

能の調節、ホメオスタシスと密接に関連している。例えば、Se はかつて生物にとって毒物と考えられていたが、抗酸化酵素の一つであるグルタチオンペルオキシダーゼの活性中心に存在することが明らかとなり、細胞構成成分の酸化変性を防ぎ、膜の安定化に関与する重要な因子であり、必須の微量元素として認識されるようになった。Se の欠乏によって引き起こされる各種の疾患は、グルタチオンペルオキシダーゼの活性が低下することにより、活性酸素が生体膜を不安定化し、さらに膜を構成する蛋白質が酸化変性されることに起因する。Se 欠乏症としては、かつて風土病といわれた克山病 (Keshan disease) という拡張型心筋症が有名である。中国の克山地方では、土壌中の Se 含量が少ないため、食物よりの Se 摂取量が少ないため起こると考えられている。一方、妊娠中の母体の Se 要求量が上昇すること、低 Se 母体では流産率が高いことなどの報告例は多い。また、動物を使った実験では、セレン欠乏食を与えられたラットのほとんどの子どもが不妊であったことが報告されている。しかし、いずれも Se 欠乏と子宮内膜症の因果関係は不明である。

血清 Cu 濃度の平均値は男性よりも女性の方がやや高いこと、妊娠中は内因性のエストロゲンによりセルロプラスミンの合成が誘導され、血清中の Cu 濃度は高値に保たれることから、Cu は女性の金属といわれている。不妊症の女性は妊孕性のある女性よりも血清中 Cu 濃度が低いことが報告されている。Cu を欠乏させた動物では、胎児の発育停止、胎盤壊死が起こる。しかし、Se と同様、Cu 欠乏と不妊の因果関係は不明である。

2) フタル酸モノエステル類

患者 29 人より採取した尿の分析を行った。その結果、測定対象 5 物質 (MBP、MEP、MEHP、MINP、MBzP) のうち、MBP と MEP がすべての検体から検出された。MBP の中央値は $35.2 \mu\text{g/g}$ 、検出濃度範囲は $14.9 \sim 100 \mu\text{g/g}$ 、であった。MEP の中央値は $16.4 \mu\text{g/g}$ 、検出濃度範囲は $3.45 \sim 230 \mu\text{g/g}$ であった。MBzP 及び MEHP の検出率はそれぞれ 59%、14% で、中央値はそれぞれ $9.66 \mu\text{g/g}$ 、<LOQ (定量下限値未満) であった。なお、MINP については、一部の検体で夾雑物と考えられる妨害ピークが認められたため、分析対象から除外した。

本研究 (昨年度実施した職員の結果を含む) と米国居住者について行った。MBP では本研究の方が 1.6~2.7 倍高く、MEP では逆に米国居住者の方が 8.6~10.3 倍高い値を示した。両調査でのフタル酸モノエステル濃度の差は、日本と米国でのフタル酸エステル類の使用実態の違いが要因の 1 つと考えられた。

すべての検体から検出された MBP と MEP につい

て、その濃度からフタル酸エステル類の推定一日摂取量を算出した。その結果、フタル酸ジブチル (DBP) は $1.08 \mu\text{g/kg/day}$ (中央値)、フタル酸ジエチルは $0.46 \mu\text{g/kg/day}$ (中央値) と、厚生労働省や欧州連合 (EU) が示した許容一日摂取量 (TDI) と比べて低い値であった。

フタル酸エステル類は、プラスチックの重要な要素として多くの消費者製品中に見られる。例えば、化粧品とパーソナル・ケア用品中に含まれる主なフタル酸エステル類は、マニキュア中のフタル酸ジブチル、香水中のフタル酸ジエチル、そしてヘアスプレー中のフタル酸ジメチルである。これらが含まれていることをラベルが表示していないことが多い。また、MEHP 及び MBP は、動物実験で精巣毒性を有することが明らかにされている。今回、MBP と MEP がすべての患者の尿中から検出されたことから、患者が日常的にフタル酸ジブチル、フタル酸ジエチルを始めとするフタル酸エステル類に暴露されていることが考えられた。従って、フタル酸エステルに対する暴露状況の把握は、今後も継続的に行っていく必要があると考えられた。

3) 揮発性有機化合物

昨年度、患者 38 人の血清中の揮発性有機化合物 (2-エチル-1-ヘキサノール、2-エチル-1-ヘキサノール、1,4-ジクロロベンゼン) の分析を行った結果、2-エチル-1-ヘキサノールと 1,4-ジクロロベンゼンがすべての検体から検出された。両物質の濃度について、子宮内膜症有症群 (n=19) と子宮内膜症を認めない対照群 (n=19) で比較を行った。その結果、2-エチル-1-ヘキサノール (有症群 vs 対照群 = 57.3 ± 51.8 vs 59.2 ± 45.9 ng/mL、 $p=0.751$)、1,4-ジクロロベンゼン (有症群 vs 対照群 = 3.7 ± 2.7 vs 7.6 ± 12.1 ng/mL、 $p=0.525$) とともに有意差は認められなかった。

6. 周産期試料および生殖婦人の生体試料を対象とした分析

周産期サンプルを I 群、生殖婦人サンプルを II 群として、それぞれの提供者の住居地分布を検討した。サンプル提供者の平均年齢は 31.9 才であった。

I 群の周産期サンプルについて、前述の方法で各物質の濃度を測定し、それぞれ 0.5ng/ml をカットオフ値とした。水性試料については、BA は母体血で 79 例中 1 例 (1.2%)、尿中で 16 例中 1 例 (6.3%)、DEHP は母体血で 79 例中 4 例 (5.1%)、臍帯血で 50 例中 1 例 (2.1%)、また NP は母体血で 79 例中 6 例 (7.7%)、臍帯血で 50 例中 4 例 (8.3%)、尿で 16 例中 12 例 (75%) の検出率であった。最も高頻度に検出されたのは、尿中の NP

(75%)であった。また検出濃度については、DEHPが母体血、および臍帯血で最も高値を示した。さらに脂性試料については胎脂に100%高濃度で検出されていた。しかしその新生児での臍帯での濃度は1/1000以下であった。胎脂と臍帯に相関は認められなかった。再現性の検定のために、他の測定機関にて同一の胎脂を再度測定したが、やはり高濃度で検出され、2つの期間での結果は有意に相関していた。この検討から生殖婦人の体内脂肪においても高濃度に蓄積されていることが危惧された。そこで、同意を得たうえで手術時に提供いただいた皮下脂肪でDEHPを測定したところ高濃度に検出されたが、このサンプルは操作中における紺民への配慮が不十分であったことが判明し、次年度に同意を得た上で手術時に提供いただいた皮下脂肪で再度DEHPを測定したところ、感度以下で全く検出されなかった。

