

海洋生物由来の2,4,6-tribromoanisole の動物肝ミクロゾームによる代謝とその関連化合物の抗酸化活性

太田千穂¹⁾ 原口浩一²⁾ 遠藤哲也³⁾
加藤善久⁴⁾ 松原大²⁾ 古賀信幸¹⁾

In Vitro Metabolism of 2,4,6-Tribromoanisole Found in Marine Biota by Animal Liver Microsomes and Anti-oxidative Activity of Its Related Compounds

Chiho Ohta¹⁾ Koichi Haraguchi²⁾ Tetsuya Endo³⁾
Yoshihisa Kato⁴⁾ Futoshi Matsubara²⁾ Nobuyuki Koga¹⁾
(2011年11月25日受理)

はじめに

われわれの身のまわりには、数多くの有機ハロゲン化合物が存在している。例えば、医薬品をはじめ、DDTやBHCなどの有機塩素系農薬、また、polychlorinated biphenyl (PCB) 類やダイオキシン類、さらには難燃剤の polybrominated diphenyl ether (PBDE) 類、などがある。このうち、医薬品を除く、農薬、PCB類、ダイオキシン類およびPBDE類は、いずれも環境汚染物質として有名であるが、特に脂溶性が極めて高く生体に蓄積しやすいことから、社会問題となってきた¹⁾。

最近、上記のものとは異なる種々の有機ハロゲン化合物が、海洋生物の海綿類²⁻⁵⁾、海藻類⁶⁻⁹⁾、魚類¹⁰⁻¹⁵⁾、貝類^{7, 10)} および哺乳動物¹⁶⁻²⁰⁾ から報告されている (Fig. 1)。例えば、2000年 Flodin と Whitfield らは、紅藻類のイトグサから2,4,6-tribromoanisole (TBA) や cresol 類を初めて報告した⁶⁾。その後、Utkina らは、海綿類から polybrominated dibenzo-*p*-dioxin である spongiadioxin を見出した²⁾。また、Vetter と Jun は、魚類のタラから、2,4,6-TBA とともに新規ハロゲン化合物の PBDE 類や Cl₇-methyl-bipyrrole (Q1) を検出した¹⁰⁾。彼らはさらに、貝類のイガイからも、2,4,6-TBA, Q1, CH₃O (MeO)-PBDE 類および anisole 類を検出した¹⁰⁾。さらに、Haraguchi らは、海綿類のザラカイメン⁹⁾ および鯨類のシャチやカズハゴンドウの組織¹⁸⁻²⁰⁾ か

ら、2,4,6-TBA, MeO-PBDE, 2,2'-diMeO-3,3',5,5'-tetrabromobiphenyl (BB80), Q1 および Br₄Cl₂-dimethyl-bipyrrole (DBP) を検出した。最近では、地中海で捕獲された魚類のミナミマグロから、2,4,6-TBA および MeO-PBDE とともに、新たに polybrominated hexahydroxanthene (PBHD) 類や mixed halogenated monoterpene (MHC-1) 類が報告された¹⁵⁾。

一方、このような海洋生物中の有機ハロゲン化合物は当初、人為的なものが海洋へと移行し、さらに海洋生物に蓄積したものであると考えられた。なぜなら、2,4,6-TBA は、ワインコルクの腐敗臭の原因物質としても知られており²¹⁾、また、PBDE 類も同

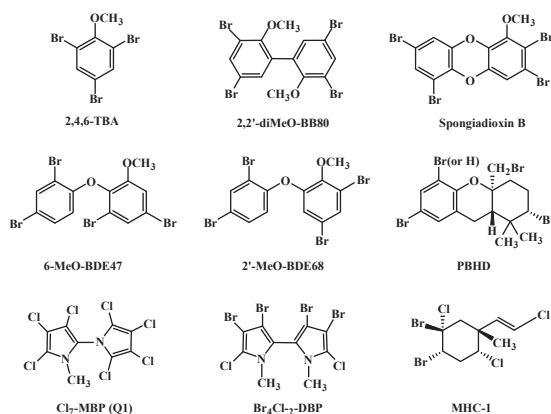


Fig. 1 Chemical structures of halogenated compounds found in marine biota

別刷請求先：太田千穂，中村学園大学栄養科学部，〒814-0198 福岡市城南区別府 5-7-1

E-mail: chiho@nakamura-u.ac.jp

1) 中村学園大学栄養科学部 2) 第一薬科大学 3) 北海道医療大学薬学部 4) 徳島文理大学香川薬学部

様に、家具類の難燃剤として世界中で大量に使用されていたからである。しかしながら、その後、これらの有機ハロゲン化合物は、いずれも海洋微生物により産生され、食物連鎖を通して高等生物へ生体濃縮されることが明らかになった^{8, 22)}。

