ラン藻が生産する発がんプロモーターマイクロシスチンの 分析法に関する研究

近 藤 文 雄

愛知県衛生研究所, 〒462-8576 名古屋市北区辻町字流 7-6

Total Analysis System for Tumor Promoter Microcystins Produced by Cyanobacteria

Fumio KONDO

Aichi Prefectural Institute of Public Health,
7-6 Nagare, Kita-ku, Nagoya 462-8576, Japan

(Received September 7, 1999)

Microcystins, produced by freshwater cyanobacteria, are cyclic peptide hepatotoxins and tumor promoters. An outbreak of human poisoning attributed to microcystins has been reported in Caruaru, Brazil in 1996, where exposure through renal dialysis led to the death of 50 patients. Although such severe acute effects on human health seem to be rare, microcystins poses problems to human health which could result from low-level, chronic exposure to microcystins in drinking water. It is therefore important to monitor the levels of microcystins in water reservoirs where cyanobacterial blooms occur. We have developed a total analysis system for microcystins using GC-MS and LC-MS. This comprises initial screening of samples to check for the presence of microcystins by detecting 2-methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric acid as an ozonolysis product using thermospray interface LC-MS and electron ionization/GC-MS. If a sample is positive in a screening test, it will be necessary to follow through with identification and quantification. Frit-FAB interface LC-MS allowed the rapid identification of microcystins in cyanobacteria and lake water, and also enabled us to identify microcystins and their metabolites formed *in vivo* in mouse liver. Finally, Frit-FAB/LC-MS using selected ion monitoring could be used for quantitative analysis of microcystins in lake water in the low nanogram range. The total analysis system proposed in the present study should be applicable to studies of the metabolism of microcystins, of their detoxification, and those of the mechanism(s) of the accumulation in the food chain.

Key words—microcystin; tumor promoter; cyanobacteria; GC-MS; LC-MS

1. はじめに

マイクロシスチンは、富栄養化の進行した湖沼等で見られる *Microcystis* 属などの淡水産ラン藻、いわゆる「アオコ」が生産する環状ペプチドで、3種のD-アミノ酸 (β -MeAsp, Glu, Ala), 炭素20個を有する β -アミノ酸(3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid, Adda), 不飽和アミノ酸である *N*-methyldehydroalanine (Mdha) を共通骨格とし、その他に成分により変化する2種のL-アミノ酸 (R_1, R_2) を含む環状ヘptaペプチドである (Fig. 1).¹⁾ 通常、本化合物の命名は2種のL-アミノ酸を一字表示接尾辞として用いて、例えばそれらがロイシン (Leu) とアルギニン (Arg) であれば「マイクロシスチン-LR」などと記す。マイクロシスチンの構造の違いは主にこの2種のL-アミノ酸の変化によるが、部分的に構造が修飾されたものを含めると約60種の成分が報告されている。²⁾

マイクロシスチンは、強力な肝毒性(急性毒性)と発がんプロモーション作用(慢性毒性)を併せ持つ化合物である。³⁾ 本化合物が原因で馬や牛といった大型動物が死亡する事件は世界各地で発生しているほか、⁴⁾ ブラジルでは1996年2月に、人工透析の際にマイクロシスチンに汚染された水を使用したことが原因で、50人が死亡する事件が発生した。⁵⁾ 一方、日本国内でも、飲料用水源として利用されている琵琶湖、霞ヶ浦、津久井湖などの湖沼で有毒アオコの出現が確認されており、人への健康影響が危惧されている。⁶⁾ 世界保健機関 (World Health Organization, WHO) は98年3月、飲料水中のマイクロシスチンの暫定ガイドライン値(マイクロシスチン-LRとして0.001 mg/l)を設定し、⁷⁾ これを受けて我が国の厚生省も水質基準設定に向けた検討を行っている。このように、マイクロシスチンは我々の身近に存在する極めて有害な化合物であり、マイクロ

シスチンによる被害を未然に防止するためには、水環境中のマイクロシスチンの存在量を把握することが重要となってくる。そのためには、マイクロシスチンを簡便、迅速にかつ精度よく分析できる方法が必要である。

マイクロシスチンの分析法に関しては、これまでに種々方法が開発されており、それらは生物学的手法、生化学的手法及び物理化学的手法に大別することができる。⁸⁾ 生物学的手法としては、種々の無脊椎動物やマウスを用いたバイオアッセイ、⁹⁾ また、生化学的手法としてはマイクロシスチンのプロテインフォスファターゼ阻害活性を利用したフォスファターゼアッセイ法、¹⁰⁾ 抗原抗体反応を利用した酵素免疫吸着測定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法¹¹⁾などが挙げられる。物理化学的手法としては、高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC)、¹²⁾ 質量分

析 (mass spectrometry, MS)、¹²⁾ 核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance, NMR) 法¹³⁾及びマイクロシスチンを酸化的に分解した際に生成される Adda 由来の分解物 3-methoxy-2-methyl-4-phenylbutyric acid (MMPB) を検出する方法などが挙げられる。¹⁴⁾ これらの方法を検出感度と選択性の面から比較した図を Fig. 2 に示した。生化学的手法 (フォスファターゼアッセイ及び ELISA 法) は検出感度に優れているが、多種存在するマイクロシスチンの成分を区別して検出することができないため、選択性が乏しいという欠点がある。一方、物理化学的手法は選択性に優れているが、フォスファターゼアッセイや ELISA 法に比べて感度の面で劣っているほか、分析に要する時間が長いという問題点がある。

