



環境儀

NO.52 APRIL 2014

国立環境研究所の研究情報誌

アオコの 有毒物質を探る

構造解析と分析法の開発



独立行政法人

国立環境研究所

<http://www.nies.go.jp/>

アオコが作る有毒物質が世界中で問題となっています。
アオコの有毒物質の化学構造解析や
簡便で迅速な高精度分析手法の開発など、
有毒アオコ問題に化学の目で挑戦しています。





「21世紀は水不足の世紀」と言われています。貴重な水資源である湖沼では富栄養化が進行し、アオコの発生による水質低下が危惧されています。日本では、アオコは、池や湖の水質低下を引き起こすことで知られていますが、世界的には、アオコの中に含まれる有毒物質が引き起こす家畜やヒトの健康被害が問題になっています。アオコ由来の有毒物質にはさまざまな種類があり、種類によって性質や強さも異なることがわかっています。そこで、アオコの有毒物質によるリスクを評価するには、アオコの中にどのような化学構造を持つ有毒物質が含まれているかを解析するとともに、それらがどの位の量含まれているのかを高い精度で分析する手法の開発が必要です。

国立環境研究所では、アオコの有毒物質の化学構造解析を進めるとともに、精度の高い分析手法を開発しています。

本号では、複雑な構造を持つアオコの有毒物質の構造解析と新しい分析手法の開発の歩みと意義について紹介します。



C O N T E N T S

アオコの有毒物質を探る

構造解析と分析法の開発

- Interview 研究者に聞く
世界に先がけ、アオコ有毒物質の
分析法を開発 p4～9
- Summary
アオコの有毒物質の化学
—構造解析と高精度分析手法の開発— p10～11
- 研究をめぐって
有毒アオコをめぐる
研究の動向 p12～13
- 国立環境研究所における
「アオコの有毒物質に関する研究」
のあゆみ p14

Interview 研究者に聞く

国立環境研究所では、アオコなど微細藻類が作る有毒物質の構造の解析や分析法の開発を行っています。この研究に取り組んでいる環境計測研究センター環境計測化学研究室 主任研究員の佐野友春さんに、研究の取り組みと成果についてうかがいました。



佐野友春 / 環境計測研究センター
環境計測化学研究室 主任研究員

世界に先がけ、アオコ有毒物質の分析法を開発

有毒物質を作るアオコ

Q：アオコとは何ですか。

佐野：夏の日に池や湖の水面が緑色の粉をまいたように見えることがあります。あの現象が「アオコ」です。藍藻（シアノバクテリア）という植物プランクトンが大量に発生したものです（図1）。「水の華」と呼ばれることもあります。

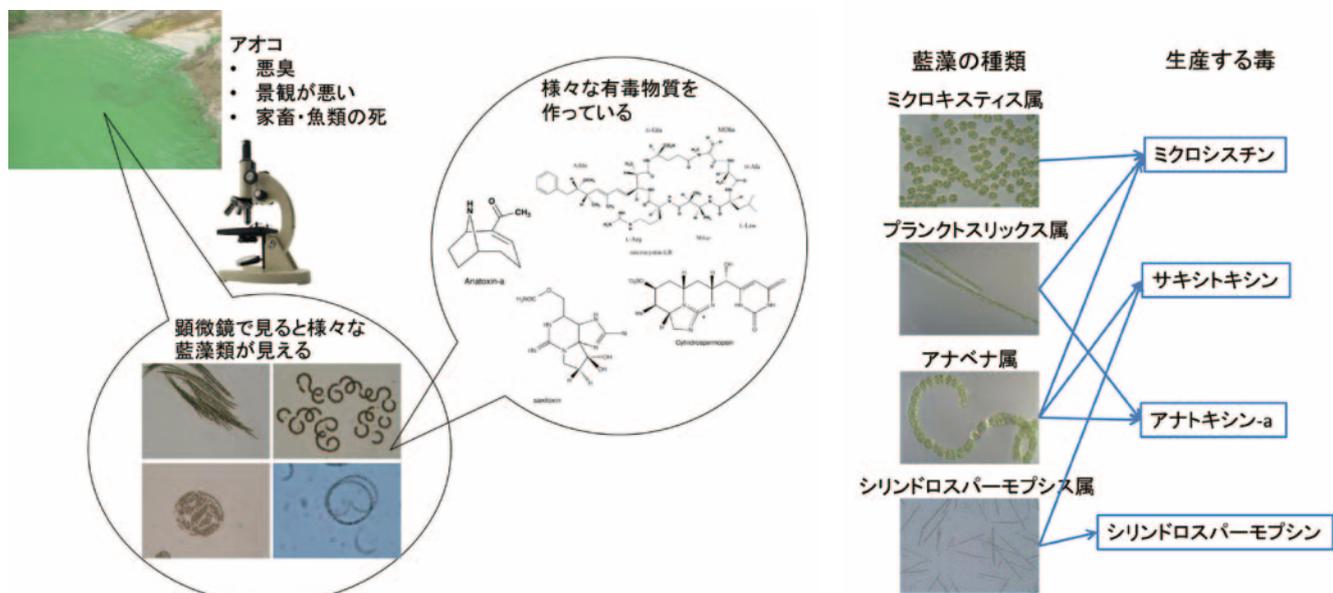
Q：水の華とは、おもしろいですね。

佐野：水面の色を変えてしまうほどだからでしょうね。赤潮とよく似ていますが、赤潮は主に海で植物プ

ランクトンが大量発生する現象です。一方、アオコは池や湖沼などの淡水でしか起こりません。都市化が進んだり、産業活動が発展したりして、排水に含まれる窒素やリンなどが池や湖に大量に流れ込んで、富栄養化したことが原因です。アオコが腐敗すると悪臭が発生しますし、大量の酸素を消費するために、魚類が酸欠状態になって大量死を招くことがあります。

Q：アオコに毒があるのですか。

佐野：藍藻にはたくさんの種類がありますが、中には肝臓や神経に対する毒性をもつものがあります。その有毒物質が自然の生態系や人の健康に深刻な影響





アオコが発生した湖

を及ぼすことがあるんですよ。アオコが発生すると、地域の飲料水の供給が滞ることもあります。有効な水資源の減少にもつながる深刻な問題です。それに加えて、有毒なアオコが問題になっています。

Q：過去に有毒なアオコで事故などが起こったことはあるのですか。

佐野：1920年代から世界中で問題になっており、国内外で野鳥や家畜に被害があった例が多数報告されています。1996年にはブラジルで、アオコが発生する水源を利用していただ病院で50名以上の透析患者が亡くなるという不幸な事故がありました。原因を詳しく調べてみると、水源に有毒な藍藻が発生していました。さらに、水が十分に浄化されていなかったようです。そのため、アオコの毒が透析に用いる水に混入したのです。幸い日本では、人への目立った健康被害は報告されていませんが、いろいろなところで富栄養化が進んでいますから、これからも問題となり続けるでしょ



う。そのためにもアオコの有毒物質についての研究を進める必要があります。

Q：どんな毒が知られていますか。

佐野：肝臓毒では「ミクロシスチン」や「シリンドロスパーマブシン」、神経毒では「アナトキシン」や「サキシトキシン」などがよく知られています(図1)。中でも私たちが注目し、研究を進めているのが「ミクロシスチン」です(図2)。

