

藍藻毒の分析

湖沼の富栄養化によって藍藻が大発生する。いわゆる「アオコ」の発生である。藍藻類のつくる毒素として環状ペプチドのミクロシスチン類、アルカロイドのアナトキシン類やシリンドロスポモプシンなどが飲料水源から検出され、中毒事故の原因となっている。本稿では、最も検出頻度の高いミクロシスチンを中心に藍藻毒の諸性質と分析法ついて解説する。

彼 谷 邦 光

1 はじめに

農業排水，工業廃水，下水処理水といった窒素やリンを含む水が大量に湖沼，内湾などの閉鎖性水域に流入すると，その水域は富栄養化する。淡水湖沼は産業用だけでなく飲料水源としても重要な資源である。人口増加や経済活動の活発化に伴って，湖沼の富栄養化は地球上のすべての地域に及び，富栄養条件を好む有毒な藍藻類が世界中の湖沼で大発生している。藍藻はシアノバクテリア（cyanobacteria）と呼ばれ，大量発生すると水面に水の華（waterbloom）をつくる種がある。この水の華を通称「アオコ」と呼んでいる。また，藍藻類のつくる毒素をまとめてシアノトキシン（cyanotoxin）という場合もある。

淡水産の藍藻類の毒として肝臓毒と神経毒の被害が顕著である。肝臓毒にはミクロシスチンやシリンドロスポモプシン，神経毒にはアナトキシン-a，アナトキシン-a(s)，アフアントキシンなどが知られている。これらの毒素のほか，細胞毒，免疫毒，魚毒など多くの毒素の存在が報告されているが，毒性評価や化学構造が明らかにされているものは少ない。安全な水を確保するために，有毒藍藻の発生を抑える技術や毒素を無毒化する技術の開発が行われているが，水源全域をコントロールすることは難しく，わずかに安全な飲料水を確保しているにすぎない。

WHO は，飲料水中のミクロシスチンの量をミクロシスチン-LR として $1 \mu\text{g}/\text{l}$ 以下にするようにというガイドラインを各国政府に勧告した。ガイドラインの勧告に対応して，ミクロシスチンの分析法の検討が EU を中心にアメリカ，オーストラリアそして日本を巻き込んで進められた。しかし，ミクロシスチン以外の毒素につい

ての国際的な動きはまだない。

2 淡水湖沼の汚濁と有毒藍藻類の発生

湖沼の富栄養化の原因は，a) 生活排水や工業廃水の流入，b) 田畑に施された肥料や家畜の尿尿^{しにょう}の流入，c) 土壌中のリン含有鉱物の分解によるリン酸化合物の流入，等である。湖沼のリン酸濃度が $10 \sim 100 \mu\text{g}/\text{l}$ 近くになると，空気中の窒素を固定する能力のある藍藻類（*Anabaena*, *Costco* など）が大発生するようになる。こうして湖沼水中に窒素化合物である硝酸塩がさらに蓄積される。湖沼のリン酸塩と硝酸塩の濃度がある程度に達すると，窒素固定能を持たない藍藻類（*Microcystis*, *Oscillatoria* など）が大発生するようになる。富栄養化によって，いろいろな種類の有毒アオコが水面を覆いつくすことになる。

3 藍藻毒

水に含まれるなんらかの物質に原因があるとされた奇病のうち，いくつかは有毒藍藻が産する毒が直接の原因であったことが確認されている。たとえば，オーストラリアのパーム島のアボリジニの居住区で発生した肝臓障害の奇病は飲料水用貯水池に発生した *Cyrodospermopsis* の毒素シリンドロスポモプシン（*cylindro-spermopsin*）によるものであった。また，1996年2月にブラジルのカルアリという町で人工透析用の水に混入した *Microcystis aeruginosa* の毒素ミクロシスチン（*microcystin*）で126人が発病し，60人が死亡した。生き残った人も慢性肝臓障害に苦しんでいる。

淡水産の藍藻類の毒として肝臓毒と神経毒の被害が顕著である。肝臓毒には，ミクロシスチン（図1）と呼ばれる7個のアミノ酸からなる環状ペプチドとシリンドロスポモプシン（図2）と呼ばれるアルカロイドがある。また，汽水域の藍藻からはミクロシスチンのほか，ノ