本研究では、ガスクロマトグラフィー (gas chromatography, GC)、HPLC と MS を直結した GC-MS 及び LC-MS 法を用いた、マイクロシスチンの総合的な分析システムの確立を目的として検討を行った。その結果、マイクロシスチンの存在の有無を簡便かつ迅速に調査するためのスクリーニング法と、迅速な同定と正確な定量法を確立したので、その結果について概略を述べる。

2. オゾン酸化を利用したマイクロシスチンのスクリーニング法¹⁵⁾

マイクロシスチンのスクリーニング法としては、バイオアッセイ、⁹⁾ フォスファターゼアッセイ法、¹⁰⁾ ELISA 法¹¹⁾及び MMPB を検出する方法¹⁴⁾が開発されている。しかし、バイオアッセイは感度が悪く、しかも生体間の感受性に差異があり信頼性に欠けるという欠点がある。フォスファターゼアッセイ及び ELISA 法は、pg オーダーでの高感度検出が可能であるが、前者はプロテインフォスファターゼ阻害活性を有する他の化合物、いわゆる「オキサダクラス」化合物がすべて検出されること、また後者は使用する抗体の交差反応性の違いにより検出されない成分があるなどの問題が指摘されている。

一方、MMPB を検出する方法は、フォスファター

	R1	R2	R3	R4	MW
microcystin-LA	Leu	Ala	CH ₃	CH ₃	909
microcystin-LR	Leu	Arg	CH ₃	CH ₃	994
microcystin-YR	Tyr	Arg	CH ₃	CH ₃	1044
microcystin-RR	Arg	Arg	CH ₃	CH ₃	1037
microcystin-YM	Tyr	Met	CH ₃	CH ₃	1019
[D-Asp ³]microcystin LR	Leu	Arg	H	CH ₃	980
[Dha ⁷]microcystin LR	Leu	Arg	CH ₃	H	980

Fig. 1. Structural Variations of Microcystins Isolated to Date

The most frequently found variants are shown in the table.

Fig. 2. Relationship between Sensitivity and Selectivity of Analytical Methods for Microcystins

Fig. 3. (a) Structures of MMPB and (b) 4-PB, (c) TSP/LC-MS SIM Chromatograms of the Reaction Solution Obtained by the Ozonolysis of a *Microcystis aeruginosa* Strain K-139 Isolated from Lake Kasumigaura (Ibaraki Prefecture Japan)

TSP/LC-MS analysis conditions are as follows: HPLC: column, Cosmosil 5C18AR (150×4.6 mm); mobile phase, methanol:0.5 M ammonium acetate (4:6); flow rate, 1.0 ml/min. MS: interface, Shimadzu TSP-100; control temperature, 170°C; tip temperature, 217°C; block temperature, 158°C; tip heater temperature, 169°C; SIM, m/z 226 ($M+NH_4^+$, MMPB) and 182 ($M+NH_4^+$, 4-PB). (Reprinted with permission from *Toxicon*, 1996, 34, 701–710. Copyright 1996 Elsevier Science.)

ゼアッセイ及び ELISA 法に比べて検出感度は劣っているが、マイクロシスチンに共通の構成アミノ酸である Adda 由来の分解物 MMPB を検出することから、マイクロシスチンの選択的なスクリーニングが可能である。しかし、この方法は、抽出、クリーンアップ、酸化分解、後処理、生成した MMPB の誘導化などの煩雑な操作を必要とするため、これらの操作を完了するのに約 1 日を必要としていた。そこで、抽出、クリーンアップなどの操作を行うことなく、MMPB を短時間で効率的に生成させるために、オゾン分解の適用を検討した。さらに、生成した MMPB を誘導化することなく、直接選択イオン検出 (selected ion monitoring, SIM) による thermo-spray (TSP)/LC-MS 及び electron impact ionization (EI)/GC-MS で検出する方法を検討した。

オゾンは強力な酸化剤で、炭素間不飽和結合、特に、二重結合及び芳香環を開裂させる。したがって、Adda の C-6 と C-7 の間の二重結合が容易に開裂して、MMPB (Fig. 3a) を高収率で生成することが期待された。そこで、凍結乾燥したアオコ及び培養株 (数 mg 程度) を 20 ml の試験管にとり約 2 ml のメタノールに懸濁させた後、ドライアイス-アセトン溶液で -78°C に冷却し、反応液が舞い上がらないよう流量を調節しながら約 10% の濃度のオゾンを 5 分間通じたところ、反応液が薄紫色に変わり、オゾンが過剰になったことを示した。またこの時、ラン藻の緑色が消失することで、反応終点を容易に判断することができた。その後、窒素ガスを同様に流量を調整しながら 1.5 分通すことにより過剰のオゾン除去し、反応液を直接 TSP/LC-MS 及び EI/GC-MS 分析に供した。分析には、長野県の諏訪湖及び福井県の三方湖で 1988—1994 年にかけて採取

したアオコ 7 検体、茨城大学農学部の白井教授から供与された培養株 *Microcystis aeruginosa* K-139 (茨城県の霞ヶ浦のアオコから単離)、及びオーストラリア南東部ニューサウスウェールズ州の Malpas Dam で採取され、Australian Centre for Water Quality Research の B. C. Nicholson 博士より供与されたアオコを使用した。

