

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：37107

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2015

課題番号：25303011

研究課題名(和文) 東南アジアの海洋生物が産出する抗菌性臭素化ビフェノール類の分布と特性

研究課題名(英文) Distribution of antimicrobial brominated biphenols produced by marine biota in southeast Asia

研究代表者

原口 浩一 (Haraguchi, Koichi)

第一薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00258500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトや海洋哺乳動物に蓄積する臭素化ビフェノール(OH-BDE)の起源が海藻または共生微生物であることから、東南アジア海域におけるOH-BDEの分布特性を調べた。発生源として海藻(Sargassum sp.)および二枚貝(Spondylus sp.)中の共生微生物(Pseudoalteromonas sp.)を特定した。臭素化カテコールを基質としてdihydroxy-BDEが生成し、O-メチル化されたMeO-BDEが食物連鎖によりヒトや海洋哺乳動物に蓄積していることを明らかにした。MeO-BDEは肝臓でCYP2B6により脱メチル化され、OH-BDEとして血液に残留すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The origin of naturally produced brominated biphenyls (OH-BDE) was found in brown algae (Sargassum sp.) and bivalve (Spondylus sp.) in Southeast Asia (Philippines, Indonesia). Genetic analysis indicated the marine bacteria (Pseudoalteromonas sp.) in the algae could produce OH-BDE, which are further methylated to methoxy metabolites (MeO-BDE) and accumulate in higher trophic organisms. Secondary metabolites (hydroxylated dioxins) during this process were found and partly distributed in fish. Human exposure to MeO-BDE may be readily metabolized in liver to OH-BDE by CYP2B6, which are retained in blood.

研究分野：環境科学

キーワード：海藻 臭素化合物 起源

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの調査で、ヒトや海洋哺乳動物には高残留性塩素系化合物のほかに天然由来の臭素化ビフェノール類(OH-BDE)が高濃度で検出され、世界各地の海洋生物で検出されている。しかし、その由来(発生源)、生成経路、曝露経路および体内動態などは不明である。OH-BDEは種々の生物活性が知られているため、その影響評価も含めて調査する必要がある。

## 2. 研究の目的

東南アジア(フィリピン、ベトナム)の熱帯海域で生産される臭素化ビフェノール類(OH-PBDE)に焦点を当て、以下を目的とした。(1) 起源となる海藻種を選定し、臭素化ビフェノールの生成環境因子(季節変動、地域特性)を明らかにする。(2) 海藻から一部を分離培養し、OH-BDE生成に関与する共生微生物の分子系統分類および菌種を特定する。(3) 海藻中のOH-BDEの前駆物質を調査し、海藻-貝類-魚類への生物濃縮と鯨類へのOH-BDEの蓄積実態を明らかにする。(4) OH-BDE関連物質のヒト体内動態(代謝活性化)を解析する。また、海藻中OH-BDEの機能性(抗菌・抗酸化)を調べ、その有用性を評価する。

## 3. 研究の方法

(1) 海藻中の臭素化ビフェノールの分布特性  
フィリピン・ルソン島(Masinloc)にて、海藻(*Sargassum* sp., *Jania* sp.)、軟体動物(*Spondylus* sp.)を雨季と乾季にそれぞれ採取し、生育過程におけるOH-BDEの生産量について環境要因を調べた。  
ベトナム(ハロン湾)・インドネシア・ジャワ島沿岸から二枚貝(*Periglypta crispata*)を採取し、抗菌性ハロゲン化合物を探索し、OH-BDEの二次代謝産物を含めた動態解析を行った。

日本海藻(沖縄、三重)および台湾海藻で海藻および二枚貝のサンプリングを行い、OH-BDEの分布調査結果をフィリピンおよびベトナムからのデータと比較した。

### (2) 共生微生物の分離培養、菌種の特定

海藻に共生する微生物(シアノバクテリア、ビブリオ菌を含む)を分離培養し、16S rRNA領域に特異的なプライマーを用いてPCRを行い、微生物の特定を行うとともに、リアルタイムPCRにより微生物を定量した。