上記海洋生物のうち、海藻類、貝類および魚類は食用として摂取する機会が多いことから、有機ハロゲン化合物の人体影響が危惧される。しかしながら、これらの生体内動態および生理活性（あるいは毒性）はほとんど調べられていない。そこで本研究では、2,4,6-TBA について、ラットおよびモルモットの肝ミクロゾームによる *in vitro* 代謝を調べた。また、その代謝物および数種類のハロゲン化フェノール化合物について、抗酸化活性（DPPH ラジカル消去活性およびリノール酸自動酸化阻害活性）を調べた。

実験方法

1. 試薬および薬物投与

2,4,6-TBA, 2,4,6-TBP, 2,3,5-trichlorophenol (TCP), 2,3,6-TCP, 2,4,5-TCP, 2,4,6-TCP および 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol (BHT) は東京化成工業（東京）より購入した。また、NADP および glucose-6-phosphate (G-6-P) はオリエンタル酵母（東京）より、phenobarbital (PB), 3-methylcholanthrene (MC) および G-6-P 脱水素酵素 (G-6-PD) は和光純薬工業（大阪）より購入した。さらに、6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox[®]) は EMD Biosciences 社 (Darmstadt, ドイツ) より、2-morpholinoethanesulphonic acid (MES) は同仁化学研究所（熊本）より、1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid (DETBA) はワコーケミカル（宮崎）より購入した。さらに、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), リノール酸およびドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は和光純薬工業（大阪）より購入した。

Wistar 系雄性ラット（体重約200 g）および Hartley 系雌性モルモット（体重約300 g）は、九動（佐賀）より購入した。12匹のラットおよびモルモットをそれぞれ4匹ずつ3群に分け、未処理群、PB 前処理群および MC 前処理群とした。PB (80 mg/kg/day) および MC (20 mg/kg/day) は、それぞれ生理食塩水およびコーン油に溶解した後、3日間腹腔内に投与した。動物肝ミクロゾームは、PB あるいは MC の最終投与日の翌日に動物を屠殺した後、直ちに肝を摘出し、常法により調製した。

2. 動物肝ミクロゾームによる *in vitro* 代謝

動物肝ミクロゾームによる2,4,6-TBA の代謝は既報²³⁾ に準じて行った。すなわち、40 μ M 2,4,6-TBA (dimethylsulfoxide に溶解) を NADPH 生成系 (0.33 mM NADP, 5 mM G-6-P, G-6-PD 1.0 unit), 6 mM MgCl₂ およびラットあるいはモルモット肝ミクロゾーム (1 mg protein) とともに、100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 中で、合計 1 mL として、37°C で 5 min インキュベートした。代謝物は、chloroform-methanol (2:1, v/v) 1 mL および *n*-hexane 3 mL を加えて抽出した。これを3回行い、有機層を集めて濃縮し、*N,O*-Bis-(trimethylsilyl) acetamide によるトリメチルシリル (TMS) 化を行った後、電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィー (GC-ECD) および質量分析計付 GC (GC-MS) により分析した。

代謝物の定量は、2,4,6-TBA の検量線を用いて、GC-ECD により測定した。その測定条件は次の通りである。分析機器、ECD 付 HP5890 Series II ガスクロマトグラフ (Hewlett-Packard 製); カラム、DB-1フューズドシリカキャピラリーカラム (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m 膜厚, J&W Scientific 製); オープン温度, 200°C; 注入口温度, 250°C; 検出器温度, 250°C; キャリアーガス, N₂ (1 mL/min)。

代謝物の分子量は GCMS2010 (島津製作所製) を用いて、EI モードで測定した。その分析条件は次の通りである。カラム、DB-1フューズドシリカキャピラリーカラム (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μ m 膜厚, J&W Scientific 製); オープン温度, 70°C (1.5 min) - 20°C /min - 230°C (0.5 min) - 4°C /min - 280°C (5 min); 注入口温度, 250°C; 検出器温度, 280°C; キャリアーガス, He (1 mL/min)。

3. DPPH ラジカル消去活性

DPPH ラジカル消去活性は、既報^{24, 25)} に準じて測定した。すなわち、25~125 μ M ハロゲン化合物 (50% ethanol に溶解) を 200 μ M DPPH 溶液, 5% ethanol および 50 mM MES 緩衝液 (pH 6.0) とともに合計 4 mL として、室温で 20 min 反応させた。その後、吸光度 (525 nm) を測定し、濃度と吸光度の関連を求めた。各ハロゲン化合物の DPPH 消去活性は、50% ethanol のみを添加して同様に操作したときの吸光度をコントロール (100%) として、その 50% を阻害する各ハロゲン化合物濃度 (IC₅₀) として算出した。なお、標準物質として Trolox を用いた。

