6 各県の調査結果との比較

地点名	調査月	検出月	最高濃度 (µg/L)		検出MCs
			総量	単成分	
Aダム	4月~10月	9月, 10月	0.018	0.010 (LR)	RR, LR
Bダム	4月~10月	7月, 9月	0.014	0.014 (RR)	RR, LR
Cダム	4月~10月	8月	0.002	0.002 (RR)	RR
Dダム	6月	検出せず			
Eダム	6月	検出せず			
F堤	4月~11月	5月~11月	14	7.3 (LR)	RR, LR, YR, 7dmLR
G堤	4月~10月	5月~9月	29	14 (RR)	RR, LR, YR, 7dmLR
H池	5月, 6月	検出せず			

3・3 アオコ抑制効果の検討

福岡県内でもアオコの発生とMCs汚染がみられたため、有毒藍藻類の増殖抑制及びMCs汚染への対策が求められる。このため、アオコ抑制技術の検討とMCs汚染への影響を検討した。抑制技術としてH₂O₂添加とO₃添加の効果を検討した。まず、H₂O₂とO₃の添加濃度を変化させ効果がみられる濃度設定のための実験を行い、その結果、H₂O₂濃度が2 mg/L以上、O₃濃度が0.2 mg/L以上あればアオコの増殖の抑制効果がみられた。室内実験でH₂O₂添加(2 mg/L)によるアオコ抑制効果を検討した結果を図6に示す。培養期間中、H₂O₂添加していない対照群のChl-a濃度は経時的に増加したが、H₂O₂添加群のChl-a濃度の上昇はみられなかった。この時、対照群のMCs濃度はChl-a濃度と共に上昇したが、H₂O₂添加群では藍藻類の増殖がみられなかったためMCsの上昇はみられなかった。次に、屋外において500 Lの大型タンクを用いた実験を行った。実験はO₃単独添加、H₂O₂単独添加、H₂O₂+O₃添加および無処理槽に分けて行った。まず、H₂O₂単独添加実験において、H₂O₂濃度は2 mg/L程度で屋外の野生株についてもアオコ抑制効果が確認できた。次に、O₃単独添加、H₂O₂+O₃添加および無処理槽におけるアオコ抑制実験を行った。その結果を図7に示す。O₃単独添加によるアオコ抑制効果は室内実験では確認されていたが、屋外の野生

