

Fig. 1 Analytical procedure for organohalogenes in food, breast milk and serum samples

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）  
分担研究報告書

汚染が懸念される物質のモニタリングー日本の生体試料：  
日本人の化学物質曝露実態ー現在と20年前の比較

分担研究者原口 浩一 第一薬科大学・教授  
研究協力者 藤井由希子 京都大学大学院医学研究科環境衛生学・大学院生

研究要旨

本研究の目的は、日本人に汚染の懸念されるPOPsおよび関連物質の曝露実態を20年前と比較し、その濃度推移を年齢別に調べることである。京都地域のヒト試料のうち、1989年、1999年および2010年の20歳代および50歳以上の男性血清（各10検体）を分析対象とし、POPs濃度の指標となる4,4'-DDE, hexachlorobenzene (HCB), t-nonachlor, PCB-153の他、POPs候補としてendosulfanおよびpentachlorophenol (PCP)、難燃剤としてtribromophenol (TBP)およびtetrabromobisphenol A (TBBPA)、さらにPCBおよびPBDEの水酸化体について濃度推移を調査した。

POPsのうち4,4'-DDE, HCB, t-nonachlorおよびPCBsは、各年代とも50歳以上が20歳グループより約2倍高い残留濃度を示した。現在の汚染状況を20年前と比較すると、endosulfanを除いて濃度は減少した。PCPは1989年の若年層で高濃度であったが、1999年以降では減少傾向であった。臭素系難燃剤のうちTBPは20年前よりも増加傾向を示した。TBBPAは1989年の血清から1検体、1999年で9検体、2010年で8検体検出された。PCB代謝物は4-OH-PCB187が母化合物と同レベルで、水酸化PBDEでは、6-OH-BDE47がPCPと同レベルで検出された。これらの結果は、フェノール性臭素化合物の濃度変化を今後も監視する必要があることを示し、モニタリング調査を行う上で基礎資料となる。

A. 研究目的

本研究班では、これまで日中韓越の母乳、血液、食事などに汚染の懸念される塩素系POPsについての曝露状況を比較してきた (Haraguchi et al 2009; Fujii et al 2012)。しかし、我が国の残留濃度の推移および年齢別の残留分布については情報が少ない。なかでも臭素系フェノール化合物

は内分泌攪乱作用や神経発達毒性を持ち、胎盤や母乳を通じ胎児（乳児）への移行が報告されている (Kawashiro et al 2008)。したがって幅広い年齢層での曝露量の違いについてヒト試料を用いたモニタリングが求められる。

我々は汚染が懸念されるPOPs候補物質としてまず、endosulfanとpentachlorophenol (PCP)に注目した。

endosulfan は殺虫剤や木材の防腐剤として使用され、日本での農薬登録は2010年に失効した。一方、PCPは1955年に殺菌剤として、1957年に除草剤として農薬登録されたが、農薬製剤の副生成物としてダイオキシン類を含むことが問題となり、1990年に農薬登録が失効した (Sakai et al 2001)。これらは海産物中に汚染物質として発見され、それによって引き起こされる免疫機能の低下や甲状腺ホルモンレベルの変動が懸念される (Sjodin et al 2000; Gerhard et al 1999)。本研究班では endosulfan を母乳や食事から検出したが、成人の曝露状況のこれまでの推移は明らかでない。PCP は水酸化PCBと内分泌かく乱性の観点から懸念されるが、ヒト曝露の推移に関するデータが見られない。

フェノール性臭素化難燃剤である tribromophenol (TBP) および tetrabromobisphenol A (TBBPA) はプラスチック製品や繊維製品に添加され、2002年の年間生産量は、世界で130,000トン以上、そのうち85%がアジアで使われている (BSEF 2004; Watanabe and Sakai 1983)。特にTBBPA曝露は甲状腺ホルモンへの影響が懸念されている (Meerts et al 2000; 2001; Kitamura et al 2002)。マウスに経口摂取されたTBBPAは、胎盤を通過して胚仔や胎仔に移行する可能性が示唆されている (Fujitani et al 2006)。TBPやTBBPAは、魚介類から検出され (Watanabe et al 1983)、また屋内環境では、電化製品の廃棄物処理場やコンピュータ室の埃や空気中から検出されている (Sjodin et al 2001)。しかし、それらのヒト曝露実態のこれまでの推移は不明である。本研究の目的は、日本人に汚染の懸念されるこれらの化学物質の現在のヒ

ト曝露実態を20年前と比較し、その濃度推移を年齢別に調べることである。今回、京都地域のヒト試料のうち、1989年、1999年および2010年の20歳および50歳以上の男性血清を用いて、中性画分から4種のPOPs (4,4'-DDE, hexachlorbenzene (HCB), trans-nonachlor, PCB-153) および  $\alpha$ -endosulfanを調査項目とし、フェノール性画分からは残留農薬としてPCPを、難燃剤としてTBPおよびTBBPAを、さらにPCBやPBDEの水酸化体を分析対象としてそれらの過去20年間の濃度推移について検討した。

## B. 研究方法

### 1) サンプル収集

ヒト血清試料は京都大学生体試料バンク (Koizumi et al 2005; 2009) の保存試料から京都地区で1989年、1999年および2010年に20歳代の男性および50歳以上の男性から提供された血清 (それぞれ10検体) を使用した。この研究プロトコール (E25) は京都大学大学院医学研究科・医学部及び医学部附属病院医の倫理委員会により承認され、参加者全員から書面による同意を得た。Table 1 に提供者の地域、採取年、年齢を示す。

### 2) 化学物質

POPsのうち、4,4'-DDE, HCB, trans-nonachlorは関東化学製のPesticide mix 1037溶液を用いた。PCB-153, PCB-180, PCB-187およびPCB-183はAccuStandard社のBP-MS溶液を用いた。PCP, TBP, TBBPA, 4-OH-PCB187および6-OH-BDE47はWellington社製を用いた。内標準として用いた  $^{13}\text{C}$  PCB-153,  $^{13}\text{C}$   $\alpha$ -endosulfan,  $^{13}\text{C}$  4-OH-PCB187

および [<sup>13</sup>C]PCPはCambridge Isotope Laboratories 社製を用いた。分析に使用した溶媒は残留農薬試験用または高速液体クロマトグラフィー用を用いた。シリカゲル (Wako gel S-1) は和光純薬より購入し、使用前に130℃で3時間乾燥させて用いた。