II群の生殖婦人サンプルは、生殖婦人が妊娠予備時期と考えられるため、胎児暴露を検討する資料として、生殖年齢の婦人への暴露を検討することが必須であると考えられる。そのために、生殖年齢の婦人から腹水を含む生体試料を採取した。各サンプルについて、前述の方法で3物質を測定した。それぞれ0.5ng/mlがカットオフ値であった。血清および腹水のサンプル数は、おのおの127と107であった。血清中においては、BAは127例中2例(1.5%)、NPは127例中34例(26.8%)、DEHPは126例中14例(11.1%)でそれぞれ検出された。腹水中ではBAが97例中1例(1.0%)、NPは101例中10例(9.9%)、DEHPは99例中25例(25.3%)で、それぞれ検出された。DEHPが血清および腹水中で最も高い濃度で検出された。年齢別検出率と濃度については、血清ではNPで年齢差がないが、DEHPでは30代後半に高値を示した。一方腹水では、NPで若年層ほど高値を示し、DEHPで年齢差を認めなかった。さらに合併症を検討した。合併症別の検出率、濃度では、明らかな差異は認めなかったが、さらに子宮内膜症での検討を試みた。しかし、子宮内膜症進行期別の検出率、濃度でも明らかな差異は認められなかった。一方、季節変動の検討では、血清中のNPが冬に、腹水中のDEHPが春に高値を示した。

検討した3物質とも母乳からの検出はなく、また水性試料の中で最も高頻度に検出されたのは、尿中のNPであった。またDEHPは決して検出率は高くはないが、検出されたサンプルでは母体血、臍帯血で最も高い濃度を示した。またDEHPは血液の中では比較的高濃度で検出されているが、尿中からの検出はなく、BAやNPとは異なり、モノ体の測定も必要であることが示唆される。また今回検出された血液・尿の検体では危険値を超える濃度を

示したものは認められなかった。一方、脂性試料においては胎脂で高濃度に検出されたが、同一個体(母児)の水性検体においてはまったく検出されておらず、生体防御のための排泄機構の一部として機能している可能性が示唆された。このためDEHPについては、体内の脂肪組織など他の検体における濃度についても検討が必要と考えられ、生殖婦人の体内脂肪においてもDEHPを検討したが最終結論は未検出で問題は見出せなかった。

7. 周産期における重金属暴露量測定と神経系初期発生における重金属のin vitro毒性評価

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。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については、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では、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。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。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： $r=0.21$)。

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。

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。

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。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。

3) 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曝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、胎盤で周産期曝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。

4) 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。

8. 胎児へのエピジェネティックな影響の解析

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。次に短期的な曝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時間曝露後、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子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。

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子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、発生初期の胎子のモデルである 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

1. 生体試料中のピレスロイド系及び有機リン系農薬分析

1) 昨年度に引き続き、有機リン系農薬の主代謝物

ジアルキルリン酸 (Dimethyl phosphate : DMP, Diethyl phosphate:DEP), ジアルキルチオリン酸 (Dimethyl thiophosphate :DMTP, Diethyl thiophosphate :DETP) 及びジアルキルジチオリン酸 (Dimethyl dithio -phosphate:DMDTP, Diethyl dithiophos -phate :DEDTP) の LC/MS/MS を用いた高感度分析法を検討した(検出下限値, DMP を除き 1ng/ml). 本法を用いて母体血 20 検体及び健康成人尿 12 検体中の有機リン系農薬曝露量を測定した. 母体血中の有機リン系農薬代謝物濃度は、いずれも操作ブランクレベル (1 ng/ml) であった. 一方, 尿中からは DEP を中心にトータルで 59ng/mL の有機リン系農薬代謝物が検出された.

2) ピレスロイド系農薬及び代表的な有機リン系農薬クロルピリホスの曝露量を評価するため、ピレスロイド系農薬の曝露マーカーには、主代謝物 3-Phenoxybenzoic acid(3-PBA) を、クロルピリホスでは 3, 5, 6-Trichloro-2-pyridinol (TCP) を指標成分とした. 本法を用いて母体血 10 検体及び健康成人尿 12 検体を分析した結果, 母体血中の 3-PBA, TCP 濃度はいずれも検出限界値以下であった. 一方, 健康成人尿からは極微量の 3-PBA (ND~0.3ng/mL) が検出された.

2. ヒト母乳試料中有機フッ素系化合物の分析および周産期生体試料におけるニコチンおよびコチニンの分析

1) 有機フッ素系化合物の測定

PFCs の子どもへの曝露源として、母乳に着目し、LC-MS/MS を用いた高感度分析法を構築した。その結果、全ての検体から PFOS が検出され、検出範囲は 0.046~0.098 ng/ml であった。ヒト母乳から検出された PFCs は前年度までに測定したハウスダストと比較するとごく微量であったが、母乳は乳児が経口的に摂取するものであることから、母乳栄養を介した乳児の PFCs 曝露評価が求められる。

2) ニコチン及びコチニンの分析

また、喫煙に起因するニコチンの曝露評価を目的として、ヒト尿中ニコチン及びコチニンを測定対象とした HILIC/MS 分析法を検討した。その結果、検出下限値 (S/N = 3) は、ニコチン、コチニン共に 0.5 ng/ml となり、平均回収率はニコチン、コチニン共に 95% 以上と高感度かつ高精度な分析法を構築した。本法を妊婦尿の分析に適用したところ、コチニンが検出される検体が数例あったものの、検出例数が少なく、血清中の濃度との相関性を検討するには至らなかった。

以上のことから、子どもが母体や生活環境を通じて、種々の化学物質に曝露されていることが明らかとなった。これらの曝露量を定量的に解析することで、疾病等との因果関係を追及するための

一助になると考える。

3. ポリ臭素化ジフェニルエーテル等の分析

ハウスタストの非意図的摂取による乳幼児のPBDEs暴露量試算値（ペンタBDE:0.4 ng/kg/日, オクタBDE:0.2 ng/kg/日, デカBDE:15 ng/kg/日）は、各原体のRfDより十分に低く、直ちに健康影響が危惧されるレベルではなかった。

4. フタル酸エステル類の子どもへの暴露評価

1) 妊婦 (n = 51), 及び対照群として健康な 20 及び 30 歳代の一般人 (n = 12) の尿中のフタル酸モノエステル類 (MEP, MBP, MBzP, MEHP, MEHHP 及び MiNP) を分析し、全て検体から、MiNP を除く、測定対象のフタル酸モノエステル類を検出した。
2) 分析値から DBP 及び DEHP の推定一日暴露量を算出した結果、耐容一日摂取量 (DBP, 66; DEHP, 37 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) を越える事例は認められず、直ちに健康影響が危惧される暴露レベルではないと思われる。

5. ヒト生体試料中の化学物質の分析(重金属類、フタル酸モノエステル類、揮発性有機化合物)

