

放線菌 *Streptomyces bangladeshensis* の培養液および渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. の培養液から単離したジ(2-エチルヘキシル)フタレート (DEHP) の¹⁴C 濃度測定結果について

Analysis of natural abundance ¹⁴C contents of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) isolated from a culture broth of *Streptomyces bangladeshensis* and cultured cells of a dinoflagellate *Amphidinium* sp.

浪越 通夫・Magie M. Kapojos・鵜飼 和代・山崎 寛之
Michio Namikoshi, Magie M. Kapojos, Kazuyo Ukai, Hiroyuki Yamazaki

東北薬科大学天然物化学教室

Department of Natural Product Chemistry, Tohoku Pharmaceutical University, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan.

*Corresponding author. E-mail: mnami@tohoku-pharm.ac.jp

Abstract

Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) was isolated from a culture broth of *Streptomyces bangladeshensis* strain NBRC 102113 and cultured cells of *Amphidinium* sp. to investigate if the isolated DEHP was a natural product. These microorganisms have been reported to provide DEHP, which may be produced by these microorganisms. The ¹⁴C contents (pMC) of DEHP and a positive control (a mixture of two fatty acids) purified from the ethanol extract of the dinoflagellate cells were 16.3 ± 0.1 and 85.7 ± 0.3 , respectively, and DEHP and a mixture of two unsaturated fatty acids from the broth filtrate of *S. bangladeshensis* were 14.3 ± 0.1 and 101.9 ± 0.4 , respectively. Consequently, the origin of DEHP isolated from these microorganisms was an industrial product.

There were several reports that claimed DEHP was a microbial origin by the fermentation with radio active and stable isotope-labeled biosynthetic precursors. However, a labeled DEHP was not isolated but detected by HPLC or MS in these reports. Our study suggests that a labeled DEHP has to be purified and examined incorporated pattern to prove its origin.

Keywords: dialkyl phthalate; dinoflagellate; *Amphidinium* sp.; *Streptomyces bangladeshensis*; ¹⁴C contents
キーワード: フタル酸エステル; 渦鞭毛藻; 放線菌; ジ(2-エチルヘキシル)フタレート; ¹⁴C 濃度

1. はじめに

フタル酸ジエステル類はプラスチック可塑剤として利用されるほか、塗料、接着剤、インクなど幅広い工業製品やその製造に使用されている。本邦では Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) が最も多く使用され、フタル酸ジエステル類の 6 割以上を占める。これらのフタル酸ジエステル類は揮発や流出などによって環境中に放出され、土壌、海水、海泥、食品など環境中のあらゆるところから検出されるため、環境汚染物質と認識されている。また、ヒトをはじめとする広範な生物への毒性の懸念が報告されている [1-5]。

一方、動植物の抽出物や微生物の培養液からフタル酸ジエステルが得られたとの報告、さらにはそれらの生物によって作られた可能性を指摘する報告もある [6-24]。

2004 年に Chen は、紅藻ウシケノリ (*Bangia atropurpurea*) の無性世代の培養液から DBP と DEHP を検出し、また、 ^{14}C でラベルした NaHCO_3 を用いて培養した所、DBP で約 171 倍、DEHP で 5.7 倍に放射活性が挙げたと報告している [6]。この報告を天然物化学的に検証し、さらに微生物を用いた生合成実験へと発展させていくことを目標として、本研究を 2005 年 4 月に開始した。これまでに 3 種類の海藻 [25, 26]、醸造用酵母と麴 [27] などから DEHP、DBP を単離し、その ^{14}C 濃度測定を行ってきた。工業で使用されているフタル酸ジエステル類は石油から製造されているので、その ^{14}C 濃度は検出限界以下である。一方、生物によって生合成された天然物であるとする、現代炭素と同等の ^{14}C 濃度が検出される筈である [28-31]。

今回は、微生物の培養液から DEHP を単離し、それが微生物によって生産されていたのではないかと報告されている学術論文を精査し、その微生物あるいは培養液を入手して DEHP を単離精製し ^{14}C 濃度測定を行う実験を計画した。

