

精密質量分析による藻類由来有機物の検知に関する検討

研究代表者	秋葉	道宏
研究分担者	越後	信哉

厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)
気候変動に伴う水道システムの生物障害等リスク評価とその適応性の強化 に向けた研究
分担研究報告書

研究課題： 精密質量分析による藻類由来有機物の検知に関する検討

研究代表者 秋葉 道宏 国立保健医療科学院 生活環境研究部 特任研究官

研究分担者 越後 信哉 京都大学大学院 地球環境学堂 教授

研究要旨

水道原水中の藻類の増殖等，原水水質の異常やその兆候を検知する技術が求められている。培養した *Microcystis aeruginosa Lemmermann* (NIES-87 および NIES-2604 株) に由来する有機物の検知を精密質量スペクトルの差異解析により試みた。その結果，固相抽出による試料濃縮を用いれば，環境水中でも藻類増殖に由来する有機物を分別可能であることを示した。今回の調査では，藻類が異常増殖した際の藻類細胞密度に対応する範囲での検知であったが，ろ過濃縮等を組み合わせれば，より低濃度でも検知可能であると考えられた。

A. 研究目的

水道原水中の藻類の増殖等，原水水質の異常やその兆候を検知する技術が求められている。本研究では，特に精密質量分析により，迅速な原水水質の変動の検知を目指している。

今年度は，藻類増殖時の溶存有機物の変化の精密質量分析を用いた検知を目的に，培養した藻類に由来する溶存有機物の検知感度についての基礎的検討を行った。

B. 研究方法

1. 藻類の培養

国立環境研究所より分譲された二種類の藻類 (*Microcystis aeruginosa Lemmermann* (NIES-87) 及び *Microcystis aeruginosa Lemmermann* (NIES-2604)，以下それぞれ NIES-87, NIES-2604 とする) を M-11 培地を用いて培養した。M-11 培地の構成成分と濃度は以下の通りである：NaNO₃, 10 mg/100 mL；K₂HPO₄, 1 mg/100 mL；MgSO₄・7H₂O, 7.5 mg/100 mL；CaCl₂・2H₂O, 4 mg/100 mL；Na₂CO₃, 3 mg/100 mL；FeSO₄・7H₂O, 0.1 mg/100 mL；有機物の添加，なし。

また，培養に際しては，2000 lux で 12 時間ごとに明暗サイクルを繰り返した。温度は 20±1 °C に制御して培養を行った。培養の後の NIES-87 と NIES-2604 の細胞数はそれぞれ 1.6×10⁸ および，1.3×10⁹ cell/mL となった。

なお，試薬は特に断りのない場合には，富士フィルム和光純薬製の特級試薬を用いた。また，水溶液の調製や希釈等に，Millipore 社 Milli-Q Academic A1 で精製した超純水(以下 MQW)を用いた。

2. 分析に用いた試料と解析法

琵琶湖南湖水を用いて NIES-87 および NIES-2604 培養液(ろ過後)それぞれを，バックグラウンドである湖水の TOC およびそれぞれの藻類由来の TOC の合計値が 3.0 mgC/L となるように希

釈を行った(数倍程度，以下ではこの希釈倍率は考慮しない)。試料の容量は 1 L とした。この後，3. で述べる固相抽出法により通水倍率 100 倍で濃縮した。これらの試料について，精密質量分析を行い，対象試料との比較を行った。また，検出下限値の検討のために，上記の TOC が 3.0 mgC/L となるように希釈を行ったサンプルを琵琶湖湖水で 10 倍，100 倍に希釈を行いそれらに関しても同様に精密質量分析を行いボルケーノプロットを用いてブランクサンプルとの比較を行った。また，これらの 3 段階の濃度の試料を以下では模擬藻類異常発生試料と表記する。培養後のマイクロシステイスのそれぞれの細胞密度は NIES-87 および NIES-2604 の細胞数はそれぞれ 1.6×10⁸ cell/mL と 1.3×10⁹ cell/mL であるので模擬藻類異常発生試料における基準となる細胞数は NIES-87 では 2.7×10⁷ cell/mL, 2.7×10⁶ cell/mL, 2.7×10⁵ cell/mL の 3 段階となり，NIES-2604 では 2.3×10⁸ cell/mL, 2.3×10⁷ cell/mL, 2.3×10⁶ cell/mL の 3 段階となる。また，実際の環境中で見られる *Microcystis aeruginosa Lemmermann* の濃度について，南條ら¹⁾は藻類の異常増殖が問題となっている鳥取県・小山湖における細胞濃度を 1986 年から 1995 年の間毎月調査した。それによると，小山湖におけるマイクロシステイスの細胞濃度はほぼ毎年 1.0×10⁵ から 1.0×10⁶ cell/mL となっている。このことから模擬藻類異常発生試料の濃度レンジは，実際の環境水中で藻類の異常増殖が発生した場合の濃度レンジと概ね同等と考えられる。またこの実験の流れを図 1 に示す。