1) 患者 84 人(昨年度分析を行った 36 人分を含む)の血清中の重金属類濃度は、臨床検査法提要に示された基準範囲や、これまでの ICP-MS 法による報告値と同程度であった。子宮内膜症有症群 (n=36) と子宮内膜症を認めない対照群 (n=48) で比較した結果、Cu と Se において有症群が対照群より有意に低い ($p < 0.01$) 値であった。有症群の Cu, Se 濃度を進行期分類 (r-ASRM 分類) による段階別で比較した結果、有意差や一定の傾向は認められなかった。
2) 患者 29 人の尿中のフタル酸モノエステル類 (MBP, MEP, MEHP, MBzP) の分析を行った結果、MBP と MEP がすべての検体から検出され、中央値 (クレアチニン補正值) はそれぞれ 35.2 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、16.4 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。両物質の濃度は、米国居住者について行われた結果と比べて、MBP では 1.6 倍高く、MEP では逆に米国居住者の方が 8.6 倍高い値を示した。また、両物質の尿中濃度から算出した DBP 及び DEP の推定一日摂取量は、それぞれ 1.08, 0.46 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (中央値) と、厚生労働省や欧州連合が示した許容一日摂取量と比べて低い値であった。
3) 患者 38 人の血清の揮発性有機化合物の分析を行った結果、すべての検体から 2-エチル-1-ヘキサノールと 1,4-ジクロロベンゼンが検出された (昨年度実施)。両物質の濃度について、子宮内膜症有症群 (n=19) と子宮内膜症を認めない対照群 (n=19) で比較した結果、いずれも有意な差は認め

られなかった。

6. 周産期試料および生殖婦人の生体試料を対象とした分析

各物質とも母乳からの検出はなかった。また最も高頻度に検出されたのは、尿中の NP であった。また DEHP は決して検出率は高くないが、検出されたサンプルでは母体血、さい帯血で最も高い濃度を示した。また DEHP は血液中では比較的高濃度で検出されているが、尿中からの検出はなく、BA や NP とは異なり、モノ体の測定も必要であることが示唆される。しかし、いずれも危険値を超えるほどの濃度には至っていない。またサンプルの提供者の居住地区および疾患と、検出濃度の間には有意な差は認められなかった。化学物質の暴露は提供者の食事、喫煙、飲酒等をふくむ生活習慣によって大きく左右されることが予想される。しかし現時点での検出例数 (率) は少なく、今後さらに、モニタリングを続ける必要性も含めて検討が必要であろう。
また、以上の 3 測定物質以外の化学物質についても、我々の共同研究班は検討していたため、これら共同研究班の結果を集め、一括して生殖婦人・母児の暴露評価の参考のために測定結果一覧表を作成した。

7. 周産期における重金属暴露量測定と神経系初期発生における重金属の in vitro 毒性評価

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。

8. 胎児へのエピジェネティックな影響の解析

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. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 仲田尚生, 中田彩子, 岡田文雄, 伊藤里恵, 井之上浩一, 斉藤貢一, 中澤裕之, オンライン固相抽出 - LC/MS/MS を用いたヒト血漿中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発, 分析化学, 54, 877-884 (2005)
- 2) Nakata, H., Nakata, A., Kawaguchi, M., Iwasaki, Y., Ito, R., Saito, K. and Nakazawa, H.: Development of analytical method of perfluorochemicals in human plasma and blood by column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid-phase extraction using a column-switching technique. *Organohalogen Compounds*, 67, 219-221 (2005).
- 3) 勝又常信, 中田彩子, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之, 超臨界流体抽出-高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法によるハウスダスト中パーフルオロ化合物の定量, 分析化学, 55, 955-962 (2006)
- 4) 岡野圭太, 日の原聖仁志, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 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)
- 5) Akutsu, K., Takatori, S., Nakazawa, H., Hayakawa, K., Izumi, S., and Makino, T. Dietary intake estimations of polybrominated diphenyl ethers based on a total diet study in Osaka, Japan. *Food Addit. Contam., in press.*
- 6) Akutsu, K., Takatori, S., Nozawa, S., Yoshiike, M., Nakazawa, H., Hayakawa, K., Makino, T., and Iwamoto, T. Polybrominated diphenyl ethers in human serum and sperm quality, *Bull. Environ. Contam. Toxicol., in press.*
- 7) TAKATORI, S., OKAMOTO, Y., KITAGAWA, Y., HORI, S., IZUMI, S., MAKINO, T. AND NAKAZAWA, H.: Simulated neonatal exposure to DEHP and MEHP from PVC enteral nutrition products. *Int. J. Pharm.*, 352, 139-145 (2008)
- 8) TAKATORI, S., AKUTSU, K., KONDO, F., IZUMI, S., MAKINO, T. AND NAKAZAWA, H.: Determination of phthalate monoesters in human breast milk by using liquid chromatograph-tandem mass spectrometer. *Bunseki Kagaku*, 56, 1025-1031 (2007)
- 9) 堀江正一, 竹上晴美, 石井里枝, 中澤裕之, 牧野恒久 「LC/MS/MSによるヒト尿中のピレスロイド系殺虫剤の分析」, 第9回環境ホルモン学会 (2006) 東京
- 10) 堀江正一, 竹上晴美, 中澤裕之, 牧野恒久 「LC/MS/MSによるヒト尿及び血清中のピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬クロルピリホスの分析」, 第68回分析化学討論会 (2007) 宇都宮
- 11) 中田彩子, 勝又常信, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 岸 玲子, 和泉俊一郎, 牧野恒久, 中澤裕之 「LC/MS/MSを用いたヒト母乳中有機フッ素系化合物の高感度分析法の構築」第50回日本薬学会関東支部大会 (2006) 新潟.
- 12) 中田彩子, 勝又常信, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 岸 玲子, 和泉俊一郎, 牧野恒久, 中澤裕之 「母乳栄養によるパーフルオロ化合物の乳幼児への暴露」第127年会 日本薬学会 (2007) 富山.
- 13) 岡野圭太, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 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ヒト生体試料中ニコチンおよびコチニンの同時分析法」第50回日本薬学会関東支部大会 (2006) 新潟.
- 14) 岡野圭太, 日の原聖仁志, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 和泉俊一郎, 牧野恒久, 中澤

