

表2 妊婦・生殖婦人の血清中の実測値（付 臍帯血清中濃度）

物質系	略語		検出率	検出数	濃度範囲	平均値
重金属類	Al (ppb)	母体血清	60%	18	6.6-131.12	26.40
		臍帯血清	57%	17	4.6-34.0	15.40
		生殖婦人血清	100%	84	0.19-13.41	4.79
	Cd (ppb)	母体血清	80%	24	0.059-0.108	0.08
		臍帯血清	90%	27	0.005-0.072	0.04
		生殖婦人血清	100%	84	0.012-0.096	0.04
	Pb (ppb)	母体血清	80%	24	0.016-3.85	0.48
		臍帯血清	87%	26	0.031-1.004	0.30
		生殖婦人血清	100%	84	0.13-0.83	0.30
	As (ppb)	母体血清	80%	24	3.2-9.6	6.00
		臍帯血清	90%	27	2.9-8.1	5.50
	Mg (ppm)	生殖婦人血清	99%	83	16-23	18.93
	Ca (ppm)	生殖婦人血清	100%	84	81-104	92.65
	Fe (ppm)	生殖婦人血清	69%	58	0.44-1.62	1.07
	Cu (ppm)	生殖婦人血清	99%	83	0.62-1.4	0.95
	Zn (ppm)	生殖婦人血清	100%	84	0.55-1.21	0.78
	Li (ppb)	生殖婦人血清	100%	84	0.21-1.16	0.58
	B (ppb)	生殖婦人血清	100%	84	5.18-15.7	8.96
	Mn (ppb)	生殖婦人血清	100%	84	0.32-2.17	0.82
	Co (ppb)	生殖婦人血清	100%	84	0.024-0.349	0.17
	Ni (ppb)	生殖婦人血清	100%	84	0.12-0.74	0.37
	Se (ppb)	生殖婦人血清	100%	84	75-147	111.06
	Rb (ppb)	生殖婦人血清	100%	84	85-233	155.12
	Sr (ppb)	生殖婦人血清	100%	84	16-73	29.38
	Mo (ppb)	生殖婦人血清	100%	84	0.25-1.89	1.22
	Sb (ppb)	生殖婦人血清	100%	84	0.017-0.215	0.11
	Hg (ppb)	生殖婦人血清	100%	84	0.2-2.04	0.60

n=211

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

ICP-MSによる周産期生体試料中の重金属測定

神経幹細胞を用いた重金属の中樞神経系初期形成に及ぼす毒性評価

分担研究者	和泉 俊一郎	(東海大学 医学部 専門診療学系 産婦人科)
研究協力者	藤田 裕子	(国立成育医療センター研究所)
	田上 昭人	(国立成育医療センター研究所)
	内田 能安	(東海大学 医学部 専門診療学系 産婦人科)
	呉屋 憲一	(東海大学 医学部 専門診療学系 産婦人科)
	池田 仁恵	(東海大学 医学部 専門診療学系 産婦人科)
	近藤 文雄	(愛知県衛生研究所)
	林 留美子	(愛知県衛生研究所)
	猪飼 誉友	(愛知県衛生研究所)

研究要旨

周産期の生体試料（母体血、母乳、母体尿、臍帯血、臍帯、胎盤）に含まれる重金属（アルミニウム、ヒ素、カドミウム、鉛）の測定法開発を試みた。誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）により母乳中ヒ素を除く全元素の測定が可能となった。この方法により30例の母子一連試料を測定した結果、高レベルでの重金属汚染が疑われるサンプルはみとめられなかった。

また、発生段階の中樞神経系における重金属の発生毒性を評価するため、「神経幹細胞」を用いた毒性評価法の開発を試みた。この評価系によって神経幹細胞に対する増殖抑制、未分化維持能の障害、分化障害といった発生毒性を評価することが可能となった。そこで、臍帯血清レベルの重金属毒性を評価したところ、顕著な毒性はみとめられなかった。

A. 研究目的

近年、発達障害（特に中樞神経系の発達障害）と診断される小児の数が急増している。これらの障害は、未だに発症メカニズムが不明な場合が多い。環境化学物質の一つである重金属は、小児発達障害を引き起こすことが懸念されている。重金属の中には成人のみならず、メチル化水銀のように妊娠中に胎盤を通過し胎児にも被害をもたらす物質も存在する。そこで、本研究では妊娠中の母親の曝露状況や母児間移行の実態を明らかにするために、母親－新生児一連の生体試料を採取し誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP-MS）を用いて重金属量を測定することを目的とした。

また、近年急増している自閉症、学習障害、注意欠陥多動性障害など中樞神経系の発達障害の

原因の一つとしても、重金属の影響が懸念されている。しかしながら、重金属の中樞神経系初期形成期に及ぼす直接的な影響はあまり知られていない。中樞神経系は発生段階で、神経管周囲に存在する神経幹細胞が対称分裂期、非対称分裂期を経て、目的の部位に移動しながら特定の細胞群（ニューロン、グリア）に分化することにより複雑な神経回路網を形成する。この発生過程は胎児期の非常に早い時期に起こりその過程は非常に複雑であることから、重金属による発生毒性メカニズムを明らかにするための障害となっている。そこで本研究では、中樞神経系の発生段階で最も早期に出現する「神経幹細胞」を用いて、培養系での毒性評価系の構築を試みた。

## B. 研究方法

### B-1 重金属測定

#### B-1.1 試料の採取

東海大学医学部産婦人科外来において、インフォームドコンセントを行い、同意書を得て試料の採取をおこなった。母体由来の試料として血液、母乳、尿を採取した。また、新生児由来の試料として臍帯血、臍帯、胎盤を採取した。試料は採取後、マイナス 20℃で凍結保存し、分析の前処理直前に解凍して使用した。

#### B-1.2 測定元素

測定元素および内標元素はそれぞれ、アルミニウム:Al (コバルト:Co)、ヒ素:As (イットリウム:Y)、カドミウム:Cd (ロンジウム:Rh)、鉛:Pb (ビスマス:Bi) の 4 元素とした。(括弧内は内標として用いた元素)

#### B-1.3 試薬および器具

試料の分解には、関東化学社製の硝酸(1.42 Ultrapur-100) および過酸化水素(Ultrapur)を用いた。Al, As, Cd, Pb, Co, Y, Rh, Bi の標準溶液は和光純薬社製を用いた。試料の希釈等には、ミリポア社製 MilliQ SP (電気伝導度 18.3Ω) で精製した超純水を使用した。サンプル水溶液、内標準溶液、ライン洗浄用超純水は全て 0.5%濃度の硝酸を添加して用いた。溶液の計量に使用するピペットマンチップは 5%硝酸溶液に一晩浸漬した後、超純水で流水洗浄した。サンプル調整に用いるビーカー、メスフラスコは使用直前に 0.5%硝酸溶液でとも洗いをした後に使用した。

#### B-1.4 試料の前処理および ICP-MS 条件

試料の前処理法および ICP-MS 条件の詳細は図 1 に示した。マイクロウェーブによる分解は、出力 200W の電子レンジおよびマイクロ波分解容器(ジューエルサイエンス社製 MV-7 用 PFA 小容器)を用いた。3分間の分解を4回行い、各々の反応の間には分解容器ごと3分間氷上冷却した。

### B-2 神経幹細胞培養による重金属の発生毒性評価

胎齢14日 (E14) のC57BL6マウスE14マウスの

大脳より線状体原器より細胞を分離した。ニューロスフェア培地に実サンプル測定によって得られた臍帯血清濃度(平均値および最高値)および陽性コントロールとして200ppbの重金属混合溶液(Al・Cd・As・Pb)を添加し、1週間培養を行った。ニューロスフェア培地としてB27(1:50)、bFGF(20ng/ml)、EGF(20ng/ml)および抗生物質を含むDMEM/F12培地を用いた。

培養後1週間目に重金属添加、または非添加条件でニューロスフェアの直径を計測して増殖能を評価した。また、形成されたニューロスフェアからRNAを抽出し、リアルタイム RT-PCR で未分化マーカー遺伝子(Nestin, Sox2, Notch1)の発現量を比較定量した。続いて、ニューロスフェアを培養後1週間目にファイブロネクチンコートした培養ディッシュに播種し、さらに1週間分化誘導培地で培養を行った。培養後、4%パラフォルムアルデヒドで固定し、ニューロンに対する特異抗体である抗 $\alpha$ -III tubulin抗体を用いて免疫染色をおこなった。