なお，この実験においては培地成分の影響は厳密には考慮しなかった。これは，M-11 培地には有機物が含まれず，直接質量スペクトルに影響がないと考えたためである。ただし，一定濃度のイオ

ン性物質を含む培地であり、後述のように分離カラムによる無機成分の分離をおこなっていないことからイオン化効率等に間接的に影響した可能性は排除できない。この点については今後の検討課題としたい。

3. 試料の前処理

精密質量測定の前に、試料の濃縮を行った。濃縮には昨年度の研究でも用いた、溶存有機物の濃縮のための固相抽出のカートリッジとして一般的に用いられている逆相系のカートリッジである Bond Elut PPL カートリッジ (500 mg, 3 mL; Agilent Technologies, 以下, PPL カートリッジ) を用いた。PPL カートリッジは溶存有機物の回収率が高いことが報告されており²⁾、極性物質と非極性物質の両方の保持を期待できるとされる³⁾。具体的な固相抽出の作業手順は以下の通りである。まず 10 mL のメタノールを約 1 mL/min で通液し、その後 0.01 M HCl 20 mL を約 1 mL/min で通液し固相のコンディショニングを行った。次に HCl を用いてサンプルを pH 2 に調製し、コンセントレーターを用いてこの試料 1.0 L を流量 20 mL/min で通液した。その後カートリッジの内部を洗浄するために 20 mL の 0.01 M HCl を約 1 mL/min で通液し、カートリッジに保持された溶存有機物を脱離するために、10 mL のメタノールを約 1 mL/min で通液した。これらの操作の結果、サンプル中の溶存有機物が濃縮した状態で回収される。この試料そのまま以降の分析に供した。

4. 精密質量分析とデータ解析

調製した藻類異常増殖試料の精密質量分析には Orbitrap 質量分析計 (Q Exactive, Thermo Fisher Scientific) を使用した。イオン化法はエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) のネガティブモードを用いて行った。原則として昨年度までの研究成果を踏まえ、同一の条件で分析を行った。サンプルの注入には付属の HPLC のポンプとオートサンプラーを用い、システム内に MQW とメタノールがそれぞれ 50% となるように 200 μ L/min にて送液している状態で 10 μ L 注入した。ただしカラムを用いた試料の分離は行わず、ランタイム (一回の分析時間) は 5 分とした。また分解能は 70,000 に設定、スキャン範囲を $m/z = 100-1500$ に設定して測定を行った。キャリブレーションは分析の直前に測定日ごとに行った。イオン化条件については、スプレー電圧を 4.5 kV、キャピラリー温度を 400 $^{\circ}$ C と設定した。分析条件を表 1 にまとめる。

上記の条件において精密質量分析を行うことで得られた精密質量スペクトルから得られた結果を用いて、差異解析を行った。解析ソフトウェアには Compound Discoverer 3.1.0.305 (Thermo Fisher Scientific) を使用した。解析手法にはワークフローのうち、メタボロミクスを使用し、MS スペクトルのピーク強度が 500,000 を超えるものについて検出を行った。その他パラメーターは Compound Discoverer のデフォルト値を用いた。

なお、具体的な解析および結果の可視化には、ボルケーノプロットを用いた。ボルケーノプロッ

トとは群間 (試料とブランク) 比 (fold change) と p 値 (有意水準の指標) の散布図であり、横軸が検出された物質の濃度の比を表し、縦軸が有意水準を表す。本研究においては群間比が 2 倍以上かつ p 値が 0.05 以下の物質について検出されたと判断した。