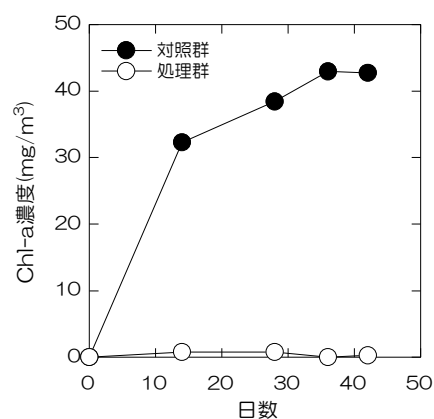


図6 過酸化水素添加によるアオコ抑制効果

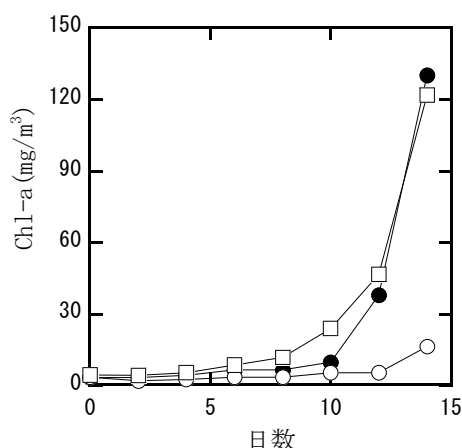


図7 屋外実験におけるアオコ抑制効果
●: オゾン添加処理、○: オゾン+過酸化水素添加処理、
□: 無処理

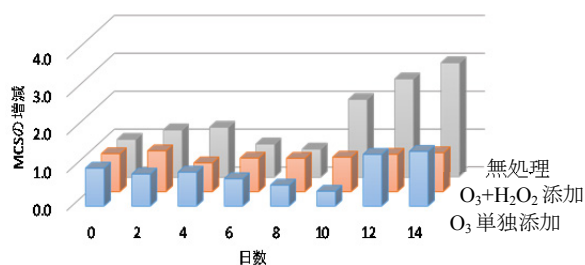


図8 屋外実験における MCs 抑制効果
MCs の増減は MCs の初期濃度に対する増減とした

株では、アオコ抑制効果が観られなかった。この原因として、室内実験では藍藻標準株を用いたのに対して、屋外実験で用いた藍藻は天然に生育する野生株を用いたためと思われる。標準株は無菌保存のため藍藻細胞を一つ一つ分散して単離されたものである。一方、野生株は細胞が寒天質に包まれた群体を形成しており O₃ が藍藻細胞に効率的に到達できなかったためと考えられた。一方、H₂O₂ + O₃ 添加は H₂O₂ 単独添加実験と同様アオコ抑制効果 (Chl-a の抑制) が観られた。また、実験期間中の MCs の経時変化を図8に示す。H₂O₂ + O₃ 添加では無添加槽及び O₃ 単独添加槽より MCs の濃度が低く抑えられている結果となった。1µg/L の MCs が、0.2mg/L のオゾンで分解することを確認しており、H₂O₂ + O₃ 添加では、アオコの抑制が抑えられたことに加え、藍藻細胞から遊離した MCs が O₃ によって分解されたことを示唆していると考えられる。

3・4 遠賀町蟹喰池の隔離水塊におけるアオコ抑制実験

平成25年5月から9月まで、隔離水塊内に H₂O₂ を添加するフロートを設置して水塊内外の藍藻類繁殖の比較実験を行った。その結果を図9に示す。フロートを設置した5

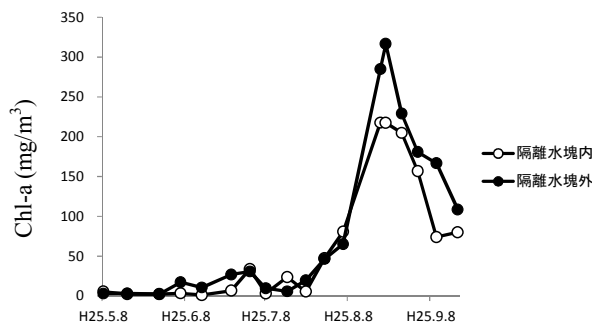


図9 蟹喰池の隔離水塊内外におけるアオコ抑制効果

月から7月の中旬までは隔離水塊の内外でアオコの発生はみられなかったが、8月に入るとアオコの発生による Chl-a の上昇がみられた。このとき、フロートを設置している隔離水塊の内と外で Chl-a の濃度差がみられ、藍藻類の増殖抑制効果がみられた。添加した H₂O₂ のオニバスへの影響が考えられたために、隔離水塊外で発芽したオニバスの芽を隔離水塊内に移植し成長を確認した。その結果、オニバスの新芽に H₂O₂ の影響はみられなかった。また、その他の水生生物への影響も考えられたために隔離水塊内の底生生物の調査を実験の前後で実施したが、捕獲された水生生物種の数や個体数への影響は見られなかった。このことから、H₂O₂ の添加によるアオコ抑制は、その水域の水生生物や植物に影響の少ない手法であると考えられる。一方、隔離水塊外におけるオニバスの成長はセイヨウスイレンの除去や池干し等の水質管理によって、前年度に比較して良好になった。今後は、さらに適正な池の水質管理に加え、アオコ発生時に H₂O₂ 添加フロートなどを活用したオニバスの再生が必要であると考えられる。