## C. 結果および考察

### C-1 重金属測定

母子一連の周産期サンプル(母親血清・尿・母乳・臍帯血清・臍帯組織・胎盤)中のアルミニウム、ヒ素、カドミウム、鉛濃度の測定法開発を行ってきた。今期、標準試料の測定において正しい結果の得られなかった母乳中ヒ素を測定項目から除外し、計30例のサンプル分析を行った(表1)。アルミニウム、ヒ素、カドミウム、鉛ともに全てのサンプルから検出された。

環境中の有害物質であるダイオキシンは年齢とともに血中レベルが上昇するという報告がある。そこで、母親および臍帯血清中の重金属量と母親年齢との相関性を調べた。今回用いたサンプル提供者の年齢は20歳から41歳までで、平均年齢は30歳であった。年齢と母親または臍帯血清中の重金属量の相関性を表2に示した。いずれの元素の測定値においても高い相関性は見られ

なかった。

母子サンプル間での相関性は、物質の胎盤通過能や胎児期における重金属曝露を評価する上で重要となる。今回測定した母親血清と臍帯血清の相関性を表2に示した。アルミニウム、ヒ素、鉛で弱い相関性がみとめられた(アルミニウム： $r=0.35$ ，ヒ素： $r=0.26$ ，鉛： $r=0.33$ )。

母乳からもアルミニウム、カドミウム、鉛が検出されたことから、母乳摂取量および母乳中の重金属含有量を推定し、JECFA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive の制定する耐用週間摂取量に対する割合を求めた。母乳摂取量は乳児の体重1kgあたり150mlとして算出した。ほとんど全てのサンプルで耐用週間摂取量の10%以下という結果が得られた(表3)。各元素の耐用週間摂取量に対する割合の平均値は、アルミニウム:2%、カドミウム:2.7%、鉛:4.2%であった。

臍帯、胎盤組織は分娩後医療廃棄物として廃棄されるため入手が臍帯血に比べて容易であることから、重金属の周産期暴露量をモニターする良い試料となりうる可能性がある。そこで臍帯血-臍帯および胎盤組織の相関性を検討した(表2)。臍帯血-胎盤中のヒ素、臍帯血-臍帯中のカドミウムで弱い相関性がみとめられた(臍帯血-胎盤ヒ素： $r=0.39$ ，臍帯血-臍帯カドミウム： $r=0.21$ )。

#### C-2 重金属が中枢神経系初期形成に及ぼす毒性評価 (*in vitro* assay)

重金属の中枢神経系初期形成期に及ぼす直接的な影響はあまり知られていないため、中枢神経系の発生段階で最も早期に出現する「神経幹細胞」を用いて、培養系での毒性評価系の開発をおこなった。確立された評価法を用いて、実サンプル測定によって得られた臍帯血清濃度(平均値および最高値)の重金属毒性を評価した(図2\_AB)。

胎児脳由来の神経幹細胞はbFGF, EGFの二つの成長因子存在下で、未分化状態を保ったまま分裂増殖し、ニューロスフェアと呼ばれる細胞塊を形成した。ニューロスフェア培地に臍帯血清濃度

の重金属を添加した場合、平均値、最高値いずれのレベルでもコントロールと同様のニューロスフェアを形成した。一方、200ppbの重金属をした際、ニューロスフェアの直径が有意に減少した( $p<0.001$ )。このことから、臍帯血清レベルの重金属曝露では神経幹細胞の増殖阻害は起こらないことが示唆された。

次に、リアルタイム RT-PCR によって神経幹細胞の未分化マーカー遺伝子の発現量を定量した。その結果、有害濃度の重金属存在下ではNestin, Sox2, Notch1の有意な発現増加または減少がみとめられたものの、臍帯血清レベルの重金属曝露によって遺伝子発現量の変化は認められなかった。

続いて、重金属を添加した状態で形成されたニューロスフェアを分化誘導培地中で成熟させることによって、神経系の分化に対する重金属の影響を検討した(図4)。分化誘導後、コントロールの神経幹細胞は、浮遊状態から培養皿に接着した状態となり神経突起を伸長させる像が認められた。しかしながら有害濃度の重金属を添加した際、細胞は培養皿に接着するものの成熟したニューロンは出現しなかった。一方、臍帯血清レベルでの重金属存在下では、コントロールと同様に・III-tubulin陽性の神経細胞が軸索突起をのびしている像がみとめられた。このことから、臍帯血清レベルの重金属曝露では神経幹細胞の分化阻害は起こらないことが示唆された。

#### D. 考察

##### D-1 ICP-MSによる重金属測定法の確立

母体由来サンプルとして、血液・尿・母乳を、また新生児由来サンプルとして臍帯血・臍帯組織・胎盤を用いて、アルミニウム、ヒ素、カドミウム、鉛濃度を測定した。全てのサンプルから4元素が検出された。いずれの元素も母親年齢と血清中重金属レベル間に相関性は見られなかった。このことから、年齢との相関性が報告されているダイオキシン類とは異なり、重金属では年齢によ

る体内への蓄積はおこっていないことが示唆された。母体血清および臍帯血清の測定において、いずれのサンプルにおいても高レベルの値は検出されず、母子間の相関性もほとんど見られなかった。すなわち、母体から胎児への移行を示唆する例は今回の測定でみとめられなかった。また、医療廃棄物として廃棄される臍帯、胎盤組織が重金属の周産期暴露量をモニターするための試料となりうるかを検討するため、臍帯血との相関性を調べた。しかしながら、各サンプル間で高い相関性はみとめられなかったことから、低レベルでの検出量では臍帯、胎盤で周産期暴露量をモニターすることは困難であると考えられる。母乳中での検出値から乳児の摂取する重金属量を推定し、耐用週間摂取量と比較したところほとんどの推定値が10%以下であることから、母乳から摂取される重金属量は低レベルであることが示唆された。

#### D-2 重金属が中枢神経系初期形成に及ぼす毒性評価 (*in vitro* assay)

重金属の中枢神経系初期形成期に及ぼす直接的な影響はあまり知られていないため、中枢神経系の発生段階で最も早期に出現する「神経幹細胞」を用いて、培養系での毒性評価を行った。この培養系に臍帯血清レベルおよび高濃度(200ppb)のアルミニウム、ヒ素、カドミウム、鉛の混合溶液を添加し、増殖や分化に与える影響を評価した。200ppbの重金属存在下では神経幹細胞の増殖阻害、未分化マーカー遺伝子の変化、および成熟ニューロンへの分化阻害がみとめられた。一方、臍帯血清レベルでは変化はみとめられなかったことから、臍帯血清レベルの重金属は、神経幹細胞の成長に対して重大な毒性を持たないことが示唆された。

#### E. 結論

ICP-MSを用いて血清、尿、母乳、臍帯、胎盤中のアルミニウム、ヒ素、カドミウム、鉛の測定

方法を検討した。測定精度の保証が得られなかった母乳中ヒ素を除く全サンプルおよび全元素での測定法を確立した。この測定方法により、30例の母子一連周産期生体サンプルを測定し回帰分析をおこなった。いずれの元素も全てのサンプルから検出されたが、既報値と比較して特に高い値は検出されなかった。母親年齢と血清中の重金属濃度に相関性はみとめられなかった。母体血清、臍帯血清レベルにおいても高い相関性はみとめられなかった。胎児由来組織間においても高い相関性はみとめられなかった。母乳中での検出値から乳児の摂取する重金属量を推定し、耐用週間摂取量と比較したところほとんどの推定値が10%以下であった。以上の結果より、今回測定した母子の生体試料においては重篤な重金属曝露の症例はみとめられなかった。

また、神経幹細胞の選択的培養法である「ニューロスフェア法」を用いて、*in vitro*での毒性評価方法の確立を試みた。この培養方法を用いて、重金属曝露による神経幹細胞の増殖能、未分化維持能、および分化能に与える影響を評価することが可能であった。そこで、実サンプル測定で得られた臍帯血清レベル重金属の毒性を評価したところ、増殖、未分化維持能、分化能に対する毒性はみとめられなかった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表

Fujita Y, Urano H, Izumi S, Uchida N, Goya K, Makino T. Assessment of prenatal exposure to neurotoxic metals (aluminium, arsenic, cadmium and lead) and up-regulation of dioxin-inducible gene, *cyp1A1*, in the neural stem cell culture. *Organohalogen compounds*. 69: 1779-1782:2007