### 3) 精製法

血清中の汚染物質の分析法は脂肪抽出、ゲル浸透クロマトグラフィー (gel permeation chromatography : GPC)、KOH+EtOH/ヘキサンによる分配抽出と誘導体化(メチル化)、シリカゲルカラムによる精製およびGC-MSによる定量の手順で行った。その方法をFig 2に示す。まず、血清試料1gに、1%ギ酸 (2 mL)、2-プロパノール (1 mL)、ジエチルエーテル (1 mL)、n-ヘキサン (2mL) を加え、4種の内標準物質 ( [<sup>13</sup>C]PCB-153, [<sup>13</sup>C]α-endosulfan, [<sup>13</sup>C] 4-OH-PCB187および [<sup>13</sup>C]PCP、各0.2 -1.0 ng/mL) を加え、試験管内で攪拌したあと、上層を分離した。この操作を3回行い抽出液を合わせて、濃縮した。脂肪含量の測定は行わなかった。

GPC 精製：血清からの抽出液を (Bio-Beads S-X3 column (20 g of gel material; バイオラッド社製)) に付し脂質除去を行なった。流速4 mL/minで、最初の50-mL溶出分を除去し、その後の40-mL分を回収した。

KOH/n-ヘキサン分配抽出：GPC溶出液をn-ヘキサン (10 mL) 溶液とし、1M KOH-エタノール (7:3) 溶液2mLで分配抽出を行い、上層 (中性画分) と下層 (フェノール性画分) を分離した。中性画分は1 mLまで濃縮した。フェノール性画分は 2M HCl 1mLを加えた後、n-ヘキサン:tert-butyl-methylether (8:2) 溶液で逆抽出を行い、抽出液を濃縮し、ジアゾメタンによるメチル化

を行い、ヘキサン溶液とた。

シリカゲルによる精製：両画分とも、シリカゲルカラム (0.2 g of Wako gel S-1) にかけて、DCM/n-hexane (12:88, v/v) 15mLで溶出した。溶出液はシリンジスパイクとして4-MeO-BDE121を加え、200 μLにまで濃縮し、GC-MSの分析試料とした。

### 4) 分析機器と定量

GC-MSはAgilent GC/MSD-5973i に6890N-GCを接続した装置を用いた。イオン化モードは負イオン化化学イオン化 (ECNI)、試薬ガスはメタンを使用し、Table 2 に示した条件で測定した。対象物質の定量はイオンクロマトグラムのシグナルと内標準との比較によって行なった。

### 5) 品質管理と品質保証

ブランク操作は10サンプル毎に行い、妨害ピークが存在しないことを確認した。標準物質の血清への添加回収率は74-91%、相対標準偏差(relative standard deviations (RSDs)) は<10%であった(n=5)。定量限界 (limits of quantification (LOQs))はシグナルノイズ比3で算出すると、0.01から0.2 ng/g lipidであった (Table 3)。分析値がLOQ以下の値であった場合、0の値を計算に用いた。キャリブレーションは各物質とも0.1 ~ 5.0 ng/mLの範囲で直線性を示した (r>0.99)。精度管理のため、Standard Reference Material (SRM1957, Organic Contaminants in Non-Fortified Human Serum, NIST) を用いて定量した。4,4'-DDE, HCB, trans-nonachlor, PCB-153について分析した結果、認証値と12%以内で一致した。

## 6) 統計解析

統計解析はSPSS (Version 14.0 for Windows 2007)を用いて、ANOVA, Tukey's HSD testでPOPs濃度のグループ間の違いを検定した。Spearman's rank correlation coefficient を求め、化学物質の濃度間の相関性を評価した。P値0.05以下を統計的な有意水準とした

## C. 研究結果

### 1. POPs

Table 3 に、1989-2010 年に提供された 20-69 歳男性血清 60 試料中の 11 種の化学物質について、検出率 (%), 平均値、標準偏差および最大-最小値を示す。成分濃度の高い順に、4, 4' -DDE > PCB-153 > 6-OH-BDE47 > PCP > TBP > HCB > 4-OH-PCB187 > t-nonachlor >  $\alpha$ -endosulfan であった。TBBPA が 60 中 17 試料で定量された(検出率 28%)。つぎに、年代別年齢グループ別に定量した結果を Table 4 に示す。POPs 4 種について、2010 年と 1989 年を高年齢グループで比較すると、4, 4' -DDE (DDT の主成分) は 7398 から 2393 pg/g serum へ、HCB は 623 から 338 pg/g serum へ、PCB-153 は 1661 から 990 pg/g serum へ、trans-nonachlor (クロルデン類の主成分) は 314 から 155 pg/g serum へ減少が見られ (P<0.05)、20 歳代グループでも同様の傾向であった (Fig. 2-6)。

### 2. $\alpha$ -endosulfan

血清  $\alpha$ -endosulfan 濃度は 1989 年 50 歳代で最も高い平均値 (267 pg/g serum) を示し、trans-nonachlor と同濃度で変動が大きかった。ほかの年代グループでは 20-80 pg/g の範囲で有意差なく推移した (Fig. 7)。

### 3. TBP および TBBPA

フェノール性画分の臭素化合物のうち、TBP は調査したすべてのサンプルから検出され、46-960 pg/g serum の濃度範囲であった。2010 年 20 歳グループで変動が大きく、1989 年では、20 歳グループが平均 110 pg/g serum, 50 歳代が 190 pg/g serum を示し、高齢者が約 1.7 倍の高濃度を示したが、他の年代グループでは、年齢による変化は見られなかった。2010 年の TBP 曝露状況は 20 年前よりもわずかに上昇する傾向が見られた。

TBBPA は 60 血清サンプルのうち、17 検体で検出され、中央値は 10 pg/g serum、最大値は 949 pg/g serum を示した。検出された 9 検体は 1999 年の 20 歳代の試料で、6 検体が 2010 年の 50 歳以上で、1989 年のサンプルからは 1 検体が検出された。

### 4. PCP, 4-OH-PCB187 および 6-OH-BDE47

血清 PCP は 1989 年 20 歳代グループで最も高濃度 (平均値 936 pg/g serum) を示したが、2010 年の同年齢グループでは 97 pg/g serum で、約 1/10 のレベルであった。高年齢グループではこの 20 年間に 373 pg/g から 179 pg/g serum に半減した。