OH-BDE生成反応を触媒するバナジウム依存性酵素(v-BPO)の関与を調べるため、バナジウム量とOH-BDE生成量の相関性を調べた。

### (3) 生成機構(反応プロセス)と残留実態

フィリピン海域で紅藻(*Jania* sp.)に付着した二枚貝(*Spondylus squamosus*)をサンプリングし、魚貝類へのOH-BDEの取込み量およびO-メチル化体の濃度を計測した。

鯨類への食物連鎖を調べるため、座礁クジラ40頭(SNH北海道ストランディングネットワーク)の組織からMeO-BDEの濃度を計測した。

### (4) 生体内動態、機能性評価

MeO-BDEの代謝活性化: OH-BDEのメチル化体であるdiMeO-BB80を用いて、ヒトP450分子種によるin vitro代謝実験を行った。

海藻の抗菌活性; 海藻の抽出物について、抗菌スペクトル試験を行った。試供菌としてグラム陽性菌(MRSAを含む黄色ブドウ球菌、腸球菌、連鎖球菌)、グラム陰性菌(緑膿菌、腸内細菌群)を用いた。抗酸化活性: Troloxを標準物質として、ラジカル消去活性(DPPH法)およびラジカル反応抑制能(ORAC法)を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 臭素化ビフェノール(OH-BDE)の特性

#### フィリピン海藻における分布特性

数十種の海藻および貝類から OH-BDE 生成の環境要因を調べた結果、海藻は冬（乾季）と夏（雨季）で OH-BDE 生産量が大きく異なること、また成長度によって OH-BDE とそのメチル化体の割合が大きく異なった。同地域の貝類(thorny oyster)では、OH-BDE の取り込みが顕著にみられ、個体重量の大きくなるに比例して OH-BDE 量が減少し、そのメチル化体が増加した。すなわち、成長過程で OH-BDE はメチル化されることが示唆された。

#### ベトナム貝類の抗菌成分の特性

ベトナムで採取した貝類(*Periglypta* sp.)では、抗 MRSA 活性の高い 2,2'-dihydroxy-bromo-biphenyl の他、数種の塩素化 dihydroxy 体(diMeO-CB80)を検出した。この dihydroxy 体は乾季(7月)では検出できなかった。このメチル化体は魚介類や鯨類に濃縮されることが分かった。

### (2) 共生微生物の特定

海洋微生物の菌種を特定するために海藻 (*Sargassum* sp.) および貝類 (*Spondylus* sp.) について一部の培養液から臭素化ビフェノールを生産する菌体を分離し、遺伝子解析を行った。16S rDNA 塩基配列解析の結果、OH-BDE を生産する菌種は *Enterobacter* sp., MeO-BDE を生産する菌株は *Pseudoalteromonas* sp.と推定された。

バナジウムを含有する酵素(v-BPO)と臭素化合物の生成量との関連を調べるため、海藻中のバナジウム量を ICP-MS を用いて測定した。海藻中の臭素化合物の総量とバナジウム量には正の相関があり、臭素化ビフェノール生成にバナジウム依存性プロモペルオキシダーゼが関与することが示唆された。

### (3) OH-BDE の生成機構と濃縮過程

フィリピンで海藻類、貝類を採取し、

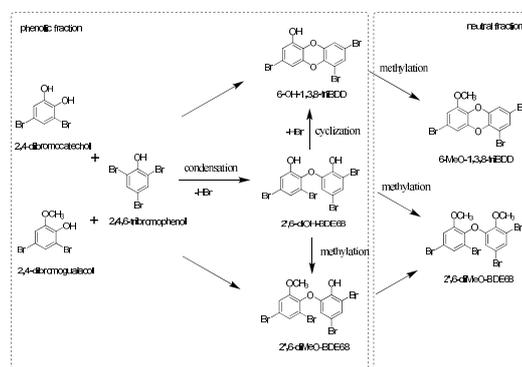
OH-BDE 関連臭素化合物の探索を GC/MS および LC/MS/MS を用いて行った。その結果、海藻から新規に臭素化ベラトロールおよびその前駆物質グアヤコールおよびカテコールがそれぞれ数種検出された。さらに、OH-BDE の閉環による精製するダイオキシン類が検出され、二次代謝産物として魚介類に分布していることを確認した(図1)。カテコールの二量体から dihydroxy-BDE が生成し、一部が閉環して、水酸化ダイオキシンに変化する一方、残りは徐々に O-メチル化により diMeO-BDE として生物濃縮されると推定される。