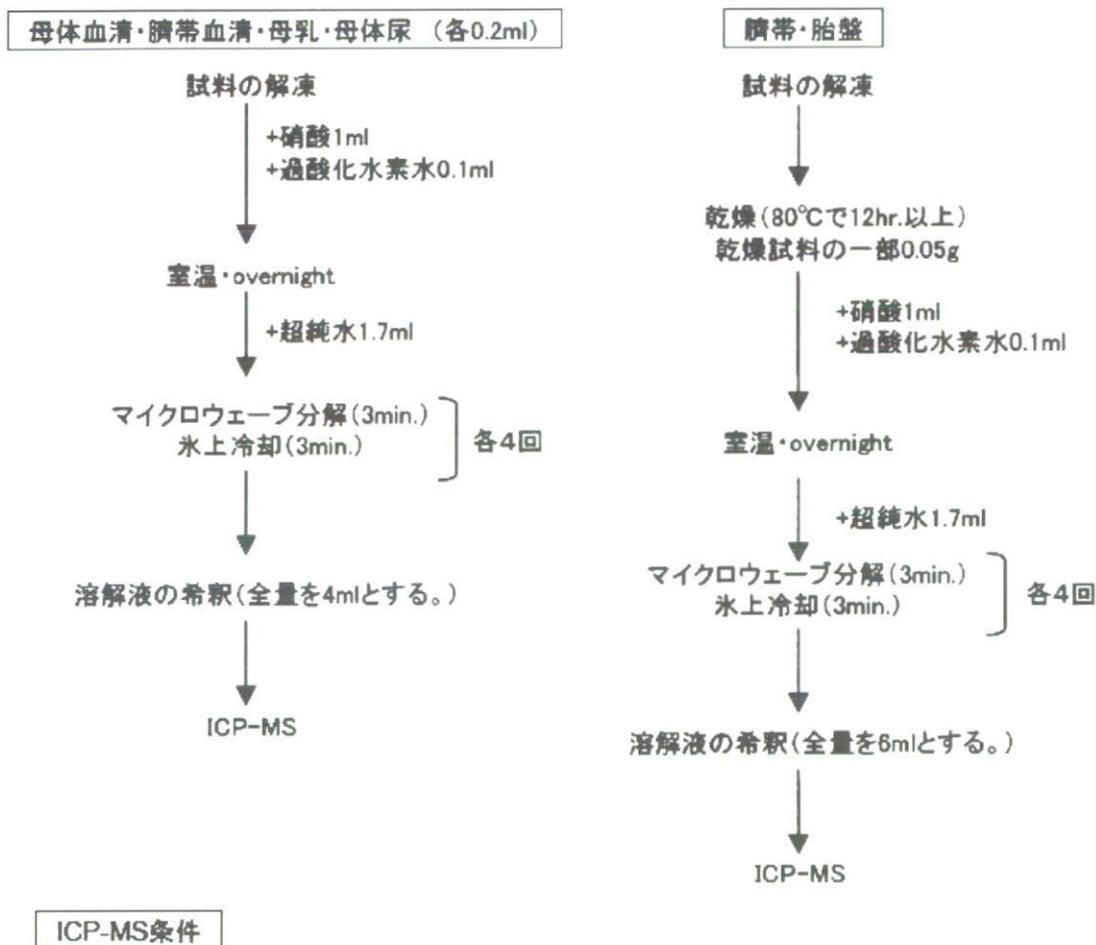
学会発表

Fujita Y, Urano H, Izumi S, Uchida N, Goya K,

Makino T. Assessment of prenatal exposure to neurotoxic metals (Aluminium, Arsenic, Cadmium and Lead) and up-regulation of dioxin-inducible gene, cypl1a1, in the neural stem cell culture. : DIOXIN meeting (2007)

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

■図1 試料の前処理およびICP-MS条件



装置:HP-4500(横河アナリティカル社製)  
 RFパワー:1400W  
 プラズマガス(Ar)流量:15L/min  
 キャリアガス(Ar)流量:1.25L/min  
 サンプリング位置:8mm  
 ネブライザ:パピントンネブライザ  
 試料導入:オートサンブラ使用  
 測定ポイント数:3  
 繰り返し回数:3回  
 積分時間:0.1  
 測定方法:AI; 標準添加法, As・Cd・Pb; 絶対検量線法(内部標準補正)  
 As干渉補正式:(1.000)(75C)-(2.937)(77C)+2.297(82C)

表1 各サンプルにおける重金属の検出量

■ Aluminium	<i>n</i>	Mean±SD	Range
母体血 (µg/L)	18	26.4 ± 6.8	6.6 - 131.12
母体尿 (µg/L)	27	5.8 ± 0.8	0.8 - 17.11
母乳(µg/L)	16	19.4 ± 3.2	5.3-63
胎盤(µg/kg)	30	318.5± 45.4	133.0 - 1428.8
臍帯血 (µg/L)	17	15.4 ± 2.1	4.6 - 34.0
臍帯(µg/kg)	29	264.2 ± 26.4	111.9 - 702.4

■ Arsenic	<i>n</i>	Mean±SD	Range
母体血 (µg/L)	24	6.0± 0.4	3.2 - 9.6
母体尿 (µg/L)	27	58.6 ± 7.7	15.5 - 169.5
胎盤(µg/kg)	30	27.0 ± 2.2	11.2 - 62.6
臍帯血 (µg/L)	27	5.5 ± 0.3	2.9 - 8.1
臍帯(µg/kg)	29	23.3 ± 1.4	7.9 - 39.4

■ Cadmium	<i>n</i>	Mean±SD	Range
母体血 (µg/L)	24	0.079 ± 0.019	0.059 - 0.108
母体尿 (µg/L)	27	0.53 ± 0.12	0.02 - 2.91
母乳(µg/L)	18	0.39 ± 0.05	0.09 - 0.91
胎盤(µg/kg)	30	40.11 ± 5.24	12.93 - 159.0
臍帯血 (µg/L)	27	0.042 ± 0.003	0.005 - 0.072
臍帯(µg/kg)	29	3.63 ± 1.26	2.39 - 5.77

■ Lead	<i>n</i>	Mean±SD	Range
母体血 (µg/L)	24	0.48 ± 0.15	0.16 - 3.85
母体尿 (µg/L)	26	0.92 ± 0.10	0.28 - 2.51
母乳(µg/L)	18	1.00 ± 0.29	0.05 - 4.11
胎盤(µg/kg)	27	15.14 ± 1.15	6.08 - 30.10
臍帯血 (µg/L)	26	0.30 ± 0.05	0.031 - 1.004
臍帯(µg/kg)	29	8.54 ± 0.59	4.41 - 19.55

表2 母親年齢と血清中重金属濃度、または各サンプル間の相関性 (r)

	母親年齢と血清中濃度の相関性 (r)		母親血清と臍帯血清中濃度の相関性 (r)	胎児由来サンプル間の相関性 (r)	
	年齢 vs. 母親血清	年齢 vs. 臍帯血清		臍帯血 vs. 胎盤	臍帯血 vs. 臍帯
Al	0.29	0.15	0.35	0.18	0.07
As	0.056	0.06	0.26	0.39	0.67
Cd	0.1	0.1	0.15	<0.001	0.21
Pb	0.03	0.03	0.33	0.004	0.05

表3 母乳中重金属の耐用週間摂取量に対する割合

ID	乳児体重 (kg)	1日当たり授乳量(ml)	耐用週間摂取量に対する割合(%)		
			Al	Cd	Pb
2	2.6	385	1.5	7.7	6.3
3	3.3	492	2.2	3.7	0.9
4	3.4	509	1.9	4.6	8.5
7	2.9	442	1.8	4.8	1.0
8	3.6	535	1.8	4.4	2.9
9	2.6	392	6.6	13.6	17.3
10	3.1	464	1.1	6.3	1.4
15	2.7	400	/	6.0	1.2
16	2.5	377	2.7	12.7	15.5
17	3.8	566	2.1	2.4	0.8
19	3.0	446	/	4.2	1.2
20	3.0	454	2.6	7.9	0.6
21	3.0	445	1.7	4.1	1.6
23	3.0	453	2.2	2.9	0.8
27	3.3	490	1.6	8.7	9.1
28	3.0	443	1.5	6.8	6.1
29	2.4	366	0.6	3.4	0.6
30	2.9	434	0.6	1.4	0.2
<b>Average</b>	<b>3.0</b>	<b>451</b>	<b>2.0</b>	<b>2.7</b>	<b>4.2</b>