検索された論文 [19-24] のうち、菌株を入手することができた放線菌 *Streptomyces bangladeshensis* NRRL B-24326 株 [21] および培養藻体抽出画分をご供与いただいた渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. [24] からの DEHP の単離、精製と ^{14}C 濃度測定を行った。

2. 機器および試薬

^1H および ^{13}C NMR は日本電子 JEOL JNM-AL-400 (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz) あるいは JNM-LA-600 (^1H , 600 MHz; ^{13}C , 150 MHz) NMR 測定機を用い、重クロロホルム溶液で測定した。ガスクロマトグラフィー-質量分析 (GC-MS) は日本電子 JMS-K9 UltraQuad GC/MS 質量分析計を用いて測定した [カラム: TC-70 (内径 0.32 mm、長さ 30 m、膜厚 0.25 μm)、キャリアーガス: He (1 mL/min)]。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) には、東ソーのシステム (ポンプ CCMP-II、コントローラー PX-8020、フォトダイオードアレイ検出器 PD-8020、オンラインデガッサー SD-802、カラムオープン CO-8010) を使用した。分取ガスクロマトグラフィーには、島津 Gas Chromatograph GC-8A を用いた。

DEHP の標準試料 (化学工業製品) はそれぞれ昭和エーテル株式会社およびシージーエスター株式会社から提供されたものを使用した。抽出と分離には全て特級の有機溶媒を使用し、その他の試薬類は市販のもっとも高品質のものをを用いた。

3. 放線菌 *Streptomyces bangladeshensis* の培養と DEHP の単離

文献 [21] に記載されている菌株は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) 生物遺伝資源部門 (Biological Resource Center) に NBRC 102113 として保存されているので、これを購入した。そのカタログには、bis-(2-ethylhexyl)phthalate を生産するとの記載がある。

アンプル中に保存されていた菌はカタログに記載された方法に従い、[peptone (0.5 g), Yeast extract (3.0 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.0 g)、蒸留水 100 mL、pH 7.0] の溶液で 24 時間、28 $^\circ\text{C}$ で培養し、スラント [Starch (1.2 g), NA Amine (0.36 g), Yeast extract (24 mg), Meat extract (0.12 g), CaCO_3 (0.36 g), Agar (1.44 g)、蒸留水 100 mL、pH 7.0)] に移した。菌はスラントで継代培養して保存した。

培地組成、培養条件等の検討を行った結果、Difco[®] の Czapek-Dox Broth を pH 7.3 に調整し、500 mL の三角フラスコに 200 mL の培地を入れて 37 $^\circ\text{C}$ で 7 日間静置培養する条件が最も再現性が良いことが分かった。

Difco®の Czapek-Dox Broth の組成 (1000 mL) は以下の通りである。

Saccharose	30.0 g
NaNO ₃	3.0 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
MgSO ₄	0.5 g
KCl	0.5 g
FeSO ₄	0.01 g

DEHP は菌体抽出物からは検出されず、常に培養ろ液抽出物中に存在することが分かった。そこで DEHP の単離には、培養後にろ過して菌体を除いたろ液を酢酸エチルまたはジクロロメタンで抽出した抽出物を用いた。抽出溶媒による差はほとんど無かった。

培養ろ液の抽出物を HPLC (ODS、70%メタノールで 30 分溶出後 100%メタノールで溶出) で分離し、標品の DEHP が溶出する位置 (57.1 分) の前後を分取し、¹H NMR スペクトルで精製の度合いを確認しながら HPLC 分取を繰り返した。数回の培養と分離により、DEHP を 2.18 mg 単離した。

¹⁴C 濃度測定用のポジティブコントロールとして、培養ろ液の抽出物から HPLC (ODS、30%メタノール溶出) で 20.7 分に溶出するピークを分取した。¹H NMR スペクトルより、このフラクションには主に 2 種類の不飽和脂肪酸が含まれていることが分かったが、いずれもこの放線菌により生産された化合物であるので、ポジティブコントロールとして適当であると判断した。