Q：ミクロシスチンとはどんな物質ですか。

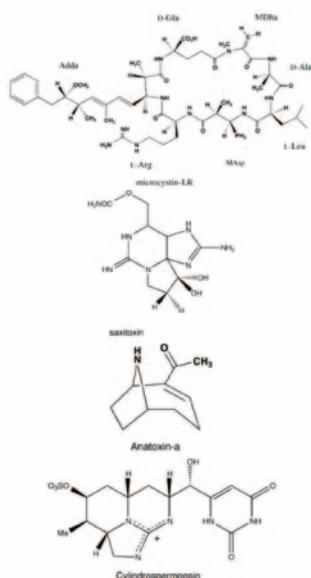
佐野：ミクロキスティス属などに分類される藍藻が作る肝臓毒で、100種類以上の同族体が知られています。同族体は、一つの一般式で示すことができ、化学的性質が互いに類似した一連の有機化合物のことをいいます。ときに構造はよく似ていながらも、作用が大きく違うことがあります。先のブラジルの事故の原因もミクロシスチンでした。

Q：毒は規制されているのですか。

佐野：1998年にはWHOから有毒アオコや有毒物質に関する報告がなされて、暫定的な規制値として飲料水中のミクロシスチンの濃度を1 μ g/L以下にするように勧告しています。日本でも環境基準の要調査項目や水道法の要検討項目に指定されていて、健康被害を抑制するために感度や精度の高いミクロシスチンの分析法の開発が求められています。

新しいミクロシスチンを発見

Q：ミクロシスチンにはそんなにたくさんの種類があるのですか。



有毒物質	強さ LD ₅₀ (μ g/kg)	作用
テトロドトキシン(フグ毒)	8	神経毒
サキシトキシン	10	神経毒
ミクロシスチン-LR	50	肝臓毒
アナトキシン-a	200	神経毒
シリンドロスパーマブシン	200	肝臓毒
青酸カリ	2500	呼吸毒

■ 図1 アオコをつくる藍藻類と有毒物質

アオコとは、藍藻(シアノバクテリア)と呼ばれる植物プランクトンが富栄養化した湖沼などで異常に増殖し、水面に集積したもので「水の華」とも呼ばれます。アオコを形成する主な藍藻として、ミクロキスティス属、アナテナ属、プランクトスリックス属、アフアニゾメノン属、シリンドロスパーマブシン属等が知られています。

アオコは見た目が悪いだけでなく、腐ったときに悪臭を放つとともに、魚類の大量死を引き起こしたりします。

また、アオコを形成する藍藻の中には有毒な種類も知られていて、いろいろな化学構造の有毒物質を作っています。主な有毒物質はミクロシスチン、シリンドロスパーマブシン、アナトキシン-a、サキシトキシンなどですが、これらの毒性は青酸カリよりもずっと強く、1/10から1/200程度の量で致死毒性を示すことが知られています。1種類の藍藻が多種類の有毒物質をつかったり、1種類の有毒物質を様々な藍藻類が作っていることが知られています。

佐野：そうなのです。私がマイクロシスチンの構造解析を始めた20年ほど前で、すでに70種類以上のマイクロシスチンが報告されていました。ですから、もう新しい種類はみつからないだろうと思われていました。そのころ、マイクロシスチンの構造を解析する方法として、高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)を使って解析することが主流となりつつありました。この方法ならば、少量の試料で高感度に解析できるからです。ところが、当時の研究室には、まだその装置がありませんでした。そのため、私たちは、藍藻からマイクロシスチンの成分を取り出して、分離精製後、核磁気共鳴装置(NMR)で構造を解析するという従来の方法を使って解析することにしました。

Q：新しいマイクロシスチンを見つけることはできましたか。

佐野：はい。NMRでの分析では、有毒物質を作る藍藻を1000リットル以上培養しなければならないときもあり苦労しました。おかげでNMRを使わないと他と区別が難しい新しいマイクロシスチンを見つけることができました。Dhb-マイクロシスチンと名付けたもので、マイクロシスチンの構造の中でわずかに官能基の位置が違うものです。NMRを使わなければ、わずかな構造の違いは見分けられなかったでしょう。Dhb-マイクロシスチンはNMRで分析したからこそ見つかったと思っています。今報告されている11種類のDhb-マイクロシスチンのうち9種類は私たちが構造を決めたものです(図3)。

Q：見つかったマイクロシスチンの毒性は強いのですか。

佐野：マイクロシスチンの中で毒性が強いとされる同族

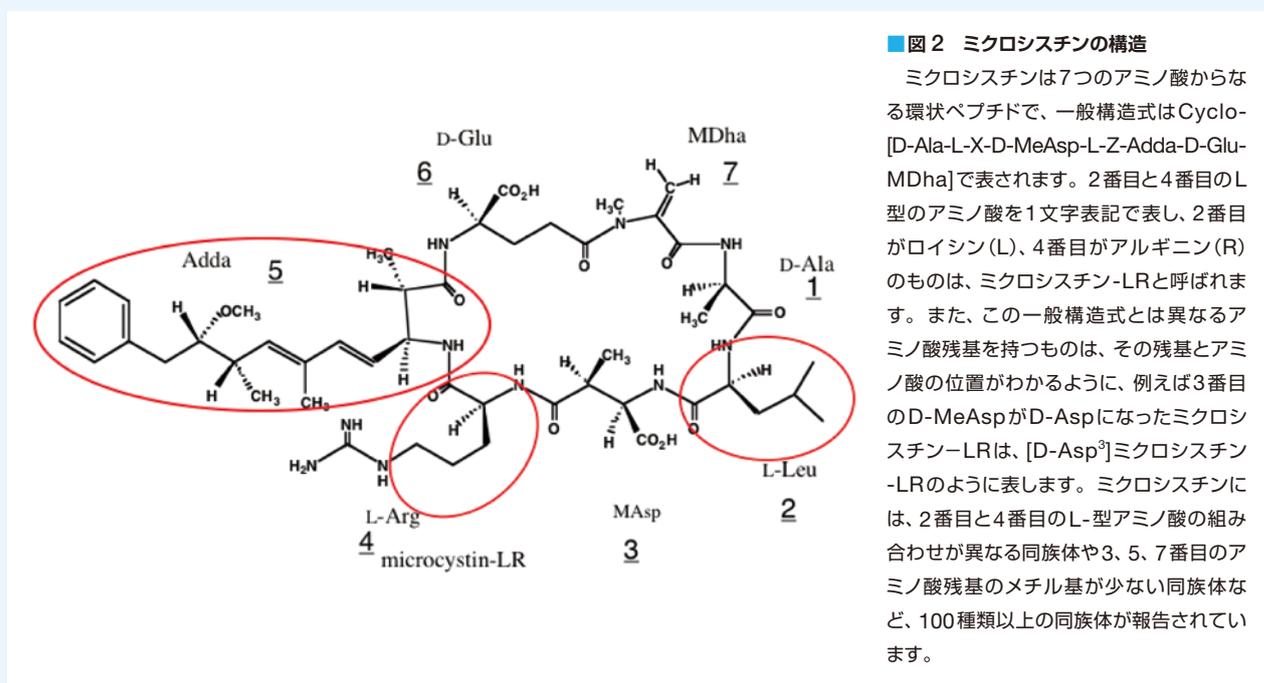


サンプリング

体(例えばマイクロシスチン-LR)と比べると、マウスに対する毒性は若干弱いですが、肝細胞に対する毒性を指標として比較すると、Dhb-マイクロシスチン類はマイクロシスチン-LRよりも毒性が強いという結果が出ています(表1)。Dhb-マイクロシスチンは代謝されにくいので、生物の体内に入ると長期間毒性を示す可能性があり、発ガン物質となるのではないかと危惧しています。