TSP 法は、イオン化が常に一定ではなく再現性のある分析結果を得ることが比較的困難であるため、内部標準物質としてマイクロシスチンに構造の類似している 4-phenylbutyric acid (4-PB) (Fig. 3b) を一定量添加して分析を行った。測定対象物は、TSP 条件下においてアンモニウム付加のイオンを生成するため、MMPB を m/z 226 で、4-PB を m/z 182 でモニターする SIM 測定を行った。Fig. 3c に、霞ヶ浦で採取されたアオコから単離された *Microcystis aeruginosa* の培養株 K-139 の分析結果を示したが、保持時間約 6 分に MMPB のピークが検出された。使用した HPLC 条件下では、MMPB と 4-PB は完全に分離されていないが、SIM クロマトグラム上では良好に分離、検出されている (Fig. 3c)。また、内部標準物質 4-PB による補正を行うことにより検量線は良好な再現性を示し、これを用いて総マイクロシスチン量の定量を行った。その結果、本株中の総マイクロシスチン量は、1 mg 中 8.8 nmol マイクロシスチン-LR 相当量 (検出された MMPB の量から算出される総マイクロシスチン量を、マイクロシスチン-LR に換算した量) と定量された。この結果を含め、諏訪湖及び三方湖で採取したアオコ中のマイクロシスチン量を定量した結果は、HPLC 法を用いて定量した結果と良好に一致することが明らかとなった。

Fig. 4. (a) Assignments of Fragment Ions at m/z 176 and 117 Observed in the EI Mass Spectrum of MMPB, (b) EI/GC-MS SIM Chromatograms of the Reaction Solution Obtained by the Ozonolysis of a Bloom Sample Collected from Malpas Dam in Australia

EI/GC-MS analysis conditions are as follows: GC: column, FFAP (15 m $\times$ 0.53 mm, J&W Scientific); oven temperature, 200°C; carrier gas, He; flow rate, 10 ml/min. MS: separator temperature, 250°C; EI voltage, 70 eV; accelerating voltage, 3 kV; switching time, 100 ms; SIM, m/z 176 and 117.

(Reprinted with permission from *Toxicon*, 1996, 34, 701–710. Copyright 1996 Elsevier Science.)

次に、EI/GC-MSによるMMPBの検出を試みた。試料としては従来法（UV検出によるHPLC法）ではマイクロシスチンが検出されていなかったオーストラリアで採取されたアオコを使用した。EIマスペクトル上、MMPBの分子イオン (m/z 208) は観察されず、代わりに m/z 176 と 117 のフラグメントイオン (Fig. 4a) が強く観察されたため、これらのイオンをモニターするSIM測定を行った。その分析結果を Fig. 4b に示した。保持時間4分にMMPBのピークが検出され、マイクロシスチンの存在が確認されるとともに、検量線を用いて定量を行ったところ、アオコ1 mg中に1.5 nmolのマイクロシスチン-LR相当量が含まれていることが明らかとなった。この量は、理論的には従来からの検出法であるHPLC法あるいは後述するFrit-FAB/LC-MS法で十分検出可能な量であるが、この検体からはマイクロシスチンは検出されていなかった。その原因としては、この試料は疎水性の高いマイクロシスチンを主に含んでいたため、5%酢酸を抽出溶媒として用いる従来法¹²⁾では抽出されていなかったこと、あるいは、マイクロシスチン-LRに代表される通常の成分と比較して、その保持時間が極端に長く、はっきりとしたピークとして検出することが困難であることなどが考えられる。

以上、オゾン酸化法は、抽出、クリーンアップ等の操作を行う必要がないため、MMPBをわずか5分で生成させることができ、また、生成したMMPBを誘導化することなく直接TSP/LC-MS及びEI/GC-MSで検出することが可能であった。このため、従来法ではマイクロシスチンの酸化分解からスクリーニングまでを約1日で行っていたものが、本法では約30分と大幅に短縮することができた。また本法は、マイクロシスチンのスクリーニングとともに、その正確な定量も可能であることが明らかと

なった。

3. Frit-FAB/LC-MSによるマイクロシスチンの分離、同定^{16–18)}

スクリーニングの結果、マイクロシスチンの存在が確認された場合には、試料中にどの成分が含まれているかを決定すること、すなわち同定を行う必要がある。最も一般的な方法はHPLCによる保持時間を標品のそれと比較することであるが、多数存在するマイクロシスチンの標品を手に入れることは困難であることが多い。¹²⁾ 最近では、HPLCとフォトダイオードアレー検出器の組み合わせにより、検出されるピークのUVスペクトルでマイクロシスチンを同定する試みも報告されている。¹⁹⁾ しかし、得られるUVスペクトルだけでは各成分を区別することができず、必ずしも同定することはできない。したがって、従来法では、ラン藻を抽出、クリーンアップして得られたマイクロシスチン画分をシリカゲルクロマトグラフィーにより分離、精製し、純粋なマイクロシスチンを取得した後MSやNMRで同定を行っていた。¹²⁾ しかし、この方法でマイクロシスチンを同定するためには10日間程かかり、多くの時間を必要とするばかりでなく、試料量もgオーダーを必要としていた。さらに、水中のマイクロシスチンを同定する場合には、含まれている量が極めて微量なため、上述したような一連の精製過程を踏むことができないという問題点が指摘されていた。そこで、ラン藻及び水中のマイクロシスチンを迅速に分離同定することを目的として、Frit-FABをインターフェースに用いるLC-MS法の適用を検討した。

3-1. Frit-FAB/LC-MS分析条件の確立^{16, 17)}

従来、マイクロシスチンのHPLC分析には、分離カラムにC18、移動相に有機溶媒（メタノールあるいはアセトニトリル）と水溶液（酢酸アンモニウム、トリフルオロ酢酸、硫酸ナトリウムあるいはリン酸

緩衝液)の混合溶媒が使用されてきた。¹²⁾ 一方, Frit-FAB/LC-MS に使用できる移動相は, 不揮発性の塩が含まれていないことが必須条件である. このような観点から, 日本の湖沼で発生するアオコから普遍的に検出される3つの成分である, マイクロシスチン-RR, -YR, -LR を分離できるHPLC条件を検討し, 以下に示す条件を設定した.