4. 渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. 培養藻体抽出画分からの DEHP の単離

沖縄県石垣島で採集された紅藻マクリ *Digenea simplex* に付着する渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. の培養藻体から、DEHP および微量の bis(3-methylhexyl)phthalate と bis(5-methylhexyl)phthalate を単離したとの報告が、第 51 回天然有機化合物討論会 (名古屋) でのポスター発表 (2009 年 10 月 8 日) でなされた [24]。この研究では、¹³C ラベルした炭酸ナトリウムを炭素源とした取り込み実験も行われ、EI-MS 分析により DEHP の分子イオンピーク (*m/z* 390) 付近の変化を検出し、DEHP がこの渦鞭毛藻によって生産されていると結論している。そこで、単離された DEHP の ¹⁴C 濃度測定を行い、この結論の確証を得ることを計画した。

研究代表者の額縁守教授 (岐阜大学工学部) を介し、当該渦鞭毛藻の培養と化合物の分離を行った岐阜大学生命科学総合研究支援センターの犬塚俊康助教から、培養藻体抽出画分を提供していただくこととなった。実験用の試料は、2010 年 6 月、7 月、9 月、12 月および 2011 年 6 月、12 月の計 6 回に渡りお送りいただいた。

それぞれの試料を用いて DEHP の単離、精製方法やばらつきの検討を行い、¹⁴C 濃度測定用の DEHP は 2011 年 12 月に頂いた試料から単離、精製した。

渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. を 1 L の三角フラスコ (800 本) で 2 ヶ月培養した液 (240 L) を減圧ろ過して得た藻体を 75%エタノールで抽出し、水と酢酸エチルで分配した酢酸エチル層から 2 回のシリカゲルカラムクロマト (ヘキサン-酢酸エチル) で分離した画分 (107.3 mg) を頂いた。この画分を HPLC (カラム: ODS シリカゲル、溶出: 70%メタノール-30 分後に 100%メタノール) で分離し、標品の DEHP が溶出する前後のリテンションタイムを特に注意深く分取した。各フラクションの ¹H NMR スペクトルを測定して DEHP の有無を検出したところ、56.1 分前後のフラクション (11.53 mg) およびそのすぐ後 (57.5 分前後) のフラクション (2.18 mg) に DEHP が検出された。しかし、いずれのフラクションにも不飽和脂肪酸の混入が見られた。遊離の不飽和脂肪酸と DEHP を完全に分離するのは、HPLC や GC でも非常に難しいので、脂肪酸をメチルエステルに誘導して

分離する方法を行った。

2つのフラクション (11.53 + 2.18 mg) を合一して 0.2 mL のメタノールに溶解し、*n*-ヘキサン (0.7 mL)、次いでトリメチルジアゾメタン (2.0 M ジエチルエーテル溶液) を 40 μ L 加え、室温で 60 分攪拌した。試薬と溶媒を窒素気流で蒸発させ、残さを HPLC (条件は上と同じ) で分取し、2.03 mg の DEHP を単離した。

^{14}C 濃度測定の際のポジティブコントロールとして使用する化合物は、2011 年 6 月に頂いた試料から分離した。 ^1H NMR スペクトルより、ステアリン酸と微量のオレイン酸の混合物であると同定した。いずれの脂肪酸もこの渦鞭毛藻によって生合成されている化合物であるので、このフラクションは ^{14}C 濃度測定のポジティブコントロールとして使用できると判断した。

5. 単離した DEHP およびポジティブコントロールの ^{14}C 濃度測定結果

単離した DEHP およびポジティブコントロールの脂肪酸の ^{14}C 濃度は、2011 年度第 3 期に測定して頂いた。

表 1. 放線菌 *Streptomyces bangladeshensis* NBRC 102113 株の培養液から単離した DEHP および不飽和脂肪酸の ^{14}C 測定結果
Natural abundance ^{14}C contents of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and unsaturated fatty acid isolated from *Streptomyces bangladeshensis* NBRC 102113

compound	^{14}C content (pMC)
DEHP	14.3 ± 0.1
不飽和脂肪酸	101.9 ± 0.4

表 2. 渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. 培養藻体抽出物から単離した DEHP および脂肪酸の ^{14}C 測定結果
Natural abundance ^{14}C contents of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and fatty acid isolated from *Amphidinium* sp.