4. リノール酸自動酸化阻害活性

リノール酸を用いた自動酸化活性は、既報^{25, 26)}に準じて測定した。まず、キャップ付遠沈管にリノール酸 1 mg/mL (99.5% ethanol に溶解), 125 μ M 各ハロゲン化合物 (80% ethanol に溶解) および 80% ethanol を加えて合計 40 μ L とし、好氣的に 80°C で 60 min 加熱した。その後、氷冷し、20 mM BHT, 8% SDS, 蒸留水および 12.5 mM DETBA を添加して総計 4 mL とした後、キャップを閉めて 95°C で 15 min 加熱した。氷冷後、同量の ethyl acetate を添加して混合、攪拌した。その後、室温で遠心分離 (2,000 rpm, 10 min) して得られた ethyl acetate 層について、蛍光強度 (励起波長, 515 nm; 蛍光波長, 555 nm) を測定した。各ハロゲン化合物の阻害率 (%) は、80% ethanol を用いて同様に操作した時の蛍光強度をコントロール (100%) として求めた。なお、標準物質として Trolox を用いた。

5. その他

ラットおよびモルモット肝ミクロゾームのタンパク質の定量は、Lowry 法²⁷⁾を用いて行った。なお、標準タンパク質として牛血清アルブミンを用いた。また統計処理は、Student's *t*-test により危険率 5% 以下 ($p < 0.05$) をもって有意差ありと判定した。

結 果

1. 動物肝ミクロゾームによる2,4,6-TBAの *in vitro* 代謝

ラットとモルモット肝ミクロゾームにより生成された2,4,6-TBA代謝物のTMS化体のGC-ECDクロマトグラムをFig. 2に示す。ラットでは、未変化体の2,4,6-TBA以外に、代謝物と思われるピーク (M-1) が、保持時間7.0 min に検出された。一方、モルモットでは、M-1に加え、保持時間9.5 min に代謝物と思われる新たなピーク (M-2) が検出された。次にラット肝ミクロゾームを用いてインキュベーション時間の検討を行った。その結果、Fig. 3に示したように、M-1の生成は反応後5 min 間では直線的に増加したが、その後頭打ちの状態となった。そこで、以下の実験ではインキュベーション時間を5 min とした。

次に、代表的なP450誘導剤前処理が2,4,6-TBA代謝へ及ぼす影響を調べた (Table 1)。未処理ラット肝の場合、M-1の生成は0.14 nmol/min/mg proteinであったが、PB前処理により、M-1は未処

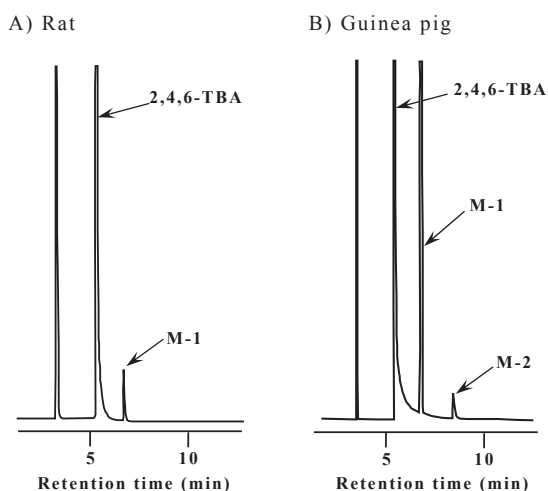


Fig. 2 GC-ECD chromatograms of the trimethylsilylated derivatives of 2,4,6-TBA metabolites formed by liver microsomes of untreated rats (A) and guinea pigs (B)

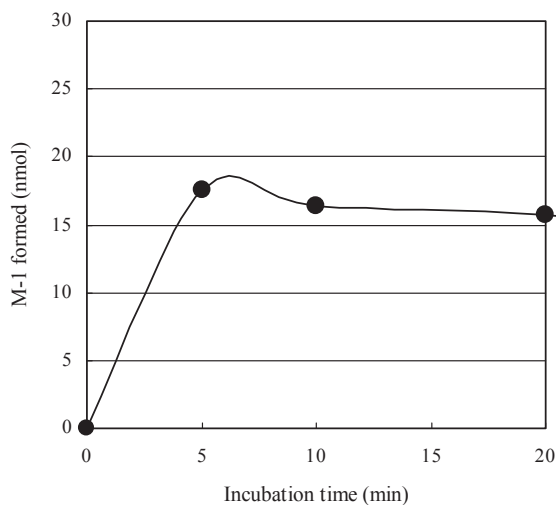


Fig. 3 Time course of M-1 formed by liver microsomes of PB-treated rats

理の約12倍と顕著に増加した。また、MC前処理でもM-1は、未処理の3倍に増加した。一方、未処理モルモット肝の場合、M-1とM-2の生成量はそれぞれ0.68と0.05 nmol/min/mg proteinであったが、PB前処理により、M-1とM-2は、ラットと同様に、それぞれ未処理の約4倍と約1.5倍に増加した。しかしながら、MC前処理により、M-1とM-2は、それぞれ未処理の51%と11%まで激減した。