Q：マイクロシスチンの中には無毒のものもあるのですか。

佐野：無毒の種類もあります。また、マイクロシスチンは紫外線が当たると無毒な[6-(Z)-Adda⁵]マイクロシスチンに変わることが知られています。このマイクロシスチンは、湖沼でアオコを採集してくると、10%程度含まれています。さらに、[6-(Z)-Adda⁵]体以外にも、無毒なトリシクロ体が生成することを見つけて



マイクロシスチン分析法を開発

Q: かなり広く使われるようになったんですね。

佐野: そうですね。今では、環境省の要調査項目の測定にも使われています。なるべくたくさんの方のところで、MMPB法を使ってほしいのですが、開発してしばらくはなかなか使ってもらえませんでした。

Q: どうしてMMPB法が使われるようになったのですか。

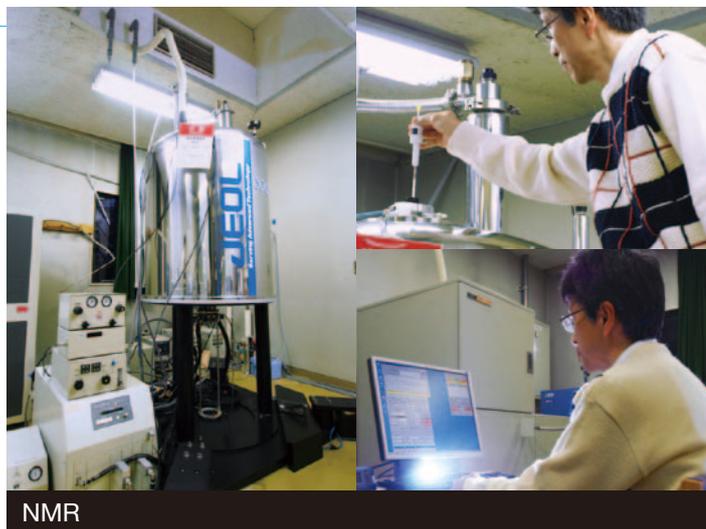
佐野: 2002年にISO(国際標準化機構)でマイクロシスチン分析の国際比較実験を行ったのですが、測定結果にすいぶんばらつきがありました。そこで、マイクロシスチン分析の精度を管理するための環境標準物質を開発しました(図6)。測定する人がみんな使える標準物質があれば、精度を管理でき、測定値のばらつきが少なくなり、測定の信頼度も増します。そうすればみんながMMPB法を使ってくれると考えたのです。

Q: それはどうすれば手に入るのですか。

佐野: 研究所のホームページで購入方法をご案内しています。これは標準物質の成分の分析をきっちりと行ったもので、マイクロシスチンの含有量の保証をしています。

Q: 開発で苦労したことは何ですか。

佐野: MMPB法の開発当初は、分析した毒の量を決めるための標準品が市販されていませんでした。そのため、自分たちで標準品や安定同位体(重水素)標識化合物(MMPB- d_3)の合成を行ったことです。今ではMMPBの標準品やMMPB- d_3 が試薬として市販されていて、切り出したMMPBをそのままLC-MS/



MSで分析しています。

Q:他にどんな分析法を開発しましたか。

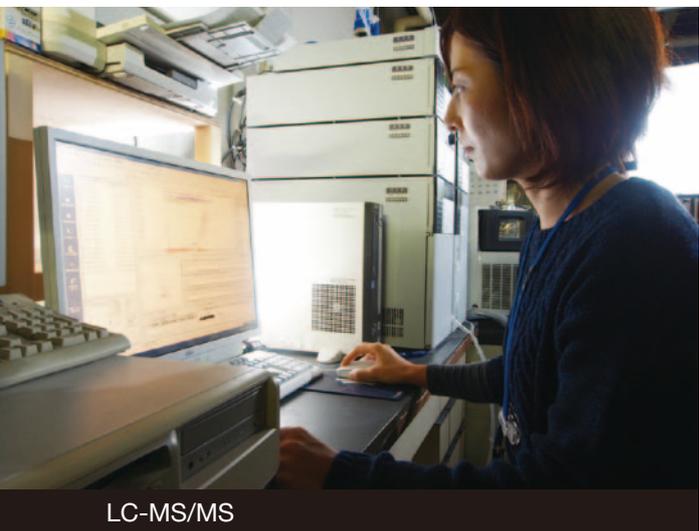
佐野: これまで開発してきた方法は、高額な分析機器や専門的な知識を必要とします。アオコの問題は世界中で起こっていますから、だれでも分析できる簡便な方法を開発しなければならないと考えました。というのは、途上国の研究者に「高価な機器を買えない私たちは、マイクロシスチンを分析できずにその毒で死んでしまうの?」と言われたことがきっかけです。

Q: それで新しい分析法を開発したのですか。

佐野: グルタチオン付加法という簡単にマイクロシスチンを測定できる方法を開発しました(図5)。これは、グルタチオンという物質を利用して、マイクロシスチンを発色させて検出する方法です。高額な分析機器を必要としないで分析することができます。ただし、この方法はDhb-マイクロシスチン類や[MSer⁷]マイクロシスチン類の分析には使えません。

■表2 一般的な機器分析手法と特徴

機器分析手法	分析対象物質	特徴		
		選択性	感度	その他
ガスクロマトグラフ 質量分析計 (GC/MS)	揮発性化合物 (大気汚染物質等)	高い	高い (~fg)	<ul style="list-style-type: none"> 熱に不安定な化合物は困難 不揮発性化合物は誘導体化が必要
高速液体クロマトグラフ タンデム型質量分析計 (LC-MS/MS)	不揮発性化合物 (水質汚染物質等)	高い	高い (~pg)	<ul style="list-style-type: none"> イオン化する化合物に限られる
核磁気共鳴装置 (NMR)	不溶性化合物 (ポリマー、セラミック、 土壌等)も可	高い	低い (~mg)	<ul style="list-style-type: none"> 構造解析が主目的 定量NMR (個別の標準品が不要)



LC-MS/MS



佐野：シンドロスパーマブシンと呼ばれる肝臓毒についても注目しています。マイクロシチンに次いで高頻度に検出される有毒物質です。熱帯や亜熱帯域で検出されていたのですが、最近、石垣島で類縁体が見つかりました。今後は、それらが北上する可能性があります。そのため、日本でも監視が必要となるでしょう。欧米でも問題となっていて、近くWHOで基準値が設定される動きもあるので、監視のための正確な分析法が必要です。そのために、シンドロスパーマブシンについても窒素の安定同位体 (^{15}N) が入ったものを培養で作り、高精度な分析手法を開発しています。