compound	^{14}C content (pMC)
DEHP	16.3 ± 0.1
脂肪酸	85.7 ± 0.3

この結果、ポジティブコントロールとして単離した脂肪酸はそれぞれ適正な ^{14}C 濃度の値を示したが、DEHP は工業製品の混入と判断できる。よって、放線菌 *Streptomyces bangladeshensis* NBRC 102113 株および渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. は DEHP を生合成していないと結論できる。

6. 考察

Streptomyces bangladeshensis NBRC 102113 株の培養においても、醸造用酵母と麹 [27] と同様に、DEHP の培地中の存在量にばらつきが見られ、全く同じ条件で同時に培養した複数のフラスコ間でも量の変動が観察された。培地のみで行ったブランクテストでは、抽出と分離操作で混入する極微量の DEHP しか検出されなかった。このブランクテストの結果は安定していた。このような状況も

醸造用酵母と麹 [27] の実験と同じであった。

Amphidinium sp. の培養藻体から単離した DEHP の ^{14}C 濃度測定結果は、この化合物が渦鞭毛藻によって生合成された可能性を否定している。このことから、取り込み実験を行った DEHP も単離同定した後に NMR および MS などにより取込み位置や取り込み率を解析する必要があることを示している。よって、Chen により報告された培養海藻の取込み実験の結果解析の信頼性も乏しいと言える。

^{14}C 濃度測定の結果から、*S. bangladeshensis* NBRC 102113 株の培養液および *Amphidinium* sp. の培養藻体から単離された DEHP は工業製品の混入物であることは明らかであるが、どのような経路で培養液に混入したのかが分からない。混入にばらつきがあるのも不可解ではある。

台湾の Chen による培養実験の報告 [6] の検証に端を発した本研究は困難の連続であった。東京海洋大学 [25] ならびに東北薬科大学 [26, 27] で行ったこれまでの実験結果から考えると、生物や食品などから単離された DEHP はいずれも工業製品の混入物である可能性が高い。DEHP が単離されたとのこれまでの報告も、天然物である可能性は無いと考えられる。

本研究の一番初めに東京海洋大学で行ったアオサ、ワカメ、マコンブからの DEHP と DBP の分離の実験において、これらの化合物、特に DBP から異常に高い ^{14}C 濃度が検出されたが [25]、その後の再検討により、 ^{13}C の存在比とこの高い ^{14}C 濃度との間に齟齬があることがわかった。考えられることは、実験を行った場所（実験室）において以前に ^{14}C を用いたトレーサー実験が行われたために ^{14}C 濃度だけが高くなったのではないかということである。トレーサー実験が行われた可能性もあり、また、同じ場所で採集した同じ海藻を東北薬科大学において実験に用いたときに ^{14}C が検出されなかった [26] ことを考慮すると、東京海洋大学での実験結果は、DEHP（および DBP）が海藻によって作られた可能性があるとの結論を導くには不都合であると言える。

現在 DEHP は環境中のあらゆるところに存在するため、混入を防ぐのは非常に難しい。よって、生物の抽出物や微生物の培養液から DEHP を単離した場合、その生物によって作られたかどうかを議論するには、確実な検証を行う必要がある。一部の報告では放射性炭素あるいは安定同位体炭素を用いた取り込み実験が行われているが、これらの取込み実験の結果の判定は放射活性あるいはマススペクトルのシフトに基づいており、ラベルされた DEHP の単離同定は行われていない。単離された DEHP が天然物であるのかどうかを明らかにするには、その ^{14}C 濃度を測定し、ラベル前駆体を取込ませた DEHP を単離同定して取込み位置を確認することが不可欠であると思われる。

謝辞

^{14}C 濃度測定をして頂いた名古屋大学年代測定総合研究センターの中村俊夫教授ならびに池田晃子さんに御礼申し上げます。また、DEHP の標準試料を提供して頂いた昭和エーテル株式会社とシージーエスター株式会社に感謝致します。

参考文献

1. Ganning, A. E.; Brunk, U.; Dallner, G. Phthalate esters and their effect on the liver. *Hepatology* **1984**, *4*, 541–547.
2. Jobling, S.; Reynolds, T.; White, R.; Parker, M. G.; Sumpter, J. P. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* **1995**, *103*, 582–587.