ジュラリン (nodularin) と呼ばれる 5 個のアミノ酸からなる環状ペプチド毒が知られている。神経毒にはアナトキシン-a (anatoxin-a) とアナトキシン-a(s) {anatoxin-a(s)}, アファントキシン (aphantoxin) などのアルカロイドが知られている。これらの毒素のほか、細胞毒、免疫毒、魚毒など多くの毒素の存在が報告されているが、毒性評価や化学構造が明らかにされているものは少ない。

肝臓毒ミクロシスチンは *Microcystis* (*M. aeruginosa*, *M. viridis*, *M. wesenbergii* など), *Anabaena* (*A. flos-aquae*, *A. spiroides* など), *Oscillatoria agardhii*, *Nostoc* などから検出され、熱帯から寒帯に至る広い地域で検出されている。シリンドロスポモプシンは *Cylindrospermopsis raciborskii* から検出され、現在のところ、オーストラリアの亜熱帯地域を中心に検出されているが、世界的に広がりつつあり、日本国内でも検出されている。ノジュラリンは *Nodularia spumigena* から検出されている。

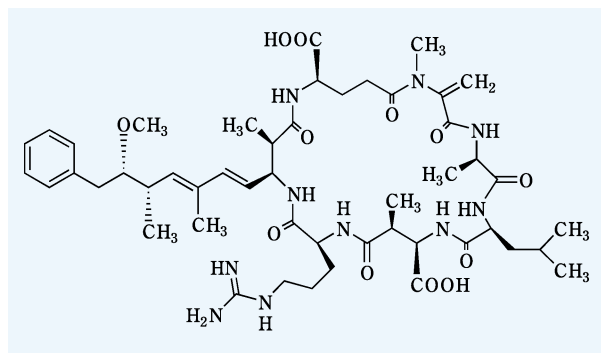


図1 ミクロシスチン-LR

N. spumigena はオーストラリアの汽水域、バルト海で大規模に発生しているが、小規模な発生は世界各地で見られる。アナトキシン類は主に *Anabena flos-aquae* から検出される。*A. flos-aquae* は熱帯から寒帯にかけて発生する。アファントキシンは *Aphanizomenon flos-aquae* の生産する毒素で、亜熱帯から亜寒帯にかけて検出されている。

4 藍藻毒の構造と毒性

世界中で最も頻りに検出される藍藻毒はミクロシスチンである。ミクロシスチンの基本構造は $\text{cyclo}[-(\text{D-Ala}^1)-(\text{L-X}^2)-(\text{D-MeAsp}^3)-(\text{L-Z}^4)-(\text{Adda}^5)-(\text{D-Glu}^6)-(\text{Mdha}^7)-]$ と表される (図3)。X および Z はタンパク質を構成する通常の L 型アミノ酸である。D-MeAsp は D-erythro- β -methylaspartic acid, Mdha は N-methyldehydroalanine である。Adda はミクロシスチンとノジュラリンに特有の β アミノ酸である。X と Z に入るアミノ酸の組み合わせにはロイシン-アルギニン (LR), アルギニン-アルギニン (RR) などがある。このような組み合わせのほかに、メチル基のないものや Mdha の代わりにデヒドロブチリン (dehydrobutyrine, Dhb) が入ったものなどがあり、現在 70 種類近い同族体が確認されている。ミクロシスチンの毒性をマウスの腹腔内投与による半数致死量 (LD₅₀) で表すと、およそ 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, IP (mouse) (腹腔内投与, IP と略す) である。生体内に入ったミクロシスチンの 90% は肝臓に集まり、肝細胞を破壊する。慢性的影響として、肝硬変、肝臓がんや胎児の奇形などが現れる。また、植物の発芽や生育を阻害する。ミクロシスチンは熱に安定であ