C. および D. 研究結果及び考察

NIES-87 と NIES-2604 の試料について、図 2~7 に示すように、希釈段階を問わず藻類を添加したサンプルから多くの物質が検出された。特に 1 倍 (つまり無希釈) である模擬藻類異常発生試料の分析結果においては、藻類を添付した模擬藻類異常発生試料特有の検出物質が群間比 2 倍以上を検出のしきい値とした場合、NIES-87 においては 165 物質、NIES-2604 においては 110 物質検出されており、十分に検出可能であるといえる (表 2)。また、100 倍で希釈を行った模擬藻類異常発生試料の分析結果としては、群間比が 2 倍以上を基準とした場合で NIES-87 においては 72 物質、NIES-2604 においては 35 物質検出されておりこちらも藻類由来溶存有機物を十分に捉えることが可能であったといえる。また、この 100 倍で希釈を行った模擬藻類異常発生試料は先に述べたように環境水中において藻類の異常増殖が発生した場合と同程度の細胞密度を有していることから、実際の環境水中でも同様の分析手法を用いて溶存有機物の動向を検知できる可能性を示したといえる。

一方で、この 100 倍に希釈を行った模擬藻類異常発生試料で検出された物質群の群間比の範囲は昨年度までに報告した通常環境水の季節変動において検出された物質群の群間比の範囲と類似しており、環境水の状態によっては検出された物質が藻類由来であるのか、季節変動由来であるのかの判断が難しい可能性がある。本実験においては培養した藻類の細胞数に限度があったことがあり、高濃度の濃縮を行うことが難しかったが、実際の環境水においてはさらに高濃度の濃縮が可能である。また、さらにろ過濃縮との併用や、細胞の破碎など、試料前処理工程において、バックグラウンドに対して藻類細胞由来の有機物の濃度を高くすることは可能と考えられる。また、今回はピーク強度 500,000 をしきい値としたが、この値の最適化も高感度化に効果があると考えられる。さらに、分離カラムおよびイオン化促進剤の添加も検討されるべきである。今後はこれらの検討結果を踏まえた上で、各藻類に特徴的な質量数 (分子の指紋のようなもの) が存在するか検討を進める必要がある。

E. 結論

精密質量スペクトルの差異解析に基づき、藻類の異常増殖の検知の可能性について検討した。その結果、試料濃縮を用いれば、環境水中でも藻類増殖に由来する有機物を分別可能であることを示した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

- 1.論文発表
該当なし
- 2.学会発表
該当なし

H.知的財産権の出願・登録状況（予定も含む。）

- 1.特許取得
該当なし
- 2.実用新案登録
該当なし
- 3.その他
該当なし

I. 参考文献

- 1) 南條吉之, 福田明彦, 矢木修身, 細井由彦. (1998) 汽水湖沼におけるアオコおよび赤潮発生の制御に関する基礎的研究, 水環境学会誌, 21(8), 530-535.
- 2) Dittmar, T., Koch, B., Hertkorn, N. and Kattner, G.(2008) A simple and efficient method for the solid-phase extraction of dissolved organic matter (SPE-DOM) from seawater, Limnology and Oceanography: Methods, 6(6), 230–235.
- 3) Chen, M., Kim, S., Park, J.-E., Kim, H. S. and Hur, J. (2016) Effects of dissolved organic matter (DOM) sources and nature of solid extraction sorbent on recoverable DOM composition: Implication into potential lability of different compound groups, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 408, 17, 4809–4819.

表 1 精密質量分析条件

LC 部	機種	UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific)
	移動相	A液：メタノール,B液：水(それぞれ50%)
	注入量(μL)	10
	流量(μL/min)	200
	分離カラム	なし
MS部	機種	Q Exactive (Thermo Fisher Scientific)
	スキャンタイプ	Full MS
	ランタイム(min)	5
	イオン化法	ESI ⁻
	スキャン範囲	100-1500
	解像度	70000
	AGCターゲット	3×10 ⁶
	最大注入時間(ms)	100
	シースガス流量(L/min)	45
	Auxガス流量(L/min)	10
	スweepガス流量(L/min)	2
	スプレー電圧 (kV)	4.5
	キャピラリー温度(°C)	400
	S-レンズRFレベル	50
Auxガスヒーター温度(°C)	400	