水酸化 PCB のうち、4-OH-CB187 の濃度は 1989 年で 50 歳男性で平均値 358 pg/g serum (127-799 pg/g serum) であったが、ほかの年代では、123 pg/g serum 以下の平均値で推移した。4-OH-PCB187 と母化合物 PCB-187 の濃度の相関図を Fig. 13 に示す。相関係数  $r=0.745$  ( $p<0.001$ ) の有意な正の相関が見られた。4-OH-CB187 と母化合物 PCB-187 の濃度比は 1989 年が 1.4:1 であったが、1999 年以降は 0.38-0.7:1

であった。

水酸化 PBDE のうち、6-OH-BDE47 がすべての試料から検出され、平均値 454 pg/g serum (25-3075 pg/g serum) を示した。この値は 4-OH-PCB187 の約 3.8 倍であった。2010 年高齢者の方が 1989 年の 50 歳グループより高濃度 (平均 875 pg/g serum) であった ( $P < 0.05$ )。

## 5. 化合物濃度の相関性

濃度間の相関係数を Table 4 に示す。POPs 4 種、 $\alpha$ -endosulfan および 4-OH-PCB187 については、化合物間で正の相関を示したが、POPs と TBP, TBBPA, 6-OH-BDE47 との間に相関性は見られなかった。

## D. 考察

### 1. POPs および endosulfan

Table 3 より POPs のうち、DDE, HCB, CHL, PCB 濃度は 20 年前と比較して半減しており、これは環境中のバックグラウンドレベルが低下していることを反映している。しかし、10 年前と現在では濃度は横ばい状態で推移しており、今後もこの状態が続くものと思われる。年齢層でみると明らかに高齢者ほど濃度が高いことが推測でき、この傾向は先行研究でも明らかにされている (Masuda et al 2005)。昨年の本研究班の調査で、日中韓の母乳中に POPs 以外に endosulfan の残留を認めため、今回の血清中濃度を調べた。その結果、ヒト血清では  $\alpha$ -endosulfan が 14-600 pg/g serum で検出された。この残留レベルは、ヨーロッパでの調査結果より低い (Cerrillo et al 2005)。今回の結果は t-nonachlor が大きく減少しているのに対して endosulfan は 20 年前と同

レベルで推移している。Endosulfan は遺伝毒性の報告があり、その物理化学的特性が従来の POPs と同様であることから、WHO による POPs 候補物質となっている (Shen et al 2005)。 $\alpha$ -endosulfan は  $\beta$  型とは異なる挙動を示し、北極大気圏より長距離輸送により拡散する (Halsall et al 1998; Shen et al 2005)。このため食事以外、たとえば大気からの吸入にも起因すると考えられる (Weber 2010)。中国や韓国では近年、食品中に endosulfan の増加が報告されているので (Desaleng et al 2011)、引き続きモニタリングが求められる。

### 2. PCP

PCP はヒトへの急性毒性がありいろいろな症状が報告され、免疫機能の低下や甲状腺ホルモンレベルの変動が報告されている (Proudfoot 2003; Gerhard et al 1999)。PCP は食物中に汚染物質として検出されているが (Sjodin et al 2000; Guvenius et al 2003)、これまで日本人の PCP 曝露に関する情報は限定的であった。

今回の調査で、血清 PCP の平均値は 363 pg/g serum であった。1989 年の 20 歳グループで高濃度 (936 pg/g serum) を示したものの、現在の曝露状態は、青柳ら (2004) による調査 (平均 1600 ng/g serum) よりかなり低く、欧米での PCP 濃度よりも低い (Glynn 2011; Meijer et al 2008)。しかし、それらの調査対象は妊婦の血液や臍帯血データであり、今回の成人の幅広い年齢層における曝露実態とは差があるかもしれない。今回、PCP は 4-OH-PCB187 の約 3 倍の濃度で検出された。PCP は TTR との結合親和性が T4 の約 2 倍あるとのデータ (van den Berg 1990) から、PCP の血液残留は、

甲状腺ホルモンかく乱性の観点から水酸化PCB (後述) 以上に懸念される。ヒト残留PCPは、食事経由のほか、HCBや pentachloroanisole (PCA) の代謝による曝露経路が考えられ、今後、その経路が明らかにされる必要がある。また、若年層と高年齢層ではPCP濃度に大きな差があり、変動要因が多いことを考慮する必要がある。

### 3. PCB および代謝物

今回、我々は血清中のPCB代謝物として4-OH-PCB187をモニタリング指標とし、その母化合物 PCB-187 (またはPCB-183) 濃度と比較した。両者はほぼ同濃度で残留し、濃度推移はよく相関していた。今回の4-OH-PCB187の血清濃度の変動は母化合物の曝露量に依存すると思われる。Kawashiroら (2008) は妊婦の血液中の水酸化PCBを定量し、4-OH-PCB187 濃度を15-43 pg/g serumと報告している。一方、Nomiyamaら (2010) は、日本女性の血清 (n=20) 中の水酸化PCBを定量し、4-OH-PCB187 濃度は12-370 pg/g serumの範囲 (中央値 110 pg/g serum) であるとしている。その濃度比は0.6:1であり、加齢とともに減少する傾向を示した。我々の調査ではOH-PCBとPCB-187の比は1.4:1から0.4:1へ年々減少傾向にあるが、20歳と50-60歳グループ間に変化は見られなかった。4-OH-PCB187を指標として欧米人と比較すると、フェロー島の妊婦で1600 pg/g serum (Frangstrom et al 2002)、東スロバキアの妊婦で200 pg/g serum (Park et al, 2007)、ラトビアおよびスウェーデン男性で50および120 pg/g serum (Sjodin et al 2000) であり、我々の結果と同じ濃度範囲となっている。これらの水酸化PCBは母化合物PCB濃度だけでなく個

人の代謝能に依存して変動することを考慮して影響評価する必要がある。

### 4. TBP

本調査で検出した血清TBP濃度は248 pg/g serumで、フェノール性画分の中ではPCPに次ぐ濃度である。若年層だけでみると、現在の曝露量は20年前よりも有意に濃度が上昇傾向にある (Fig. 9) ( $p<0.01$ )。Kawashiroら (2008) によると、妊婦の血液中TBP濃度 (平均値22 pg/g wet, 最大値130pg/g wet) であり、今回の値とは10倍以上の差が生じた。ノルウェー人のウール血清で検出されるTBPは195pg/g (Thomsen et al 2002) で、本調査とほぼ同濃度であった。