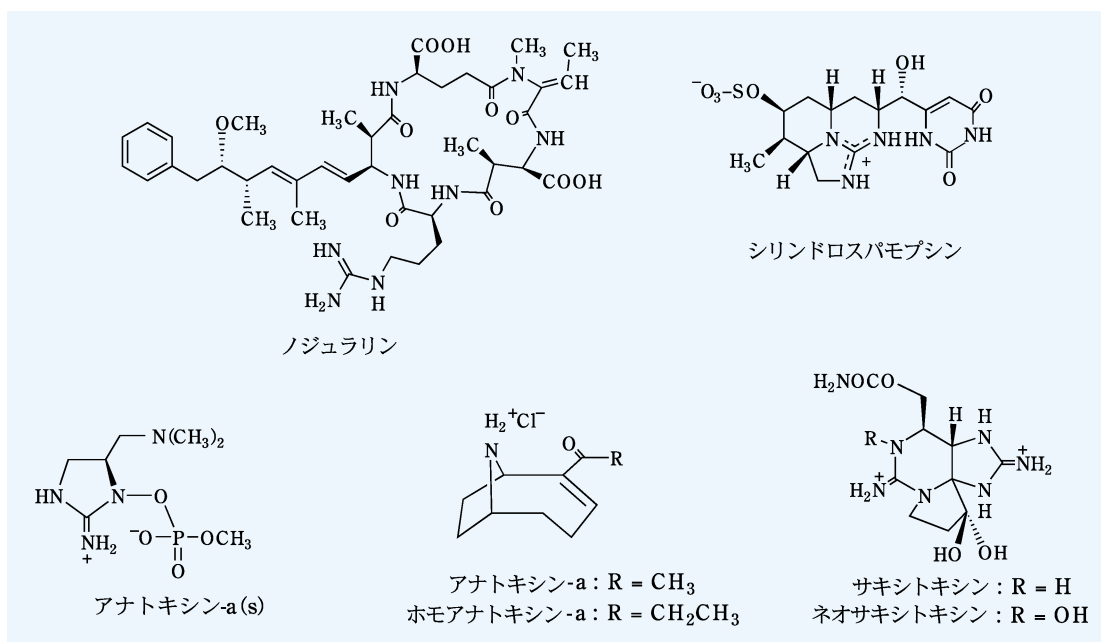


図2 藍藻毒の種類

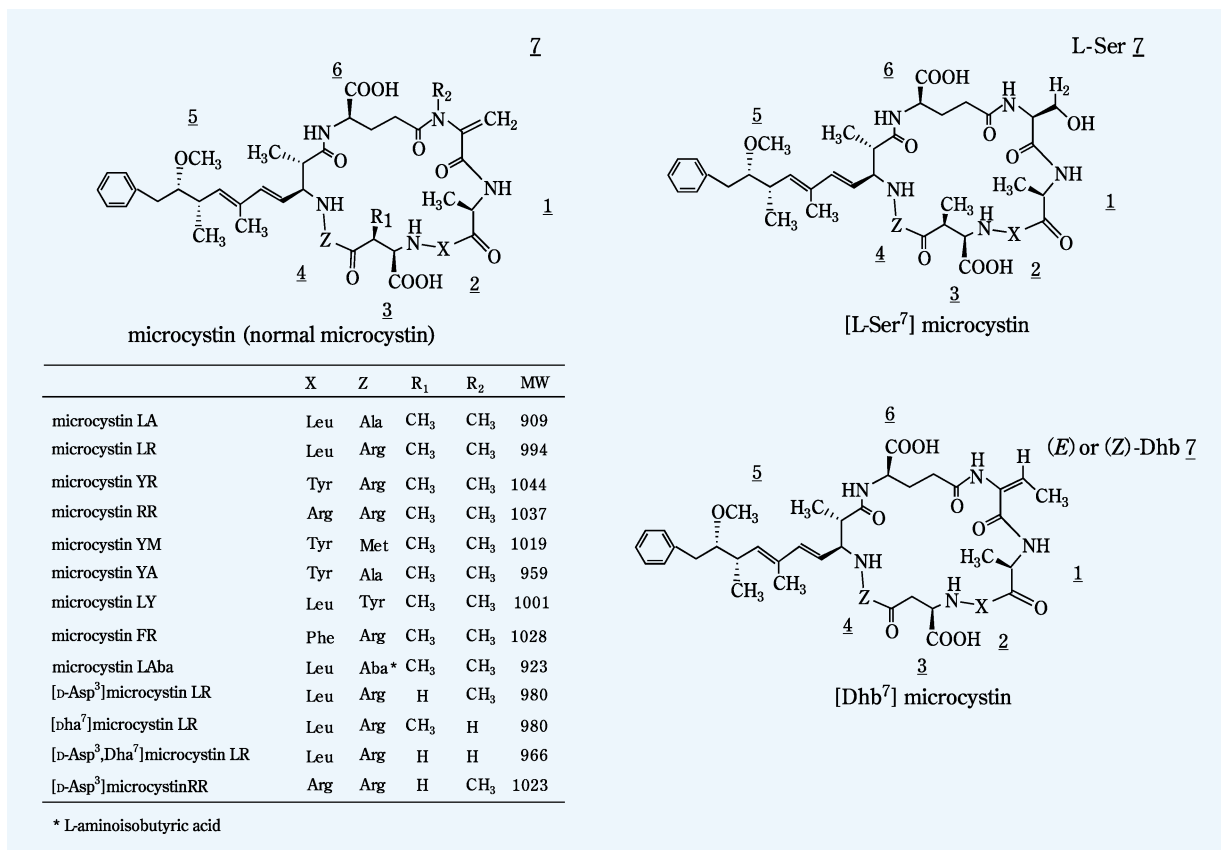


図3 ミクロシスチンの同族体

るが、可視光線や紫外線で幾何異性化や分解が起こり、毒性が消失する。藍藻中のミクロシスチンの含有量は乾燥重量1g当たり、最大量で10mg程度である。毒素は通常細胞内に蓄積され、細胞が破壊されることによって水中に放出される。水中のミクロシスチンはバクテリアによって徐々に分解していく。類似の毒素にノジュラリンがある。肝臓毒には環状ペプチドだけでなく、アルカロイドもある。シリンドロスポモプシンは肝臓でグルタチオンやタンパク質の合成を阻害するアルカロイド毒素として知られている。LD₅₀は200mg/kg (mouse, IP)である。アナトキシン-aと-a(s)は神経毒であり、LD₅₀はそれぞれ200µg/kgと20µg/kgである。アナトキシン-aはアセチルコリンの伝達を遮断し、アナトキシン-a(s)はコリンエステラーゼの活性を阻害することによって毒性を発現する。アナトキシン-a(s)の毒性は毒ガスのサリンと全く同じであり、毒性の強さも同じである(表1)。アファントキシンはネオサキトキシンとサキトキシンの混合した毒で、通常10:1の割合でネオサキトキシンが多い。毒性はフグ毒のテトロドトキシンと同じく神経伝達を遮断することによって発現する。

5 ミクロシスチンの分析法

ミクロシスチンの飲料水中のガイドラインとして

表1 シアノトキシンと毒物の急性毒性の比較

シアノトキシン および毒物	LD ₅₀ (µg/kg)	備考
パリトキシン*1	0.15	マウスに投与
2,3,7,8-TCDD*2	0.6	モルモットに経口投与 マウスでは274µg/kg
テトロドトキシン*3	8	マウスに投与
サリン	17	ウサギに投与 マウスでは170µg/kg
アナトキシン-a(s)	20	マウスの腹腔に投与
ミクロシスチン-LR	100	マウスの腹腔に投与
アナトキシン-a	200	マウスの腹腔に投与
シアン化ナトリウム	2200	ウサギに投与

下線は合成化合物。*1: イソギンチャク毒素, *2: 最も毒性の強いダイオキシン, *3: フグ毒。

WHOはミクロシスチン-LRとして1µg/lの値を各国政府に勧告している。このことはミクロシスチンの量を正確に計測する必要があることを示している。ここではミクロシスチン同族体を含めた“総ミクロシスチン量”を求めるといった観点にたって話を進めたい。