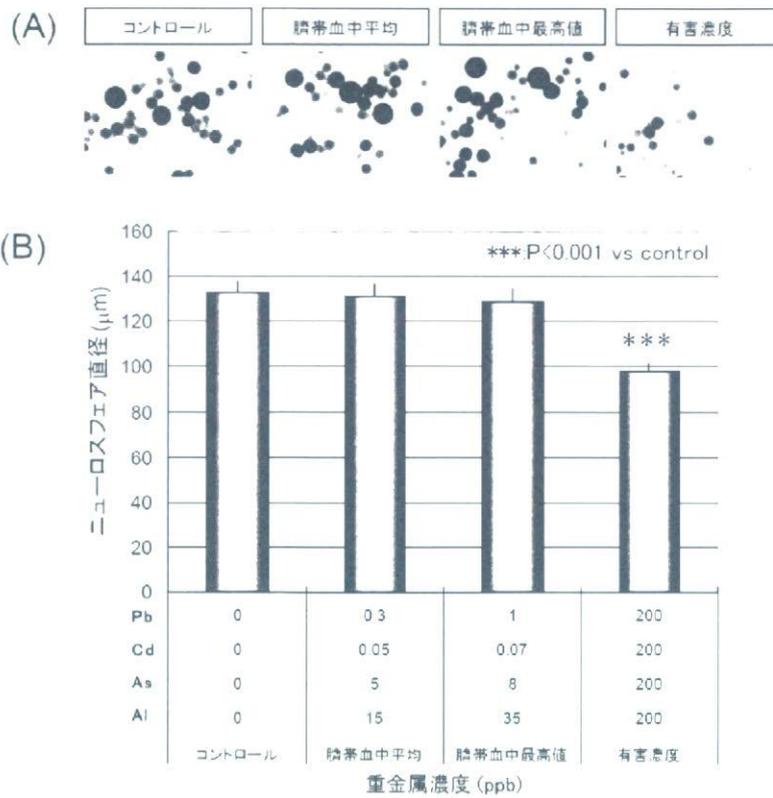


図2 重金属が神経幹細胞の増殖能に与える影響  
 (A) 重金属存在下、または非存在下で形成されたニューロスフェアの位相差顕微鏡像  
 (B) ニューロスフェアの直径の平均値

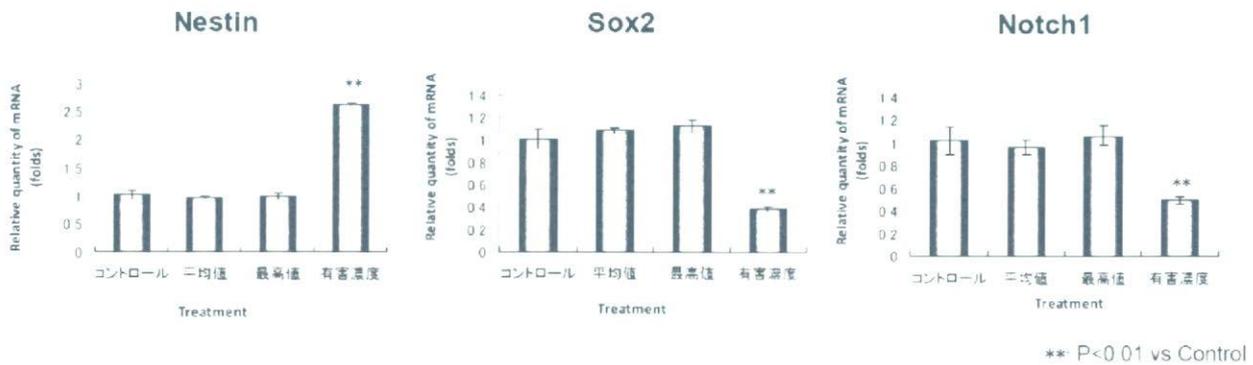


図3 神経幹細胞の未分化マーカーの遺伝子発現への影響 (リアルタイムRT-PCR結果)

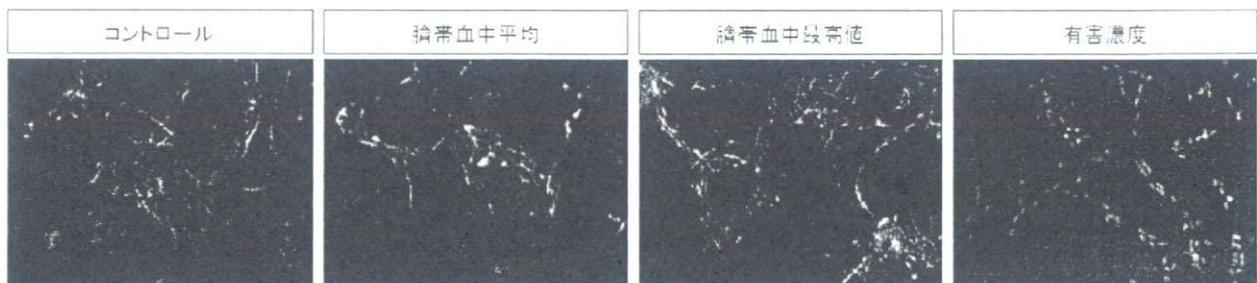


図4 重金属が神経幹細胞からニューロンへの分化能に与える影響  
 重金属存在下または非存在下で神経幹細胞を分化させた際の免疫染色像 抗βIII-tubulin抗体染色

化学物質の胎盤機能と胎児発生におけるエピジェネティックな影響の解明

分担研究者	塩田 邦郎	東京大学農学生命科学研究科細胞生化学教室
研究協力者	大鐘 潤	東京大学農学生命科学研究科細胞生化学教室
	新井 良和	東京大学農学生命科学研究科細胞生化学教室

研究要旨

エピジェネティクスは、DNA メチル化とヒストン修飾によるクロマチン構造の変化を伴う遺伝子発現の記憶装置である。人は様々な化学物質に暴露されており、その一部は胎児の発生にも影響を与える事が懸念されている。そこで、本研究ではこれまでに当研究班で明らかにされた母体中に存在する化学物質について胎児の発生への影響の有無を検討するために、初期発生胎児のモデルと考えられる ES 細胞を用いて、エピジェネティクスを指標とした解析を行った。その結果、DEP、コチニン、水銀、セレン、S-421 といった化学物質は、血中濃度程度の比較的低濃度で暴露した場合でも、DNA メチル化状態やヘテロクロマチン形成に影響を与え得る事が示唆された。この中で特に重篤な影響の見られた DEP については、本研究で開発したゲノムワイドなメチル化解析法である D-REAM (T-DMR Restriction-tag-mediated amplification) 法を用いて遺伝子領域の詳細な解析を行った。

A. 研究目的

近年、発生異常やガン、慢性疾患の原因としてエピジェネティック異常が検出される例が多数報告され、発生異常や病態を誘発する原因因子の探索が重要になってきた。これまでに、人類は多種多様な化学物質を単離、合成することで生活を豊かにしてきたが、日常生活において様々な化学物質に暴露されることによる影響が懸念されている。そこで本研究では、身近に存在する化学物質で人体への影響が疑われているものについて、その血中に存在している程度の比較的低い濃度でも胎児の発生に影響を与え得るかどうかを検討するために、マウス胚性幹 (ES) 細胞を用いて化学物質暴露によるエピジェネティック状態や分化能への影響を解析する。

B. 研究方法

1. ES 細胞を用いたヘテロクロマチン形成への化学物質の影響の解析

本研究班では、これまでに 25 種類の化学物質 (3-PBA, TCP, DMP, DEP, DMTP, DETP, DMDTP, DEDTP, S-421, nicotine, cotinine, PFOA, PFOS, 2-EH, 2-EHA, DCB, Sn, Se, Cd, Hg, Pb, pentaBDE, decaBDE, DEHP, MEHP) について、妊娠母体血中の濃度を決定した。そこで、これらの化学物質について初期発生胎児のモデルである ES 細胞においてヘテロクロマチン形成を指標とした解析を行った。マウス未分化 ES 細胞をゼラチンコート培養ディッシュに播種し、25 種類の化学物質をそれぞれ培地に添加した。暴露後 48 時間で細胞を回収し、酢酸 / エタノール溶液で固定した後、

スライドガラス上に塗抹標本を作成した。このうちの一部については、48 時間暴露後に化学物質を除いてさらに 48 時間培養したものと、化学物質に暴露した状態で ES 細胞から胚様体への分化を誘導したものについても同様の解析を行った。作成した塗抹標本について、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) による核染色、または major satellite 領域を認識するプローブを用いた DNA-FISH を行い、蛍光顕微鏡下で核のヘテロクロマチン状態を観察した。核内の DAPI、major satellite 領域を示すシグナルの数を調べ、化学物質が ES 細胞のヘテロクロマチン形成へ及ぼす影響について検証した。

## 2. D-REAM 法による DEP 暴露により DNA メチル化状態が変化する遺伝子領域の探索

マウス ES 細胞をゼラチンコートディッシュ上で DEP を添加したものとコントロールとして溶媒のみを添加した 48 時間培養し、それらの細胞からゲノム DNA を抽出した。これをメチル化感受性制限酵素 HpyCH4IV 処理とその後のアダプターライゲーション PCR により脱メチル化領域を増幅し、マウスプロモーターアレイを用いた遺伝子領域の DNA メチル化解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、最終的にはヒト胎児への化学物質の影響を明らかにする事が目的であるが、実際の実験にはマウス由来細胞のみを用いており、倫理面への問題はないと判断した。