- 裕之「タバコ煙暴露評価のための母体血中ニコチンおよびコチニンの分析」第127年会 日本薬学会 (2007) 富山.
- 15) 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, 吉池美紀, 野澤資亜利, 岩本晃明, 「日本人男性の血清中のフタル酸モノエステル類の分析」第9回環境ホルモン学会研究発表会 (2006) 東京.
 - 16) 近藤文雄, 猪飼誉友, 林留美子, 木村隆, 高取聡, 中澤裕之, 和泉俊一郎, 牧野恒久; GC/MS法を用いたヒト尿中フタル酸エステル代謝物の測定; 環境ホルモン学会第9回研究発表会 (2006)
 - 17) 林留美子, 近藤文雄, 木村隆, 宮崎豊, 中澤裕之, 和泉俊一郎, 牧野恒久; 成人における血清及び尿中の多元素濃度バランス; 台77回日本衛生学会 (2007)
 - 18) 仲田尚生, 中田彩子, 岡田文雄, 伊藤里恵, 井之上浩一, 斉藤貢一, 中澤裕之, オンライン固相抽出 - LC/MS/MSを用いたヒト血漿中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発, 分析化学, 54, 877-884 (2005)
 - 19) 岩谷美沙, 大鐘潤, 塩田邦郎. 発生・分化とエピジェネティクス. ゲノム医学 5:25-30, 2005
 - 20) Misa Iwatani, Kohta Ikegami, Yuliya Kremenska, Naka Hattori, Satoshi Tanaka, Shintaro Yagi and Kunio Shiota. Demethyl sulfoxide (DMSO) affects genome-wide DNA methylation profiles and level of Dnmt3a transcript in mouse embryoid body. Stem Cells (in revision)
2. 学会発表
- 1) 堀江正一, 竹上晴美, 中澤裕之, 牧野恒久 「LC/MS/MSによるヒト尿及び血清中のピレスロイド系農薬及び有機リン系農薬クロルピリホスの分析」, 第68回分析化学討論会 (2007) 宇都宮
 - 2) 中田彩子, 仲田尚生, 勝又常信, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 西條泰明, 佐田文宏, 岸 玲子, 中澤裕之 「カラムスイッチング - LC/MS/MSによるヒト母体血中の有機フッ素系化合物の測定」第126年会 日本薬学会 (2006) 仙台.
 - 3) 中田彩子, 勝又常信, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 岸 玲子, 和泉俊一郎, 牧野恒久, 中澤裕之 「LC/MS/MSを用いたヒト母乳中パーフルオロ化合物の高感度分析法の構築」第50回日本薬学会関東支部大会 (2006) 新潟.
 - 4) 岡野圭太, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 和泉俊一郎, 牧野恒久, 中澤裕之 「HILIC/MSによるヒト生体試料中ニコチンおよびコチニンの同時分析法」第50回日本薬学会関東支部大会 (2006) 新潟.
 - 5) 中田彩子, 勝又常信, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 岸 玲子, 和泉俊一郎, 牧野恒久, 中澤裕之 「母乳栄養によるパーフルオロ化合物の乳幼児への暴露」第127年会 日本薬学会 (2007) 富山.
 - 6) 中田彩子, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 岸 玲子, 和泉俊一郎, 牧野恒久, 中澤裕之 「LC/MS/MSを用いた牛乳および母乳中に残留する有機フッ素系化合物の分析」第93回食品衛生学会 学術講演会 (2007) 東京.
 - 7) 中田彩子, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 岸 玲子, 和泉俊一郎, 牧野恒久, 中澤裕之 「LC/MS/MSを用いたヒト母乳試料中有機フッ素系化合物の分析」第68回分析討論会 (2007) 栃木.
 - 8) 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」27th International Symposium on alogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs)-Dioxin 2007 (2007)
 - 9) 岡野圭太, 日の原聖仁志, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 和泉俊一郎, 牧野恒久, 中澤裕之 「タバコ煙暴露評価のための母体血中ニコチンおよびコチニンの分析」第127年会 日本薬学会 (2007) 富山.
 - 10) Akutsu, K., Takatori, S., Nakazawa, H., Hayakawa, K., Izumi, S., and Makino, T. Dietary intake estimations of polybrominated diphenyl ethers based on a total diet study in Osaka, Japan. *Organohalogen Compounds: Proceeding of the 27th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin2007)*, 69, 2303-2306, September 2-7, 2007, Tokyo, Japan.
 - 11) Akutsu, K., Takatori, S., Nozawa, S., Yoshiike, M., Nakazawa, H., Hayakawa, K., Makino, T., and Iwamoto, T. Polybrominated diphenyl ethers in human serum and sperm quality. *Organohalogen Compounds: Proceeding of the 27th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (Dioxin2007)*, 69, 1926-1929, September 2-7, 2007, Tokyo,

- Japan.
- 12) 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「母体及び臍帯血清中のフタル酸モノエステル類の分析」環境ホルモン学会第10回研究発表会 2007年12月10-11日 東京
 - 13) 林留美子、近藤文雄、中澤裕之、和泉俊一郎、牧野恒久；子宮内膜症患者の血清中多元素濃度レベル；環境ホルモン学会第10回研究発表会 (2007)
 - 14) 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. : DIOXIN meeting (2007)
 - 15) 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)
 - 16) Kondo F., Ikai Y., Goto T., Ito Y., Oka H., Nakazawa H., Odajima Y., Kamijima M., Shibata E., Torii S., Miyazaki Y. Serum levels of volatile organic compounds in patients with sick building syndrome. *Bull Environ Contam Toxicol* 2006; 77: 331-337.
 - 17) Kondo F., Ikai Y., Goto T., Ito Y., Oka H., Nakazawa H., Odajima Y., Kamijima M., Shibata E., Torii S., Miyazaki Y. Two sensitive sick-building syndrome patients possibly responding to p-dichlorobenzene and 2-ethyl-1-hexanol: case report. *J Health Sci* 2007; 53: 119-123.
 - 18) 仲田尚生、中田彩子、岡田文雄、伊藤里恵、井之上浩一、斉藤貢一、中澤裕之；オンライン固相抽出-高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計を用いるヒト血しょう中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発；*BUNSEKI KAGAKU*. 2005 ; 54 (9) : 877-884.
 - 19) 勝又常信、中田彩子、岩崎雄介、伊藤里恵、斉藤貢一、中澤裕之；超臨海流体抽出-高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計によるハウスダスト中パーフルオロ化合物の定量；*BUNSEKI KAGAKU*. 2006;55 (12) :955-961.
 - 20) Misa Iwatani, Kohta Ikegami, Yuliya Kremenska, Naka Hattori, Satoshi Tanaka, Shintaro Yagi and Kunio Shiota. Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells* 24: 2549-2556 (2006)
 - 21) 仲田尚生、中田彩子、岡田文雄、井之上浩一、伊藤里恵、斉藤貢一、中澤裕之、「カラムスイッチング-LC/MS/MSを用いた血液試料中有機フッ素系化合物の一斉分析法の構築」第66回分析化学討論会 (2005)
 - 22) Hisao Nakata, Migaku Kawaguchi, Teruaki Iwamoto, Koichi Inoue, Shiari Nozawa, Miki Yoshiike, Fumio Okada, Yusuke Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Hiroyuki Nakazawa. Determination of perfluorooctanesulfonic acid in human serum and semen samples by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, *Fluoros* (2005)
 - 23) Hisao Nakata, Ayako Nakata, Migaku Kawaguchi, Yusuke Iwasaki, Rie Ito, Koichi Saito, Hiroyuki Nakazawa. Development of analytical method of perfluorochemicals in human plasma and blood by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid phase extraction using column switching technique. 25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs)-Dioxin 2005 (2005)
 - 24) Hiroyuki Nakazawa, Migaku Kawaguchi, Hisao Nakata, Tsunenobu Katumata, Ayako Nakata, Fumio Okada, Koichi Inoue, Rie Ito, Koichi Saito, Yasuaki Saijo, Fumihiro Sata, Reiko Kishi. Measurement of perfluorooctane sulfonate and related perfluorinated compounds in human maternal and cord blood samples. The Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC North America 26th Annual Meeting) (2005)
 - 25) 中田彩子、仲田尚生、勝又常信、岩崎雄介、伊藤里恵、斉藤貢一、西條泰明、佐田文宏、岸 玲子、中澤裕之. カラムスイッチング-LC/MS/MSによるヒト母体血中の有機フッ素系化合物の測定. 第126年会 日本薬学会 (2006) 仙台.
 - 26) 勝又常信、仲田尚生、中田彩子、岩崎雄介、伊藤里恵、斉藤貢一、中澤裕之「HPLC/MS/MS法によるハウスダスト中パーフルオロ化合物の分析」第126年会 日本薬学会 (2006) 仙台.
 - 27) 近藤文雄、猪飼誉友、林 留美子、富田伴一、高取 聡、吉村真理子、中澤裕之、牧野恒久；