マイクロシチンを個別に測定

Q：マイクロシチンを個別に分析する方法はどのように行うのでしょうか。

佐野：WHOが設けているマイクロシチンの暫定基準は、マイクロシチン-LRの値ですし、日本の上水試験法も同族体(マイクロシチン-LR, YR, RR)の個別分析です。そうするとやはり個別でマイクロシチンを分析する必要があります。従来からLC-MS/MSで分析する方法がありましたが、精度がよくありませんでした。そこで、窒素の安定同位体 (^{15}N) が入ったマイクロシチンを作り、それを使ってマイクロシチン-LR、-RR、-YRを高精度で分析する手法を開発しました。今では、安定同位体で標識したマイクロシチンも市販されているので、いずれこの分析手法が世界標準になることを期待しています。

Q：アオコの有毒物質で、マイクロシチン以外にも注目しているものはありますか。

世界標準をめざす

Q：開発中の分析法が世界で使われるようになると思いますね。

佐野：その通りです。これまで私たちはいろいろな方法や標準物質を開発してきました。将来、私たちが開発した分析法を世界標準や公定法にすることをめざしています。そのためには、精度がよいことはもちろんのこと、繰り返し測定しても苦にならず、だれでも使いやすい方法にすることが必要だと思っています。

Q：アオコの毒もまだみつきりそうですか。

佐野：アオコの有毒物質には未知のものがまだたくさんあります。これからも新しいものを見つけたいですね。そうして、見つけた新しい有毒物質が、アオコの毒性のメカニズムの解明や新薬の開発につながることを期待しています。

	分析法	精度	感度	同族体の選択性	前処理の時間	分析時間	分析費用(消耗品)	機器価格
個別分析	LC-MS/MS	高	高	高	短(～1時間)	短(20分)	中	高
	LC/MS	高	高	高	中(～半日)	短(20分)	中	高
	LC-PDA*	中	中	中	中(～半日)	短(20分)	中	中
	TLC*	低	低	低	中(～半日)	中(1時間)	低	低
	NMR	高	低	高	長(数日)	長(数時間)	低	高
総量分析	ELISA*	中	高	無	短(～1時間)	長(数時間)	高	中
	PP2A*	中	中～高	無	短(～1時間)	中(1時間)	高	中
	MMPB	高	高	無	中(～半日)	短(20分)	中	中～高
	グルタチオン付加-発色	中	低	無	中(～1日)	中(1時間)	低	低
	グルタチオン付加-LC-MS	中	高	無	中(～1日)	短(20分)	中	高

LC-PDA：高速液体クロマトグラフ-フォトダイオードアレイ検出器；
TLC：薄層クロマトグラフィー；ELISA：酵素結合免疫吸着法；PP2A：蛋白質脱リン酸化酵素

■表3 マイクロシチン分析手法の比較

主なマイクロシチン分析手法についてWHOの暫定基準値である $1\mu\text{g/L}$ 程度のマイクロシチンを測定する場合を想定して比較してみました。

個別分析法では、LC-MS/MS法が感度・精度・選択性・迅速性すべてで優れていますが、分析機器が高額です。NMRは感度が低いので、低濃度の分析は現実的ではありません。

総量分析法では、ELISA法は感度は高いのですが精度が高くなく、キットも高額です。グルタチオン付加-発色法は精度は良くないですがコストが安く、高額な機器を必要としないことから、開発途上国でも使いやすい分析法と思われます。

(測定値のばらつきが小さいと精度が高い、微量で測定できると感度が高い、同族体を区別できると選択性が高いと表示しています)

アオコの有毒物質の化学 —構造解析と高精度分析手法の開発—

アオコを形成する藍藻類の中には有毒物質を産生する種類があり、様々な構造を持つ有毒物質が報告されています。研究所ではアオコが産生する有毒物質による健康被害を抑制するために、アオコが産生する有毒物質の構造を解析するとともに、簡便・迅速で精度の高い分析手法の開発を行ってきました。

アオコが産生する有毒物質の構造解析

有毒物質の性質を理解するためには、まずその化学構造を知ることが大切です。アオコが産生する有毒物質であるマイクロシチンの構造は1980年代中頃に決定されました。その後、ノーベル化学賞も受賞した2次元核磁気共鳴 (NMR) を含む化学分析の進歩により1990年代初めころには70種類以上のマイクロシチン同族体の構造が決定されていました。

研究所でも1990年代からアオコが産生する有毒物質について研究を行っていて、一つの藍藻株について数百リットル培養しては有毒物質を抽出・精製し、構造解析をしてきました。1995年にはスコットランドの株保存施設から預かった藍藻株の中から、新しいタイプのマイクロシチン類を見つけることができ、Dhb-マイクロシチンと命名しました(図3)。Dhb-マイクロシチン類はNMRスペクトルでは特徴的なパターンを示しますが、当時一般的に行われていた質量分析による解析では区別が難しく、発見が遅れたものと思われます。さらに、Dhb-マイクロシチンの中にはNMRでしか区別できない幾何異性体の同族体も存在していて、NMRによる解析が重要であることを認識させられ

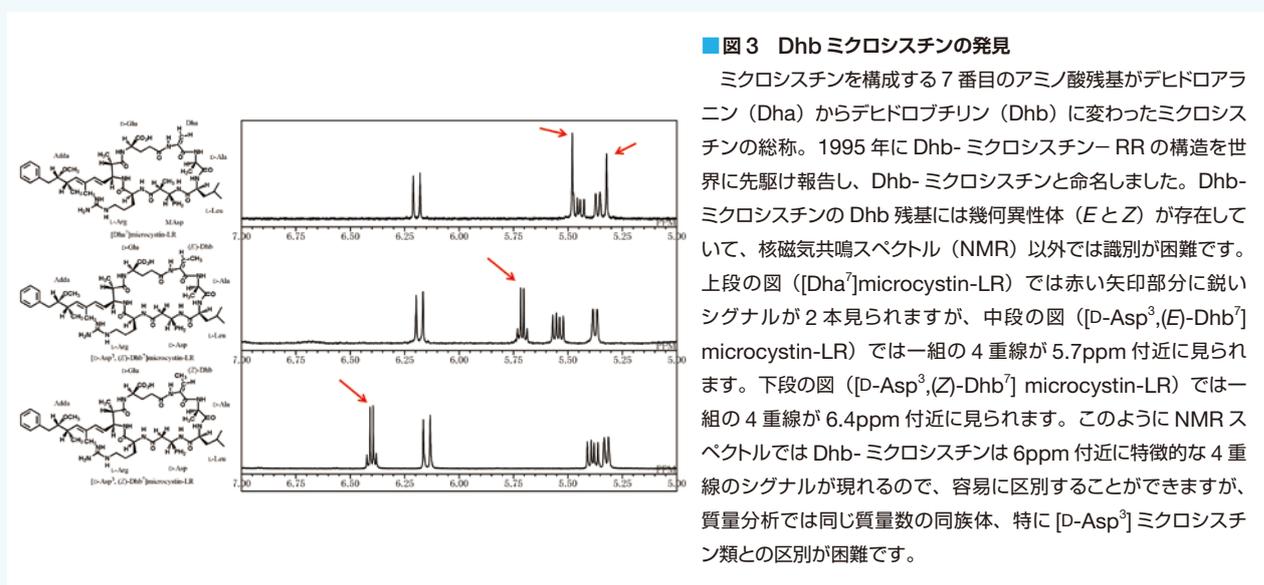
ました。また、Dhb-マイクロシチンはグルタチオン抱合による解毒を受けにくいことが知られていて、発がん物質である可能性も指摘されています。現在までに11種類のDhb-マイクロシチン類が報告されていますが、研究所ではそのうちの9種類についてその構造を決定・報告してきました。