5.1 HPLC¹⁾

藍藻毒の一般的な高感度な分析法としてはLC/MSがあるが、すべての藍藻毒に対して必ずしも定量性が良

いわけではない 後述。また、藍藻毒の問題が多発する開発途上国では、設備的に難しい場合もある。

マイクロシチンには70種類以上の同族体がある。通常、シアノバクテリアでは、3~5種類のマイクロシチンで全マイクロシチンのおよそ80%を占めているが、残りの20%に5~8種類のマイクロシチンが含まれている。

最近の考え方では、すべてのマイクロシチンを毒性の最も強いマイクロシチン-LRとみなす方法、つまり「マイクロシチン-LR換算当量」という表記が求められている。従って、マイクロシチン-LR換算当量を求めるにはすべてのマイクロシチンを測定することが必要になる。しかし、小さなマイクロシチンのピークは定量しにくいし、もっと小さなピークは見落とすことになる。つまり、すべてのマイクロシチンを測定しているとは言えないということである。従って、マイクロシチン-LR換算当量を求めるための全マイクロシチン量を高速液体クロマトグラフ/紫外線(UV)検出器で求めるのは良い方法とは言えないことになる。UV検出器の代わりに質量分析計(MS)を用いた場合は検出感度が上がるが、基本的な点はUV検出器を用いた場合と同じである。

5.2 ELISA法²⁾

全マイクロシチンを測る方法として、マイクロシチン同族体に共通して存在し、部分構造が変わらないユニットを測定することが試みられている。その一つは抗体を用いる方法で、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, 酵素結合免疫吸着検定法の意味)と呼ばれている。測定法については別の書を参照していただくとして、まずマイクロシチン-LRの抗体ができやすいように、マイクロシチン-LRをタンパク質に結合させてハプテン抗原を作製する。できてきた抗体はマイクロシチン-LRに対して最も反応性が高いのは予想どおりである。その抗体の中から、いくらマイクロシチンの共通部分だけを認識する抗体を選抜しようとしても、マイクロシチン同族体に均一な反応性を示す抗体は得られていない。おそらく、水溶液中のマイクロシチン同族体の立体構造がそれぞれ少しずつ異なっているためではないかと考えられている。マイクロシチン-LRを抗原としてつくられた抗体のマイクロシチン-LRに対する結合の強さを100とすると、マイクロシチン-RRに対しては109、マイクロシチン-YRに対しては80、マイクロシチン-LAに対しては30というように、同族体の種類によって結合の強さが異なる。また、マイクロシチンがないにもかかわらず、ある類似構造をもつ物質が抗体に結合するという事も起きる。つまり、正確に濃度が測定できないことになる。しかし、この方法はスクリーニング法としては他の方法と同じく有効である。

5.3 プロテインホスファターゼアッセイ (protein phosphatase assay)

マイクロシチンの毒性は肝細胞のプロテインホスファターゼという酵素を阻害することによって発現する。このことを利用して、マイクロシチンを定量する方法がある³⁾。

この方法は、水中でプロテインホスファターゼを阻害する物質はマイクロシチンだけであるという仮定の上に成り立っている。マイクロシチンの同族体に対しては比較的一定した阻害活性がみられている。しかし自然界には、毒性がないにもかかわらずプロテインホスファターゼを阻害する物質がいくつも見つかっている。例えば、ノストサイクリンという環状ペプチドはマイクロシチンと類似の物理化学的性質を持っているが、毒性はない。しかし、プロテインホスファターゼを阻害する。阻害活性はマイクロシチンの1/100程度であるが、ノストサイクリンの細胞内濃度は100倍以上あるから、無視できない活性を示すことになる。毒性がないのになぜプロテインホスファターゼを阻害するのかと不思議に思われるかもしれないが、ノストサイクリンは細胞の中に入れないので、生体ではプロテインホスファターゼと接触する可能性がないのである。しかし、試験管内(*in vitro*)ではシアノバクテリアの細胞抽出液と酵素を混ぜるので酵素を阻害するのである。従って、マイクロシチンを正確に測定するという目的からはこの酵素阻害活性法も有効ではないということになる。