GC/MSによる尿中フタル酸モノエステル類の
分析法の開発；日本薬学会第126年会（2006）

- 28) 岩谷美沙、池上浩太、服部中、田中智、八木
慎太郎、塩田邦郎. ジメチルサルフォキシド
(DMSO) はDnmt3a mRNA発現を上昇させ、DNA
メチル化プロファイルを変化させる. (ポスタ
ー発表) 第28回日本分子生物学会（2005年12
月）

H. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | 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、斉藤貢一、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ニ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、日の原型仁志、岩崎雄介、伊藤里恵、斉藤貢一、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

Kondo F, Ikai Y, Goto T, Ito Y, Oka H, Nakazawa H, Odajima Y, Kamijima M, Shibata E, Torii S, Miyazaki Y.	Two sensitive sick-building syndrome patients possibly responding to <i>p</i> -dichlorobenzene and 2-ethyl-1-hexanol: case report.	Journal of Health Science	53	119-123	2007
牧野恒久	内分泌かく乱化学物質による女性への影響	産婦人科治療	93 (4)	439-443	2006
勝又常信, 中田彩子, 岩崎雄介, 伊藤里恵, 斉藤貢一, 中澤裕之,	超臨界流体抽出・高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析法によるハウスダスト中パーフルオロ化合物の定量	分析化学	55	955-962	2006
Kondo F, Ikai Y, Goto T, Ito Y, Oka H, Nakazawa H, Odajima Y, Kamijima M, Shibata E, Torii S, Miyazaki Y.	Serum Levels of Volatile Organic Compounds in Patients with Sick Building Syndrome	Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology	77	331-337	2006
Iwatani, M., Ikegami, K., Kremenska, Y., Hattori, N., Tanaka, S., Yagi, S. and Shiota, K	Dimethyl sulfoxide has an Impact on epigenetic profile in mouse embryoid body.	Stem Cells	24	2549-2556	2006
Nakata H., Nakata A., Kawaguchi M., Iwasaki Y., Ito R., Saito K. Nakazawa H.	Development of analytical method of perfluorochemicals in human plasma and blood by column-switching LC-MS/MS coupled with solid-phase extraction using a column-switching technique	Organohalogen Compounds	67	386-388	2005
仲田尚生, 中田彩子, 岡田文雄, 伊藤里恵, 井之上浩一, 斉藤貢一, 中澤裕之	オンライン固相抽出・LC/MS/MSを用いたヒト血漿中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発	分析化学	54	877-884	2005
岩谷美沙, 大鐘潤, 塩田邦郎	発生・分化とエピジェネティクス	ゲノム医学	5	25-30	2005
John Greally, 前田千晶, 塩田邦郎	DNA のメチル化と疾患、栄養因子、薬剤および胎生期の影響	実験医学	23	2122-2127	2005

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

Kazuhiko Akutsu^{1,2*}, Yukio Tanaka¹, Kazuichi Hayakawa²

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

²*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).

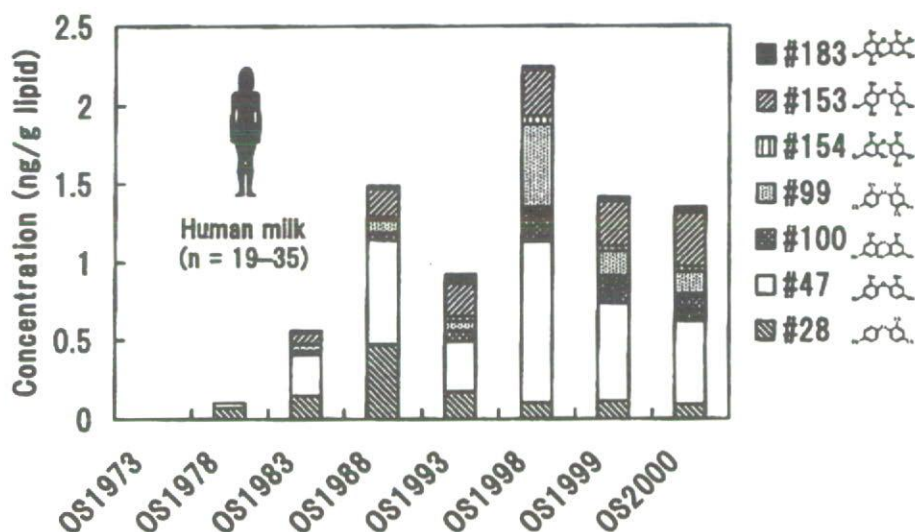


Fig. 1: Temporal trend of PBDE levels in pooled human milk samples collected from Osaka between 1973 and 2000.

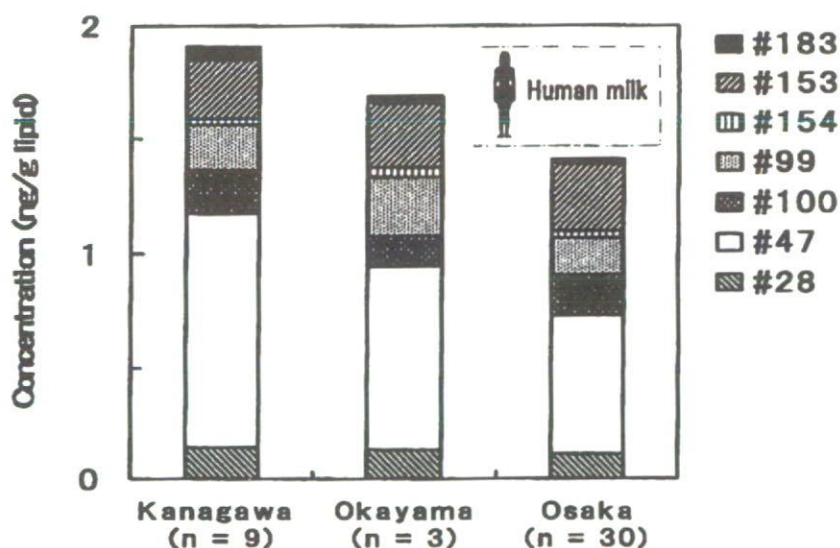


Fig. 2: PBDE levels in human milk samples collected from three different prefectures in 1999.

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).