表 2 各株および細胞密度における検出物質数

株	細胞密度	Log2 Fold Change			
		< -1	> 1	< -2.3	> 2.3
NIES-87	2.7×10 ⁷	32	165	14	66
	2.7×10 ⁶	5	100	1	51
	2.7×10 ⁵	5	72	3	29
NIES-2604	2.3×10 ⁸	20	110	6	79
	2.3×10 ⁷	21	94	12	63
	2.3×10 ⁶	5	35	3	17

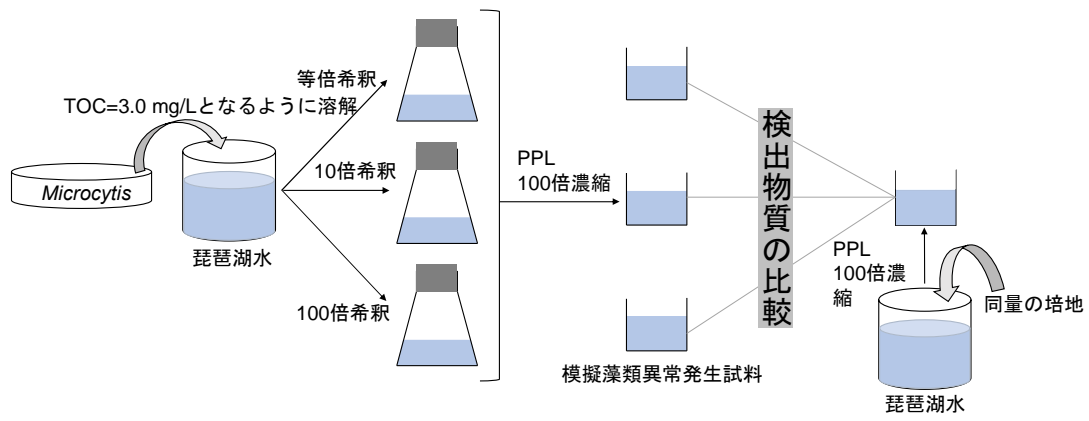


図1 精密質量分析条件

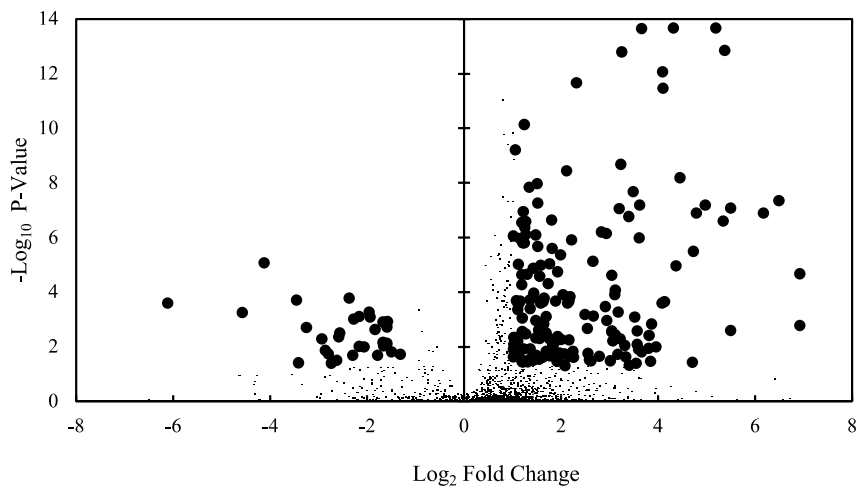


図2 *Microcystis aeruginosa* Lemmermann NIES-87 を 2.7×10^7 cell/mL 由来の有機物を添加した琵琶湖湖水とブランクサンプルでの検出物質の比較

