

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端緒（低濃度での存在）を検知する技術が求められている。本研究では、実際の水源で増殖したラフィド藻を対象に、ラフィド藻に由来する有機物の精密質量分析による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、イオン化法に APCI を用いれば、環境水中でも 90 cells/mL 程度の藻類増殖に由来する有機物を分別可能な感度を達成できることを示した。今回の調査では、藻類がやや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、顕微鏡観察が困難なより低濃度でも検知可能性を示したといえる。

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端緒（低濃度での存在）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、実際の水源で増殖した藻類に由来する溶存有機物の検知感度について検討を行った。今回対象とした藻類はラフィド藻類である。ラフィド藻類は、海水¹⁾および淡水²⁾に生息し、赤潮³⁾の原因となることが知られている。また、一部の淡水ラフィド藻(例えば *Gonyostomum semen*)は、ヒトの皮膚に炎症を引き起こすとされる³⁾。さらに、近年ではラフィド藻類に由来する有機物が、琵琶湖等国内の水道水源で増殖し、塩素と反応することで、消毒副生成物濃度や生成能が増大する現象が知られるようになった⁴⁾。このラフィド藻由来の有機物は、比較的高分子量かつ親水性の糖フェノールのようなものと考えられている⁵⁾がその化学構造は完全には理解されていない。本研究では、このように特徴的な有機物を構成要素に含む藻類の早期検知を目標に、精密質量分析による高感度検知の可能性について、実際に国内の水源で増殖したラフィド藻を用いて、実験的検討を行った。

B. 研究方法

1. 試料と試薬

淀川水系木津川の支流名張川の支川である宇陀川に位置する室生ダムで採水を行った。このダムの水は奈良県水道局の水源の一つとして利用されている。採水は 2022 年 10 月と 2023 年 10 月に行った。2022 年 10 月採水の試料は、ラフィド藻の増殖が見られないときに採水したものであり、2023 年 10 月に採水した試料はラフィド藻(メロトリキア属の一種)が 9,000 cells/mL 程度増殖していたときのものである。以降前者を対照

試料、後者をラフィド藻試料とする。試料はガラス繊維ろ紙 (GF/F, 0.7 μ m, Whatman) でろ過したのち、そのまま、あるいは希釈して以降の実験に使用した。対象試料とラフィド藻試料の水質を表 1 にまとめる。DCAAFP および TCAAFP はそれぞれ、ジクロロ酢酸生成能、トリクロロ酢酸生成能を意味し、ハロ酢酸生成能について両試料で大きな差があることがわかる(すなわち、TOC の比よりも各ハロ酢酸の比率のほうが大きい)(注: ラフィド藻は走光性を示し、増殖時には水面付近で極端に濃度が高くなることから、室生ダムでは、水深が深い位置から取水を行うことでできる限り浄水場に到達する原水にラフィド藻やそれに由来する有機物が含まれないように工夫している)。なお、これらの生成能の測定においては、試料を 10 倍に希釈したうえで、30 mg/L の次亜塩素酸ナトリウムを添加し、1 日後に塩化アンモニウムで反応を停止した後に、LC-MSMS にてそれぞれのハロ酢酸濃度を測定した。表示されている値は、希釈倍率を考慮したものである(すなわち 1/10 で割り戻している)。

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・解析法

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。イオン化法は大気圧化学イオン化法 (APCI) のネガティブ・ポジティブモードを用いて行った。エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) が通常使用されるが、ラフィド藻類培養液を ESI 法で測定したところ、ほぼピークが検出されなかったため、本研究ではより強力なイオン化法である APCI 法を採用した。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 5 mM 酢酸水溶液とアセトニトリルがそれぞれ 50%

となるように 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ にて送液している状態で 10 μL 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 $m/z = 133\text{--}2000$ 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、キャピラリー温度を 300 $^{\circ}\text{C}$ 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 10,000 を超えるものについて検出を行った（昨年度のしきい値よりも小さい値を用いている点に注意のこと）。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

無希釈、10 倍希釈、100 倍希釈試料（注：対照試料も同倍率で希釈していることに注意）について、対照試料とラフィド藻試料を APCI ネガティブモードで比較した結果を図 1~3 にそれぞれ示す。また、同様に APCI ポジティブモードで測定・比較した結果を図 4~6 に示す。