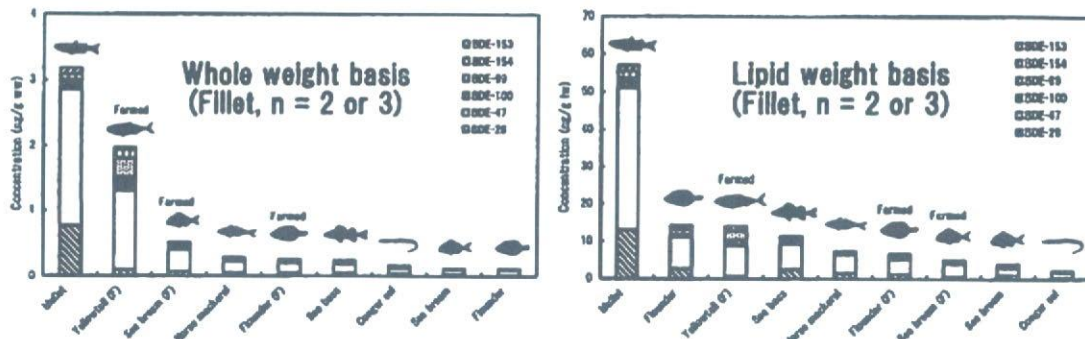


Fig. 3: PBDE levels in fish samples collected from Seto Inland Sea in 1999. Left, whole weight basis; right, lipid weight basis.

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

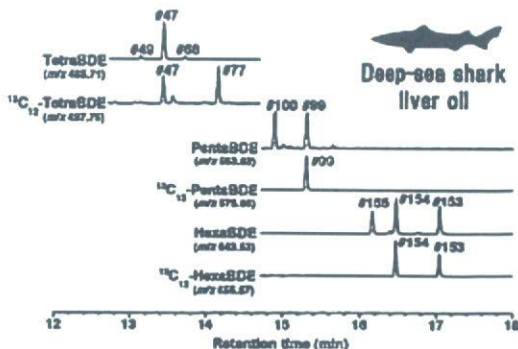


Fig. 4: Chromatograms of the deep-sea shark liver oil supplement

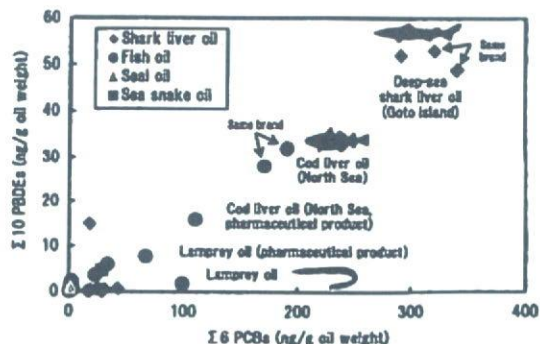


Fig. 5: Comparison of PCB and PBDE concentrations in fish oil supplements.

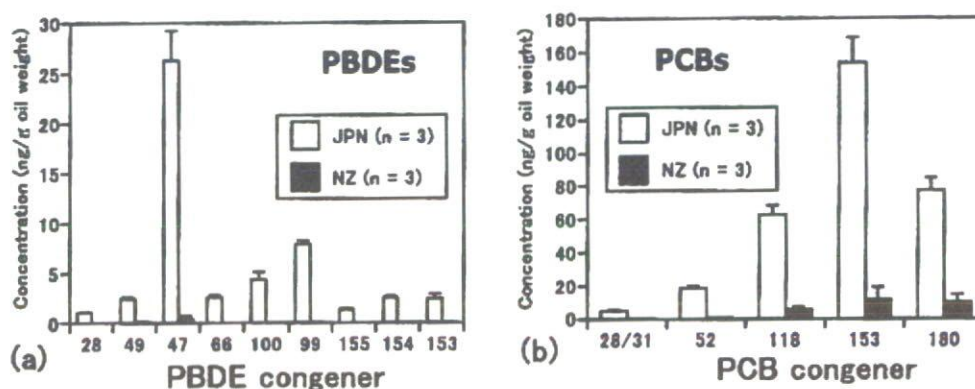


Fig. 6: Concentrations of selected PBDEs (a) and PCBs (b) in dietary supplements originate from Japanese and New Zealand deep-sea sharks (mean and standard deviation).

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°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 ± 1 years (range, 18–22 years). The mean \pm SD abstinence period was 3.1 ± 0.4 days (range, 2.6–3.8 days). In addition, 2 brands of commercially pooled human serum (“L-Conserra N” and “L-Suitrol I,” Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) were used as in-house reference materials.

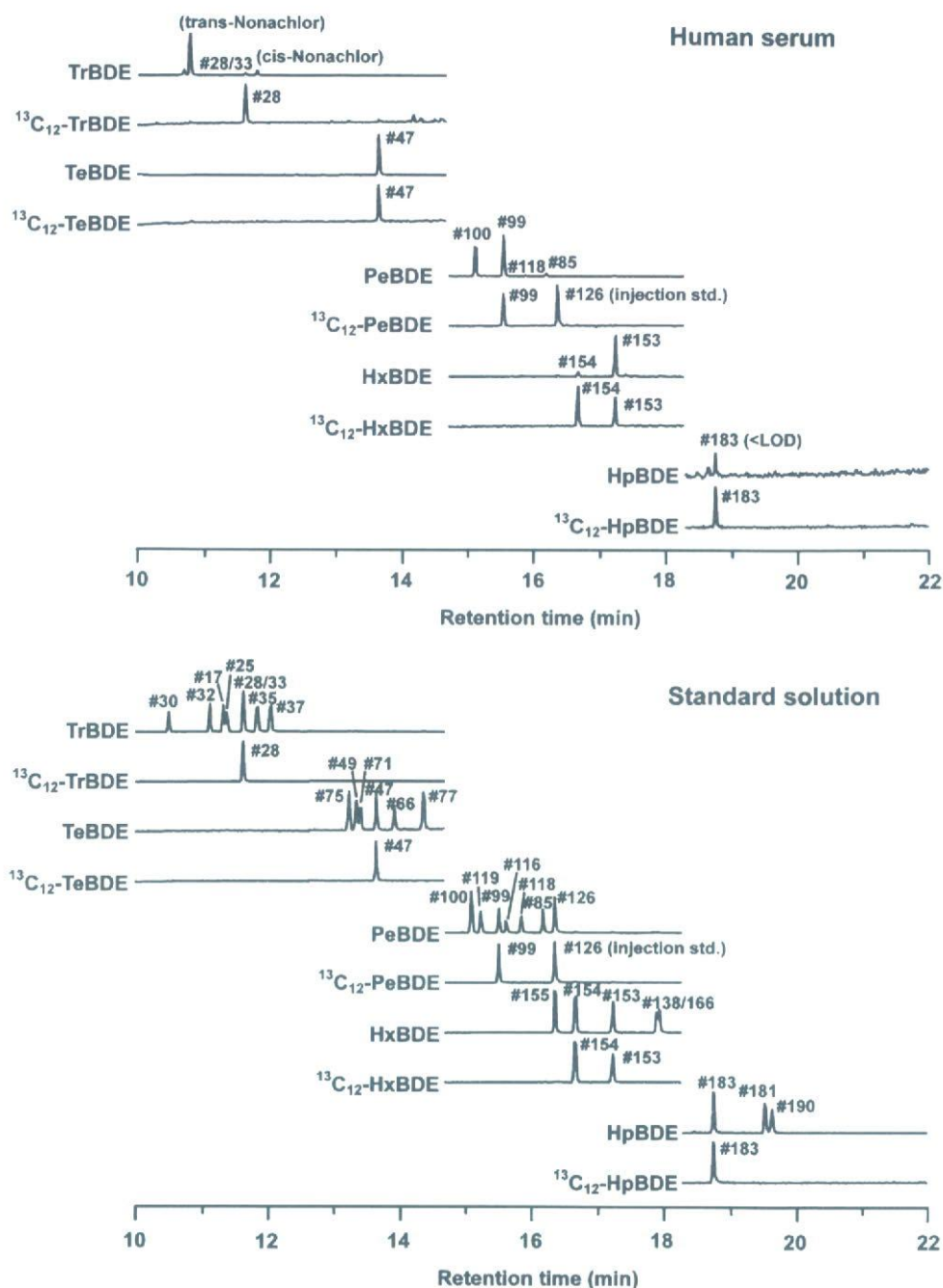
Standard mixture solutions of native PBDEs (BDE-AAP-A-15X) were purchased from AccuStandard (New Haven, CT, USA), and $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled PBDEs (MBDE-MXC) were purchased from Wellington Laboratories (Ontario, Canada). In this study, 29 PBDE congeners with 3–7 bromine atoms were monitored. The 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 μL *n*-nonane), the extract was finally evaporated to approximately 10 μL 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-IMS, 15 m length, 0.25 mm i.d., 0.1 μm 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.