Table 1 Effects of cytochrome P450 inducer on 2,4,6-TBA metabolism by rat and guinea pig liver microsomes

Animal	Treatment	Metabolite formed (nmol/min/mg protein)	
		M-1	M-2
Rat	None	0.142 ± 0.023 (1.0)	N.D.
	PB	1.740 ± 0.502* (12.3)	N.D.
	MC	0.382 ± 0.133* (2.7)	N.D.
Guinea pig	None	0.675 ± 0.150 (1.0)	0.053 ± 0.020 (1.0)
	PB	2.558 ± 0.282* (3.8)	0.077 ± 0.016 (1.5)
	MC	0.342 ± 0.040* (0.5)	0.006 ± 0.005* (0.1)

Each value is mean ± S.D. of four animals and the values in parentheses are the ratio to untreated animals. N.D., not detected.

* Significantly different from untreated animals ($p < 0.05$).

さらに、代謝物の化学構造を明らかにするため GC-MS にて分析を行った。その結果、Table 2 に示すように、M-1 の TMS 化体は分子量 400 を有していた。この結果から、2,4,6-TBA が脱メチル化された 2,4,6-TBP に TMS 基が結合したものと考えられた。そこで、予想代謝物として考えられる 2,4,6-TBP (標準品) の TMS 化体と比較したところ、分子量 400 を有すること、フラグメントイオン $[M^+ - 15]$ が強く検出されること、さらに GC-MS における保持時間 (8.13 min) がいずれも完全に一致した。以上のことから、M-1 は 2,4,6-TBA が脱メチル化した 2,4,6-TBP であることが明らかとなった。なお、M-2 については生成量が少ないことから、今回分子量を明らかにするには至らなかった。

2. DPPH ラジカル消去活性

各ハロゲン化合物を DPPH ラジカルとともに

50% エタノール、MES 緩衝液中、室温で 20 min 反応させた。Fig. 4 には、6 種類の各ハロゲン化合物 25~125 μ M 添加時の吸光度曲線を示す。2,4,6-ハロゲン化合物、すなわち 2,4,6-TBA、2,4,6-TBP および 2,4,6-TCP は、今回使用した最大濃度 125 μ M でいずれも約 10% 程度の DPPH ラジカル消去活性しか示さなかった (Fig. 4 A)。また、塩素置換位置の異なる 4 種類の TCP、すなわち 2,3,5-TCP、2,3,6-TCP、2,4,5-TCP および 2,4,6-TCP では、さらに活性は低く、最大濃度 125 μ M の場合で DPPH ラジカル消去活性は、約 5% 程度であった (Fig. 4 B)。なお、標準物質 Trolox の IC₅₀ 値、すなわち 50% 阻害を示す濃度は 45.1 μ M であり、既報²⁵⁾と同程度の強い活性であった。

3. リノール酸自動酸化阻害活性

この阻害活性は、不飽和脂肪酸のリノール酸を加熱して起こる過酸化反応に対し、化学物質を添加し、その阻害活性 (%) を調べるもので、生体内での挙動により近い反応と考えられる。実際には、リノール酸の自動酸化により生成したアルデヒド体を高感度な DETBA 法にて分析する。Fig. 5 に、各ハロゲン化合物の結果を示した。まず、2,4,6-TBA は、コントロールのリノール酸自動酸化を約 20% 阻害した。一方、2,4,6-TBA 代謝物の 2,4,6-TBP では、66% の強い阻害活性を示した。次に、4 種の TCP について調べたところ、2,4,6-TCP、2,4,5-TCP および 2,3,5-TCP は、40% 前後の阻害活性を有していたが、2,3,6-TCP は全く阻害活性を示さなかった。なお、標準物質の Trolox は、リノール酸自動酸化反応の 85% を阻害し、既報²⁵⁾と同様、強い阻害活性を示した。

考 察

今回、ラットおよびモルモット肝ミクロゾームにより 2,4,6-TBA の代謝について調べた結果、2,4,6-TBA はラットおよびモルモット肝ミクロゾームにより、非常に速やかに 2,4,6-TBP (M-1) へと脱メ

Table 2 GC-MS data of the trimethylsilylated derivatives of 2,4,6-TBA metabolite and its authentic compound

Compound	Molecular weight	Mass fragmentation (%) ^{a)}			Retention time (min)
		$[M^+]$	$[M^+ - 15]$	$[M^+ - 43]$	
2,4,6-TBA	342	100	66	31	7.18
M-1	400	100	450	-	8.13
2,4,6-TBP	400	100	466	-	8.13

TBA, tribromoanisole; TBP, tribromophenol.

^{a)} Relative intensity is expressed as percentage of molecular ion.