TBPは人為的発生源のほか天然物からの発生源がある。TBPは樹脂用の添加剤が主な用途であり、防腐剤、殺菌剤、木材防腐剤、難燃剤の合成にも用いられるため、その過程で環境拡散があると考えられる。Suzukiら (2008) は日本のハウスダストの成分にTBPおよびPCPがあり、それらに甲状腺ホルモン作用(ヒトTTR結合能)があることを明らかにした。一方で、数種の海洋藻はTBPを含有しており、人間の食事の一部となる可能性のある生物相では、食用部分のTBP平均含有量は、海洋魚で最大39  $\mu\text{g}/\text{kg dry wet}$  と推定されている (Whitfield et al 1999)。このため、ヒト血清のTBP濃度は食事 (海産物) および吸入量に依存すると考えられる。

### 5. TBBPA

本研究で未検出サンプル (検出限界20pg/g serum以下) が60検体中43検体あった。今回、少量の血清を用いており、検体重量を増やし、分析方法を改良することで定量できる数が増え

と思われる。今回最も高濃度 (950 pg/g serum) で検出された試料グループの職業は不明であり、職業的曝露との関連は分からない。本調査では1999年の20歳代グループの血清で比較的高濃度のTBBPAが検出され、16件の平均値は69pg/g serumであった。今回の結果は他のこれまでの報告と比べると高い値で検出されたことになる。たとえば福岡の血液試料では1325pg/g lw (7pg/g serumに相当) (Nagayama et al 2000)が、Hayamaら (2004) によるデータでは平均7.4 pg/g serum、Kawashiroら (2008) による妊婦の血液で26pg/g serumのTBBPAが報告されている。欧米での調査結果と比較すると、ベルギー人で:80pg/mL serum (Dirtu et al 2008), フランスの妊婦で154 pg/g wet (Cariou et al 2008) となっている。日本を含むアジアでのTBBPAの使用量は欧米より多く、中国での2009年の調査によると、食品や母乳から最大でそれぞれ2000および5100 pg/g lipidレベルのTBBPAが検出されている (Shi et al, 2009)。TBBPAのヒト曝露要因として食品およびハウスダストが考えられ、そのヒト曝露量の把握のためには、性差、年齢差、地域差、職業などを考慮したモニタリングが求められる。

## E. 結論

本研究では、少量の血清を用いて、汚染の懸念される化合物群の主成分を対象に、その残留濃度の経年変化および年齢差について検討した。現在のPOPsの汚染状況は20年前と比較して、減少傾向にあるものの年齢の増加とともに残留濃度が顕著に増加する傾向が見られた。中性画分のPOPs曝露データの報告が多い中で、フェノール性

画分の分析例はこれまで不足していた。今回得られた endosulfan, PCP, フェノール性難燃剤 (TBP, TBBPA) およびPCB, PBDEの水酸化体に関するデータは、今後、これらの安全性を評価するための基礎資料になると思われる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表・その他

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## I. 文献

- 青柳光洋、鈴木智和、黒木広明、奥村為男、益永茂樹、ヒト血清中における水酸化体PCB第13回環境化学討論会講演要旨集 pp210-211,2004. 7月、静岡、
- van den Berg, K. J., Interaction of chlorinated phenols with thyroxine binding sites of human transthyretin, albumin and thyroid binding globulin. *Chem Biol Interact* 1990, 76, 63-75.
- BSEF: Bromine Science and Environmental Forum, Brussels, Belgium. Data reported in Fact sheet, edition 2004 at <http://WWW.Bsef.org>
- Cariou R, Antignac JP, Zalko D, Berrebi A, Cravedi JP, Maume D, et al. Exposure assessment of French women

- and their newborns to tetrabromobisphenol-A: occurrence measurements in maternal adipose tissue, serum, breast milk and cord serum. *Chemosphere* 2008;73:1036-41.
- Cerrillo, I.; Granada, A.; López-Espinosa, M. J.; Olmos, B.; Jiménez, M.; Caño, A.; Olea, N.; Olea-Serrano, M. F., Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. *Environmental Research* 2005, *98*, 233-239.
- Desalegn, B.; Takasuga, T.; Harada, K. H.; Hitomi, T.; Fujii, Y.; Yang, H. R.; Wang, P.; Senevirathna, S. T. M. L. D.; Koizumi, A., Historical trends in human dietary intakes of endosulfan and toxaphene in China, Korea and Japan. *Chemosphere* 2011, *83*, 1398-1405.
- Dirtu, A.; Roosens, L.; Geens, T.; Gheorghe, A.; Neels, H.; Covaci, A., Simultaneous determination of bisphenol A, triclosan, and tetrabromobisphenol A in human serum using solid-phase extraction and gas chromatography-electron capture negative-ionization mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, *391*, 1175-1181.
- Fängström, B.; Athanasiadou, M.; Grandjean, P.; Weihe, P.; Bergman, Å., Hydroxylated PCB metabolites and PCBs in serum from pregnant Faroese women. *Environ Health Perspect* 2002, *110*(9), 895-9.
- Fujii, Y.; Ito, Y.; Harada, K. H.; Hitomi, T.; Koizumi, A.; Haraguchi, K., Regional variation and possible sources of brominated contaminants in breast milk from Japan. *Environ Pollut* 2012, *162*, 269-74.
- Fujitani T, Tada Y, Takahashi H, Yano N, Ando H, Kubo Y, Yazawa K, Nagasawa A, Ogata A and Kamimura H. Placental transfer of TBBPA and excretion to milk in mice *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P.H.* 57, 361-365, 2006.
- Gerhard, I.; Frick, A.; Monga, B.; Runnebaum, B., Pentachlorophenol exposure in women with gynecological and endocrine dysfunction. *Environmental Research* 1999, *80*, 383-388.
- Glynn, A.; Larsdotter, M.; Aune, M.; Darnerud, P. O.; Bjerselius, R.; Bergman, A., Changes in serum concentrations of polychlorinated biphenyls (PCBs), hydroxylated PCB metabolites and pentachlorophenol during pregnancy. *Chemosphere* 2011, *83*, 144-51.
- Guvénius, D. M.; Aronsson, A.; Ekman-Ordeberg, G.; Bergman, A.; Noren, K., Human prenatal and postnatal exposure to polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, polychlorobiphenyls, and pentachlorophenol. *Environ Health Perspect* 2003, *111*, 1235-41.
- Haraguchi, K., Koizumi, A., Inoue, K., Harada, K.H., Hitomi, T., Minata, M., Tanabe, M., Kato, Y., Nishimura, E., Yamamoto, Y., Watanabe, T., Takenaka, K., Uehara, S., Yang, H.R., Kim, M.Y., Moon, C.S., Kim, H.S., Wang, P., Liu, A., Hung, N.N., 2009. Levels and regional trends of persistent organochlorines and polybrominated diphenyl ethers in Asian breast milk demonstrate POPs signatures unique to individual countries. *Environ Int* 35, 1072-1079.
- Hayama, T.; Yoshida, H.; Onimaru, S.; Yonekura, S.; Kuroki, H.; Todoroki, K.; Nohta, H.; Yamaguchi, M., Determination of tetrabromobisphenol A in human serum by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004, *809*, 131-6.
- Halsall, C. J.; Bailey, R.; Stern, G. A.; Barrie, L. A.; Fellin, P.; Muir, D. C. G.; Rosenberg, B.; Rovinsky, F. Y.; Kononov, E. Y.; Pastukhov, B., Multi-year observations of organohalogen pesticides in the Arctic atmosphere. *Environmental Pollution* 1998, *102*, 51-62.
- Kawashiro, Y.; Fukata, H.; Omori-Inoue, M.; Kubonoya, K.; Jotaki, T.; Takigami, H.; Sakai, S.; Mori, C., Perinatal exposure to brominated flame