Fig. 1 Chromatograms of PBDEs in human serum (participant No.2) and standard solution (1–2.5 ng/mL each)



We validated the serum extraction procedure prior to beginning sample analysis by analyzing 4 replicate samples of pooled serum fortified with target analytes at 0.04–0.1 ng/g serum. The mean percent recovery of 7 representative PBDE congeners (TrBDE-28, TeBDE-47, PeBDE-99, PeBDE-100, HxBDE-153, HxBDE-154, and HpBDE-183) ranged from 91% to 107%, and the relative standard deviation (RSD) ranged from 2% to 10%. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were defined as 3 times and 10 times the SD

values obtained from the analysis of the 7 procedural blank samples (6 g of water), respectively. However, for congeners that could not be detected in the blanks, the values that were 3 times and 10 times the SD values obtained from the analysis of 5 replicates of the lowest calibration standard were used as LOD and LOQ. The LOD values for all the PBDE congeners were below 0.3 ng/g lw. In the analysis of 3 split unfortified serum samples, the RSD values for all the detected congeners were below 10%.

Results and Discussion

Of the 29 PBDE congeners monitored, 4 congeners (TeBDE-47, PeBDE-99, PeBDE-100, and HxBDE-153) were mainly detected in human serum samples (Fig. 1). The concentrations of the detected PBDE congeners in the serum samples ($n = 10$) are shown in Table 1. The median levels of the individual PBDE congeners were as follows: TeBDE-47, 1.4 ng/g lw; PeBDE-99, 0.21 ng/g lw; PeBDE-100, 0.24 ng/g lw; and HxBDE-153, 0.72 ng/g lw. The levels of total PBDEs in Japanese human serum samples were almost the same as those reported in European countries but were 1 order of magnitude lower than those reported in USA (Hites 2004). Significant positive correlations were observed between the concentrations of TeBDE-47 and PeBDE-99 ($r = 0.988$, $p < 0.001$), TeBDE-47 and PeBDE-100 ($r = 0.938$, $p < 0.001$), and PeBDE-99 and PeBDE-100 ($r = 0.915$, $p < 0.001$). In contrast, no significant correlations were observed between the concentration of HxBDE-153 and those of the other 3 congeners ($r = 0.306$ – 0.390 , $p = 0.26$ – 0.39). The absence of a significant correlation between HxBDE-153 and the other 3 dominant congeners (TeBDE-47, PeBDE-99, and PeBDE-100) implies that the main sources and/or biological properties of HxBDE-153 were different from those of the other 3 congeners. It has been reported that the technical mixtures of pentaBDE (DE-71 and Bromkal 70-5DE) and octaBDE (DE-79 and Bromkal 79-8DE) both contained HxBDE-153 in the range 5.32%–5.44% w/w and 0.15%–8.66% w/w, respectively (La Guardia et al. 2006). The congeners TeBDE-47, PeBDE-99, and PeBDE-100

have been found in pentaBDE as the major components, but they have not been found in octaBDE (La Guardia et al. 2006). These 3 congeners and HxBDE-153 have never been found in a technical decaBDE mixture (Saytex 102E and Bromkal 82-0DE) (La Guardia et al. 2006). Therefore, TeBDE-47, PeBDE-99, and PeBDE-100 are mainly sourced from pentaBDE, although HxBDE-153 is sourced from both pentaBDE and octaBDE. In the early 1990s, Japanese manufacturers voluntarily stopped the production and use of pentaBDE because its potency to accumulate in the biota and produce toxic polybrominated dibenzofurans/dioxins under thermal stresses was a cause of concern. However, the production and use of octaBDE were continued in Japan until 2002 (Ministry of the Environment, Japan 2006). Therefore, many consumer products containing octaBDE in the Japanese indoor environment might continue to exist. Thus, with regard to octaBDE components such as HxBDE-153 and HpBDE-183, inhalation and dermal exposure might be important exposure routes for the Japanese people. Geyer et al. (2004) have predicted elimination half-lives of PBDEs in the human adipose tissue; the predicted half-lives of individual congeners in an adult male were as follows: TeBDE-47, 1.9 years; PeBDE-99, 3.5 years; PeBDE-100, 2.4 years; and HxBDE-153, 7.8 years. It is expected that the half-lives of Te-HxBDEs increase with the number of bromine atoms per molecule, and the half-life of HxBDE-153 is much longer than those of other dominant congeners detected in human serum. Further research is needed to examine the difference between the elimination half-lives and toxicity of individual PBDE congeners in animals and humans.

Table 1 Concentrations of PBDEs in serum samples from 10 Japanese males (ng/g lw)

Congener	Participant No									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TrBDE-17	tr <0.04	tr <0.05	nd <0.01	nd <0.01	nd <0.02	nd <0.01	nd <0.02	nd <0.01	nd <0.02	nd <0.02
TrBDE-28/33	tr <0.2	0.37	0.16	tr <0.2	0.16	0.24	tr <0.2	0.17	tr <0.2	tr <0.2
TrBDE-37	tr <0.02	tr <0.03	nd <0.01	nd <0.01	nd <0.01	nd <0.01	nd <0.01	nd <0.01	nd <0.01	nd <0.01
TeBDE-49	nd <0.02	nd <0.03	0.09	tr <0.07	tr <0.08	0.07	nd <0.02	0.09	nd <0.03	tr <0.09
TeBDE-47	1.3	5.9	1.5	0.96	1.6	1.8	0.54	2.9	0.93	0.81
TeBDE-66	nd <0.04	nd <0.05	nd <0.04	nd <0.04	nd <0.04	nd <0.04	nd <0.04	tr <0.2	nd <0.05	nd <0.05
PeBDE-100	0.23	0.67	0.24	0.21	0.24	0.40	0.13	0.31	0.21	0.25
PeBDE-99	0.21	1.1	0.21	0.16	0.25	0.21	0.10	0.49	0.15	0.20
PeBDE-118	0.02	0.03	tr <0.02	tr <0.02	0.02	0.03	tr <0.02	tr <0.02	0.03	0.03
PeBDE-85	tr <0.07	tr <0.09	tr <0.07	nd <0.02	tr <0.08	nd <0.02	nd <0.02	tr <0.07	nd <0.03	nd <0.02
HxBDE-155	nd <0.02	tr <0.07	tr <0.05	tr <0.05	nd <0.02	tr <0.06	nd <0.02	nd <0.02	tr <0.07	nd <0.02
HxBDE-154	tr <0.06	0.08	0.05	0.05	tr <0.06	0.06	tr <0.06	tr <0.06	tr <0.07	tr <0.07
HxBDE-153	0.76	0.96	1.1	0.56	0.58	0.68	0.37	0.52	0.91	0.79
HpBDE-183	nd <0.1	nd <0.2	tr <0.4	tr <0.4	tr <0.4	tr <0.4	nd <0.1	nd <0.1	tr <0.5	nd <0.2
Sum of 4 PBDEs ^a	2.5	8.6	3.1	1.9	2.7	3.1	1.1	4.2	2.2	2.1