3. Mylchreest, E.; Sar, M.; Cattley, R. C.; Foster, P. M. Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1999**, *156*, 81–95.
4. Lovekamp-Swan, Davis, B. J. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ. Health. Perspect.* **2003**, *111*, 139–145.
5. Howdeshell, K. L.; Furr, J.; Lambright, C. R.; Rider, C. V.; Wilson, V. S.; Gray, L. E. Jr. Cumulative effects of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate on male rat reproductive tract development: altered fetal steroid hormones and genes. *Toxicol. Sci.* **2007**, *99*, 190–202.
6. Chen, C. Y. Biosynthesis of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP) from red alga—*Bangia atropurpurea*. *Water Res.* **2004**, *38*, 1014–1018.
7. Lee, K. H.; Kim, J. H.; Lim, D. S.; Kim, C. H. Anti-leukemic and anti-mutagenic effects of di(2-ethylhexyl) phthalate isolated from *Aloe vera* Linne. *J. Pharm. Pharmacol.* **2000**, *52*, 593–598.
8. El-Naggar, M. Y. M. Dibutyl phthalate and the antitumor agent F5A1, two metabolites produced by *Streptomyces nasri* submutant H35. *Biomed. Lett.* **1997**, *55*, 125–131.
9. Sastry, V. M. V. S.; Rao, G. R. K. Dioctyl phthalate, and antibacterial compound from the marine brown alga—*Sargassum wightii*. *J. Appl. Phycol.* **1995**, *7*, 185–186.
10. Stefanov, K.; Konaklieva, M.; Brechany, E. Y.; Christie, W. W. Fatty acid composition of some algae from the black sea. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 3495–3497.
11. Noguchi, T.; Ikawa, M.; Uebel, J. J.; Andersen, K. K. Lipid constituents of the red algae *Ceramium rubrum*. A search for antimicrobial and chemical defense substances. In *Marine algae in pharmaceutical science*; Hoppe, H. A.; Levring, T.; Tanaka, Y., Eds.; Walter de Gruyter & Co.: New York, 1979; pp. 711–718.
12. Shi, D. Y.; Han, L. J.; Sun, J.; Wang, Y.; Yang, Y. C.; Shi, J. G.; Fan, X. Chemical constituents from marine alga *Chaetomorpha basiretorsa*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2005**, *30*, 347–350.
13. Lee, D. -S. Dibutyl phthalate, an α -glucosidase inhibitor from *Streptomyces melanosporofaciens*. *J. Biosci. Bioeng.* **2000**, *89*, 271–273.
14. El-Naggar, M. Y. M. Dibutyl phthalate and the antitumor agent F5A1, two metabolites produced by *Streptomyces nasri* submutant H35. *Biomed. Lett.* **1997**, *55*, 125–131.
15. Savard, M. E.; Miller, J. D.; Blais, L. A.; Seifert, K. A.; Samson, R. A. Secondary metabolites of *Penicillium bilaii* strain PB-50. *Mycopathologia* **1994**, *127*, 19–27.
16. Keire, D. A.; Anton, P.; Faull, K. F.; Ruth, E.; Walsh, J. H.; Chew, P.; Quisimoro, D.; Territo, M.; Reeve, J. R., Jr. Diethyl phthalate, a chemotactic factor secreted by *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48847–48853.
17. Ivanova, V.; Oriol, M.; Montes, M. J.; Garcia, A.; Guinea, J. Secondary metabolites from a *Streptomyces* strain isolated from Livingston Island, Antarctica. *Z. Naturforsch.* **2001**, *56*, 1–5.
18. Cakir, A.; Mavi, A.; Yildirim, A.; Duru, M. E.; Harmandar, M.; Kazaz, C. Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. *J. Ethnopharm.* **2003**, *87*, 73–83.
19. Mavar-Manga, H.; Hadda, M.; Pieters, L.; Baccelli, C.; Penge, A.; Quetin-Leclercq, J. “Anti-inflammatory compounds from leaves and root bark of *Alchornea cordifolia* (Schumacher & Thonn.) Müll. Arg.” *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *115*, 25–29.
20. Amade, P.; Mallea, M.; Bouaicha, N. Isolation, structural identification and biological activity of two metabolites produced by *Penicillium olsonii* Bainier and Sartory. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 201–207.