カラム; Chromatorex ODS (5 μ m, 250 $\times$ 4.0 mm i. d.),

移動相; メタノール:0.05% トリフルオロ酢酸水溶液=63:37

流速; 0.5 ml/min

検出; 238 nm

さらに, FAB イオン化にはマトリックスが必要であることから, 最も一般的に用いられているグリセリンを移動相に添加して, 上記3種のマイクロシスチン混合物の Frit-FAB/LC-MS 分析を行った. その結果, トータルイオンクロマトグラム (total ion chromatogram, TIC) 上, 3つの成分が良好に分離, 検出された (Fig. 5a). また, 各成分のピークトップ

付近のマススペクトルの分子イオン領域には, プロトン化分子, $[M+H]^+$ (マイクロシスチン-RR: m/z 1038, -YR: m/z 1045, -LR: m/z 995) が明瞭に認められた (Fig. 5b). また, これらの $[M+H]^+$ でモニターしたマスクロマトグラムでも各成分が良好に分離, 検出された (Fig. 5a). なお, マイクロシスチンには毒性を示さない幾何異性体が微量に存在することが報告されているが,²⁰⁾ 本分析により, 各成分の幾何異性体 (RR-s, YR-s, LR-s) がマスクロマトグラム上で分離, 検出された.

ところで, マイクロシスチンは環状ペプチドであるため, FAB マススペクトルの m/z 200 以上の高質量領域にはペプチドの配列を示すフラグメントイオン (配列イオン) はほとんど出現していない (Fig. 5b). このため, Namikoshi らは MS/MS 法を用いて構造情報を含んだフラグメントイオンを生成させ, 種々のマイクロシスチンの構造解析を行っている.¹³⁾ 一方, Frit-FAB/LC-MS 法は, コンピュータによるデータ処理を行うことにより, 移動相に添加したマトリックスに由来するバックグラウンド

Fig. 5. Frit-FAB/LC-MS Analysis of a Mixture of Purified Microcystins-LR, -YR and -RR

(a) TIC and mass chromatograms at m/z 995, 1045, 1038 and 135. (b) Frit-FAB/LC-MS mass spectra of microcystins-LR, -YR and -RR. Expanded lower mass region at m/z 40–200 of microcystin-RR is shown below the mass spectrum. (c) Structure of fragment ion at m/z 135 derived from Adda. Frit-FAB/LC-MS analysis conditions are as follows: HPLC: column, Chromatorex ODS (5 μ m, 250 $\times$ 4.0 mm i.d.); mobile phase, methanol:0.05% trifluoroacetic acid (63:37) containing 0.8% glycerol; flow rate, 0.5 ml/min. MS: ion source, Frit-FAB; primary beam, Xe⁰; accelerating voltage, 5 kV (primary), 3 kV (secondary); scan range, m/z 40–1500; cycle time, 6.5 s; split ratio, 4/500.

(Reprinted with permission from *Toxicon*, 1992, 30, 227–237. Copyright 1992 Elsevier Science.)

イオンを消去でき、得られるマスペクトル上に試料に由来するイオンのみを呈示することができる。 m/z 200 以下の低質量領域にはいくつかのフラグメントイオンが観察され (Fig. 5b), このうち, 3 種のマイクロシスチンに共通して強く観察されている m/z 135 のイオンは, Adda の C-8 と C-9 位で開裂して生成するイオンと帰属されている (Fig. 5c).¹³⁾ このイオンでモニターしたマスキロマトグラムでは, 各成分のピークが確実にしかも高感度に検出されている (Fig. 5a). Adda はごく一部を除き, マイクロシスチンに共通の構成アミノ酸であることから,²⁾ このイオンをモニターするマスキロマトグラムは, マイクロシスチンのみを選択的に検出できると考えられた。

さらに, マイクロシスチン-RR の FAB マスペクトルを例として, その低質量領域 (m/z 40—200) を拡大したスペクトルを Fig. 5b に示したが, m/z 70 及び 112 のイオンが強い強度で観察されている。これらは, アルギニンのインモニウムタイプのイオン, $\text{H}_2\text{N}^+=\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHC}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ からさらにアンモニアあるいはグアニジル基が脱離して生成した環状のインモニウムイオンである。¹⁷⁾ 現在

までに報告されているマイクロシスチンの中で, アルギニンを含む成分は極めて多く, これらのイオンの出現の有無は, 同定を行う際の重要な情報となると考えられる。

以上の結果から, Frit-FAB/LC-MS によってマイクロシスチンの分離, 同定を行う手順を次のように設定した。

- 1) m/z 135 のマスキロマトグラムでマイクロシスチンのピークを探す。
- 2) 検出されたピークのマスペクトルから分子量を調べる。
- 3) 構成アミノ酸に関するインモニウムイオンの情報を調べる。