- retardants and polychlorinated biphenyls in Japan. *Endocr J* 2008, *55*, 1071-84.
- Kitamura, S.; Jinno, N.; Ohta, S.; Kuroki, H.; Fujimoto, N., Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, *293*, 554-9.
- Koizumi, A., Yoshinaga, T., Harada, K., Inoue, K., Morikawa, A., Muroi, J., Inoue, S., Eslami, B., Fujii, S., Fujimine, Y., Hachiya, N., Koda, S., Kusaka, Y., Murata, K., Nakatsuka, H., Omae, K., Saito, N., Shimbo, S., Takenaka, K., Takeshita, T., Todoriki, H., Wada, Y., Watanabe, T., Ikeda, M., 2005. Assessment of human exposure to polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in Japan using archived samples from the early 1980s and mid-1990s. *Environ Res* 99, 31-39.
- Koizumi, A., Harada, K.H., Inoue, K., Hitomi, T., Yang, H.R., Moon, C.S., Wang, P., Hung, N.N., Watanabe, T., Shimbo, S., Ikeda, M., 2009. Past, present, and future of environmental specimen banks. *Environ Health Prev Med* 14, 307-318.
- Masuda, Y.; Haraguchi, K.; Kono, S.; Tsuji, H.; Pöpke, O., Concentrations of dioxins and related compounds in the blood of Fukuoka residents. *Chemosphere* 2005, *58*, 329-344.
- Meerts, I. A.; van Zanden, J. J.; Luijckx, E. A.; van Leeuwen-Bol, I.; Marsh, G.; Jakobsson, E.; Bergman, A.; Brouwer, A., Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicol Sci* 2000, *56*, 95-104.
- Meerts, I. A.; Letcher, R. J.; Hoving, S.; Marsh, G.; Bergman, A.; Lemmen, J. G.; van der Burg, B.; Brouwer, A., In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environ Health Perspect* 2001, *109*, 399-407.
- Meijer, L.; Weiss, J.; Van Velzen, M.; Brouwer, A.; Bergman, A.; Sauer, P. J., Serum concentrations of neutral and phenolic organohalogenes in pregnant women and some of their infants in The Netherlands. *Environ. Sci. Technol* 2008, *42*, 3428-33.
- Nagayama J, Tsuji H, Takasuga T. Comparison between brominated flame retardants and dioxins or organochlorine compounds in blood levels of Japanese adults. *Organohalogen Compd* 2000;48:27-30.
- Nomiyama, K.; Yonehara, T.; Yonemura, S.; Yamamoto, M.; Koriyama, C.; Akiba, S.; Shinohara, R.; Koga, M., Determination and Characterization of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in Serum and Adipose Tissue of Japanese Women Diagnosed with Breast Cancer. *Environ. Sci. Technol* 2010, *44*, 2890-2896.
- Park, J. S.; Linderholm, L.; Charles, M. J.; Athanasiadou, M.; Petrik, J.; Kocan, A.; Drobna, B.; Trnovec, T.; Bergman, A.; Hertz-Picciotto, I., Polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites (OH-PCBS) in pregnant women from eastern Slovakia. *Environ Health Perspect* 2007, *115*, 20-7.
- Proudfoot, A. T., Pentachlorophenol poisoning. *Toxicological Reviews* 2003, *22*, 3-11.
- Sakai, S. I.; Watanabe, J.; Honda, Y.; Takatsuki, H.; Aoki, I.; Futamatsu, M.; Shiozaki, K., Combustion of brominated flame retardants and behavior of its byproducts. *Chemosphere* 2001, *42*, 519-531.
- Shen, L.; Wania, F.; Lei, Y. D.; Teixeira, C.; Muir, D. C. G.; Bidleman, T. F., Atmospheric distribution and long-range transport behavior of organochlorine pesticides in North America. *Environ. Sci. Technol* 2005, *39*, 409-420.
- Sjödin, A.; Carlsson, H.; Thuresson, K.; Sjölin, S.; Bergman, Å.; Östman, C., Flame retardants in indoor air at an electronics recycling plant and at other work environments. *Environ. Sci.*

- Technol.* 2001, *35*, 448-454.
- Sjodin, A.; Hagmar, L.; Klasson-Wehler, E.; Bjork, J.; Bergman, A., Influence of the consumption of fatty Baltic Sea fish on plasma levels of halogenated environmental contaminants in Latvian and Swedish men. *Environ Health Perspect* 2000, *108*, 1035-41.
- Shi ZX, Wu YN, Li JG, Zhao YF, Feng JF. Dietary exposure assessment of Chinese adults and nursing infants to tetrabromobisphenol-A and hexabromocyclododecanes: occurrence measurements in foods and human milk. *Environ Sci Technol* 2009;43:4314-9.
- Suzuki, G.; Takigami, H.; Watanabe, M.; Takahashi, S.; Nose, K.; Asari, M.; Sakai, S.-i., Identification of Brominated and Chlorinated Phenols as Potential Thyroid-Disrupting Compounds in Indoor Dusts. *Environ. Sci. Technol.* 2008, *42*, 1794-1800.
- Thomsen, C.; Lundanes, E.; Becher, G., Brominated Flame Retardants in Archived Serum Samples from Norway: □ A Study on Temporal Trends and the Role of Age. *Environ. Sci. Technol.* 2002, *36*, 1414-1418.
- Watanabe, I.; Kashimoto, T.; Tatsukawa, R., Identification of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in the river sediment and the mussel collected in Osaka. *Bull Environ Contam Toxicol* 1983, *31*, 48-52.
- Watanabe, I.; Sakai, S., Environmental release and behavior of brominated flame retardants. *Environ Int* 2003, *29*, 665-82.
- Weber, J.; Halsall, C. J.; Muir, D.; Teixeira, C.; Small, J.; Solomon, K.; Hermanson, M.; Hung, H.; Bidleman, T., Endosulfan, a global pesticide: A review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Science of the Total Environment* 2010, *408*, 2966-2984.
- Whitfield, F. B.; Drew, M.; Helidoniotis, F.; Svoronos, D., Distribution of bromophenols in species of marine polychaetes and bryozoans from eastern Australia and the role of such animals in the flavor of edible ocean fish and prawns (shrimp). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999, *47*, 4756-4762.