4 まとめ

本研究では MCs 汚染の実態調査とアオコ抑制及び MCs 汚染対策を検討した。汚染の実態調査では、従来の分析手法を改善し、共同研究機関と分析手法の標準化及び精度管理を行った上、MCs 汚染の実態を明らかにした。また、MCs を生産するアオコ対策として、簡易な H₂O₂ 添加による手法を検討した。実験では、室内実験を基に、野外実験及び遠賀町の蟹喰池においてオニバス再生への一助となるよう検討した。実験の結果、H₂O₂ 添加による藍藻類の増殖抑制と O₃ による MCs の分解などの効果が示唆された。今後は、アオコが発生している個別の湖沼、ため池などでの活用を検討しなければならない。一方、課題として H₂O₂ 添加で長期間、藍藻類の増殖は抑制できるもののアオミドロなど他の植物プランクトンの成長は抑

制できないことも今回の研究で明らかになった。本来、閉鎖性水域の水質改善には流入負荷量の削減や底質の改善など根本的な対策が望まれるが、本研究で検討した手法は応急処置的な対策としては有効ではないかと考えられた。

謝辞

本研究の一部は平成25年度(財)住友財団環境研究助成及び国立環境研究所II型共同研究により行った。ここに、謝意を表する。

文献

1) 国土交通省、日本の水資源（平成 26 年版）、56-62

2) 環境省、平成 26 年版環境・循環型社会・生物多様性白書、274-277

3) W. W. Carmichael *et.al.* : *J. Appl. Bact.*, 72, 445-459, 1992.

4) R. Nishiwaki-Matsushima *et. al.* : *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 118, 420-424, 1992.

5) E. J. McBarron *et. al.* : *Aust. Vet. J.*, 51, 587, 1975.

6) E. M. Jochimsen *et. al.* : *New Eng. J. Med.*, 338(13), 873-878, 1998.

7) T. Sano *et. al.* : *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(7), 2511-2516,

8) 渡辺真利代ら：アオコ-その出現と毒素、東京大学出版、1994

9) 国立環境研究所 微生物系統保存施設 培地リスト (<http://mcc.nies.go.jp/>)

(英文要旨)

Analysis of ^{15}N labeled microcystins from lakes in Fukuoka Prefecture

Yoshito TANAKA, Kazuhiro TOBIISHI, Kazuhiro FUJIKAWA, Toyokazu KOGA, Satoko NAGASHIMA, Hiroshi KUMAGAI*, Tomoharu SANO**

*Fukuoka Institute of Health and Environmental Sciences,
Mukaizano 39, Dazaifu, Fukuoka 818-0135, Japan*

**Environmental Affairs Division, Fukuoka Prefecture,
Higashikoen 7-7, Hakata-ku, Fukuoka 812-8577*

***National Institute for Environmental Studies,
Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaragi 305-8506*

Three aspects of toxic cyanobacterial microcystins were studied in Fukuoka Prefecture. First, we determined the accuracy of an improved analysis method using liquid chromatography coupled with tandem mass-spectrometry on ^{15}N labeled microcystins. Second, we investigated microcystins in lakes and ponds within Fukuoka Prefecture, using this new analysis method. Finally, we used our measurements to evaluate toxic water blooms. To evaluate our new analysis method, microcystins were analyzed by four different laboratories. Using our verified technique we carried out a survey of microcystins in Fukuoka Prefecture. Microcystins were detected in most lakes and ponds from May to October, especially in eutrophic ponds. Specifically, we detected microcystin-LR, microcystin-RR, and microcystin-YR in Fukuoka Prefecture. Collaborative institutes also reported that microcystin-FR and microcystin-WR were present in this area. Microcystin variants have different toxicity. Therefore, it is necessary to determine the distribution of each microcystin variant. Because toxic microcystins were detected in Fukuoka Prefecture, a measure of their toxicity was required. Growth of cyanobacteria under addition of hydrogen peroxide and ozone also was studied as a remediation technique. We found that addition of hydrogen peroxide inhibited growth of cyanobacteria, reducing microcystin production.

[Key words : microcystin, LC/MS/MS, ^{15}N -labeled, hydrogen peroxide, Lake, eutrophication]