3-2. ラン藻中のマイクロシスチンの分離, 同定^{16, 17)} これまでの検討結果をもとに, ラン藻中のマイクロシスチンの分離, 同定を行った。試料は, 南オーストラリアのアデレードの近くにある沼で採取され, Cooperative Research Centre for Water Quality and Treatment の Michael Burch 博士より供与されたアオコを用いた。凍結乾燥藻 100 mg を 5% 酢酸水で抽出後, ODS シリカゲルカートリッジによるクリーンアップ¹²⁾を行って得られた毒性画分

Fig. 6. Frit-FAB/LC-MS Analysis of a Toxic Fraction from a Bloom Sample Collected in South Australia

(a) TIC and mass chromatograms at m/z 135, 1029, 1068, 995 and 1038. (b) Frit-FAB/LC-MS mass spectra of peak 1, (c) peak 2, (d) peak 3, and (e) peak 4. Expanded lower mass region at m/z 40—200 is shown on the right of the respective mass spectrum. Frit-FAB/LC-MS analysis conditions are described in Fig. 5.

(Reprinted with permission from *Natural Toxins*, 1995, 3, 41–49. Copyright 1995 John Wiley & Sons Limited.)

を Frit-FAB/LC-MS 分析に供した。TIC では多数のピークが検出されているため、どのピークがマイクロシスチンであるかを判別することは極めて困難である (Fig. 6a)。しかし、 m/z 135 のマスキロマトグラムには数本のピークのみが検出され、数種のマイクロシスチンが含まれていると考えられた。これらのピークのうち 1 と 2 は、マスキロマトグラムにおいて $[M+H]^+$ がそれぞれ m/z 1038 (Fig. 6b) と 995 (Fig. 6c) に観察されること、さらに、これらの標品と保持時間が一致することから、マイクロシスチン-RR 及び -LR と同定された。

保持時間 22 分あたりに検出されたやや幅が広いピークのマスキロマトグラムには、 $[M+H]^+$ と考えられる 2 つのイオン m/z 1068 と 1029 が観察された。事実、これらの $[M+H]^+$ でモニターしたマスキロマトグラムでは、わずかに保持時間が異なるピークが検出されていることから、2 種のマイクロシスチンが含まれていると考えられた (Fig. 6a)。両者のピークの重なりが少なくなるように積算して得られたマスキロマトグラムをピーク 3 及び 4 として、それぞれ Fig. 6d, 6e に示した。ピーク 3 については $[M+H]^+$ が m/z 1068 に観察され、マイクロシスチン-W (トリプトファン)R の分子量に一致することが明らかとなった。さらに、低質量領域 (m/z 40—200) を拡大したマスキロマトグラムにはアルギニンに由来する環状インモニウムイオン (m/z 112, 70) と、トリプトファンのインモニウムイオン (m/z 159) が観察されることから、ピーク 3 はマイクロシスチン-WR と同定できた。ピーク 4 のマスキロマトグラムで観察されるプロトン化分子 (m/z 1029) は、マイクロシスチン-F (フェニルアラニン) R 又は -M(O) (メチオニンオキサイド) R と予想された。しかし、フェニ

ルアラニンとメチオニンオキサイドのインモニウムイオンが同一の質量数 (m/z 120) を示すため、最終的に同定することができなかった。

Frit-FAB/LC-MS 法は、ラン藻中のマイクロシスチンを単離精製することなく分離、同定することが可能であるため、必要とする試料量が mg オーダーと少量で済み、しかも、従来法ではマイクロシスチンの抽出から同定までに約 10 日かかっていたものが、本法では約 1 日と、要する時間を大幅に短縮することができた。

3-3. ミクロ分離カラムを用いる Frit-FAB/LC-MS (1) 水中のマイクロシスチンの分離、同定¹⁷⁾——前述の汎用 HPLC 分離カラム (内径 4.0 mm) を用いた Frit-FAB/LC-MS は、インジェクターから注入された試料がカラムで分離された後、マトリックスを含む移動相とともにスプリッターに導かれ、そこで分割された試料と移動相はキャピラリーチューブを経て質量分析計のイオン源に導かれイオン化される (Fig. 7a)。このシステムでは質量分析計に導入できる移動相は数 $\mu\text{L}/\text{min}$ と極めて少量であり、注入した試料の 1% 以下しか質量分析計に導入することができない。このため、マイクロシスチンが極めて微量に含まれていると考えられる水や生体試料には、適用できないと考えられた。

そこで、より少ない試料量でマイクロシスチンの分離及び同定を行うことを目的として、注入した試料を全量質量分析計に導入することができる、マイクロボア分離カラムを用いるシステムを検討した。その結果、Fig. 7b に示すように、抵抗カラムを装着したスプリッターにより移動相を HPLC ポンプとインジェクターの間で $4 \mu\text{L}/\text{min}$ にスプリットし、インジェクターから注入された試料は移動相とともに内

Fig. 7. Frit-FAB/LC-MS System Using (a) Conventional and (b) Microbore Column

Fig. 8. Frit-FAB/LC-MS Analysis of an Extract from Water Collected from Lake Tsukui (Kanagawa Prefecture Japan) on September 28, 1993

(a) TIC and mass chromatograms at m/z 135, 995, 1045, and 1038. Arrow indicates a peak of microcystin-RR. (b) Frit-FAB/LC-MS mass spectrum of microcystin-RR detected. Frit-FAB/LC-MS analysis conditions are as follows: HPLC: column, Develosil ODS-HG-5, 150×0.3 mm i.d.; mobile phase, methanol:0.05% trifluoroacetic acid (56:44) containing 0.8% glycerol; flow rate, $4 \mu\text{l}/\text{min}$. MS: ion source, Frit-FAB; primary beam, Xe^+ ; accelerating voltage, 5 kV (primary), 3 kV (secondary); scan range, m/z 40–1500; cycle time, 6.5 s. (Reprinted with permission from *Natural Toxins*, 1995, 3, 41–49. Copyright 1995 John Wiley & Sons Limited.)