マイクロシチン以外では、1993年には魚毒性を示すチオンスルフォリピドの単離・構造解析、2011年には筑波大学の彼谷教授のグループと共同で環境ホルモン作用が疑われている7-ヒドロキシレチノイン酸の単離・構造決定も行っています。

アオコが産生する有毒物質の 毒性評価手法の開発

有毒物質は構造とともにその毒性(強さ、作用機序)に関する研究も大切です。マイクロシチンは哺乳類では肝臓に特異的に取り込まれ、急性肝炎を起こすことが知られていて、マイクロシチンの毒性はマウスに注射して調べられていました。

しかし動物実験を行うことが難しくなってきたことから、培養細胞を使った毒性試験法の開発を試みまし



■図3 Dhb マイクロシチンの発見

マイクロシチンを構成する7番目のアミノ酸残基がデヒドロアラニン (Dha) からデヒドロプロチリン (Dhb) に変わったマイクロシチンの総称。1995年にDhb-マイクロシチン-RRの構造を世界に先駆け報告し、Dhb-マイクロシチンと命名しました。Dhb-マイクロシチンのDhb残基には幾何異性体(EとZ)が存在していて、核磁気共鳴スペクトル(NMR)以外では識別が困難です。上段の図([Dha⁷]microcystin-LR)では赤い矢印部分に鋭いシングルが2本見られますが、中段の図([D-Asp³,(E)-Dhb⁷]microcystin-LR)では一組の4重線が5.7ppm付近に見られます。下段の図([D-Asp³,(Z)-Dhb⁷]microcystin-LR)では一組の4重線が6.4ppm付近に見られます。このようにNMRスペクトルではDhb-マイクロシチンは6ppm付近に特徴的な4重線のシグナルが現れるので、容易に区別することができますが、質量分析では同じ質量数の同族体、特に[D-Asp³]マイクロシチン類との区別が困難です。



た。1996年には、電気刺激により細胞膜に穴を開けて強制的に細胞に取り込ませるエレクトロポレーションという手法により、本来はマイクロシスチンを取り込まない培養細胞を使って毒性評価をする方法を開発しました。また、平成19～21年度には沖縄県の株式会社トロピカルテクノセンターとの共同研究で、遺伝子操作により安定性を高めた蛋白質脱リン酸化酵素(PP2A)を利用した毒性評価(定量)手法の開発も行いました。

さらに、平成21～23年度には、国立医薬品食品衛生研究所との共同研究において、冷凍状態で市販されている初代培養肝細胞を用いるとともに、定量的NMRで濃度をきちんと把握したマイクロシスチン同族体を使うことにより再現性の良い毒性評価を行い、マイクロシスチンによるリスクの評価手法を確立しました。

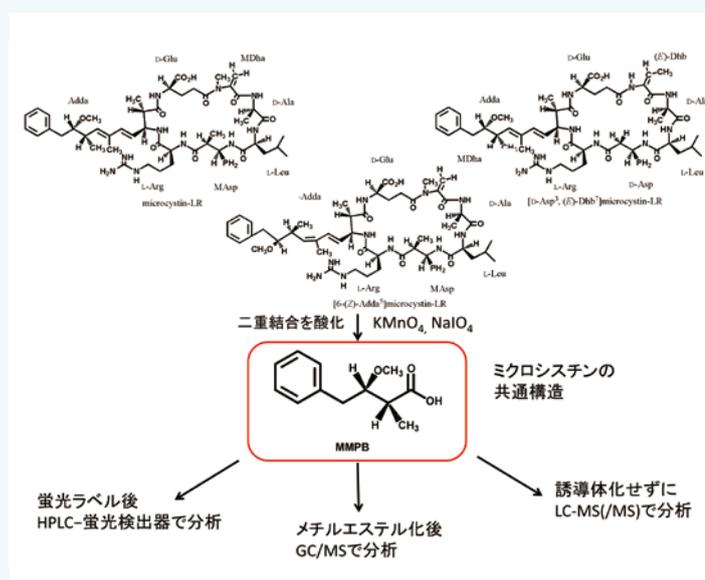
アオコが産生する有毒物質の分析手法の開発

有毒物質の構造と毒性が解明されたら、そのリスクを評価するために有毒物質の量を測定する分析手法の開発が重要になります。研究所がマイクロシスチンに関する研究を始めた頃にはすでに70種類以上のマイクロシスチン類が報告されていましたが、標準品は6種類ほどしか市販されていなかったことから、まずマイクロシスチン類の総量を測定する手法の開発を試みました。マイクロシスチン類のAddaと呼ばれる共通構造を酸化することによりMMPB(3-メトキシ-2-メチル-4-フェニル酪酸)とし、生成したMMPBを測定することでマイクロシスチンの総量を測定する手法を1992年に開発しました(MMPB法)。この手法は、現在でも生物試料中や湖沼の底質中のマイクロシスチン類を測定す

る手法として、世界中で利用されています。

MMPB法はマイクロシスチン総量を測定する手法ですが、世界保健機関(WHO)が勧告したマイクロシスチンの暫定基準値はマイクロシスチン-LRという一つの同族体についての基準値だったことから、同族体を個別に測定する手法も開発されてきました。その中でも高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)を用いる手法が同族体の同定および分析感度で優れています。ただし、この手法の弱点は測定時の夾雑物等によりイオン化する効率が不安定なことでした。この弱点の克服には、安定同位体で標識された化合物を使うのが一般的ですが、市販品はありませんでした。研究所ではマイクロシスチンを作る藍藻株を窒素の安定同位体(^{15}N)を含む培地中で培養することで、マイクロシスチン中の窒素(通常は ^{14}N)を効率よく安定同位体(^{15}N)に置き換えることができることを見つけ、大量培養により ^{15}N を含むマイクロシスチンを調製しました。この ^{15}N で標識したマイクロシスチンを内部標準物質として測定したい試料に添加して分析することにより、精度よくマイクロシスチンの分析を行うという手法を2010年に世界に先駆けて報告しました。今では、 ^{15}N 標識マイクロシスチンが市販されているので、 ^{15}N 標識マイクロシスチンを用いた高精度分析手法が日本国内のみならず世界の標準的な分析手法になることを期待しています。

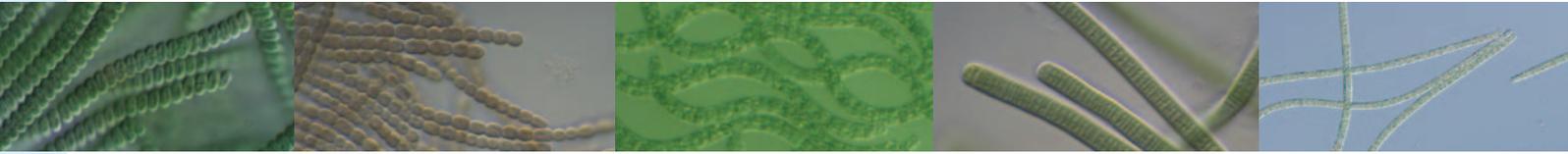
また、有毒アオコへの対処を実際に担当される地方自治体の環境研究所と共同研究も行っていて、宮城県保健環境研究所、千葉県環境研究センター、奈良県景観・環境総合センター、福岡県保健環境センター、佐賀県くらし環境本部環境センター、沖縄県衛生環境研究所の研究者の方々と有毒アオコのモニタリング手法について検討を続けています。