Table 1. Information of human serum samples collected from Kyoto 1989-2010

Sample group	Region	M/F	n	Year of sampling	Age
Serum89A	Kyoto	M	10	1989	20-22
Serum89B	Kyoto	M	10	1989	50-52
Serum99A	Kyoto	M	10	1999	21-28
Serum99B	Kyoto	M	10	1999	50-59
Serum10A	Kyoto	M	10	2009-2010	21-23
Serum10B	Kyoto	M	10	2009-2010	65-69

Table 2. GC/MS condition and limit of quantification (LOQ) of target chemicals for breast milk analysis.

Carrier gas	helium (head pressure of 3 psi)		
Injection mode	splitless		
Column	HP-5MS (30 m × 0.25 mm i.d. 0.25 µm film thickness, J&W Scientific)		
Oven	70 °C (1.5 min) - 20 °C/min to 230 °C (0.5 min) - 4 °C/min to 280 °C (5 min)		
Temperature	injector (250 °C), transfer line (280 °C), ion source (150 °C)		
Ionization mode	electron capture negative ionization (ECNI)		
Reagent gas	methane		
Analytes	GC $t_R$ , min	Target ion, $m/z$	LOQ*, ng/mL
<i>p,p'</i> DDE**	12.44	318 (235)***	0.05
HCB	9.33	284 (286)	0.002
trans-nonachlor	12.28	444 (446)	0.01
α-endosulfan	12.19	404 (406)	0.01
[ <sup>13</sup> C] α-endosulfan (IS)	12.19	415 (416)	0.02
PCB-153	13.65	360 (352)	0.01
PCB-187	14.70	394 (392)	0.01
[ <sup>13</sup> C]PCB-153 (IS)	13.65	372 (374)	0.01
TBP (methylated)	8.77	81 (79)	0.002
PCP (methylated)	9.40	280 (278)	0.001
[ <sup>13</sup> C]PCP (IS) (methylated)	9.40	292 (290)	0.001
4-OH-PCB187 (methylated)	17.02	424 (409)	0.02
6-OH-BDE47 (methylated)	17.93	81 (79)	0.05
TBBPA (methylated)	21.71	81 (79)	0.1
[ <sup>13</sup> C]4-OH-PCB187 (IS) (methylated)	17.02	438 (423)	0.02

\*S/N = 3, \*\*EI mode, \*\*\*Confirmation ion

Table 3. Serum concentration (pg/g wet) of Japanese men (20-69 year old) from Kyoto Japan during 1989-2010

analyte	frequency (%)	Mean	SD	Min	Max
4,4'-DDE	100	3501	3057	333	12995
HCB	100	325	228	43	1233
PCB-153	100	799	620	100	2833
PCB-187	100	131	114	13	563
t-nonachlor	100	119	140	4	714
$\alpha$ -endosulfan	100	101	102	14	600
TBP	100	248	161	46	960
TBBPA	28	69	188	<LOQ	949
PCP	100	363	369	37	1667
4-OH-PCB187	92	120	169	<LOQ	799
6-OH-BDE47	100	454	546	25	3075

Table 4. Serum concentration (pg/g wet) of organohalogens in Japanese men (n=60) from 1989 to 2010

stage		4,4"-DDE	HCB	PCB-153	PCB-187	t-nonachlor	$\alpha$ -endosulfan	TBP	PCP	TBBPA	6-OH-BDE47	4-OH-PCB187
1989-50 (n=10)	mean	7398	623	1661	254	314	267	190	373	nd	150	358
	SD	2944	301	734	144	189	159	86	135	nd	79	292
	median	7444	625	1489	185	286	213	176	370	nd	128	189
	min	3333	235	800	96	95	117	67	89	nd	52	127
	max	12995	1233	2833	563	714	600	370	538	nd	292	799
1989-20 (n=10)	mean	3847	356	485	55	47	51	110	936	94	246	77
	SD	2922	201	184	23	32	22	80	483	297	189	40
	median	3523	292	481	51	34	46	73	855	94	212	71
	min	333	128	100	13	10	28	46	342	nd	55	23
	max	10939	714	733	99	111	100	276	1667	940	679	136
1999-50 (n=10)	mean	5310	241	962	159	120	66	208	329	12	621	115
	SD	1969	108	262	45	42	28	28	276	38	513	68
	median	5192	202	929	147	112	65	208	225	12	405	96
	min	1846	126	536	98	64	14	164	152	nd	150	71
	max	8889	446	1391	241	191	113	250	1059	120	1590	305
1999-20 (n=10)	mean	1212	213	325	50	60	51	278	263	163	479	19
	SD	838	51	110	19	62	27	81	91	286	533	20
	median	935	222	281	52	36	42	291	244	72	298	9
	min	389	117	200	21	12	27	112	167	nd	25	nd
	max	2833	304	500	83	191	112	382	469	949	1388	56
2010-60 (n=10)	mean	2393	338	990	195	155	89	352	179	110	875	123
	SD	1938	138	571	134	142	28	110	240	152	881	92
	median	1800	356	988	199	113	86	369	92	54	533	120
	min	615	131	325	49	42	60	113	59	nd	186	7
	max	6000	536	2143	476	529	152	500	849	417	3075	336