5.4 MMPB法⁴⁾⁵⁾

マイクロシチン同族体に共通した部分として Adda と呼ばれているユニットがある。このユニットには二重結合が二つ続いた部分(共役二重結合)がある。この部分を過マンガン酸カリウムと過ヨウ素酸ナトリウムの混合液中室温で2~4時間かけて酸化分解すると、2-メチル-3-メトキシ-4-フェニル酪酸(MMPB)と呼ばれる物質が生成する(図4)。このMMPBをGC/MSやLC/MSで測定することによって、全マイクロシチンを測定する方法が提唱されている。この方法の場合、微量の同族体があっても見落とす心配はない。気になる問題点は、酸化分解によるMMPBの回収率が65%~80%と分析者によって変動する点である。

5.5 GSH付加法⁶⁾

マイクロシチンによる被害が多発している発展途上国では、大学や国の研究機関でさえGC/MSやLC/MSがないことが多い。まして、マイクロシチンの測定が必要な保健所や水道水検査所に高価な大型分析機器などあるはずがない。しかし、最もマイクロシチンの分析が必要なのはこれらの現場機関である。そこで、分析機器がなくても、感度よくマイクロシチンを分析でき、しかも

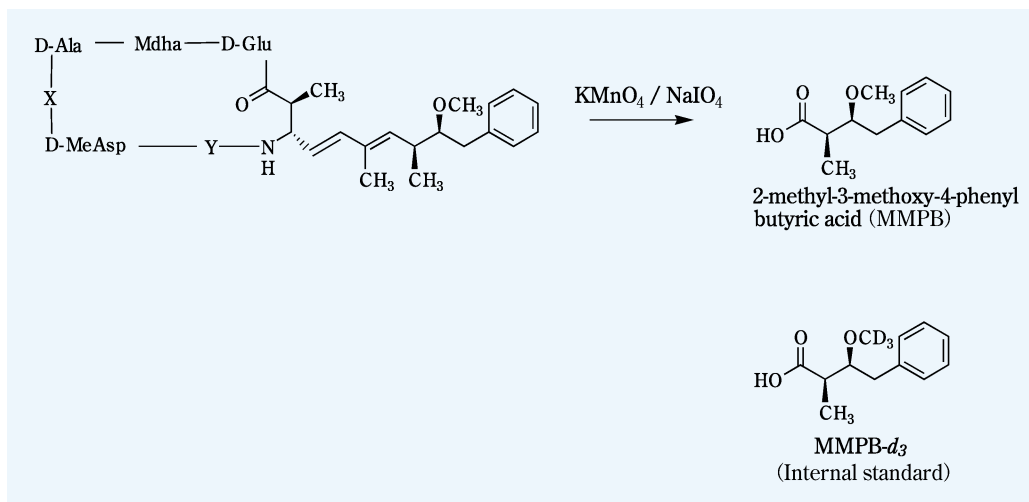


図4 総マイクロシスチン定量のための MMPB の調製

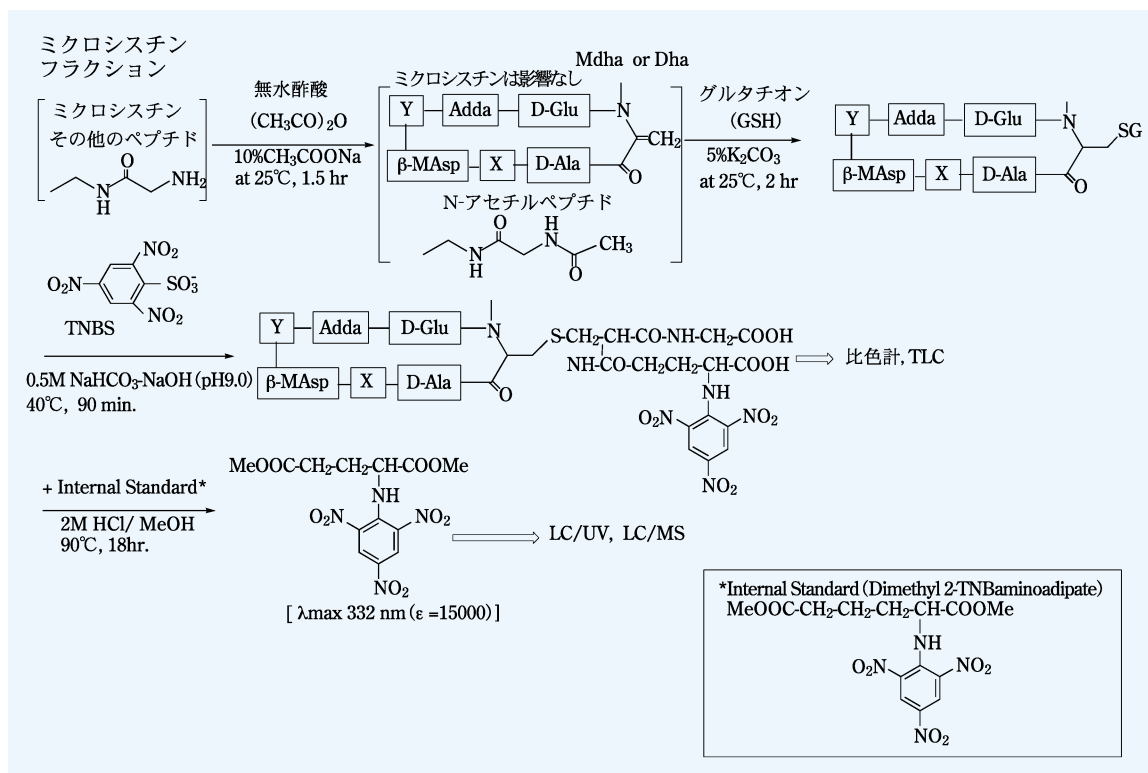


図5 グルタチオン (GSH) 付加法によるノーマルマイクロシスチンの定量法の概略

LC/MS とモクロスチェックできる方法が模索された。検討の結果、第7アミノ酸のデヒドロアラニンの二重結合にグルタチオン (GSH) を求核反応させて、マイクロシスチン-GSH 付加体とし、GSH のアミノ基にトリニトロベンゼンスルホン酸を作用させ、マイクロシスチンを可視化した (図5)。この状態で、比色や薄層クロマトグラフィー (TLC) でマイクロシスチンを識別できるが、マイクロシスチン全量を測定するために、これを塩酸-メタノールでメタノリシスして生成する *N*-(トリニトロベンゼン) グルタミン酸ジメチルエステルを定量す