Abbreviations: tr, trace; nd, not detected. ^a Sum of TeBDE-47, PeBDE-100, PeBDE-99, and HxBDE-153

The sperm concentration and testis size of the 10 participants are shown in Table 2. The sperm concentration of these participants ranged from 25–115 million/mL. No participant had a sperm concentration below 20 million/mL, the minimum fertility standard established by the World Health Organization (World Health Organization 1999). Strong inverse correlations were observed between the serum HxBDE-153 concentration and sperm concentration ($r = -0.841$, $p = 0.002$; Fig. 2) and testis size ($r = -0.764$, $p = 0.01$). However, no significant relationships were observed between the serum concentrations of the other congeners and the sperm concentration (r ranged from -0.187 to -0.099 , $p = 0.605$ – 0.786) or testis size (r ranged from -0.216 to -0.054 , $p = 0.548$ – 0.883). Researchers have hypothesized that endocrine-disrupting chemicals with thyroid-hormonal or sex-hormonal activities might adversely affect male fertility. The thyroid-disrupting and estrogenic/anti-estrogenic activities of PBDEs have been reported in several studies (Meerts et al. 2001; Zhou et al. 2002). In addition, considerable evidence

regarding the reproductive effects of PBDEs is available from in vivo studies. Kuriyama et al. (2005) have reported that developmental exposure to a single low dose (60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight) of PeBDE-99 decreased the sperm count in male Wistar rats. Although the levels of PBDEs found in our study are relatively low, we observed significant inverse associations between the serum concentration of HxBDE-153 and the sperm concentration and testis size; this suggests an association between the serum HxBDE-153 concentration and human sperm quality. The lack of a significant relationship among other individual PBDE congeners and sperm parameters might indicate a difference in bioactivity between the congeners. The relationship between PBDEs and sperm quality is a complicated problem and needs further study.

Acknowledgments We thank the participants who donated their blood and semen samples. This study was supported by grants from the Ministry of the Environment and the Ministry of the Health, Labor and Welfare, Japan.

Table 2 Sperm concentration and testis size of 10 Japanese males

	Participant No									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sperm concentration (million/mL) ^a	49	55	38	108	83	74	115	78	25	30
Testis size (mL) ^b	36	36	40	50	46	42	51	54	29	33

^a Annual average of monthly data. ^b Total of right and left testes

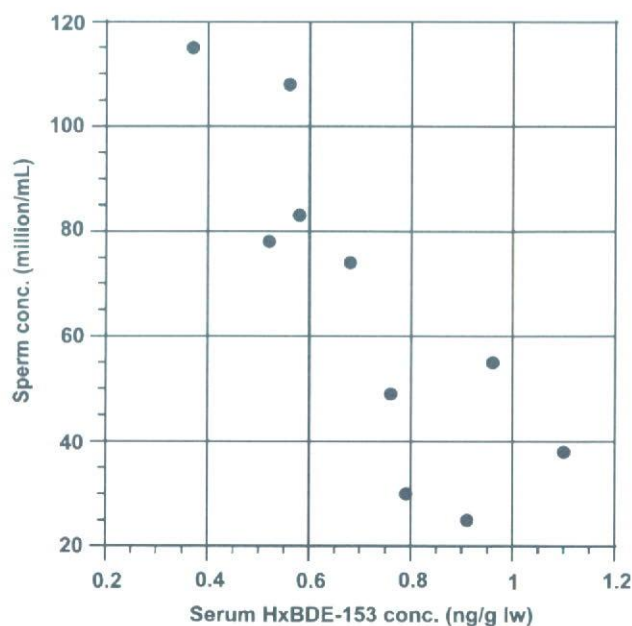


Fig. 2 Relationship between the serum HxBDE-153 concentration and sperm concentration

References

- Akutsu K, Kitagawa M, Nakazawa H, Makino T, Iwazaki K, Oda H, Hori S (2003) Time-trend (1973–2000) of polybrominated diphenyl ethers in Japanese mother's milk. *Chemosphere* 53:645–654
- Eriksson P, Jakobsson E, Fredriksson A (2001) Brominated flame retardants: a novel class of developmental neurotoxicants in our environment? *Environ Health Perspect* 109:903–908
- Fowles JR, Fairbrother A, Baecher-Steppan L, Kerkvliet NI (1994) Immunologic and endocrine effects of the flame-retardant pentabromodiphenyl ether (DE-71) in C57BL/6J mice. *Toxicology* 86:49–61
- Geyer HJ, Schramm K-W, Darnerud PO, Aune M, Feicht A, Fried KW, Henkelmann B, Lenoir D, Schmid P, McDonald TA (2004) Terminal elimination half-lives of the brominated flame retardants TBBPA, HBCD, and lower brominated PBDEs in humans. *Organohalogen Comp* 66:3867–3872
- Hites RA (2004) Polybrominated diphenyl ethers in the environment and in people: a meta-analysis of concentrations. *Environ Sci Technol* 38:945–956
- Ikonomou MG, Rayne S, Addison RF (2002) Exponential increases of the brominated flame retardants, polybrominated diphenyl ethers, in the Canadian Arctic from 1981 to 2000. *Environ Sci Technol* 36:1886–1892
- Iwamoto T, Nozawa S, Yoshiike M, Hoshino T, Baba K, Matsushita T, Tanaka SN, Naka M, Skakkebaek NE, Jorgensen N (2006) Semen quality of 324 fertile Japanese men. *Hum Reprod* 21:760–765
- Kuriyama SN, Talsness CE, Grote K, Chahoud I (2005) Developmental exposure to low dose PBDE 99: effects on male fertility and neurobehavior in rat offspring. *Environ Health Perspect* 113:149–154
- La Guardia MJ, Hale RC, Harvey E (2006) Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used penta-, octa-, and deca-PBDE technical flame-retardant mixtures. *Environ Sci Technol* 40:6247–6254
- Meerts IA, Letcher RJ, Hoving S, Marsh G, Bergman Å, Lemmen JG, van der Burg B, Brouwer A (2001) In vitro estrogenicity of