

機関番号：37107
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20404006
 研究課題名（和文）太平洋島嶼における天然有機ハロゲン化合物の生成機構および生物濃縮に関する研究
 研究課題名（英文）Formation and bioconcentration of natural organohalogen compounds in Asia-Pacific food web

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

研究成果の概要（和文）：

東南アジア海域の特定の海藻で hydroxy-PBDE が大量に産生されることを明らかにした。パラオ産の海綿から検出される dihydroxy-PBDE およびそのメトキシ体の LC/MS/MS 分析法を確立した。フィリピンの海菊貝では hydroxy-PBDE が高濃度で取り込まれ、成長とともにメチル化され、MeO-PBDE として残留した。ベトナム産の貝類から抗菌作用を有するハロゲン化ビフェノール類を単離した。これらの二次代謝産物は食物連鎖を通じて高等海洋生物に蓄積するほか、抗菌薬のリード化合物としても期待される。

研究成果の概要（英文）：

In Asia-Pacific food web, we found that natural organobromine compounds are produced by some specific species of marine algae and sponges. We developed the LC/MS/MS method for screening of dihydroxy-PBDEs in sponges from Palau. In thorny oyster from the Philippines, naturally produced hydroxy-PBDEs were O-methylated with growth to the corresponding methoxy-PBDEs. In bivalves from Vietnam, halogenated biphenols (i.e. Br₃Cl- and Br₂Cl₂-analogs) that show antibacterial activities, were isolated. These secondary metabolites are accumulated in the higher organisms via food chain and also anticipated as lead compounds for bioactive medicines.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：環境化学

科研費の分科・細目：生体関連化学

キーワード：天然臭素化合物、海藻、食物連鎖、生物濃縮

1. 研究開始当初の背景

天然には微生物により作り出され、多様な生物活性を有する有機臭素化合物が 4000

種以上も存在する。そのなかで、生物濃縮性の高い天然ハロゲン化合物の動向が注目されている。

我々はアジア・オセアニア海域において、海洋生物中に残留する天然由来ハロゲン化合物群（ビピロール類およびジフェニルエーテル類(PBDE))に着目した。このうち、PBDEの水酸化体(OH-PBDE)およびメトキシ体(MeO-PBDE)は、太平洋島嶼の熱帯海域の海藻や海綿で生産され、食物連鎖を通じて生物濃縮し、ヒトを含む高等動物にも残留するとの仮説を検証するための調査が必要となった。

MeO-PBDEは1920年代の鯨類の脂肪にも存在が確認された天然化学物質で、その脱メチル化体(OH-PBDE)は内分泌かく乱活性や抗菌活性が報告されている。それらの体内残留量は毒性の高い人為起源臭素系難燃剤の残留量をしばしば上回る。OH-PBDEは微生物から生合成されると考えられているが、生物種と生成機構は明らかでない。またその分布と濃縮経路は解明されていない。

食物連鎖の上位捕食者の体内に天然ハロゲン化合物が存在するためには、脂溶性があること(log Kow >5)、残留性があること(肝臓で分解されない)、バイオアベイラビリティが高いこと(膜を透過する)が必要である。そこで(1)どのような天然臭素化合物がどの地域のどの生物種で生産され、どのような二次代謝産物を生じるのか、(2)そのレベル、動態、残留特性はどうか、(3)体内負荷量の増加または代謝が生物やヒトの健康にどう影響するのかについて知見が求められる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アジア太平洋において生体残留性の高い天然由来ハロゲン化合物の起源、分布状況、生成機構ならびに生物濃縮過程を明らかにし、天然由来ハロゲン化合物が食物連鎖を通じてヒトを含む海洋哺乳動物にどう関与するのかを明らかにすることである。本研究は、3年間の海外学術調査で太平洋島嶼(沖縄、フィリピン、ベトナム、グアム、パラオ)の海洋資源(海藻、海綿、魚貝類)を対象に調査した成果である。具体的には、(1)フィリピンルソン島西海岸の海藻が産生する臭素化合物の分布状況、(2)パラオ産海綿中のフェノール性臭素化合物の探索とその分析法の開発、(3)ルソン島貝類のOH-PBDEの取り込みとメチル化機構、(4)ベトナム貝類で検出される新規抗菌成分の単離、同定を行うことである。これらの結果を踏まえ、二次代謝産物の食物連鎖による生物濃縮とヒトへの関与についても考察する。