る。定量は比色法や蛍光剤入りの TLC プレート/UV で可能であり、同一の試料を用いて LC/MS で測定できる。一方、マイクロシスチンのスクリーニング法として、トリニトロベンジル化したマイクロシスチン-GSH 付加体を蛍光剤入り TLC で展開することにより、高感度検出ができる。欠点は全種類のマイクロシスチンにこの方法を適用できないことである。これまで世界各地で検出されたマイクロシスチンの 99% 以上は 7 番目のアミノ酸がデヒドロアラニン (Dha) のノーマルマイクロシスチンであるが、バルト海周辺諸国やイギリスでしばしば Dha

の代わりにデヒドロブチリン { Dhb, dehydrobutyrine (2-aminobutyric acid) } を持つマイクロシスチンが検出される。また, Dha の代わりに L-セリン (Ser) が入ったマイクロシスチンも極希に同定される (図 3)。Dhb や Ser は GSH と反応できないので, この方法からもれることになる。しかし, これまでのところ, アジア・太平洋地域の試料から Dhb や Ser の入ったマイクロシスチンは検出されていない。

6 その他の藍藻毒とそれらの分析法

6.1 アナトキシン-a とアナトキシン-a(s)

アナトキシン-a は低分子アルカロイド (Mw, 165) で, その構造は 2-acetyl-9-azabicyclo [4.2.1] non-2-ene である。アナトキシン-a はアナベナだけでなく, 糸状藍藻からも検出される。同族体にアセチル基がプロピオニル基になったものが報告されている。分析は N-アセチル体⁷⁾の GC/MS, GC/ECD, LC/UV, LC/MS などで行われている。