径 0.3 mm のマイクロ分離カラム及び UV 検出器を経て、質量分析計に全量導入するシステムを考案した。精製したマイクロシスチンを用いて調べたこのシステムの検出限界は 5 ng (S/N 比=5) であり、汎用 HPLC 分離カラム (内径 4.0 mm) を用いたシステムと比較して約 200 倍感度が向上することが明らかとなった。

本システムを用いて、1993 年 9 月 28 日に神奈川県津久井湖で採取した水に含まれるマイクロシスチンの分離、同定を行った。試料を、ODS シリカゲル及びシリカゲルカートリッジを用いた二段階のクリーンアップ²¹⁾を行った後、Frit-FAB/LC-MS 分析に供した。TIC 上では、不純物と考えられる保持時間 5 分付近の大きなピークのみが検出されているが、 m/z 135 のマスキログラムでは保持時間 10 分付近にピーク (矢印で示した) が検出された (Fig. 8a)。このピークのマススペクトルをみると、マイクロシスチン-RR の $[\text{M}+\text{H}]^+$ である m/z 1038 のイオンが観察され (Fig. 8b)、また保持時間も精製したマイクロシスチン-RR と一致した。また、この湖水に含まれるマイクロシスチン-RR 濃度を HPLC で定量したところ 40 ng/l と極めて低濃度であったことから、ここに示したマイクロ分離カラムを用いた Frit-FAB/LC-MS 法は、微量のマイクロシスチンを含む試料の分離同定に適用可能であることが実証された。

3-4. ミクロ分離カラムを用いる Frit-FAB/LC-MS (2) マイクロシスチンを投与したマウスの肝臓で生成される代謝物の分離、同定¹⁸⁾——ミクロ分離カラムを用いる Frit-FAB/LC-MS により、マイクロシスチンを投与したマウスの肝臓で生成される代謝物の分離、同定を試みた。分析試料の調製は次

に示す方法で行った。マイクロシスチン-RR 20 μg をマウスの腹腔内に投与し、3 時間後に摘出した肝臓を Tris-HCl 緩衝液で抽出した。抽出液を遠心分離して得られた細胞質画分を熱変性、プロナーゼ消化し、ODS シリカゲルカートリッジでクリーンアップを行った。最終的に、抗マイクロシスチンモノクローナル抗体²²⁾を用いて作成した抗体カラムで精製し、分析試料とした。

調製した試料を Frit-FAB/LC-MS で分析したところ、 m/z 135 のマスキログラム上に 2 つのピークが検出された (Fig. 9a)。これらのうち、保持時間 16 分のピークのマススペクトルでは m/z 1038 に $[\text{M}+\text{H}]^+$ が観察され、マイクロシスチン-RR と同定された。一方、保持時間 12 から 13 分付近に検出されたややブロードなピーク (Fig. 9a) のマススペクトルの分子イオン領域には、いくつかのイオンが観察された。このピークの後半部分 (X-L) のマススペクトルには、 m/z 1345 に $[\text{M}+\text{H}]^+$ と考えられるイオンが観察され (Fig. 9b)、これはマイクロシスチン-RR にグルタチオンが付加した化合物の分子量に一致していた。そこで、マイクロシスチン-RR のグルタチオン付加体を化学的に調製し、²³⁾ その FAB マススペクトル及び HPLC 分析での保持時間を比較した。その結果、マウスの肝臓から検出されたピーク (X-L) とマイクロシスチン-RR のグルタチオン付加体の FAB マススペクトルは、両者ともに m/z 1345 に $[\text{M}+\text{H}]^+$ が観察された。さらに、HPLC 分析での保持時間も一致することから、ピーク X-L はグルタチオン付加体と同定することができた。また、このピークの前半部分 (X-s) のマススペクトルの分子イオン領域には、 m/z 1284, 1330, 1459 というイオンが弱い強度で観察されたが (Fig.

Fig. 9. Frit-FAB/LC-MS Analysis of a Cytosolic Extract from Mouse Liver at 3 h Post-Injection of Microcystin-RR (20 µg/head)

(a) TIC and mass chromatograms at m/z 135, 1038, 1345, 1459, 1330, and 1284. (b) Frit-FAB/LC-MS mass spectra of longer retention time area of the peak X (indicated by X-L) and (c) shorter retention time area of the peak X (indicated by X-s). Frit-FAB/LC-MS analysis conditions are as follows: HPLC: mobile phase, methanol:0.05% trifluoroacetic acid (55:45) containing 0.8% glycerol; other HPLC and MS conditions are described in Fig. 8.

(Reprinted with permission from *Chem. Res. Toxicol.* 1996, 9, 1355-1359. Copyright 1996 American Chemical Society.)

Fig. 10. (a) Frit-FAB/LC-MS Analysis of a Mixture Containing 2 ng Each of Purified Microcystins-RR, -YR, and -LR Using SIM of the $[M+H]^+$ Ions, (b) Calibration Curves for Purified Microcystins-RR, -YR, and -LR Using SIM of the $[M+H]^+$ Ions, (c) Frit-FAB/LC-MS SIM Chromatograms of an Extract of Water Collected from Lake Tsukui on July 29, 1993

Frit-FAB/LC-MS analysis conditions are as follows: MS: switching time, 100 ms. Other HPLC and MS conditions are described in Fig. 8. (Reprinted with permission from *Natural Toxins*, 1995, 3, 41-49. Copyright 1995 John Wiley & Sons Limited.)