■ 図4 マイクロシスチンの総量測定法(MMPB法)の開発

マイクロシスチンの構造にはAddaと呼ばれる炭素20個のβ-アミノ酸、3-アミノ-9-メトキシ-10-フェニル-2,6,8-トリメチル-4,6-デカジエン酸が共通構造として存在しています。このAddaの二重結合部分を過マンガン酸カリウム(KMnO_4)と過ヨウ素酸ナトリウム(NaIO_4)で酸化して分解すると、マイクロシスチン1分子からMMPB(3-メトキシ-2-メチル-4-フェニル酪酸)が1分子生成します。生成したMMPBを測定することにより、マイクロシスチンの総量を測定する方法がMMPB法です。開発当初は生成したMMPBを蛍光ラベル後、HPLC-蛍光検出器で測定していました。その後、MMPBをメチルエステルとした後、GC/MSで測定する方法も開発しました。今では生成したMMPBを固相抽出し、誘導体化することなしにLC-MS(/MS)で測定しています。筋肉などの生体試料や湖沼の底質に含まれるマイクロシスチンの測定法として広く世界中で使われています。

有毒アオコをめぐる研究の動向



世界では

1980年代からアオコの有毒物質であるマイクロシスチン、シリンドロスパーマブシン等の構造解析が行われていて、現在では100種類以上のマイクロシスチン同族体が報告されています。高速液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析計(LC-MS/MS)を用いたマイクロシスチン同族体の個別分析手法についても早くから検討されていて、定量だけでなく構造解析もLC-MS/MSで行われてきました。

WHOでは、1996年に起きたブラジルでのヒトの死亡事故をうけて、1998年にマイクロシスチン-LRの暫定基準値(1 μ g/L)を勧告しました。この勧告を受けて、ヨーロッパの国やオーストラリアではマイクロシスチンの基準値を定めて、厳しく監視しています。また、水酸化カルシウムを用いたリン酸の除去手法や、過酸化水素や草食魚等を用いたアオコの増殖抑制手法等の検討が行われています。

日本では

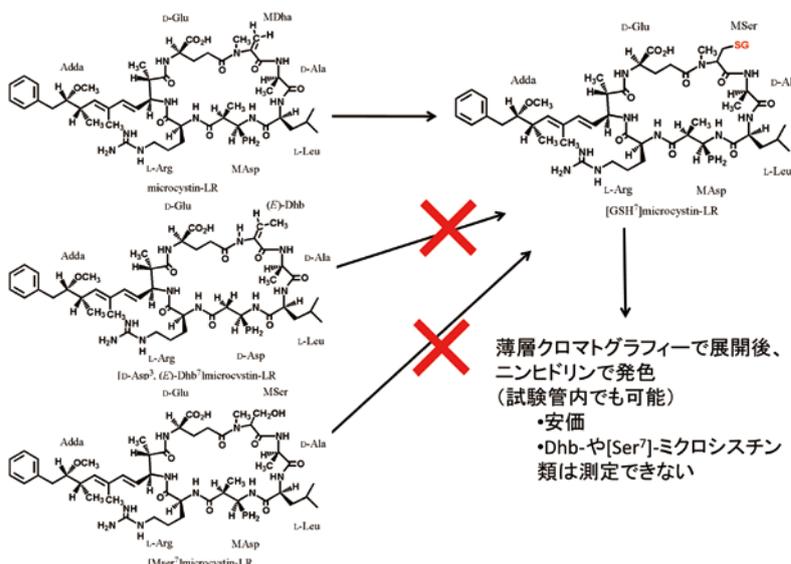
1980年代後半にアジア地域で量が多いマイクロシスチン-RRの構造解析が筑波大学の楠見武徳博士らに

より報告された後、多くの同族体の構造が日本人研究者により報告されてきました。日本のアオコは欧米のアオコと比較して毒性が弱いものが多く、健康被害や家畜の斃死などは記録されていませんが、日本各地の富栄養化が進んだ湖沼で有毒アオコの発生が確認されています。

アオコの有毒物質の中ではマイクロシスチンが最も高頻度で確認されていて、環境省では平成10年に要調査項目、厚生労働省では要検討項目や上水試験法の試験項目に指定していますが、基準値にはなっていません。また、マイクロシスチンやシリンドロスパーマブシン等の有毒物質を合成する酵素の遺伝子やマイクロシスチンを分解する酵素の遺伝子等を調べることにより、環境中での有毒アオコやマイクロシスチンの動態等についても研究が進められています。

国立環境研究所では

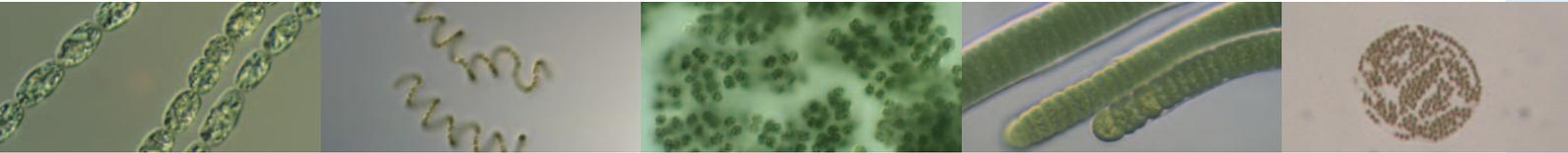
生物系や工学系の研究者たちは、1980年代から藍藻類の分類や増殖条件、マイクロシスチンの産生条件の検討、水生生物によるマイクロシスチンの濃縮などについて研究を行っていて、「アオコの見た目標標」等も作成しました。最近では遺伝子解析による分類や有毒



■図5 グルタチオン付加法

マイクロシスチンをグルタチオンで処理すると、7位のMdhA(Dhaでも可)残基にグルタチオンの硫黄原子が付加した化合物が得られます。この付加体を薄層クロマトグラフィー(TLC)で展開した後、アミノ酸の発色試薬であるニンヒドリンで発色させて、マイクロシスチンがあるかどうかとおおよその量を分析することができます。TLCで展開しないで、試験管内で発色反応を行うと、比色法でマイクロシスチンの測定ができます。この方法では、[MSer⁷]マイクロシスチンのように7位のアミノ酸残基に二重結合がないマイクロシスチン同族体やDhb-マイクロシスチン類はグルタチオンと付加体を作らないため、測定することができません。しかし、このグルタチオン付加法は、測定に高価な機器を必要としないので、開発途上国などでマイクロシスチンを測定するための良い方法だと思います。

有毒アオコによる事故は 1920 年代から報告されていましたが、1980 年代になりアオコの有毒物質の構造が決定されました。1998 年には世界保健機関（WHO）により飲料水中のミクロシスチンについて暫定的な基準値が勧告されました。また、アオコの増殖を抑制する技術や、ミクロシスチン等のアオコの有毒物質の除去・分解方法についても検討されています。



株の判定、分化の推定などについても研究しています。また、富栄養化の原因となる栄養塩類の推移やアオコの増殖抑制、生物膜処理によるミクロシスチンの分解等についても研究を行っています。