アナトキシン-a(s) は cyclic N-hydroxyguanine のリン酸エステルである。LC/MS で分析した例があるだけで, ほかの方法は見当たらない。

6.2 シリンドロスパモプシン

シリンドロスパモプシンはグアニジルアルカロイドの硫酸エステルである。分析は LC/UV または LC/MS が主な方法⁸⁾であるが, 定量法に使える分析法はまだない。

6.3 アファントキシン (サキシトキシン)

アファントキシンはネオサキシトキシンとサキシトキシンの混合物に付けられた名前である。サキシトキシンは古くから知られている神経毒の一種であり, 分析法も多くある。主な方法として LC で分離した後に発色させるポストカラム法と色素を結合させてから LC で分析するプレカラム法⁹⁾がある。また, LC/MS もよく用いられている。LC の場合, イオン化法によって感度がかなり変動する。

6.4 その他の毒素

Microcystis の細胞壁にリポポリサッカライドがあることが知られている。これは多くの病原菌の内毒素と同じ成分である。また, *Cyaneochoccus* sp. にはチオンスルホリピドと呼ばれる糖脂質があり, 分解すると硫化水素を発生する。これらの他に皮膚に炎症を起こす毒素や魚毒なども知られている。詳しくは下記の藍藻毒の参考書を

参照されたい。

7 おわりに

WHO は飲料水中のマイクロシスチンの量をマイクロシスチン-LR として 1 µg/l 以下にするようにというガイドラインを各国政府に勧告した。この値は大人が 1 日 2 l の水を生涯にわたって飲み続けてもマイクロシスチンの影響が出ない濃度ということであるが, データがまだ十分に蓄積されていないという理由でマイクロシスチンの助がん作用のファクターは除かれている。将来, このファクターが加味されると, ガイドラインの値はもう一桁下がると予想されている。

文 献

- 1) L. A. Lowton, C. Edwards, G. A. Codd : *Analyst*, **119**, 1525 (1994).
- 2) S. Nagata, H. Soutome, T. Tsutsumi, A. Hasegawa, M. Sekijima, M. Sugamata, K. Harada, M. Sukanuma, Y. Ueno : *Natural Toxins*, **3**, 78 (1995).
- 3) T. W. Lambert, M. P. Boland, C. F. B. Holmes, S. E. Hurdey : *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 753 (1994).
- 4) T. Sano, K. Nohara, F. Shiraiishi, K. Kaya : *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **49**, 163 (1992).
- 5) K. Kaya, T. Sano : *Anal. Chim. Acta*, **386**, 107 (1999).
- 6) K. Kaya, T. Sano, H. Inoue, H. Takagi : *Anal. Chim. Acta*, **450**, 73 (2001).
- 7) C. Edwards, K. A. Beattie, C. M. Scrimgeour, G. A. Codd : *Toxicol.*, **30**, 1165 (1992).
- 8) R. Li, W. W. Carmichael, S. Brittan, G. K. Eaglesham, G. R. Shaw, A. Mahakhant, N. Noparatnaraporn, W. Yongmanichai, K. Kaya, M. M. Watanabe : *Toxicol.*, **39**, 937 (2001).
- 9) Y. Oshima : “*Manual on Harmful Marine Microalgae*”, Edited by M. G. Hallegraeff, D. M. Anderson, A. D. Cembella, p. 81 (1995), (IOC Manuals and Guide No. 33).

藍藻毒についての参考書

- 彼谷邦光 : “有毒シアノバクテリア” (2001), (裳華房)
- 彼谷邦光 : “環境のなかの毒” (1995), (裳華房)
- 渡辺真理代, 原田健一, 藤木博太編 : “アオコ その出現と毒素” (1996), (東京大学出版会)



彼谷邦光 (Kunimitsu KAYA)

独立行政法人国立環境研究所環境研究基盤技術ラボラトリー (〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2)。東北大学大学院博士課程修了。農学博士。現在の研究テーマ 藍藻毒の化学と分析法の開発など。

主な著書 “有毒シアノバクテリア” (裳華房)。趣味 岸壁での五目釣り。

E-mail : kayakuni@nies.go.jp