まず、ネガティブモードの結果であるが、どのケースについても ESI によるイオン化を試みた場合とは異なり、対照試料にはなくて、ラフィド藻試料にある質量数（ピーク）が検出された。ラフィド藻由来の有機物には糖やフェノール性物質のように、ESI によるよりソフトなイオン化法ではイオン化されにくい物質が多く含まれており⁵⁾、またこれら物質の多くは比較的高分子量であるため、ESI では低分子のイオンや多価イオンが生成しなかったが、APCI ではある程度検出可能なイオンのフラグメントが生成したものと考えて矛盾はない。以上の結果は、藻類由来の溶存有機物の検知に APCI モードによる分析の有効性を示すものである。なお、通常の検知のしきい値よりも低い値を用いることの有効性にも注意された。

以下、より具体的に実験結果を比較する。まずネガティブモードの結果（図 1~3）であるが、無希釈から希釈倍率が高くなるに従って、ラフィド藻試料のほうが有意に高い（強度で 2 倍以上、 $p < 5$ ）、ピークの数、数 10、10 程度、数個と、大まかにではあるが、反比例傾向にあった。この傾向は、濃度が低くなれば検出される物質数が減少することを意味するものであり、妥当と考えられた。

また、100 倍希釈の試料は 90 cells/mL に対応する。夾雑物質の影響を詳細に評価する必要はあるが、例えば 100 倍程度のろ過濃縮を組み合わせることにより、0.9 cells/mL、といった低濃度のラフィド藻に由来する有機物を検知できる可能性を示唆する結果であり、精密質量分析が高濃度に増殖する前の藻類の存在検知に利用できる実用的な感度がある可能性を示したことになる。

次に図 4~6 の結果について述べる。無希釈、10 倍希釈、100 倍希釈を比較すると検出されたピーク（質量数）の数は大きく変わらなかったが、検出されるシグナル強度は希釈倍率とともに現象しており、ある程度の濃度依存性が確認できた。ネガティブモードよりも希釈倍率が高い場合、検出されるピークが多いが、対照試料に対する倍率のレンジは同等であり、ポジティブモードとネガティブモードの感度はそれほど大きく変わらないものと考えられた。

上記の結果を踏まえ、今後の実用化に向けた課題を示す。まず、各ピーク（質量数）の帰属の確認、すなわち今回の例でいえば他の藻類ではなくラフィド藻に特有であることの確認を行い、指標ピーク（質量数）を絞り込み、スキャン範囲を絞ることで分析感度の向上を試みる必要がある。また、このような質量分析上の工夫と試料前処理（ろ過濃縮等）との組み合わせにより、増殖前の存在実態を検知できる手法を構築する必要がある。

E. 結論

精密質量スペクトルの差異解析に基づき、ラフィド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、イオン化法に APCI 用いることで、無濃縮であっても、藻類増殖に由来する有機物を検知可能であることを示した。また、試料前処理を組み合わせれば、低濃度の藻類の存在を検知できる可能性を示した。

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) Jeong, H. J. (2011). Mixotrophy in red tide algae raphidophytes 1. J. Eukaryot. Microbiol, 58(3), 215-222.
- 2) Figueroa, R. I. and Rengefors, K. (2006). Life Cycle and Sexuality of the Freshwater Raphidophyte Gonyostomum Semen (RAPHIDOPHYCEAE) 1. J. Phycol., 42(4), 859-871.
- 3) Hagman, C. H. C., Ballot, A., Hjermann, D. Ø., Skjelbred, B., Brettum, P., and Ptacnik, R. (2015). The occurrence and spread of Gonyostomum semen (Ehr.)

- Diesing (Raphidophyceae) in Norwegian lakes. Hydrobiologia, 744, 1-14.
- 4) 横井貴大, 荻野賢治, 細田耕, 船岡英彰, 小倉明生. (2021). ラフィド藻類の塩素処理による給水トリクロロ酢酸濃度の上昇及びその原因調査. 水道協会雑誌, 90(1), 13-20.
 - 5) Tada, Y., Kosaka, K., Echigo, S., and Itoh, S. (2023). High formation of trichloroacetic acid from high molecular weight and ultra-hydrophilic components in freshwater raphidophytes upon chlorination. Sci. Total Environ., 879, 163000.