## C. 研究結果

### 1. ES 細胞を用いたヘテロクロマチン形成への化学物質の影響の解析

解析を行った 25 種類の化学物質の中で、DEP、コチニン、水銀で ES 細胞の核内ヘテロクロマチン数が減少すること、逆にセレン、S-421 ではヘテ

ロクロマチン数が増加することが示唆された。さらに、セントロメア配列をプローブとした FISH 法による解析からは、DEP でセントロメア以外のヘテロクロマチン領域が弛緩すること、および S-421 でのセントロメアヘテロクロマチン領域が増大することも示唆された。次に短期的な暴露の影響が化学物質を除去した後も残存する可能性を検討するために、影響の見られた 5 種類について血中濃度で 48 時間暴露後、化学物質を除いた状態でさらに 48 時間培養した。その結果、5 種類のうちコチニン、水銀、セレン、S-421 では化学物質を除くことでヘテロクロマチンの状態が対照と同程度まで回復したのに対し、DEP では化学物質を除いた後もヘテロクロマチンの異常な状態が持続することが示された。そこでこれまでにヘテロクロマチン異常を引き起こすことが示された化学物質が胎仔の発生に伴う細胞分化に影響を与えるかどうか検討するために、化学物質に暴露した状態の ES 細胞を分化誘導することで胚様体を形成させた。その結果、DEP、水銀、S-421 では、胚様体の大きさが対照群と比較して有為な差があり、細胞分化にも影響を与える可能性が示唆された。この実験では、コチニン、セレンでは胚様体形成への影響は見られなかった。

### 2. DEP についての D-REAM 法を用いたゲノムワイドな遺伝子領域のメチル化解析

これまでの研究からエピジェネティクスへの影響が最も大きいと考えられる DEP 暴露した細胞と溶媒のみを添加した細胞の DNA メチル化状態を D-REAM 法により比較した。その結果、232 遺伝子が DEP 暴露により対照と比べて有為に低メチル化であり、逆に 203 遺伝子が有為に高メチル化であることが示唆された。これらのメチル化異常が認められた遺伝子の中には、ガン関連遺伝子やエピジェネティクス関連遺伝子も含まれていた。

#### D. 考察

これまでに本研究班では様々な化学物質が妊娠母体中に存在していることを同定し、それらの血中濃度を決定してきた。そこで、これらの濃度の化学物質が胎児の発生過程にも影響を与え得るかを明らかにする事が必要になってきた。我々は、以前に不妊治療用卵の凍結保護剤として使用されていた経緯のある DMSO が、発生初期の胎仔のモデルである ES 細胞で DNA メチル化を始めとしたエピジェネティクスに影響を与えることを示した。そこで、これまでに同定してきた化学物質を ES 細胞に血中濃度と同じ濃度で暴露し、ヘテロクロマチン形成を指標として検討した結果、一部にヘテロクロマチン形成の異常をきたす化学物質が同定された。本研究から、ヘテロクロマチン形成を指標としてエピジェネティック異常を引き起こす可能性のある化学物質を簡便にスクリーニングする系を確立することができた。今後は、エピジェネティック異常を引き起こす可能性のある化学物質について、暴露後の ES 細胞の分化能を検討するとともに、本研究で開発した D-REAM 法を用いて解析することで、これらの化学物質についてのより詳細なエピジェネティック異常誘導機構を明らかに出来ると考えられる。

#### E. 結論

本研究では、従来の毒性学試験等と異なりヒト血中濃度程度の低濃度の化学物質 (DEP、コチニン、水銀、セレン、S-421) が、初期発生胚のモデルと考えられる ES 細胞において、DNA メチル化状態の変化やヘテロクロマチン形成といったエピジェネティックな現象に影響を与え得ることを明らかにした。これにより、身近に存在している化学物質が、母体血中に存在するレベルの濃度で、胎児の発生にも影響を与える可能性が示唆され

た。今後は、本研究で開発したゲノムワイドな DNA メチル化解析法などにより、化学物質によって DNA メチル化変化を受けやすい遺伝子およびエピジェネティック因子を同定してゆく必要がある。

#### F. 健康危機情報

該当無し

#### G. 研究発表

##### 1 論文発表

なし

##### 2 学会発表

1) Hui Wen Lim, Misa Iwatani, Naoko Hattori, Naka Hattori, Satoshi Tanaka, Shintaro Yagi and Kunio Shiota. Distinctive demethylating effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on gene coding regions and non-coding repetitive elements in NIH/3T3 cells.

第1回日本エピジェネティクス研究会年会 (2007年6月)

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表.

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版者名	出版地	出版年	ページ
Akutsu, K., Tanaka, Y., Hayakawa, K.	Analysis of polybrominated diphenyl ethers in Japanese mother's milk and food samples	Tanabe, S., Takeoka, H., Isobe, T., Nishibe, Y.	Chemical Pollution and Environmental Changes (Frontiers Science Series No. 48, ISSN 0915-8502, ISBN 978-4-946443-41-1)	Universal Academy Press, Inc.	Tokyo	2006	155-158

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Akutsu, K., Takatori, S., Nozawa, S., Yoshiike, M., Nakazawa, H., Hayakawa, K., Makino, T., Iwamoto, T.	Polybrominated diphenyl ethers in human serum and sperm quality	<i>Bull. Environ. Contam. Toxicol.</i>			印刷中
Takatori, S., Okamoto, Y., Kitagawa, Y., Hori, S., Izumi, S., Makino, T., Nakazawa, H.	Simulated neonatal exposure to DEHP and MEHP from PVC enteral nutrition products	<i>Int. J. Pharm.</i>	352	139-145	2008
高取 聡、阿久津和彦、近藤文雄、和泉俊一郎、牧野恒久、中澤裕之	高速液体「クロマトグラフィー/タンデム型質量分析法によるヒト母乳中のフタル酸モノエステル類の分析	分析化学	56	1025-1031	2007
Akutsu, K., Takatori, S., Nakazawa, H., Hayakawa, K., Izumi, S., Makino, T.	Dietary intake estimations of polybrominated diphenyl ethers based on a total diet study in Osaka, Japan	<i>Organohalogen Compounds</i>	69	2303-2306	2007
Akutsu, K., Takatori, S., Nozawa, S., Yoshiike, M., Nakazawa, H., Hayakawa, K., Makino, T., Iwamoto, T.	Polybrominated diphenyl ethers in human serum and sperm quality	<i>Organohalogen Compounds</i>	69	1926-1929	2007
Akutsu, K., Tanaka, Y., Hayakawa, K.	Occurrence of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in shark liver oil supplements Food Additives and Contaminants	<i>Food Addit. Contam.</i>	23	1323-1329	2007
堀江正一、小林晴美、石井里枝、齊藤貢一、中澤裕之、牧野恒久	液体クロマトグラフィー/質量分析法による魚介類中のノンルフェノール及びオクチルフェノールの定量	分析化学	56	1037-1043	2007
Nakata A., Katsumata T., Iwasaki Y., Ito R., Saito K., Izumi S., Makino T., Kishi R., Nakazawa H.	Measurement of perfluorinated compounds in human milk and house dust	<i>Organohalogen compounds</i>	69	2844-2846	2007
岡野圭太、日の原聖仁志、岩崎雄介、伊藤里恵、齊藤貢一、和泉俊一郎、牧野恒久、中澤裕之	親水性相互作用クロマトグラフィー/質量分析法によるタバコ煙暴露評価のためのヒト血清中ニコチン及びコチニンの定量	分析化学	56	785-790	2007
Fujita Y, Urano H, Izumi S, Uchida N, Goya K, Makino T.	Assessment of prenatal exposure to neurotoxic metals (aluminium, arsenic, cadmium and lead) and up-regulation of dioxin-inducible gene, cyp1A1, in the neural stem cell culture	<i>Organohalogen compounds</i>	69	1779-1782	2007
牧野恒久	家庭で使用している化学物質と子どもの健康	食品衛生研究	57 (10)	21-28	2007

## Analysis of Polybrominated Diphenyl Ethers in Japanese Mother's Milk and Food Samples

Kazuhiko Akutsu<sup>1,2\*</sup>, Yukio Tanaka<sup>1</sup>, Kazuichi Hayakawa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Division of Food Chemistry, Osaka Prefectural Institute of Public Health,  
1-3-69, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan*

<sup>2</sup>*Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University,  
Kakuma-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-1192, Japan*