マレーシアおよびインドネシア産の海藻では主として 2'-MeO-BDE68 の成分が大量に生産され、二枚貝(*Isogonmon isogonum*)への取り込みが大きいことが分かった。

#### ヒトクジラへの MeO-BDE の残留特性

日本近海の哺乳動物およびヒトへの蓄積性を調べた結果、アジアの海洋哺乳動物には MeO-BDE が最大 400 ng/g lipid で脂肪組織に蓄積されていることが分かった。

以上の結果、臭素化ビフェノールはプロモフェノールを前駆物質として生成する OH-BDE と、カテコールまたはグアヤコールを起源として生成する diOH-BDE の経路があり、一部は水酸化ダイオキシン類へ、残りはメチル化されて脂溶性を増し、MeO-BDE として食物連鎖によってヒトを含む高等動物へ蓄積していることを明らかにした。



(図1)生成経路

#### (4) 体内動態及び機能性評価

海藻成分 diMeO-BB80 の in vitro 代謝実験により、diMeO-BB80 はラット肝ミクロゾーム CYP2B により速やかに脱メチル化されることが示唆された。一方ヒト P450 分子種では脱メチル化反応に CYP2B6 が大きく関与していることが分かった。

海藻抽出成分の機能性評価：OH-BDE および海藻抽出成分について以下の機能性を調べた。(a)抗酸化活性：ORAC 法により評価した結果、3 種 OH-BDE は抗酸化物質 tolorox より強い活性を有した。DPPH 法ではテトラプロモカテコールが強い活性を示したが、ほかの OH-BDE の活性は弱かった。海藻の OH-BDE 抽出液は、ORAC 法で抗酸化性が高いことを確認した。(b)抗菌活性：海藻から OH-BDE 抽出液および標準 OH-BDE 3 種について抗菌スペクトルを作成した。いずれも抗菌剤トリクロサンと同様のスペクトルを示し、海藻抽出液は抗 MRSA 活性が高いことが分かった。

全体の結果をまとめると、ヒトや海洋哺乳動物に蓄積している臭素化ビフェノールは東南アジアの近海海藻(特に *Sargassum sp*) に広く分布しており、海洋細菌 (*Pseudoalteromonas sp*) により生産され、生成過程でメチル化による生物濃縮が起こり、食事経路でヒトおよび海洋哺乳動物に蓄積する機構ならびに体内動態を明らかにした。今後、二次代謝産物による機能性分子の創製と代謝活性化による影響評価が求められる。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 13 件)

1. Haraguchi, K.; Ito, Y.; Takagi, M., Fujii, Y.; Harada, K.; Koizumi, A. Levels, profiles and dietary sources of hydroxylated PCBs and

hydroxylated and methoxylated PBDEs in Japanese women serum samples. *Environment International* 2016, 155-162. 2016.

Doi.org/10.1016/j.envint.2016.08.022 査読有

2. Endo, T.; Kimura, O.; Fujii, Y.; Haraguchi, K. Relationship between mercury, organochlorine compounds and stable isotope ratios of carbon and nitrogen in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) taken from different regions of the Pacific and Indian Oceans. *Ecological Indicators*. 2016, 69:340-347.

Doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.04.021 査読有

3. Fujii, Y.; Sakurada, T.; Harada, K. H.; Koizumi, A.; Kimura, O.; Endo, T.; Haraguchi, K. Long-chain perfluoroalkyl carboxylic acids in Pacific cods from coastal areas in northern Japan: A major source of human dietary exposure. *Environmental Pollution* 2015, 199, 35-41. Doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.007 査読有

4. Kimura, O.; Ohta, C.; Koga, N.; Haraguchi, K.; Kato, Y.; Endo, T. Carrier-mediated uptake of nobiletin, a citrus polymethoxyflavonoid, in human intestinal Caco-2 cells. *Food Chemistry* 2014, 154, 145-150.