3. 研究の方法

(1) サンプル地域

①フィリピン：2008年12月～2011年8月にルソン島の西海岸(Macinloc など4地点)で海藻類および二枚貝 *Thorny Oyster* (*Spondylus* sp.)、Penshell、Green mussel および魚類を採取し、形態学的に分類した。

②ベトナム：2009年12月、ハイフォン近海で海綿、海藻および魚介類を採取した。

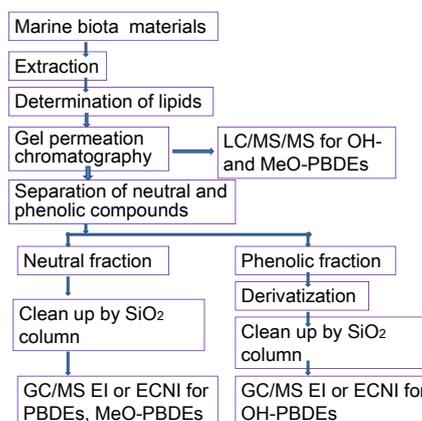
③パラオ、グアム、沖縄：2005～2009年に採取した海綿 (*Lamelloysidea* sp, *Callyspongia* sp.) およびグアム・沖縄海域で採取した魚類を分析対象とした。



(図1. 調査地域)

(2) クリーンアップ法

図2に示すように、秤量した試料をホモジナイズ後、臭素化合物を有機溶媒で抽出した。ゲルクロマトグラフィー(GPC)で脱脂を行い、中性画分とフェノール性画分に分離し、後者はジアゾメタンでメチル化した。両画分はシリカゲルカラムで精製した後、GC-MS(EIまたはECNI)で定性、定量した。一方、試料の一部は、GPC処理後、フェノール性画分を直接定量できるスクリーニング法として、大気圧化学イオン化(APCI)によるLC/MS/MS(MRM)で分析した。



(図2. 分析方法)

(3) 定性、定量

① GC/MS: EI の選択イオン検出を用いて OH-PBDE をメチル化誘導体にして定量した。

② LC/MS/MS: GC/MS で検出困難な dihydroxy-PBDE を誘導体化せず、直接イオン化し、MRM-transition ($[M-H]^- \Rightarrow Br^-$) によって hydroxy-methoxy PBDE と区別できる選択定量法を開発し、海綿の成分分析に応用した。

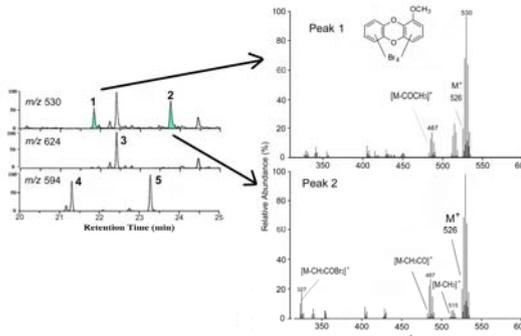
(4) 標準品の合成および精度管理

OH-PBDE の合成は Dr. G. Marsh (ストックホルム大学) の協力を得た。標準 OH-PBDE を用いた本法の直線性 ($r > 0.999$)、再現性 ($RSD < 15\%$)、回収率 ($> 83\%$) はいずれも良好であった。精度管理は標準試料 (SRM1588b, cod liver oil) の分析結果が PBDE の保証値と一致するかどうかで評価した。