A) 2,4,6-Trihalogenated compounds

B) Trichlorophenols

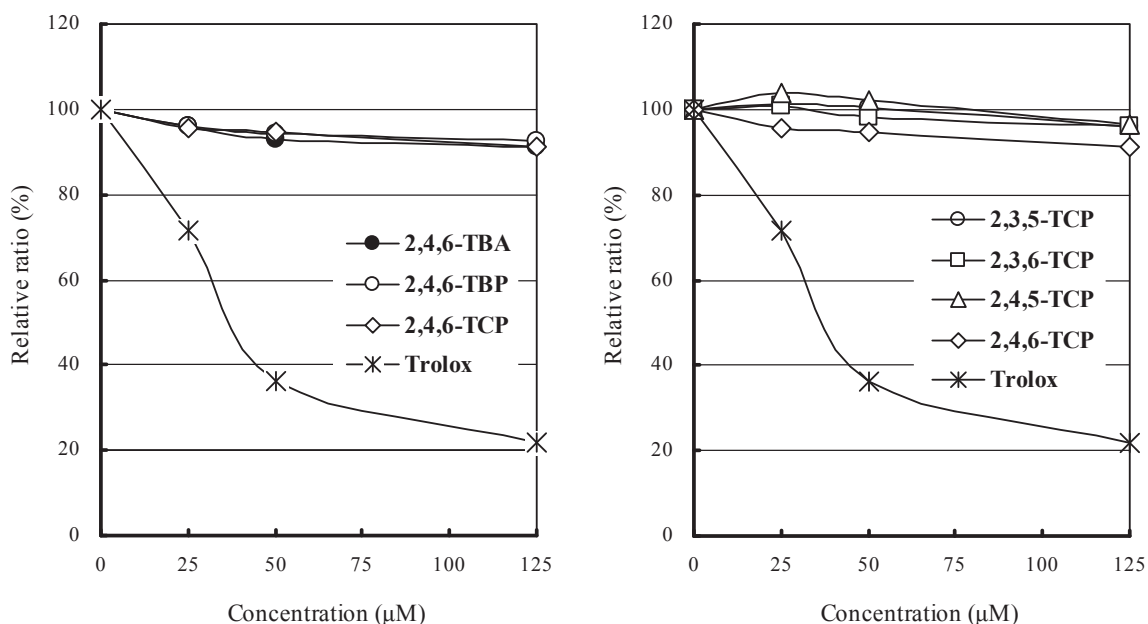


Fig. 4 DPPH radical-scavenging activity of three 2,4,6-trihalogenated phenols (A) and four trichlorophenols (B)

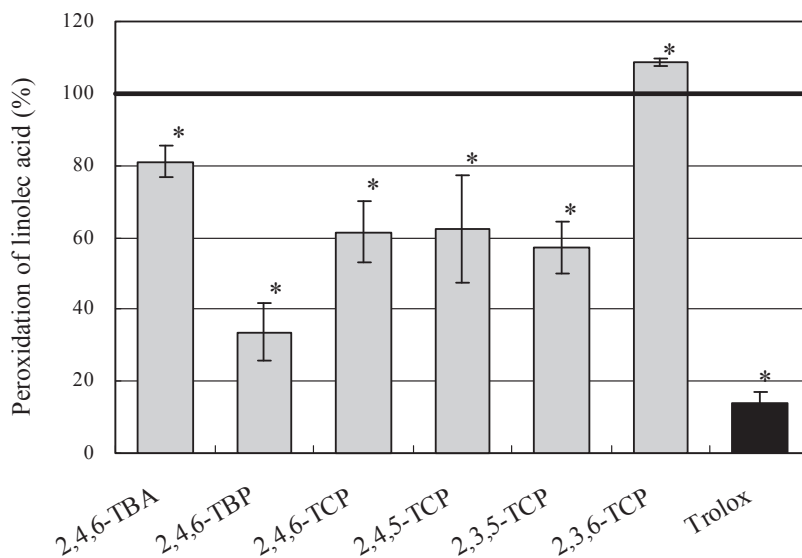


Fig. 5 Inhibitory effect of trihalogenated phenols on the auto-oxidation of lioleic acid

* Significantly different from control ($p < 0.05$).

Each bar represents the mean \pm S.D. of triplicate determinations.