9c), これらはマイクロシスチン-RR の Adda のジエンの1つがエポキシ化され、加水分解後硫酸抱合体になった化合物に由来するイオンであると推定された。

以上の結果より、マイクロ分離カラムを用いる Frit-FAB/LC-MS 法は、生体試料中の微量なマイクロシスチン及びその代謝物の分離、同定にも適用可能であることが明らかとなった。

4. 水中のマイクロシスチンの定量—SIM 法を用いた Frit-FAB/LC-MS¹⁷⁾

マイクロシスチンの存在が確認された試料につい

ては、同定とともに定量を行う必要がある。従来マイクロシスチンの定量法としては、UV あるいはフォトダイオードアレイ検出による HPLC が最も広く用いられてきた。¹²⁾ しかし、標準となるマイクロシスチンがない場合には、本法により信頼性の高い同定及び定量を行うことができないことは既に述べた。さらに、本法の検出限界は絶対量として 10 ng 程度であることから、湖水のように極めて微量のマイクロシスチンしか含まない試料には適用できないと考えられた。一方、フォスファターゼアッセイ¹⁰⁾や ELISA 法¹¹⁾は、検出感度が非常に高く、湖水

や飲料水中のマイクロシスチンの定量に用いられている。しかし、これらの方法は、数多く存在するマイクロシスチンの成分を区別して検出することができないという欠点を有している。さらに、フォスファターゼアッセイ法はプロテインフォスファターゼ阻害活性を有するものをすべて検出してしまうこと、また、ELISA法は用いる抗体の交差反応性の違いにより正確な検出ができない問題点があることは既に述べた。

そこで、マイクロシスチンの高感度な定量法として、マイクロ分離カラムを用いる Frit-FAB/LC-MS と SIM を組み合わせた方法を検討した。SIM 法の特長は、試料中の目的物質が有している特徴的なイオンの質量数を選択し、そのイオンの強度変化だけを検出するため、HPLC などで分離されないピークであっても特定イオンの質量数が異なれば分離が可能なことである。また、得られるクロマトグラムは他のイオンの妨害を受けないため、S/N 比がよく、微量定量法に適している。

Fig. 10a に、精製した 3 種のマイクロシスチン-RR, -YR, -LR を各 2 ng 含む混合物について、各成分の $[M+H]^+$ の質量数でモニターする SIM 測定を行って得られたクロマトグラムを示した。検出限界はマイクロシスチン-RR が 300 pg, マイクロシスチン-YR が 350 pg, マイクロシスチン-LR が 400 pg (S/N 比=5) であり、UV 検出による HPLC の感度を上回る結果を得た。また、各成分 2, 5, 10, 25, 50 ng を含む標準混合物を注入して得られたクロマトグラムのピーク面積を用いて作成した検量線を Fig. 10b に示したが、各成分は良好な直線性を示し、定量分析に適用可能であることが明らかになった。

以上の検討結果をもとに、1993 年 7 月 29 日に神奈川県津久井湖で採取した湖水中のマイクロシスチンの定量を行った。試料は、ODS シリカゲル及びシリカゲルカートリッジを用いた二段階のクリーンアップ²¹⁾を行った後、SIM 測定に供した。この試料からはマイクロシスチン-RR 及び -LR が検出され、検量線からそれぞれ 0.07, 0.02 $\mu\text{g}/\text{l}$ と定量された (Fig. 10c)。

以上、マイクロ分離カラムを用いる Frit-FAB/LC-MS 法は、SIM 法との組み合わせにより、従来法の UV 検出による HPLC 法の感度を上回るサブ ng オーダーの検出限界を達成した。SIM 法は成分ごとの個別定量が可能であることから、より選択性の高い定量法として有用であると考えられる。

5. おわりに

本研究では、ラン藻が生産する発がんプロモーターマイクロシスチンの総合的な分析システムの確立を目的として検討を行い、以下に示す成果を得ることができた。

1) マイクロシスチンの存在の有無を簡便かつ迅速に調査するためのスクリーニング法として、オゾ

ン酸化を利用した TSP/LC-MS 及び EI/GC-MS 法を開発した。本法は、マイクロシスチンのオゾン酸化による MMPB の生成からスクリーニングまでを約 30 分で完了することができ、従来法では 1 日要したのに比べて大幅に時間を短縮することができた。

2) マイクロシスチンの迅速な同定法として、Frit-FAB/LC-MS 法を確立した。本法は、ラン藻中のマイクロシスチンを単離精製する必要がないため、その抽出から同定までを 1 日で実施することができ、従来法が要した約 10 日と比べて大幅に時間を短縮できた。また本法は、マイクロシスチンの迅速な分離、同定が可能であるばかりでなく、試料が極めて少量 (mg オーダー) の場合にも適用できることが明らかとなった。さらに、マイクロ分離カラムを用いた Frit-FAB/LC-MS 法は、水中の微量なマイクロシスチン及び生体試料中のマイクロシスチン及びその代謝物の分離、同定に適用可能であることが実証された。

3) ミクロ分離カラムを用いる Frit-FAB/LC-MS 法は、SIM 法との組み合わせにより、従来法の UV 検出による HPLC 法の感度を上回るサブ ng オーダーの検出限界を達成した。本法は成分ごとの個別定量が可能であることから、より選択性の高い定量法として有用であると考えられる。