化学系の研究者は、有毒物質の構造解析としては、1995年にDhb-ミクロシスチンの発見、1996年には魚類に毒性を示すチオンスルフォリピドの単離、2011年には環境ホルモン作用のある7-ヒドロキシレチノイン酸の単離などを行っています。

毒性の評価法の開発としては、1996年にはエレクトロポレーションによる細胞毒性評価手法の開発、2010年にはトロピカルテクノセンターとの共同研究で遺伝子組み換え蛋白質脱リン酸化酵素（PP2A）を利用したマイクロプレートアッセイ法の開発、2011年には国立医薬品食品衛生研究所との共同研究で凍結初代培養幹細胞を用いた毒性評価システムの開発などを行ってきました（表3）。

分析法としては、1992年にミクロシスチン総量分析法であるMMPB法を開発（図4）、2001年には、高額な分析機器を持たない開発途上国でも分析ができるように、ミクロシスチンにグルタチオンを付加させて安価に分析する方法の開発も行いました（図5）。

2005年には研究者が自分の分析の確からしさを確

認できるようにするために、ミクロシスチン分析用の環境標準物質（NIES CRM No.26 アオコ）を開発しました（図6）。2010年には安定同位体標識ミクロシスチンの調製と高精度分析手法の開発等を行ってきました。

また、ミクロシスチン以外で高頻度で検出される有毒物質シリンドロスペーモプシンについても、種類の異なる固相抽出カートリッジを連結して使用することにより、簡便に濃縮する手法の開発や、安定同位体（¹⁵N）で標識されたシリンドロスペーモプシンの調製と、それをを用いた高精度分析手法の開発も行ってきました。

人為的な環境汚染物質による汚染とは異なり、アオコ発生の主な原因は富栄養化であるためにアオコの制御は難しく、今後も地球温暖化の進行に伴い、世界中で有毒アオコの発生が問題になると考えられています。有毒アオコによる被害を抑制するためには、アオコの発生を抑制する技術の開発とともに、ミクロシスチン等の有毒物質を注意深く監視していく必要があります。今後もアオコの有毒物質の構造解析や、アオコの有毒物質に対する迅速・簡便・高精度な分析手法の開発がますます重要になると考えています。



■ 図6 環境標準物質の調製

環境標準物質とは、そこに含まれている化学物質の濃度が正確に求められている環境試料で、環境分析における標準として極めて重要なもので、わが国では当研究所の前身である環境庁国立公害研究所が1980年から開発を進めてきました。現在14種類の環境標準物質を頒布しています。

環境試料は化学組成が極めて複雑なため、試料の前処理や測定が難しく、単純な標準溶液を用いたのではなかなか正しい分析値を求めることができません。このような場合には、分析試料と化学組成がよく似た標準物質を用いることにより、分析値の正確さを向上させることができます。

アオコの有毒物質ミクロシスチンの分析精度管理用の環境標準物質を作製するために、有毒な藍藻株を大量に培養し、凍結乾燥しました。乾燥藻体を混ぜ合わせ、63μmのふるいを通しました。この細かい粉体をビンに小分けした後、均質性試験、認証値付与、安定性試験を行い、環境標準物質（NIES CRM NO.26 アオコ）が完成しました。NIES CRM NO.26は、ミクロシスチンの分析用に開発された環境標準物質です。

環境標準物質のホームページ

<http://www.nies.go.jp/labo/crm/index.html>

国立環境研究所における 「アオコの有毒物質に関する研究」のあゆみ

国立環境研究所では、環境中の有害物質の化学構造解析や高精度分析手法の開発に関する研究を行っています。ここでは、その中から、アオコの有毒物質に関するものについて、そのあゆみを紹介します。

課題名

有毒アオコが生産する毒物質の標識化と その生体影響作用機構に関する研究

(1990～1994年度)

重水素化標識化合物を用いたアオコ毒マイクロシスチンの総量分析手法を開発しました。

課題名

アジア地域の微生物研究ネットワークに関する研究

(1995～1997年度)

アジア地域で発生したアオコの有毒物質について構造解析および分析をしました。

課題名

アジアにおける水資源域の水質評価と 有毒アオコ発生モニタリング手法の開発に関する研究

(2004～2006年度)

アジア地域の研究者に簡易分析手法を含むアオコ毒分析手法を伝授しました。

課題名

PP2Aを利用した藍藻毒分析キットの開発

(2007～2009年度)

PP2Aを利用したアオコ毒マイクロシスチンのマイクロプレートアッセイキットを開発しました。

課題名

藍藻類が生産するマイクロシスチンのモニタリング手法と その評価に関する研究

(2009～2011年度)

アオコ毒マイクロシスチンの安定同位体標識体の調製と高精度分析手法の開発をするとともにモニタリング手法の検討を行いました。また、マイクロシスチン同族体毎の毒性を評価し、マイクロシスチンによるリスク評価手法も検討しました。

課題名

微細藻類が生産する有毒物質マイクロシスチンの モニタリングに関する研究

(2012年度～)

安定同位体標識マイクロシスチンを用いた簡便・迅速・高精度なモニタリング手法の検討を行っています。

本号で紹介した研究は、以下の機関、スタッフにより実施されました(所属は当時、敬称略、順不同)

<研究担当者>

国立環境研究所：佐野友春、彼谷邦光、白石不二雄、西川雅高、高木博夫、渡邊信、笠井文絵、広木幹也、河地正伸、今井章雄、松重一夫

国立医薬品食品衛生研究所：西村哲治、清水久美子

地方環境研究所(福岡県、沖縄県、宮城県、奈良県、佐賀県、千葉県)

株式会社トロピカルテクノセンター

ダンディー大学(イギリス)：Geoffrey A. Codd

カセタート大学(タイ)：Wichien Yongmanitchal

タイ科学技術研究所(タイ)：Aparat Mahakhant

水生生物研究所(中国)：劉 永定

● 過去の環境儀から ●

これまでの環境儀から、藻類や湖沼の環境保全に関連するものをいくつか紹介します。

No.44 試験管内生命で環境汚染を視る — 環境毒性の *in vitro* バイオアッセイ

研究所では、環境汚染物質の毒性を評価するため、培養細胞や微生物を用いたさまざまな *in vitro* バイオアッセイ法を開発してきました。こうした試験法は、今後、環境モニタリングにも応用できると期待されています。本号では、研究所が取り組む *in vitro* バイオアッセイ法の構築のあゆみと環境モニタリングへの応用について紹介しています。

No.43 藻類の系統保存 — 微細藻類と絶滅が危惧される藻類

藻類は光合成による有機物の生産者として地球上で重要な役割をはたしているほか、物質の循環や有用物質の生産などにも深くかかわっています。研究所の微生物系統保存施設（NIES コレクション）では、藻類を収集し、培養株として系統保存しています。本号では、わが国の藻類保存プロジェクトの中核機関である NIES コレクションについて紹介します。

No.13 難分解性溶存有機物 — 湖沼環境研究の新展開

湖沼の水質がなかなか改善しない原因の一つに、難分解性溶存有機物の影響が考えられます。研究所では、湖沼において増大する難分解性有機物の発生原因と影響評価に関する研究に取り組んでいます。本号では、これらの研究成果とともに、難分解性溶存有機物の特性や湖沼での動態、環境への影響などについて紹介しています。