チル化された。また、モルモットでは、M-1の生成活性がラットに比べ数倍高いこと、および2,4,6-TBPの他に、M-2を生成することから動物種差が明らかになった。なお、M-2については微量であったため、化学構造を明らかにするには至らなかった。次に、P450誘導剤を用いた結果から、2,4,6-TBAの脱メチル化反応は、両動物ともにP450分子種のCYP2B酵素により、強く触媒されることが示唆された。また、ラットではCYP1A酵素も本反応を弱いながらも触媒した。その代謝経路をFig. 6に示した。一般に、CYP2BとCYP1A酵素の関与を特定するのに、それぞれ7-pentoxoresorufinの脱ペンチル化反応²⁸⁾と7-ethoxyresorufinの脱エチル化反応²⁹⁾がよく用いられるが、本研究での2,4,6-TBAの脱メチル化反応はCYP2B酵素の関与を特定するのに利用できるかもしれない。

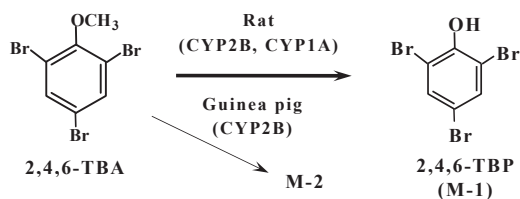


Fig. 6 Postulated metabolic pathways of 2,4,6-TBA in animal liver

ところで、phenol, cresolおよびtriclosan³⁰⁾などのフェノール化合物は、抗生物質やサルファ剤とともに、抗菌作用を有することが知られている。このうち、塩素化フェノール化合物のtriclosanはわが国においては薬用石けんとして0.3%含有製剤が手指や皮膚の消毒に使用されている。最近、松原らは海綿類や海藻類が含有する2,4,6-TBP, tetrabromocatecholおよび2,2'-dihydroxy (diOH)-BB80などの臭素化フェノール化合物が、グラム陽性菌に対しては、triclosanに匹敵する強さの増殖抑制作用を有することを明らかにした³¹⁾。本研究では、2,4,6-TBPおよび4種類のTCPについて、抗菌作用とは別の生理活性として抗酸化活性を調べた。まず、DPPHラジカル消去活性を調べたが、いずれのハロゲン化合物もほとんど活性を示さなかった。ところが、リノール酸自動酸化阻害活性を調べたところ、臭素化フェノール、すなわち、2,4,6-TBPが66%の強い阻害活性を有していた。また、TCPのうち、2,4,6-TCP, 2,4,5-TCPおよび2,3,5-TCPも40%程度の弱い阻害を示した。これらの結果より、塩素化フェノールより臭素化フェノールの方が強いリノール酸自動酸化阻害活性を有すること

が示唆された。

われわれの研究室では、これまでに7種類のフェニルプロパノイド類と6種類のフラボノイド類の抗酸化活性を調べた結果、従来の報告と同様に、caffeic acid, chlorogenic acid, luteolinおよびeriodictyolなどのカテコール化合物がDPPHラジカル消去活性およびリノール酸自動酸化阻害活性のいずれも高い活性を有することを示した²⁵⁾。また、ferulic acidやhesperetinのように、カテコール基の3位がメチル化されると両活性が減弱されることも示した²⁵⁾。本研究での2,4,6-TBPやTCPはほとんどDPPHラジカル消去活性を示さなかったが、これはフェノール性OH基の片側あるいは両側に、塩素や臭素が結合しているため、DPPHラジカルとの反応性が低下したためであると考えられる。

最近、Koschierら³²⁾は、2,4,6-TBAについてラットで毒性評価を行い、①2,4,6-TBAは生物学的利用率が高いこと、②ラットにおけるNOEL(最大無毒性量)は1,000 mg/kg body weight/dayであること、③細菌に対する変異原性がないこと、を報告した。これらの結果は、2,4,6-TBAの毒性がかなり弱いことを示しているが、一方、経口で28日間1,000 mg/kg body weight/dayを連続投与した場合、雄ラットでのみ、腎重量と肝重量の増加を観察している。彼らは、このような組織重量の増加を2,4,6-TBA投与に対する生体の適応反応と結論しているが、本研究の結果から、2,4,6-TBAの脱メチル化代謝物である2,4,6-TBPの毒性の可能性も考えられる。この点は今後の課題である。

総括

1. 海洋生物由来のハロゲン化合物の1つである2,4,6-TBAのラットおよびモルモット肝ミクロゾームによる*in vitro*代謝を調べた。2,4,6-TBAは両動物肝ミクロゾームにより速やかに脱メチル化され、主代謝物として2,4,6-TBP(M-1)へと代謝された。なお、モルモットでは、M-1の生成はラットの約5倍と高く、さらにM-1以外に、微量代謝物としてM-2の生成もみられた。現在のところ、M-2の化学構造は不明である。

2. 2,4,6-TBA代謝に及ぼすP450誘導剤の影響を調べた。M-1の生成は、PB前処理により、ラットで未処理の12倍、モルモットでは約4倍に促進された。このことから、2,4,6-TBAの代謝にはP450分子種のうちCYP2B酵素が関与することが強く示唆された。また、ラットではMC前処理により、M-1の生成が未処理の約3倍に増加されたことか