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
	2.3×10 ⁸	20	110	6	79
NIES-2604	2.3×10 ⁷	21	94	12	63
	2.3×10 ⁶	5	35	3	17

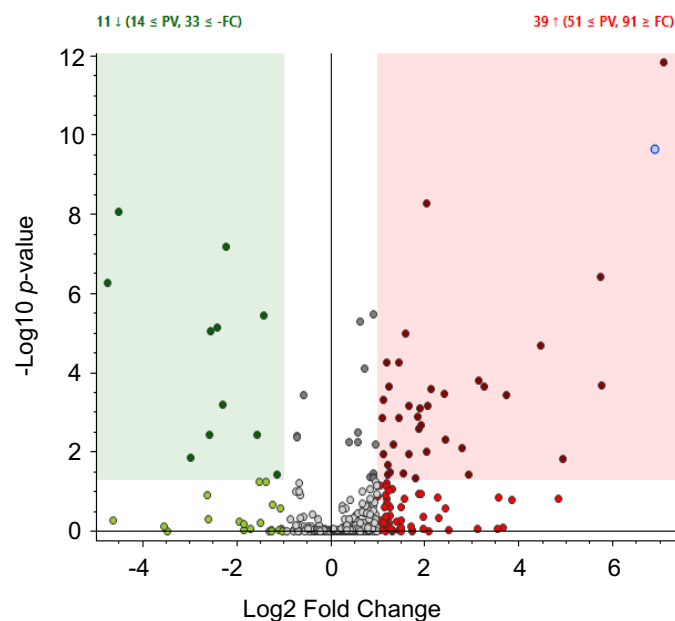


図1 室生ダム水の通常時（2022 年 10 月）とラフィド藻類増殖時（2023 年 10 月）での検出物質の比較（試料の希釈なし、ネガティブモードでの測定）

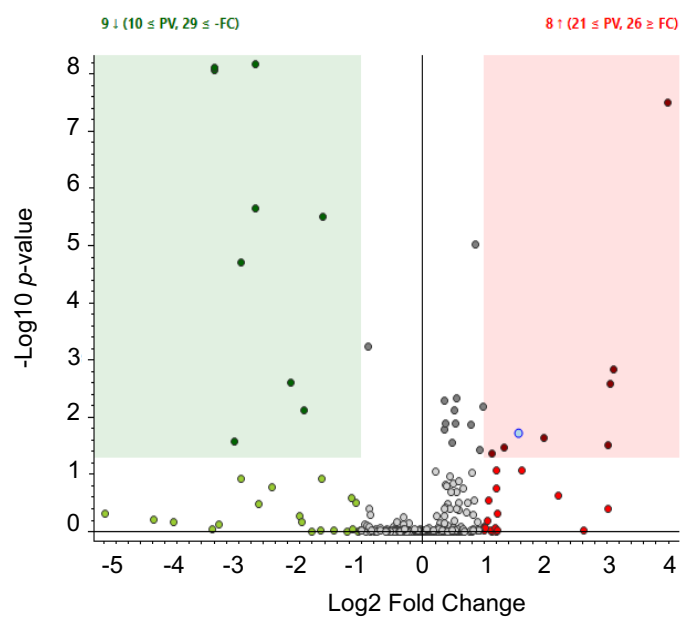


図2 室生ダム水の通常時（2022 年 10 月）とラフィド藻類増殖時（2023 年 10 月）での検出物質の比較（超純水で 10 倍希釈後に測定、ネガティブモードでの測定）

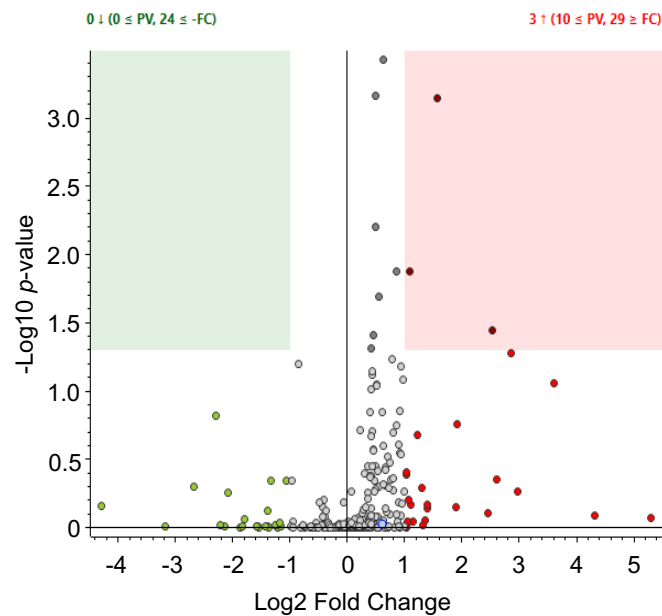


図3 室生ダム水の通常時（2022 年 10 月）とラフィド藻類増殖時（2023 年 10 月）での検出物質の比較
（超純水で 100 倍希釈後に測定、ネガティブモードでの測定）