4. 研究成果

(1) 東南アジア海藻のモニタリング

フィリピンで採取した海藻のうち、ルソン島の褐藻 (*Sargassum* sp.) および紅藻 (*Jania* sp.) は種特異的に OH-PBDE および MeO-PBDE を産生していることが分かった。OH-PBDE の主成分は、2'-hydroxy-2,3',4,5'-tetraBDE (2'-OH-BDE68), 6-hydroxy-2,2',4,4'-tetraBDE (6-OH-BDE47), 2,2'-dihydroxy-3,3',5,5'-tetrabromobiphenyl (2,2'-diOH-BB80) および 2',6-dihydroxy-BDE68 (diOH-BDE68) で、これらは海洋哺乳動物に蓄積している MeO-PBDE 群の前駆物質 (脱メチル体) と一致した。海藻から臭素化カテコールおよび臭素化ヒドロキシジベンゾ-*p*-ダイオキシン (OH-PBDD) を単離した (図 3)。この結果は、海藻にカテコールを基質とする diOH-PBDE の生合成経路および OH-PBDD への変換経路が存在することを示唆した。



(図 3. GC/MS of OH-PBDD)

(2) パラオ諸島海綿のモニタリング

パラオ産海綿のうち、*Lamellodysidea* sp. および *Callyspongia* sp. は dihydroxy-PBDE およびそのメチル化体を豊富に含有し、その

組成と量をスクリーニングするための APCI-LC/MS/MS 法を確立した。海綿の生産する diOH-体、OH-MeO-体および diMeO-体の組成とその前駆体の一部は、海藻の臭素成分と一致することから、周辺の魚貝類に残留する MeO-PBDE は海藻のほか海綿由来であると推察された。*Lamellodysidea* sp. では diOH-penta-および diOH-hexa-BDEs が生産されるのに対し、*Callyspongia* sp. では、OH-MeO-tetraBDE の比率が高かった。この生成率の違いは海綿中の異なる共生微生物群の関与が示唆された。

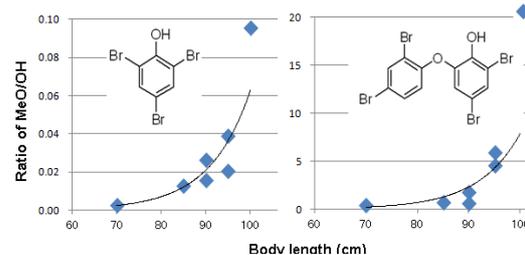
(3) ルソン島貝類のモニタリング

ルソン島西海岸で貝類を探索した結果、ウミギクガイ Thorny oyster (*Spondylus squamosus*) は hydroxy-PBDE を豊富に体内に取り込んでいることがわかった。同地域で収集した Penshell (*Atrina vexillum*) では MeO-PBDE のみが検出された。マニラ湾の Green mussel (*Perna viridis*) では OH 体、MeO 体ともに検出されなかった。

そこで Thorny oyster の内容物の重量 (殻の長さ) と臭素成分濃度の関連性を調べると、OH-PBDE 濃度は Thorny oyster の体重 (殻の長さ) が大きいほど低く、逆に、MeO-PBDE 濃度が高かった。図 4 に tribromophenol および 6-OH-BDE47 のメチル化される割合を示す。このことは、周辺の海藻が産生する OH-PBDE が Thorny oyster に取り込まれると、若い個体ではメチル化の機能が弱く、貝の成育の過程で徐々にメチル化され MeO-PBDE として残留する機構が考えられた。

夏 (8 月) と冬 (2 月) に採集した Thorny oyster の臭素成分の比較を行ったところ、OH-PBDE の生産量および MeO-PBDE の残留量はともに 2 月 (乾季) の方が 8 月 (雨季) より有意に高い結果が得られた。このことは、貝類の OH-PBDE の取込みは、OH-PBDE を生産する海藻の生育時期に盛んに行われることを示唆した。

Thorny oyster のフェノール性分画に検出される dihydroxy-PBDE および hydroxy-PBDD は、海藻と同一成分であった。



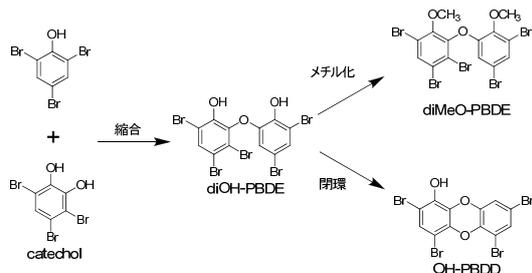
(図 4. メトキン体の生成比率)