今回開発した方法は、環境中のラン藻毒に対する有効な分析法として広い利用が期待される。

謝辞 本研究を推進するにあたりご指導とご支援を賜りました、名城大学薬学部 故鈴木真言教授並びに原田健一助教授に深く感謝申し上げます。さらに、本研究に際し、多くのご助言、ご協力を賜りました、愛知県衛生研究所 岡 尚男博士及び猪飼 誉友博士、東京都立衛生研究所 (現立正大学) 渡辺 真利代博士、神奈川県衛生研究所 辻 清美博士、岐阜薬科大学 後藤正志教授、名城大学薬学部機器分析学教室の皆様には厚くお礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Harada K.-I., Kusumi T., "Waterbloom of blue-Green Algae and Their Toxins," ed. by Watanabe M. F., Harada K.-I., Fujiki H., University of Tokyo Press, Tokyo 1994, pp. 117-164.
- 2) Sivonen C., Jones G., "Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management," ed. by Chorus I., Bartram J., E & FN Spon, London 1999, pp. 41-111.
- 3) Sueoka E., Fujiki H., "Waterbloom of Blue-green Algae and Their Toxins," ed. by Watanabe M. F., Harada K.-I., Fujiki H., University

- of Tokyo Press, Tokyo 1994, pp. 209–227.
- 4) Carmichael W. W., *Sci. Am.*, **270**(January), 78–86 (1994).
 - 5) Jochimsen E. M., Carmichael W. W., JiSi A., Cardo D. M., Cookson S. T., Holmes C. E. M., Antunes M. B. C., Filho D. A. M., Lyra T. M., Barreto V. S. T., Azevedo S. M. F. O., Jarvis W. R., *New. Engl. J. Med.*, **338**, 873–878 (1998).
 - 6) Watanabe M. F., “Waterbloom of Blue-green Algae and Their Toxins,” ed. by Watanabe M. F., Harada K.-I., Fujiki H., University of Tokyo Press, Tokyo 1994, pp. 55–73.
 - 7) Falconer I. R., Bartram J., Chorus I., Kuiper-Goodman T., Utkilen H., Burch M., Codd G. A., “Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management,” ed. by Chorus I., Bartram J., E & FN Spon, London 1999, pp. 155–178.
 - 8) Harada K.-I., Kondo F., Lawton L., “Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring and Management,” ed. by Chorus I., Bartram J., E & FN Spon, London 1999, pp. 369–403.
 - 9) Falconer I.R., “Algal Toxins in Seafood and Drinking Water,” ed. by Falconer I. R., Academic Press, London 1993, pp. 165–175.
 - 10) Lambert T. W., Boland M. P., Holmes C. F. B., Hrudey S. E., *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 753–755 (1994).
 - 11) Ueno Y., Nagata S., Tsutsumi T., Hasegawa A., Watanabe M. F., Park H. D., Chen G.-C., Chen G., Yu S.-Z., *Carcinogenesis*, **17**, 1317–1321 (1996).
 - 12) Harada K.-I., “Toxic *Microcystis*,” ed. by Watanabe M. F., Harada K.-I., Carmichael W. W., Fujiki H., CRC Press, Boca Raton, Florida 1996, pp. 103–148.
 - 13) Namikoshi M., Choi B. W., Sun F., Rinehart K. L., Carmichael W. W., Evans W. R., Beasley V. R., *J. Org. Chem.*, **60**, 3671–3679 (1995).
 - 14) Sano T., Nohara K., Shiraishi F., Kaya K., *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **49**, 163–170 (1992).
 - 15) Harada K.-I., Murata H., Qiang Z., Suzuki M., Kondo F., *Toxicon*, **34**, 701–710 (1996).
 - 16) Kondo F., Ikai Y., Oka H., Ishikawa N., Watanabe M. F., Watanabe M., Harada K.-I., Suzuki, M., *Toxicon*, **30**, 227–237 (1992).
 - 17) Kondo F., Ikai Y., Oka H., Matsumoto H., Yamada S., Ishikawa N., Tsuji K., Harada K.-I., Shimada T., Oshikata M., Suzuki M., *Natural Toxins*, **3**, 41–49 (1995).
 - 18) Kondo F., Matsumoto H., Yamada S., Ishikawa N., Ito E., Nagata S., Ueno Y., Suzuki M., Harada K.-I., *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, 1355–1359 (1996).
 - 19) Lawton L. A., Edwards C., Codd G. A., *Analyst*, **119**, 1525–1530 (1994).
 - 20) Harada K.-I., Matsuura K., Suzuki M., Watanabe M. F., Oishi S., Dahlem A. M., Beasley V. R., Carmichael W. W., *Toxicon*, **28**, 55–64 (1990).
 - 21) Tsuji K., Naito S., Kondo F., Watanabe M. F., Suzuki S., Nakazawa H., Suzuki M., Shimada T., Harada K.-I., *Toxicon*, **32**, 1251–1259 (1994).
 - 22) Nagata S., Soutome H., Tsutsumi T., Hasegawa A., Sekijima M., Sugamata M., Harada K.-I., Suganuma M., Ueno Y., *Natural Toxins*, **3**, 78–86 (1995).
 - 23) Kondo F., Ikai Y., Oka H., Okumura M., Ishikawa N., Harada K.-I., Matsuura K., Murata H., Suzuki M., *Chem. Res. Toxicol.*, **5**, 591–596 (1992).