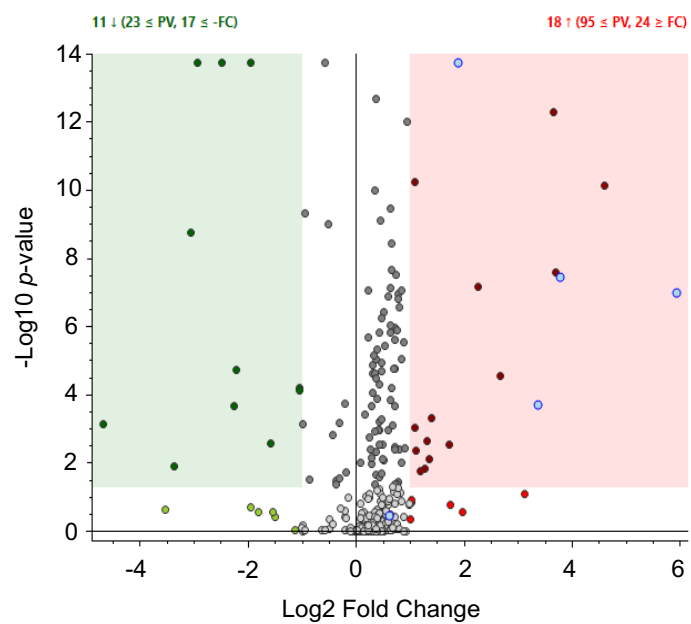


図4 室生ダム水の通常時（2022 年 10 月）とラフィド藻類増殖時（2023 年 10 月）での検出物質の比較
（試料の希釈なし、ポジティブモードでの測定）

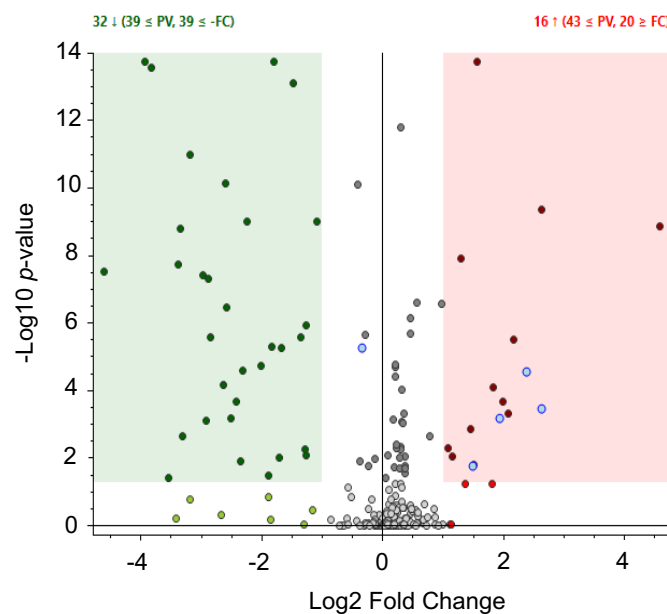


図5 室生ダム水の通常時（2022年10月）とラフィド藻類増殖時（2023年10月）での検出物質の比較（超純水で10倍希釈後に測定、ポジティブモードでの測定）

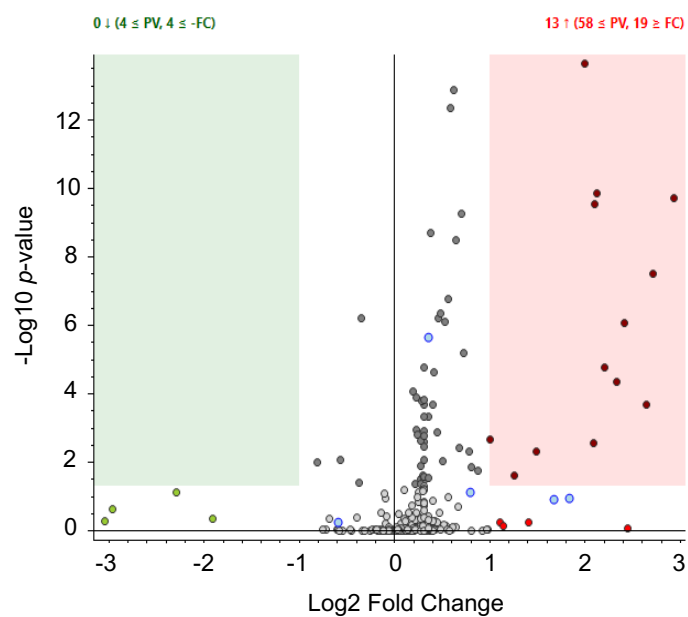


図6 室生ダム水の通常時（2022年10月）とラフィド藻類増殖時（2023年10月）での検出物質の比較（超純水で100倍希釈後に測定、ポジティブモードでの測定）