2010-20 (n=10)	mean	843	180	374	75	18	80	349	97	37	352	29
	SD	188	179	295	64	11	35	293	73	117	449	34
	median	892	130	232	43	15	72	225	53	37	259	18
	min	470	43	103	20	4	39	62	37	nd	34	nd
	max	1074	658	1053	205	39	140	960	227	372	1577	85
total (n=60)	mean	3501	325	799	131	119	101	248	363	69	454	120
	SD	3057	228	620	114	140	102	161	369	188	546	169
	median	2348	251	637	98	81	68	230	241	10	272	82
	min	333	43	100	13	4	14	46	37	nd	25	nd
	max	12995	1233	2833	563	714	600	960	1667	949	3075	799

nd= not detected

**Table 5** Correlation between organohalogens in serum concentrations from Japanese men (n=60) 1989-2010

	4,4'-DDE	TCDF	PCB-153	PCB-187	t-nonachlor	$\alpha$ -endosulfan	TBP	PCP	4-OH-PCB187	TBBPA
TCDF	0.519**									
PCB-153	0.778*	0.58**								
PCB-187	0.651**	0.516**	0.951**							
t-nonachlor	0.683**	0.585**	0.770**	0.736**						
$\alpha$ -endosulfan	0.329*	0.367**	0.585**	0.538**	0.455**					
TBP	-0.241	-0.089	0.053	0.191	0.132	0.162				
PCP	0.388**	0.226	0.091	-0.067	0.160	-0.007	0.411**			
4-OH-PCB187	0.646**	0.518	0.793**	0.747**	0.629**	0.474**	-0.105	0.178		
TBBPA	0.260*	0.069	-0.115	-0.020	0.011	-0.140	0.412**	-0.159	0.258*	
6-OH-BDE47	-0.204	-0.186	-0.069	-0.026	0.014	-0.144	0.340**	-0.245	-0.082	0.131