21. Al-Bari, M. A.; Bhuiyan, M. S.; Flores, M. E.; Petrosyan, P.; Garcia-Varela, M.; Islam, M. A. *Streptomyces bangladeshensis* sp. nov., isolated from soil, which produces bis-(2-ethylhexyl)phthalate. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55*, 1973–1977.
22. Roy, R. N.; Laskar, S.; Sen, S. K. Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2. *Microbiol. Res.* **2006**, *161*, 121–126.
23. Hoang, V. L. T.; Li, Y.; Kim, S.-K. “Cathepsin B inhibitory activities of phthalates isolated from a marine *Pseudomonas* strain.” *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2083–2088.
24. 山本裕, 犬塚俊康, 額額守, 原宏和, 安藤香織. 渦鞭毛藻が産生する抗酸化作用物質の研究. 第 51 回天然有機化合物討論会 (名古屋) 2009, 講演要旨集 pp. 587-592.
25. 浪越通夫, 西川輝昭, 鵜飼和代. 3 種類の海藻ワカメ, マコンブおよびアオサから分離したジブチルフタレート (DBP) およびジ(2-エチルヘキシル)フタレート (DEHP) の ^{14}C 測定結果の解析. 名古屋大学加速器質量分析計業績報告書(XVIII), 2007, pp. 236–246.
26. 浪越通夫, 中澤孝浩, 鵜飼和代. マコンブおよびワカメから単離したジ(2-エチルヘキシル)フタレート (DEHP) の ^{14}C 測定結果について. 名古屋大学加速器質量分析計業績報告書(XXII), 2011, pp. 137–144.
27. 浪越通夫, 中澤孝浩, 鵜飼和代. 酒酵母培養液から単離したジ(2-エチルヘキシル)フタレート (DEHP) の ^{14}C 測定結果について. 名古屋大学加速器質量分析計業績報告書(XXI), 2010, pp. 152–158.
28. Teuten, E. L.; Xu, L.; Reddy, C. M. Two abundant bioaccumulated halogenated compounds are natural products. *Science* **2005**, *307*, 917–920.
29. Reddy, C. M.; Xu, L.; Eglinton, T. I.; Boon, J. P.; Faulkner, D. J. Radiocarbon content of synthetic and natural semi-volatile halogenated organic compounds. *Environ. Pollut.* **2002**, *120*, 163–168.
30. 中村俊夫. ライフサイエンスのためのアイソトープ測定機器 (第四シリーズ) <加速器質量分析法 AMS> I. 加速器質量分析 (AMS) による環境中およびトレーサ放射性同位体の高感度測定. *Radioisotopes* **2003**, *52*, 145–171.
31. Nakamura, T.; Niu, E.; Oda, H.; Ikeda, A.; Minami, M.; Ohta, T.; Oda, T. High precision ^{14}C measurements with the HVEE Tandetron AMS system at Nagoya University. *Nucl. Instr. Meth.* **2004**, *B223-224*, 124–129.

日本語要旨

放線菌 *Streptomyces bangladeshensis* NBRC 102113 株の培養液および渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. 培養藻体抽出物から単離した di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) が、これらの微生物によって生合成されている天然物であるかを検討した。それぞれ、培養液と培養藻体抽出画分から DEHP およびコントロールとして脂肪酸を HPLC および GC 分取により単離、精製した。これら DEHP と脂肪酸の ^{14}C 濃度測定結果 (pMC) はそれぞれ 14.3 ± 0.1 と 101.9 ± 0.4 (放線菌) および 16.3 ± 0.1 と 85.7 ± 0.3 (渦鞭毛藻) であった。この結果から、これらの放線菌培養液および渦鞭毛藻培養藻体から単離された DEHP は工業製品であったと考えられる。