ら、CYP1A 酵素の関与も示唆された。

3. 2,4,6-TBA および 5 種類のハロゲン化フェノールについて、DPPH ラジカル消去活性およびリノール酸自動酸化阻害活性による抗酸化活性を調べた。その結果、いずれの化合物も DPPH ラジカル消去活性はほとんど見られなかった。一方、リノール酸自動酸化阻害活性をみると、2,4,6-TBP が最も強かった。

以上の結果から、2,4,6-TBA は、動物肝ミクロゾームにより速やかに脱メチル化されること、また、主代謝物の2,4,6-TBP はリノール酸自動酸化反応に対して比較的強い阻害活性を有することが明らかとなった。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、ご協力いただきました小島裕美助手および当研究室の諸氏（楠林 薫、古屋知代、村田麻衣子）に感謝します。

Abstract

In vitro metabolism of 2,4,6-tribromoanisole (TBA), which is found in marine biota, by rat and guinea pig liver microsomes was studied and the anti-oxidative activity of its related compounds was compared. In both animals, 2,4,6-TBA was very rapidly demethylated to 2,4,6-tribromophenol (TBP) and the formation rate in guinea pig liver microsomes was 5 times faster than that in rat liver microsomes. Phenobarbital pretreatment accelerated the formation of 2,4,6-TBP to 12-fold of untreated rats and 4-fold of untreated guinea pigs, suggesting an involvement of CYP2B enzymes in the demethylation of 2,4,6-TBA in both animals. The anti-oxidative activity of 2,4,6-TBP and four trichlorophenol (TCP) isomers such as 2,3,5-, 2,3,6-, 2,4,5- and 2,4,6-TCP was compared. All compounds used in this study showed no DPPH radical-scavenging activity, whereas 2,4,6-TBP inhibited auto-oxidation of linoleic acid with the highest activity of all phenolic compounds used.

文 献

- 1) 堀 伸二郎. 2010. 食品中ダイオキシン等有機化学物質の分析と暴露評価. 食品衛生学雑誌 51 (6) : 373-382.
- 2) Utkina NK, Denisenko VA, Scholokova OV, Virovaya MV, Gerasimenko AV, Povov DY, Krasokhin VB, Popov AM. 2001. Spongiadioxins A and B, two new polybrominated dibenzo-*p*-dioxins from an Australian marine sponge *Dysidea dendyi*. *Journal of Natural Products* 64 (2) : 151-153.
- 3) Liu H, Namikoshi M, Meguro S, Nagai H, Kobayashi H, Yao X. 2004. Isolation and characterization of polybrominated diphenyl ethers as inhibitors of microtubule assembly from the marine sponge *Phyllospongia dendyi* collected at Palau. *Journal of Natural Products* 67 (3) : 472-474.
- 4) Vetter W, Janussen D. 2005. Halogenated natural products in five species of Antarctic sponges: compounds with POP-like properties? *Environmental Science and Technology* 39 (11) : 3889-3895.
- 5) Melcher J, Janussen D, Garson MJ, Hiebl J, Vetter W. 2007. Polybrominated hexahydroxanthene derivatives (PBHDs) and other halogenated natural products from the Mediterranean sponge *Scalarispongia scalaris* in marine biota. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52 (4) : 512-518.
- 6) Flodin C, Whitfield FB. 2000. Brominated anisoles and cresols in the red algae *Polysiphonia sphaerocarpa*. *Phytochemistry* 53 (1) : 77-80.
- 7) Malmvärn A, Marsh G, Kautsky L, Athanasiadou M, Bergman Å, Asplund L. 2005. Hydroxylated and methoxylated brominated diphenyl ethers in the red algae *Ceramium tenuicorne* and blue mussels from the Baltic Sea. *Environmental Science and Technology* 39 (9) : 2990-2997.
- 8) Malmvärn A, Zebuhr Y, Kautsky L, Bergman Å, Asplund L. 2008. Hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers and polybrominated dibenzo-*p*-dioxins in red algae and cyanobacteria living in the Baltic Sea. *Chemosphere* 72: 910-916.
- 9) Haraguchi K, Kotaki Y, Relox JR, Romero ML, Terada R. 2010. Monitoring of naturally produced brominated phenoxyphenols and phenoxyanisoles in aquatic plants from the Philippines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (23) : 12385-12391.
- 10) Vetter W, Jun W. 2003. Non-polar halogenated natural products bioaccumulated in marine samples. II. Brominated and mixed halogenated compounds. *Chemosphere* 52 (2) : 423-31.
- 11) Marsh G, Athanasiadou M, Bergman Å, Asplund L. 2004. Identification of hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers in Baltic Sea salmon