\*p<0.05

\*\*p<0.01

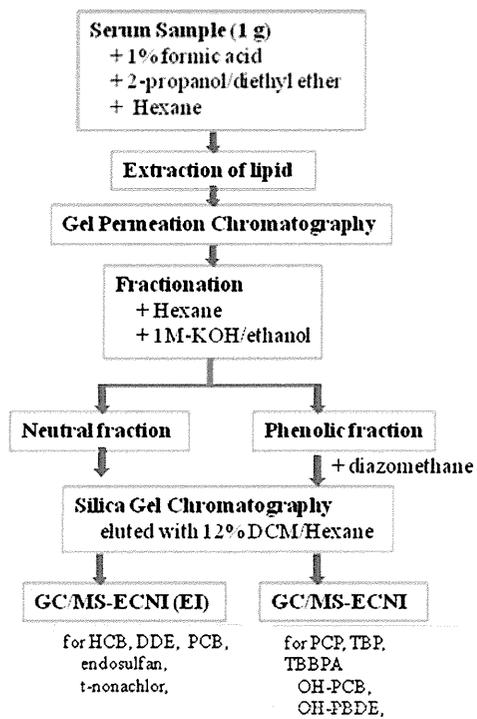


Fig. 1 Analytical procedure for organohalogens in serum samples

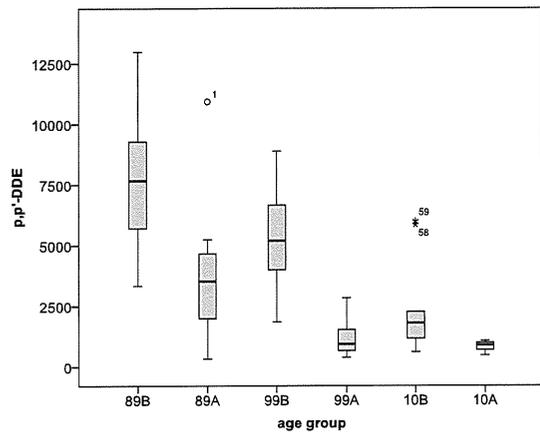


Fig. 2

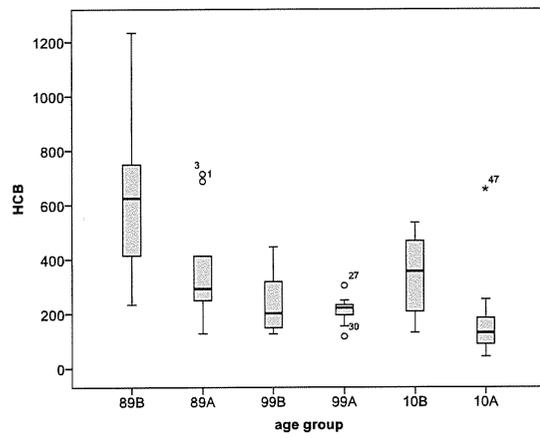


Fig. 3

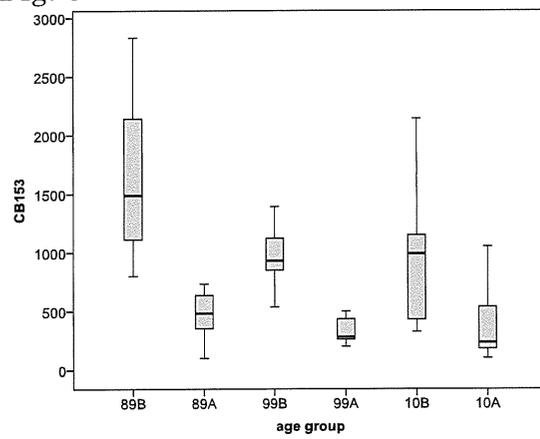


Fig. 4

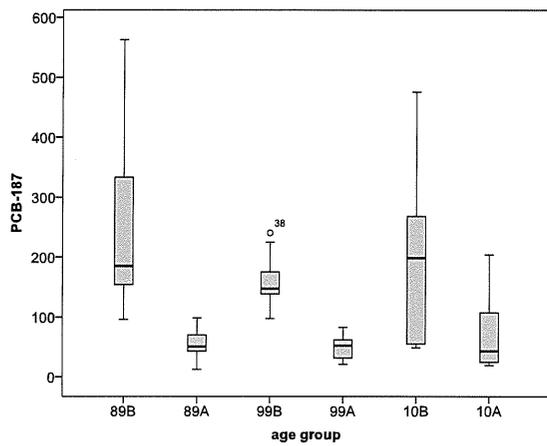


Fig. 5

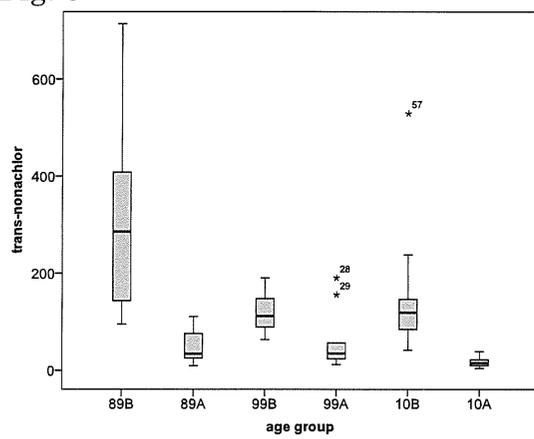


Fig. 6

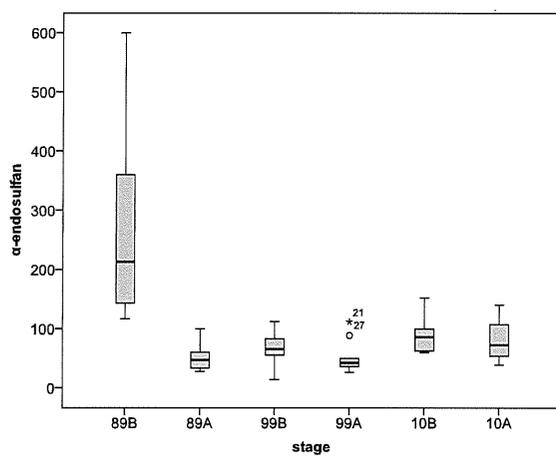


Fig. 7

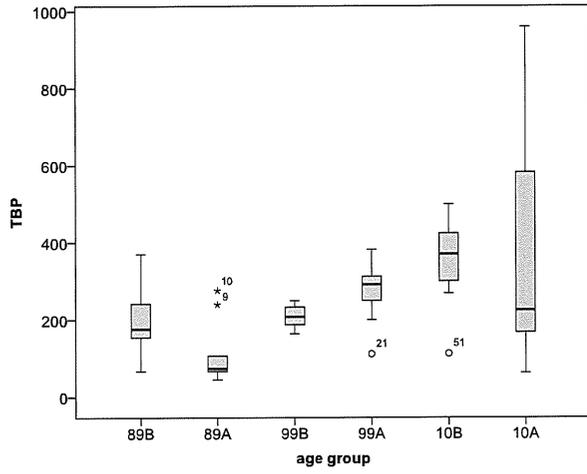


Fig. 8

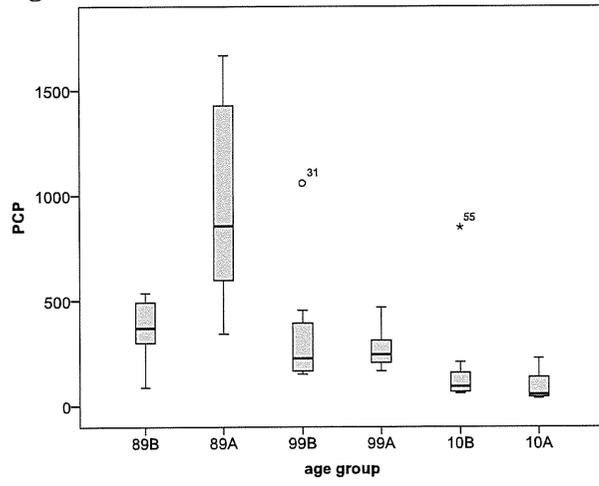


Fig. 9

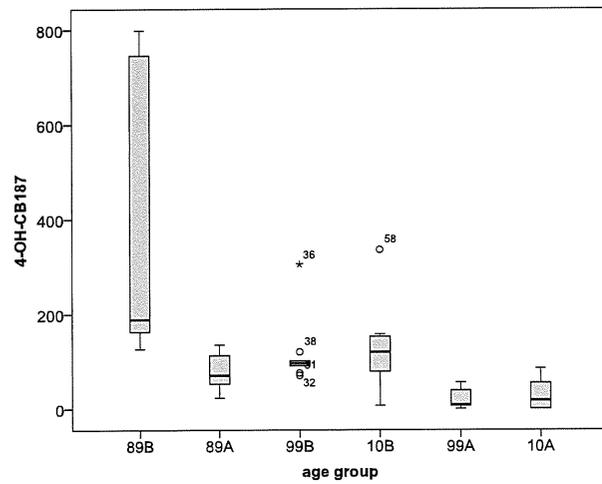


Fig. 10

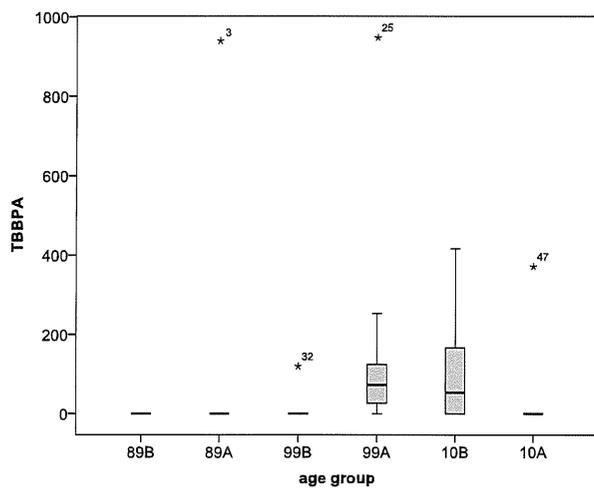


Fig. 11

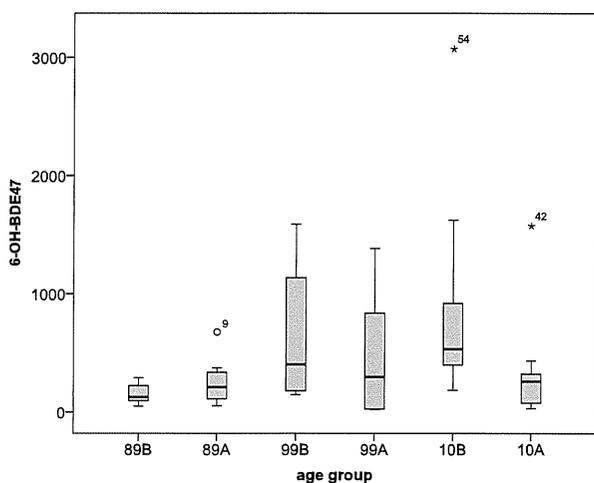


Fig. 12

Figs 2-12 Box plot of organohalogens in serum concentration (pg/g wet) of Japanese men. 89B (50 year old in 1989), 89A (20 year old in 1989), 99B (50 year old in 1999), 99A (20 years old in 1999), 10B (60 year old in 2010) and 10A (20 year old in 2010).