Doi:dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.069 査読有

5. Fujii, Y.; Nishimura, E.; Kato, Y.; Harada, K. H.; Koizumi, A.; Haraguchi, K. Dietary exposure to phenolic and methoxylated organohalogen contaminants in relation to their concentrations in breast milk and serum in Japan. *Environment International* 2014, 63: 19-25. doi.org/j.envint.2013.10.016 査読有
6. Fujii, Y.; Harada, K.H.; Hitomi, T.; Kobayashi, H.; Koizumi, A.; Haraguchi, K. Temporal trend and age-dependent serum concentration of phenolic organohalogen contaminants in Japanese men during 1989-2010. *Environ. Pollut.*, 2014: 185, 228-233.

[学会発表](計15件)

- 岡崎裕之、池田(高露)恵理子、水之江来夢、松尾紗樹、古田恵梨果、竹田修三、藤井由希子、原口浩一、渡辺和人、荒牧弘範：海洋生物由来のフェノール性臭素化合物によるエストロゲンシグナルかく乱作用の解析、日本薬学会第137年会(仙台市)2017年3月
- Fujii Y, Haraguchi K, Kato Y, Kimura O, Endo T, Ohta C, Koga N, Harada K, Koizumi A. The levels and trends of POPs and perfluorinated carboxylic acids in fish and marine mammals from Japanese coastal waters, Dioxin2016, Congress and Exhibition Center, Florence, Italy, 2016年8月
- 太田千穂、山本健太、藤井由希子、原口浩二、木村 治、遠藤哲也、加藤善久、古賀信幸 Gossypetin hexamethylether の動物肝ミクロゾームによる代謝 第70回日本栄養・食糧学会大会(神戸市)2016年5月
- 高木雅恵、森山綾香、藤井由希子、原口浩二、太田千穂、古賀信幸、加藤善久、木村治、遠藤哲也 海藻食品に由来するヒト血液および尿中6-OH-BDE47の抱合体 日本薬学会第136回年会(横浜市)2015年3月
- 小柳侑平、河野龍海、高木雅恵、森山綾香、藤井由希子、松原 大、原口浩一、太田千穂、古賀信幸、海藻で生産される臭素化ビフェノール類の機能性評価、日本薬学会第135年会(神戸市)2015年3月
- 太田千穂、西村理恵、原口浩一、遠藤哲也、加藤善久、山本健太 海洋生物由来の tetrabromo-1,4-dimethoxybenzene(TDB)の動物肝ミクロゾームによる代謝 日本薬学会第135年会(神戸市)2015年3月
- 太田千穂、西村理恵、原口浩一、遠藤哲也、加藤善久、山本健太、古賀信幸 海洋生物由来の tetrabromoveratrole (TBV)の動物肝ミ

クロゾームによる代謝 日本薬学会第134年会(熊本市)2014年3月27日~30日

- 加治佐彰悟、河村忠彦、原雄一、西村理恵、原口浩一、太田千穂、古賀信幸. 二枚貝 (*Spondylus* sp.) に検出される臭素化グアヤコールおよびベラトロールの濃縮特性. 日本薬学会第134年会(熊本市)2014年3月27~30日
- 河野龍海、小柳侑一、高木雅恵、森山綾香、藤井由希子、松原大、原口浩一、Jun Rolex、Marc Romero、小瀧裕一. 海藻由来の臭素化ビフェノール類の起源および機能性評価 平成26年度日本水産学会秋季大会(福岡市)2014年9月19~22日
- 西村理恵、太田千穂、原口浩一、遠藤哲也、加藤善久、山本健太、古賀信幸 海洋生物由来 2,2'-dimethoxy-BB80 のラットにおける in vivo 代謝、フォーラム2014 衛生薬学・環境トキシコロジー(つくば市)2014年9月19日~9月20日

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

原口 浩一 (HARAGUCHI Koichi)  
第一薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：00258500

### (2)研究分担者

小瀧 裕一 (KOTAKI Yuichi)  
北里大学・海洋生命科学部・研究員  
研究者番号：30113278

### (3)連携研究者

遠藤 哲也 (ENDO Tetsuya)  
北海道医療大学・薬学部・准教授  
研究者番号：10133216