(4) ベトナム貝類のモニタリング

ハノイ東海岸（ハイフォン近海）で採取した貝類 13 種のうち、マルスタレガイ (*Periglypta crispta*)には海藻中の成分と同一の 2'-OH-BDE68 および 6-OH-BDE47 が検出されるほか、抗菌作用（抗 MRSA 活性）を有する diOH-BB80 誘導体が高濃度で含有することがわかった。その構造はハロゲン化ビフェノール類（2,2'-dihydroxybiphenyl の Br₃Cl- および Br₂Cl₂ 置換体）と同定した。これらは共生微生物による二次代謝産物と推定され、抗菌活性のリード化合物として注目される。

(5) 食物連鎖による生物濃縮

東南アジアの特定種の海洋生物には bromophenol を基質として OH-PBDE を産生し、メチル化され、MeO-PBDE として残留する機構がある。一方、臭素化カテコールを基質として、diOH-PBDE を産生し、メチル化され、diMeO-PBDE として体内へ残留するほか、閉環（脱 HBr）による OH-PBDD への変換経路（図 5）があることも分かった。これらの二次代謝産物は食物連鎖により海産食品を経由してヒトへ曝露が考えられる。事実、我々は日本人の母乳中から MeO-PBDE を検出している。また、MeO-PBDE は肝臓において脱メチル化反応によって代謝活性化を受けると、OH-PBDE による内分泌かく乱が懸念される。天然由来臭素成分の生産は種に依存し季節変動があるが、その分布把握は人為起源 POPs の海洋生物での動向を知る上で指標となるかもしれない。また、いくつかの代謝産物の抗菌、抗酸化活性を有するため、それらを利用した創薬研究が期待される。



(図 5. カテコールから OH-PBDD の生合成)

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 10 件)

- ① Kato Y, Okada S, Atobe K, Endo T, Haraguchi K. Selective determination of mono- and dihydroxylated analogs of polybrominated diphenyl ethers in marine sponges by liquid-chromatography tandem

mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, 403, in press. (査読有)

- ② Hisamichi Y, Haraguchi K, Endo T. Levels of mercury and organohalogen compounds in Pacific bluefin tuna (*Thynnus orientalis*) cultured at different regions of Japan. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2012, 62: 296-305. (査読有)
- ③ Haraguchi K, Kato Y, Ohta C, Koga N, Endo T. Marine sponge: A potential source for methoxylated polybrominated diphenyl ethers in the Asia-Pacific food web. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59: 13102-13109. (査読有)
- ④ Haraguchi K, Kotaki Y, Rolet JR Jr, Romero MLJ, Terada R. Monitoring of naturally produced brominated phenoxyphenols and phenoxyanisoles in aquatic plants from the Philippines. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58: 12385-12391. (査読有)
- ⑤ Hisamichi Y, Haraguchi K, Endo T. Levels of mercury and organochlorine compounds and stable isotope ratios in three tuna species taken from different regions of Japan. *Environ. Sci. Technol.*, 2010, 44:5971-5978. (査読有)
- ⑥ 原口浩一. 天然由来脂溶性臭素化合物の環境動態、第一薬科大学研究年報、2010, 26:1-30 (ISSN 0286-8016) (査読有)
- ⑦ Kato Y, Okada S, Atobe K, Endo T, Matsubara F, Oguma T, Haraguchi K. Simultaneous determination by APCI-LC/MS/MS of hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers found in marine biota. *Anal. Chem.*, 2009, 81:5942-5948. (査読有)
- ⑧ Haraguchi K, Hisamichi Y, Kotaki Y, Kato Y, Endo T. Halogenated bipyrroles and methoxylated tetrabromodiphenyl ethers in tiger shark (*Galeocerdo cuvier*) from the southern coast of Japan. *Environ. Sci. Technol.*, 2009, 43:2288-2294. (査読有)
- ⑨ Haraguchi K, Hisamichi Y, Endo T. Accumulation and mother-to-calf transfer of anthropogenic and natural organohalogenes in killer whales (*Orcinus orca*) stranded on the Pacific coast of Japan. *Sci. Total Environ.*, 2009, 407:2853-2859. (査読有)