\*Corresponding author, e-mail: akutu@iph.pref.osaka.jp

---

**Abstract.** This study determined the concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Japanese mother's milk and fishery foods. The total concentrations of seven PBDE congeners in eight pool of archived human milk samples from Osaka ranged from <0.01 ng/g lipid to 2.3 ng/g lipid. These concentrations showed an increasing trend from 1973 to 1988. After 1988, the concentrations almost leveled off around 1.5 ng/g lw. The PBDE concentrations and congener profiles in 1999 were similar among mothers living in three regions of Japan (Kanagawa, Okayama and Osaka). The concentrations of PBDEs in human milk samples in the present study are similar to concentrations reported in previous studies on Swedish human milk. The total concentrations of six PBDE congeners in fish samples ranged from 0.1 ng/g to 3.2 ng/g on a whole weight basis and ranged from 2.3 ng/g to 57 ng/g on a lipid weight basis. The mullets contained PBDEs in high concentrations both on a whole weight and lipid weight basis. The most dominant congener was BDE-47 in all the fish samples. The total concentrations of ten PBDE congeners (BDE-28, -47, -49, -66, -99, -100, -153, -154, -155 and -183) in dietary fish oil supplements ranged from <0.1 ng/g to 53 ng/g oil weight, and the total concentrations of six PCB congeners (CB-28/31, -52, -118, -153 and -180) in the samples ranged from <0.1 ng/g to 340 ng/g oil weight. Two brands of Japanese deep-sea shark liver oil contained the highest levels of PBDEs (49 to 53 ng/g oil weight) and PCBs (290 to 340 ng/g oil weight). Our result indicates that PBDEs may have entered the Japanese deep-sea waters.

---

### Introduction

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) have been used worldwide as additive flame retardants in polymeric materials. Because PBDEs are not chemically bound to the materials, they can leak into the environment during the production, use and disposal of consumer products. PBDEs are resistant to degradation in the natural environment and especially Penta-BDE accumulates in the fatty tissues of fish, birds and mammals (including humans). Several toxic effects on the thyroid system and on neurodevelopment have been reported in experimental animals exposed to PBDEs. PBDEs have been recognized as environmental pollutants of global concern because their levels in the environment and in humans have increased markedly over the past several decades. PBDEs have been detected in human milk and foodstuffs and the potential health effects of dietary exposure to PBDEs have now become a great concern. However, information about the levels of PBDEs in Japanese human milk and foodstuffs is still limited. The aim of this study was to determine PBDE concentrations in human milk and fishery food samples collected in Japan.

### Materials and Methods

**Samples.** Human milk samples were collected from Osaka between 1973 and 2000 and were also collected from Kanagawa and Okayama in 1999. Edible fish samples were collected from the Seto Inland Sea in 1998. Dietary fish oil supplements were purchased from Japanese retailers in 2004.

**Chemical analysis.** The details of analytical methods are described in references (Akuktsu et al. 2001, 2003, 2006). Identification and quantification of PBDEs were performed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS).

### Results and Discussion

**Human milk.** The total concentrations of seven PBDE congeners in eight pool of archived human milk samples from Osaka ranged from  $<0.01$  ng/g lipid to 2.3 ng/g lipid. These concentrations showed an increasing trend from 1973 to 1988. After 1988, the concentrations almost leveled off around 1.5 ng/g lw (Figure 1). The PBDE concentrations and congener profiles in 1999 were similar among mothers living in three regions of Japan (Kanagawa, Okayama and Osaka) (Figure 2). The concentrations of PBDEs in human milk samples in the present study are similar to concentrations reported in previous studies on Swedish human milk (Meironyté & Norén 1999).

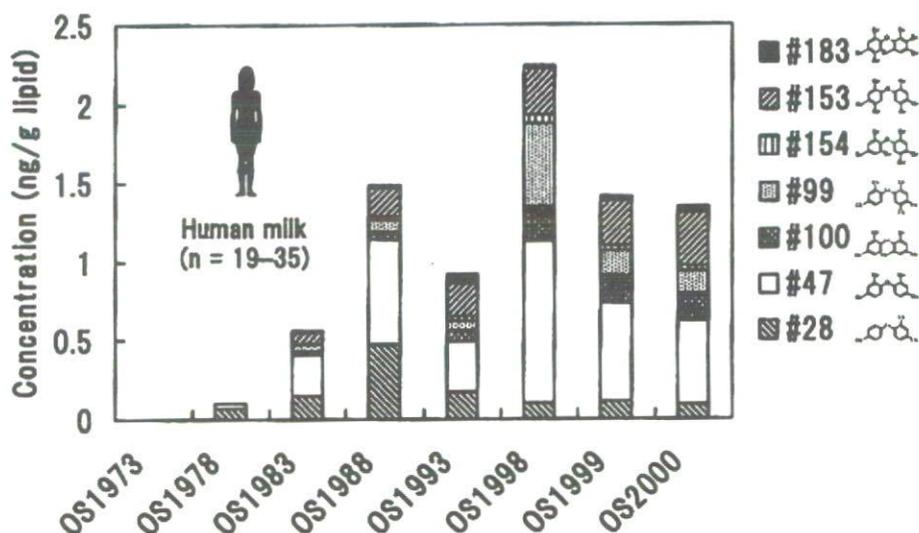


Fig. 1: Temporal trend of PBDE levels in pooled human milk samples collected from Osaka between 1973 and 2000.

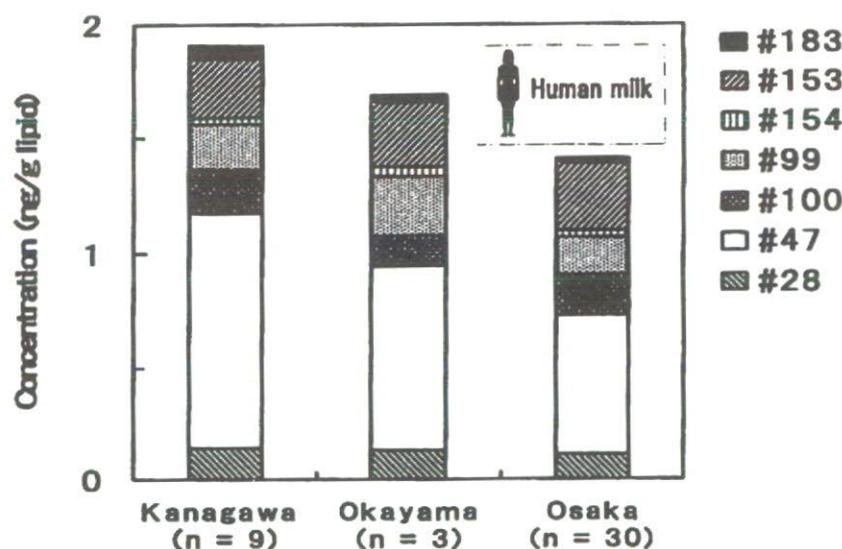


Fig. 2: PBDE levels in human milk samples collected from three different prefectures in 1999.

**Fish.** The total concentrations of six PBDE congeners in fish samples ranged from 0.1 ng/g to 3.2 ng/g on a whole weight basis and ranged from 2.3 ng/g to 57 ng/g on a lipid weight basis. The mullets contained PBDEs in high concentrations both on a whole weight and lipid weight basis. The most dominant congener was BDE-47 in all the fish samples (Figure 3).

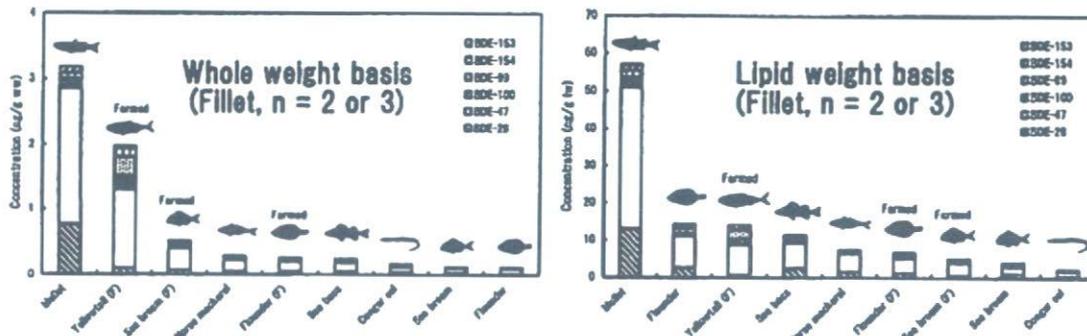


Fig. 3: PBDE levels in fish samples collected from Seto Inland Sea in 1999. Left, whole weight basis; right, lipid weight basis.