No.9 湖沼のエコシステム — 持続可能な利用と保全をめざして

湖沼の富栄養化が進む中、湖沼環境を改善し、保全していくためには、生物間の相互作用を含めた湖沼生態系の構造と機能を理解し、活用していくことが必要です。本号では、湖沼の水質が魚の影響を強く受けていた事実を通して、湖沼における生物間の相互作用を明らかにするとともに、生態系を保全・管理しつつ湖沼利用を進めるための道を探っています。

No.7 バイオ・エコエンジニアリング — 開発途上国の水環境改善をめざして

開発途上国で安全な飲み水を確保するためには、生活系排水の処理が重要です。研究所では、途上国において、排水を現場で処理、浄化できる、分散型で低コストの維持管理しやすい水処理システムの技術開発に取り組んできました。本号では、生物の機能を最大限に活用した「バイオ・エコエンジニアリング」技術を応用した新しい水処理システムについて紹介しています。

環境儀 No.52

— 国立環境研究所の研究情報誌 —

2014年4月30日発行

編集 国立環境研究所編集委員会

(担当 WG: 稲葉一穂、佐野友春、玉置雅紀、石垣智基、近藤美則、滝村 朗)

発行 独立行政法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2

問合せ先 国立環境研究所情報企画室 pub@nies.go.jp

編集協力 有限会社サイテック・コミュニケーションズ

無断転載を禁じます

リサイクル適性の表示：紙ヘリサイクル可

本冊子は、グリーン購入法に基づく基本方針における「印刷」に係る判断の基準にしたがい、印刷用の紙へのリサイクルに適した材料「Aランク」のみを用いて作製しています。

「環境儀」既刊の紹介

No.6 2002年 10月	海の呼吸—北太平洋海洋表層のCO ₂ 吸収に関する研究	No.29 2008年 7月	ライダーネットワークの展開—東アジア地域のエアロゾルの挙動解明を目指して
No.7 2003年 1月	バイオ・エコエンジニアリング—開発途上国の水環境改善をめざして	No.30 2008年 10月	河川生態系への人為的影響に関する評価—よりよい流域環境を未来に残す
No.8 2003年 4月	黄砂研究最前線—科学的観測手法で黄砂の流れを遡る	No.31 2009年 1月	有害廃棄物の処理—アスベスト、PCB 処理の一翼を担う分析研究
No.9 2003年 7月	湖沼のエコシステム—持続可能な利用と保全をめざして	No.32 2009年 4月	熱中症の原因を探る—救急搬送データから見るその実態と将来予測
No.10 2003年 10月	オゾン層変動の機構解明—宇宙から探る 地球の大気を探る	No.33 2009年 7月	越境大気汚染の日本への影響—光化学オキシダント増加の謎
No.11 2004年 1月	持続可能な交通への道—環境負荷の少ない乗り物の普及をめざして	No.34 2010年 3月	セイリング型洋上風力発電システム構想—海を旅するウィンドファーム
No.12 2004年 4月	東アジアの広域大気汚染—国境を越える酸性雨	No.35 2010年 1月	環境負荷を低減する産業・生活排水の処理システム—低濃度有機性排水処理の「省」「創」エネ化～
No.13 2004年 7月	難分解性溶存有機物—湖沼環境研究の新展開	No.36 2010年 4月	日本低炭素社会シナリオ研究—2050年温室効果ガス70%削減への道筋
No.14 2004年 10月	マテリアルフロー分析—モノの流れから循環型社会・経済を考える	No.37 2010年 7月	科学の目で見える生物多様性—空の目とミクロの目
No.15 2005年 1月	干潟の生態系—その機能評価と類型化	No.38 2010年 10月	バイオアッセイによって環境をはかる—持続可能な生態系を目指して
No.16 2005年 4月	長江流域で検証する「流域圏環境管理」のあり方	No.39 2011年 1月	「シリカ欠損仮説」と海域生態系の変質—フェリーを利用してそれらの因果関係を探る
No.17 2005年 7月	有機スズと生殖異常—海産巻貝に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響	No.40 2011年 3月	VOCと地球環境—大気中揮発性有機化合物の実態解明を目指して
No.18 2005年 10月	外来生物による生物多様性への影響を探る	No.41 2011年 7月	宇宙から地球の息吹を探る—炭素循環の解明を目指して
No.19 2006年 1月	最先端の気候モデルで予測する「地球温暖化」	No.42 2011年 10月	環境研究 for Asia/in Asia/with Asia —持続可能なアジアに向けて
No.20 2006年 4月	地球環境保全に向けた国際合意をめざして—温暖化対策における社会科学的方法	No.43 2012年 1月	藻類の系統保存—微細藻類と絶滅が危惧される藻類
No.21 2006年 7月	中国の都市大気汚染と健康影響	No.44 2012年 4月	試験管内生命で環境汚染を視る—環境毒性の <i>in vitro</i> バイオアッセイ
No.22 2006年 10月	微小粒子の健康影響—アレルギーと循環機能	No.45 2012年 7月	干潟の生き物のはたらきを探る—浅海域の環境変動が生物に及ぼす影響
No.23 2007年 1月	地球規模の海洋汚染—観測と実態	No.46 2012年 10月	ナノ粒子・ナノマテリアルの生体への影響—分子サイズにまで小さくなった超微小粒子と生体との反応
No.24 2007年 4月	21世紀の廃棄物最終処分場—高規格最終処分システムの研究	No.47 2013年 1月	化学物質の形から毒性を予測する—計算化学によるアプローチ
No.25 2007年 7月	環境知覚研究の勧め—好ましい環境をめざして	No.48 2013年 4月	環境スペシメンバンキング—環境の今を封じ込め未来に伝えるパトナリレー
No.26 2007年 10月	成層圏オゾン層の行方—3次元化学モデルで見るオゾン層回復予測	No.49 2013年 7月	東日本大震災—環境研究者はいかに取り組むか
No.27 2008年 1月	アレルギー性疾患への環境化学物質の影響	No.50 2013年 10月	環境多媒体モデル—大気・水・土壌をめぐる有害化学物質の可視化
No.28 2008年 4月	森の息づかいを測る—森林生態系のCO ₂ フラックス観測研究	No.51 2014年 1月	旅客機を使って大気を測る—国際線で世界をカバー

●環境儀のバックナンバーは、国立環境研究所のホームページでご覧になれます。
<http://www.nies.go.jp/kanko/kankyogi/index.html>

「環境儀」



地球儀が地球上の自分の位置を知るための道具であるように、「環境儀」という命名には、われわれを取り巻く多様な環境問題の中で、われわれは今どこに位置するのか、どこに向かおうとしているのか、それを明確に指し示すべしという意図が込められています。「環境儀」に正確な地図・行路を書き込んでいくことが、環境研究に携わる者の任務であると考えています。

2001年 7月 合志 陽一
 (環境儀第1号「発刊に当たって」より抜粋)



このロゴマークは国立環境研究所の英語文字 N.I.E.S で構成されています。N=波(大気と水)、I=木(生命)、E.Sで構成されるOで地球(世界)を表現しています。ロゴマーク全体が風を切って左側に進むようにする動きは、研究所の躍動性・進歩・向上・発展を表現しています。