- ⑩ Haraguchi K, Kato Y, Atobe K, Okada S, Endo T, Matsubara F, Oguma T. Negative APCI-LC/MS/MS method for determination of natural persistent halogenated products in marine biota. *Anal. Chem.*, 2008, 80:9748-9755. (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 小倉良太, 西村理恵, 小瀧裕一, 原口浩一. 海洋生物 (*Spondylus* sp.) における抗菌性臭素化合物 (PBDE-OH) のO-メチル化機構に関する研究、日本薬学会第 28 回九州支部大会 (福岡) 12 月 (2011)
- ② 久道洋輔, 原口浩一, 遠藤哲也. 養殖マグロに蓄積している水銀および有機塩素系化合物の地域差について. フォーラム 2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー (金沢) 10 月 (2011)
- ③ Haraguchi K, Kato Y, Ohta C, Koga N, Endo T. A potential source for hydroxylated and methoxylated analogs of brominated diphenyl ethers in the Asia-Pacific food web. 31th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (POPs). August 21-25, 2011, Brussels, Belgium, *Organohalogen Compounds* 2011, 73:182-185.
- ④ 原口浩一, 伊藤美子, 太田千穂, 古賀信幸, 遠藤哲也. 新規PBDE 関連物質の鯨類組織分布および地域差, フォーラム 2010・衛生環境トキシコロジー (東京) 9 月(2010)
- ⑤ 伊藤美子, 原口浩一, 原田浩二, 井上佳代子, 人見敏明, 竹中勝信, 加美山茂利, 渡辺孝男, 小泉昭夫. 日本人血清中の hydroxy-およびmethoxy-PBDEs. フォーラム2010・衛生環境トキシコロジー (東京) 9 月(2010).
- ⑥ 遠藤哲也, 久道洋輔, 原口浩一. マグロ類の水銀汚染と有機塩素系化合物汚染: 種差と地域差について, フォーラム 2010・衛生環境トキシコロジー (東京) 9 月(2010).
- ⑦ 久道洋輔, 木村 治, 原口浩一, 遠藤哲也. キハダマグロの水銀と有機塩素化合物の汚染調査:安定同位体による捕獲地域の推測, 日本薬学会第 128 年会 (京都) 3 月 (2009) .

- ⑧ 加藤善久, 岡田将平, 跡部一孝, 松原大, 遠藤哲也, 尾熊隆嘉, 原口浩一. APCI-LC/MS/MSによる天然ハロゲン化合物の定量: 海洋哺乳動物における蓄積特性、環境ホルモン学会第 11 回研究発表会 (東京) 12 月 (2008)

- ⑨ 原口浩一, 久道洋輔, 遠藤哲也, 加藤善久, 太田千穂, 古賀信幸, 海洋哺乳動物 における PCB 代謝: 鯨類の肝臓にみられる methylsulfone および dihydroxy 体の蓄積特性、フォーラム 2008: 衛生薬学・環境トキシコロジー (熊本) 10 月 (2008) .

- ⑩ 久道洋輔, 遠藤哲也, 加藤善久, 太田千穂, 古賀信幸, 原口浩一. GC/MS-EI/SIM による天然ハロゲン化合物の定量: サメにおける蓄積特性、フォーラム 2008: 衛生薬学・環境トキシコロジー (熊本) 10 月 (2008)

[その他]

ホームページ等

<http://www.daiichi-cps.ac.jp/kenkyu/index.html>

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

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
小瀧裕一 (KOTAKI YUICHI)
北里大学・海洋生命科学部・准教授
研究者番号: 30113278
松原 大 (MATSUBARA FUTOSHI)
第一薬科大学・教授
研究者番号: 60368975
(H22: 連携研究者)

(3) 連携研究者

古賀信幸 (KOGA NOBUYUKI)
中村学園大学・栄養科学部・教授
研究者番号: 80136514
太田千穂 (OHTA CHIHO)
中村学園大学・栄養科学部・講師
研究者番号: 80271435