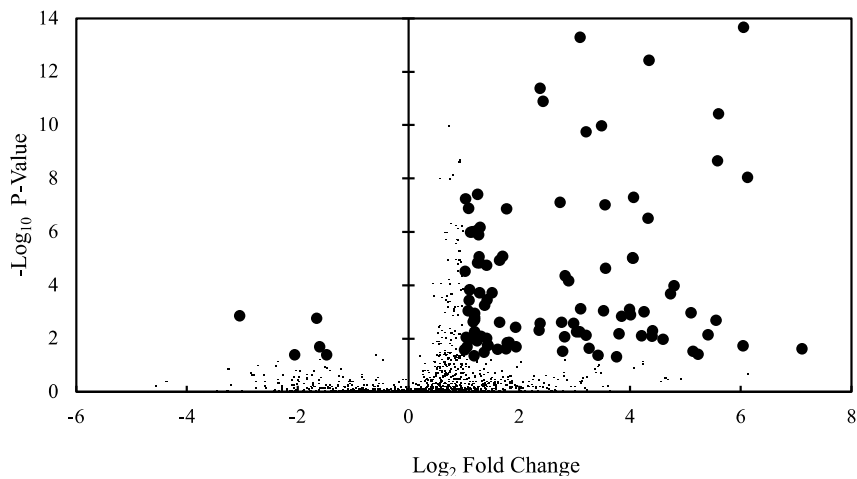


図3 *Microcystis aeruginosa* Lemmermann NIES-87 を 2.7×10^6 cell/mL 由来の有機物を添加した琵琶湖湖水とブランクサンプルでの検出物質の比較

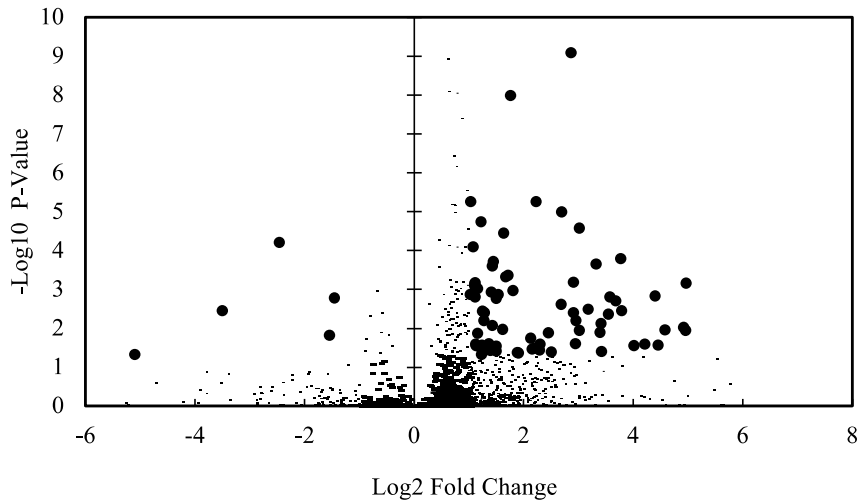


図4 *Microcystis aeruginosa* Lemmermann NIES-87 を 2.7×10^5 cell/mL 由来の有機物を添加した琵琶湖湖水とブランクサンプルでの検出物質の比較

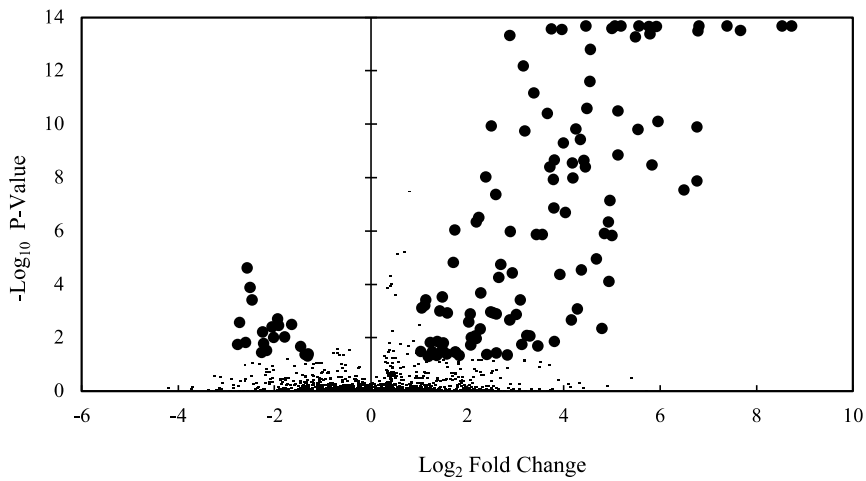


図5 *Microcystis aeruginosa* Lemmermann NIES-2604 を 2.3×10^8 cell/mL 由来の有機物を添加した琵琶湖湖水とブランクサンプルでの検出物質の比較