- (*Salmo salar*) blood. *Environmental Science and Technology* **38** (1) : 10-18.
- 12) Hiebl J, Melcher J, Gundersen H, Schlabach M, Vetter W. 2006. Identification and quantification of polybrominated hexahydroxanthene derivatives and other halogenated natural products in commercial fish and other marine samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54** (7) : 2652-2657.
- 13) Covaci A, Losada S, Roosens L, Vetter W, Santos FJ, Neels H, Storelli A, Storelli MM. 2008. Anthropogenic and naturally occurring organobrominated compounds in two deep-sea fish species from the Mediterranean Sea. *Environmental Science and Technology* **42** (23) : 8654-8660.
- 14) Haraguchi K, Hisamichi Y, Kotaki Y, Kato Y, Endo T. 2009. Halogenated bipyrroles and methoxylated tetrabromodiphenyl ethers in tiger shark (*Galeocerdo cuvier*) from the southern coast of Japan. *Environmental Science and Technology* **43** (7) : 2288-2294.
- 15) Pena-Abaurrea M, Weijs L, Ramos L, Borghesi N, Corsolini S, Neels H, Blust R, Covaci A. 2009. Anthropogenic and naturally-produced organobrominated compounds in bluefin tuna from the Mediterranean Sea. *Chemosphere* **76** (11) : 1477-1482.
- 16) Vetter W, Scholz E, Gaus C, Muller JF, Haynes D. 2001. Anthropogenic and natural organohalogen compounds in blubber of dolphins and dugongs (*Dugong dugon*) from northeastern Australia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **41**: 221-231.
- 17) Vetter W, Stoll E, Garson MJ, Fahey SJ, Gaus C, Muller JF. 2002. Sponge halogenated natural products found at parts-per-million levels in marine mammals. *Environmental Science and Technology* **21** (10) : 2014-2019.
- 18) Marsh G, Athanasiadou M, Athanassiadis I, Bergman Å, Endo T, Haraguchi K. 2005. Identification, quantification, and synthesis of a novel dimethoxylated polybrominated biphenyl in marine mammals caught off the coast of Japan. *Environmental Science and Technology* **39**: 8684-8690.
- 19) Haraguchi K, Kato Y, Atobe K, Okada S, Endo T, Matsubara F, Oguma T. 2008. Negative APCI-LC/MS/MS method for determination of natural persistent halogenated products in marine biota. *Analytical Chemistry* **80** (24) : 9748-9755.
- 20) Haraguchi K, Hisamichi Y, Endo T. 2009. Accumulation and mother-to-calf transfer of anthropogenic and natural organohalogenes in killer whales (*Orcinus orca*) stranded on the Pacific coast of Japan. *Science of the Total Environment* **407** (8) : 2853-2859.
- 21) Chatonnet P, Bonnet S, Boutou S, Labadie MD. 2004. Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoanisole in musty, corked odors in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52** (5) : 1255-1262.
- 22) Vetter W. 2006. Marine halogenated natural products of environmental relevance. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **188**: 1-57.
- 23) Ohta C, Haraguchi K, Kato Y, Koga N. 2005. *In vitro* metabolism of 2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl (CB187) by liver microsomes from rats, hamster and guinea pigs. *Xenobiotica* **35** (4) : 319-330.
- 24) Oki T, Masuda M, Kobayashi M, Nishiba Y, Furuta S, Suda I, Sato T. 2002. Polymeric procyanidins as radical-scavenging components in red-hulled rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50** (26) : 7524-7529.
- 25) 太田千穂, 森岡樹子, 加藤善久, 原口浩一, 遠藤哲也, 古賀信幸. 2011. フェニルプロパノイド類とフラボノイド類の抗酸化作用と α -グルコシダーゼ阻害作用: 構造活性相関について. 中村学園大学・中村学園大学短期大学部研究紀要 **43**: 243-249.
- 26) 須田郁夫. 2002. 食品の機能性評価マニュアル. 食品総合研究所編, pp 11-12.
- 27) Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.
- 28) Burke MD, Thompson S, Elcombe CR, Halpert J, Haaparanta T, Mayer RT. 1985. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: A series of substrates to distinguish between different induced cytochrome P-450. *Biochemical Pharmacology* **34**: 3337-3345.
- 29) Burke MD, Mayer RT. 1974. Ethoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal *O*-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition* **2**: 583-588.
- 30) DeSalva SJ, Kong BM, Lin YJ. 1989. Triclosan: a safety profile. *American Journal of Dentistry* **2**: 185-196.
- 31) 松原大, 加藤善久, 尾熊隆嘉, 小瀧裕一, 遠藤哲

也, 太田千穂, 古賀信幸, 原口浩一. 2009. 海綿由来フェノール性臭素化合物の細菌増殖抑制効果: 抗菌薬の開発をめざして. 環境トキシコロジー講演要旨集, p186.

- 32) Koschier F, Gallo MA, Feng X, Baxter GE, Preston R, Stevens K, Powers W. 2011. Toxicological studies on 2,4,6-tribromoanisole. *Food and Chemical Toxicology* **49** (9) : 2078-2080.