**Dietary fish oil supplements.** The total concentrations of ten PBDE congeners (BDE-28, -47, -49, -66, -99, -100, -153, -154, -155 and -183) in dietary fish oil supplements ranged from <0.1 ng/g to 53 ng/g oil weight, and the total concentrations of six PCB congeners (CB-28/31, -52, -118, -153 and -180) in the samples ranged from <0.1 ng/g to 340 ng/g oil weight. Two brands of Japanese deep-sea shark liver oil (cold processed products) contained the highest levels of PBDEs (49 to 53 ng/g oil weight) and PCBs (290 to 340 ng/g oil weight) (Figure 4 and 5). Similar cold processed products that were derived from New Zealand deep-sea sharks were also contaminated with PBDEs and PCBs. However, the levels of these compounds were one or two orders of magnitude lower than those found in the Japanese shark products. This result suggests that Japanese sharks are more contaminated than New Zealand sharks. Lohmann et al. reported that fish and fish related matrices (fish oil, fish meal and fish feed) in the Northern Hemisphere tend to have higher levels of PBDEs than those in the Southern Hemisphere (Lohmann et al. 2006). While known contributions of BDE-28, -49, -66 and -155 in chemical PBDE mixtures (e.g. Bromkal 70-5DE and 79-8DE) are almost negligible (Ikonomou et al. 2002), we found these minor congeners in clear proportions together with the five major congeners (BDE-47, -99, -100, -153 and -154) in the Japanese shark liver oil samples (Figure 4 and Figure 6). Similar proportions have also been reported in salmon (Hites et al. 2004). The PBDE congener profiles in shark liver oil suggest that the contaminations have occurred in the natural environment, not in manufacturing processes. In other words, the Japanese deep-sea sharks would have accumulated significant amount of PBDEs and PCBs during their lifetime. According to the product specifications, the two brands of Japanese shark liver oil were obtained from selected bathyal sharks (*Centrophoridae* and *Squalidae*) that were captured using long-line fishing in waters approximately 600–800 m in depth around the Goto Islands. Our results suggest that PBDEs may have reached Japanese deep-sea waters. In the marine

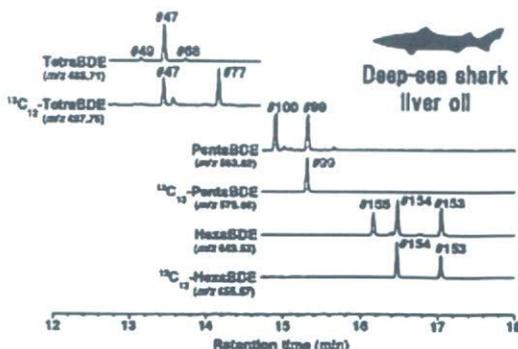


Fig. 4: Chromatograms of the deep-sea shark liver oil supplement

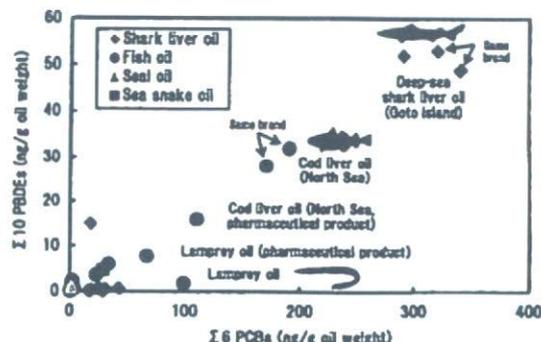


Fig. 5: Comparison of PCB and PBDE concentrations in fish oil supplements.

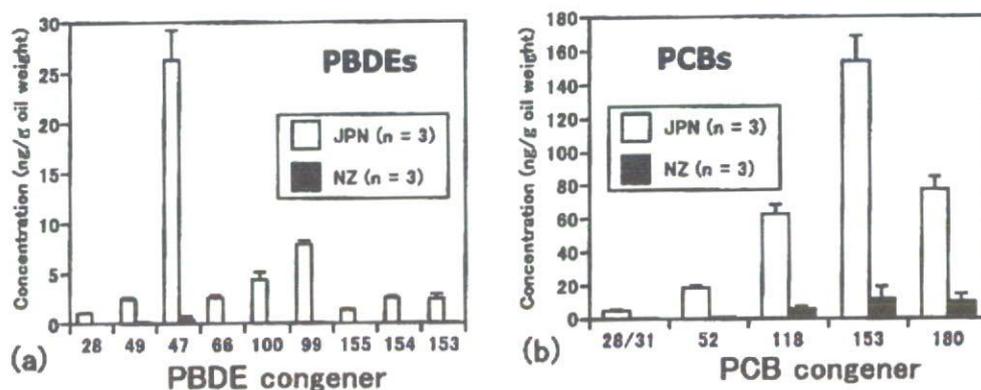


Fig. 6: Concentrations of selected PBDEs (a) and PCBs (b) in dietary supplements originate from Japanese and New Zealand deep-sea sharks (mean and standard deviation).

environment, the deep sea and its ecosystems will be the ultimate sink for PBDEs. The intakes of PBDEs were calculated at the daily doses proposed by the product manufacturers/suppliers for each of the products. The intakes of ten PBDEs ranged from less than 0.001 to 0.09  $\mu\text{g}/\text{day}$ . The maximum intake of the ten PBDEs estimated in this study (0.09  $\mu\text{g}/\text{day}$ ) was comparable to or higher than the total dietary intake of PBDEs reported in Spain (0.097  $\mu\text{g}/\text{day}$ ), Sweden (0.051  $\mu\text{g}/\text{day}$ ), and Finland (0.044  $\mu\text{g}/\text{day}$ ) (Domingo 2004). The maximum intake of the ten PBDEs (0.09  $\mu\text{g}/\text{day}$ ) was 0.075% of the US EPA reference dose for penta-BDE (120  $\mu\text{g}/\text{day}$  for a 60 kg person) (Wenning et al. 2003). It can be calculated that the maximum intake of total PCBs from the shark liver oil supplements was 2  $\mu\text{g day}^{-1}$  (four times the intake of the six indicator PCBs). This level is less than 1% of the provisional tolerable daily intake of PCBs set by the Japanese Government (300  $\mu\text{g day}^{-1}$  for a 60 kg person). Our data indicate that the frequent consumption of shark liver oil supplements will increase human dietary exposure to PBDEs and PCBs, although it appears that the safety margins between the proposed toxic levels and the estimated intakes of these pollutants are considerable. In addition, there are no data available regarding the safety of the long-term use of shark liver oil supplements. Further research is needed to evaluate the potential risks and benefits of shark liver oil supplements.

### Acknowledgments

We thank the staff of all health centers in Osaka Prefecture for their assistance in sample collections. We also thank all participants in this study. This research was partially supported by the Ministry of Education, Science, Sports and Culture, Grant-in-Aid for Young Scientists (B), No.13770216, 2001–2002, No.15790291, 2003–2004 and No.18790414, 2006–2007.

### References

- Akutsu K., Obana H., Okihashi M., Kitagawa M., Nakazawa H., Matsuki Y., Makino T., Oda H. & Hori S. (2001) *Chemosphere* 44: 1325–1333.
- Akutsu K., Kitagawa M., Nakazawa H., Makino T., Iwazaki K., Oda H. & Hori S. (2003) *Chemosphere* 53: 645–654.
- Akutsu K., Tanaka Y. & Hayakawa K. *Food Addit. Contam.* (In press 2006).
- Domingo J. L. (2004) *J. Chromatogr. A* 1054: 321–326.
- Hites R. A., Foran J. A., Schwager S. J., Knuth B. A., Hamilton M. C. & Carpenter D. O. (2004) *Environ. Sci. Technol.* 38: 4945–4949.
- Ikonomou M. G., Rayne S. & Addison R. F. (2002) *Environ. Sci. Technol.* 36:1886–1892.
- Lohmann N., Paepke O. & Herrmann T. (2006) Abstract of the 26th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants. available at <http://www.dioxin2006.org/>.
- Meironyté D. & Norén K. (1999) *J. Toxicol. Environ. Health A* 58: 329–341.
- Wenning R. J., Von Burg A., Braithwaite S., Serex T., Campbell R., Shipp A. & Lawrence G. (2003) *Organohalogen Compd.* 61: 275–278.

## Polybrominated Diphenyl Ethers in Human Serum and Sperm Quality

K. Akutsu · S. Takatori · S. Nozawa · M. Yoshiike ·  
H. Nakazawa · K. Hayakawa · T. Makino · T. Iwamoto

Received: 24 July 2007 / Accepted: 28 January 2008  
© Springer Science+Business Media, LLC 2008

**Abstract** Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are widely used flame retardants; currently, they are identified as ubiquitous environmental contaminants. Several studies indicate that PBDEs might affect male fertility. We present the results of a pilot study on the relationship between human serum PBDEs and sperm quality. The PBDE levels in Japan are comparable to those found in European countries. Strong inverse correlations were observed between the serum concentration of 2,2',4,4',5,5'-hexabromodiphenyl ether and

sperm concentration ( $r = -0.841$ ,  $p = 0.002$ ) and testis size ( $r = -0.764$ ,  $p = 0.01$ ). Extensive studies on the relationship between PBDEs and sperm quality are required.

**Keywords** Polybrominated diphenyl ethers · Flame retardants · Human serum · Sperm

---

K. Akutsu (✉) · S. Takatori  
Division of Food Chemistry, Osaka Prefectural Institute  
of Public Health, 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku,  
Osaka 537-0025, Japan  
e-mail: akutu@iph.pref.osaka.jp

K. Akutsu · K. Hayakawa  
Graduate School of Natural Science and Technology,  
Kanazawa University, Kakumamachi, Kanazawa,  
Ishikawa 920-1192, Japan

S. Nozawa · M. Yoshiike · T. Iwamoto  
Department of Urology, St. Marianna University School  
of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae, Kawasaki,  
Kanagawa 216-8511, Japan

H. Nakazawa  
Department of Analytical Chemistry, Hoshi University,  
2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan

T. Makino  
Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,  
Tokai University, 143 Shimokasuya, Isehara,  
Kanagawa 259-1143, Japan

*Present Address:*

T. Iwamoto  
Center for Infertility and IVF, International University of Health  
and Welfare, 2600-1 Kitakanemaru, Ohtawara,  
Tochigi 324-8501, Japan

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are used as flame retardants in the production of common consumer products such as electronics, furniture, and textiles. PBDEs are currently recognized as environmental pollutants of global concern because their levels in the environment and in humans have increased markedly over the past several decades (Meironyté et al. 1999; Ikonomou et al. 2002; Akutsu et al. 2003). Since PBDEs are somewhat structurally similar to thyroid hormones such as thyroxine (T4), it was speculated that PBDEs might mimic thyroid hormones and disrupt thyroid homeostasis. Several studies indicate that exposure to PBDEs can decrease the circulating levels of T4 in laboratory animals (Fowles et al. 1994; Zhou et al. 2002) and can cause permanent neurological effects similar to those associated with thyroid hormone deficiencies (Eriksson et al. 2001; Viberg et al. 2004). In addition, several PBDEs possess weak estrogenic/antiestrogenic activities (Meerts et al. 2001). The proliferation and differentiation of Sertoli cells and sperm production are regulated by thyroid and sex hormones. Thus, PBDEs might affect male reproductive health by interfering with the thyroid- and sex-hormone functions. Kuriyama et al. (2005) have reported that developmental exposure to a single low dose (60 µg/kg body weight) of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (PeBDE-99) decreased the

sperm count in male Wistar rats. However, no previous studies have examined the relationship between human PBDE levels and sperm quality.

We participated in an international project examining the sperm quality of fertile males and found that the sperm concentration of Japanese males was lower than that of European males (Iwamoto et al. 2006). The examination of sperm quality and an estimation of the concentration of chemicals in the serum would be required to reveal the correlation between chemical exposure and the sperm quality in Japanese males. The aim of this pilot study was to measure PBDEs in serum samples from young Japanese males and to examine the relationship between serum PBDE levels and sperm quality.

## Materials and Methods

This study was performed in accordance with the protocols which were approved by the ethical committees of the St. Marianna University School of Medicine and Osaka Prefectural Institute of Public Health. Written informed consent was obtained from all study participants. Blood serum and sperm samples were collected on a monthly basis in the year 2003 from 45 young Japanese males at the Department of Urology, St. Marianna University School of Medicine. The participants were instructed to abstain from ejaculation for at least 48 h prior to sperm collection. The blood samples were collected in vacuum tubes, and the serum fractions were separated by centrifugation. The serum samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Of the 45 sample sets, 10 were randomly selected for this study. For PBDE analysis, 10 pooled serum samples ( $0.5\text{ g} \times 12$  months; total, 6 g per person) were prepared, and each pool was regarded as a representative sample of each set. The mean  $\pm$  standard deviation (SD) of the age of the 10 participants was  $22 \pm 1$  years (range, 18–22 years). The mean  $\pm$  SD abstinence period was  $3.1 \pm 0.4$  days (range, 2.6–3.8 days). In addition, 2 brands of commercially pooled human serum (“L-Consera N” and “L-Suitrol I,” Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) were used as in-house reference materials.

Standard mixture solutions of native PBDEs (BDE-AAP-A-15X) were purchased from AccuStandard (New Haven, CT, USA), and  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled PBDEs (MBDE-MXC) were purchased from Wellington Laboratories (Ontario, Canada). In this study, 29 PBDE congeners with 3–7 bromine atoms were monitored. The PBDE numbers are assigned according to the International Union of Pure and Applied Chemistry nomenclature for polychlorinated biphenyls. Acetone, acetonitrile, and *n*-hexane of pesticide analysis grade; ammonium sulfate of biochemistry grade; 44% sulfuric acid-impregnated silica gel; and *n*-nonane of

dioxin analysis grade were purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan). Water was deionized and purified using a Milli-Q cartridge system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Sperm analyses were performed at the Department of Urology, St. Marianna University School of Medicine, according to World Health Organization criteria as described elsewhere (World Health Organization 1999; Iwamoto et al. 2006).

Serum samples were analyzed at Osaka Prefectural Institute of Public Health. The serum sample (6 g) was extracted using ethanol/*n*-hexane (1:3 v/v, 14 mL) in a 50 mL test tube after adding  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled surrogate standards ( $^{13}\text{C}_{12}$ -2,4,4'-tribromodiphenyl ether ( $^{13}\text{C}_{12}$ -TrBDE-28),  $^{13}\text{C}_{12}$ -2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether ( $^{13}\text{C}_{12}$ -TeBDE-47),  $^{13}\text{C}_{12}$ -2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether ( $^{13}\text{C}_{12}$ -PeBDE-99),  $^{13}\text{C}_{12}$ -2,2',4,4',5,5'-hexabromodiphenyl ether ( $^{13}\text{C}_{12}$ -HxBDE-153),  $^{13}\text{C}_{12}$ -2,2',4,4',5,6'-HxBDE ( $^{13}\text{C}_{12}$ -HxBDE-154), and  $^{13}\text{C}_{12}$ -2,2',3,4,4',5,6-heptabromodiphenyl ether ( $^{13}\text{C}_{12}$ -HpBDE-183); 10 pg for each congener) and 3.6 mL saturated ammonium sulfate solution. The test tube was shaken for 30 min and then centrifuged for 10 min at 3,000 rpm. The *n*-hexane phase was collected, and the aqueous phase was re-extracted twice with 12 mL *n*-hexane. The 3 *n*-hexane phases were combined and washed with 12 mL water. After evaporation of the solvent, the lipid content was determined gravimetrically using a semimicro balance (Sartorius RC210P, Goettingen, Germany). The lipid was dissolved in *n*-hexane and transferred to a column of 44% sulfuric acid-impregnated silica gel (3 g). The column was eluted with 30 mL *n*-hexane, and the eluate was evaporated to 2 mL. The *n*-hexane solution was transferred to a test tube and partitioned with *n*-hexane-saturated acetonitrile (4 mL) 3 times by shaking the test tube for 10 min and then centrifuging for 10 min at 3,000 rpm. The acetonitrile phase was combined and then evaporated to dryness. The residue was redissolved in *n*-hexane and transferred to a microconcentration tube. After addition of the injection standard ( $^{13}\text{C}_{12}$ -3,3',4,4',5-PeBDE ( $^{13}\text{C}_{12}$ -PeBDE-126)) and keeper solvent (10  $\mu\text{L}$  *n*-nonane), the extract was finally evaporated to approximately 10  $\mu\text{L}$  under a gentle stream of nitrogen. The serum extract was assayed by a gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) system (Agilent 6890A GC coupled with JEOL JMS-GC mateII, Tokyo, Japan) using a fused silica capillary column (Rtx-1MS, 15 m length, 0.25 mm i.d., 0.1  $\mu\text{m}$  film thickness; Restek, Bellefonte, PA, USA). For each compound, 2 ions of the molecular ion or fragment ion cluster were monitored. Quantitation was based on the isotope dilution method using  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled internal standards. The PBDE concentrations were adjusted for total serum lipids and were expressed in units of nanogram per gram lipid weight (ng/g lw). TeBDE-47, PeBDE-99, PeBDE-100, and HxBDE-153 were of interest because they are dominant in human serum.