

<報 文>

底質・土壌からの有機フッ素化合物の  
効率的な抽出法の検討\*

岩淵勝己\*\*・千崎則正\*\*\*・鑑迫典久\*\*\*\*

キーワード ①有機フッ素化合物 ②底質 ③土壌 ④回収率

要 旨

底質及び土壌からのPFAAsの抽出法について検討を行った。ASEを使用せずに効率的に抽出する方法として、MTBEによる液液抽出と、固相カートリッジを使用したクリーンアップを組み合わせた方法を検討した。この方法を用いてサロゲートの回収率を測定したところ、底質で50~85%、土壌で56~110%であり、PFAAs抽出・分析法として妥当であることが確認された。一方、サンプルによっては回収率が50%を下回ったものもあり、回収率を高めるための更なる改良の余地があることも示唆された。今後は、更なる回収率向上のための抽出方法の改良、サンプルの均一性を担保する方法を検討していくことが必要である。

1. はじめに

有機フッ素化合物 (PFAAs) は、天然にはほとんど存在しない、人工的に作られた化合物である。代表的なPFAAsとしては、Perfluorooctane sulfonate (PFOS, C8S), Perfluorooctanoic acid (PFOA, C8A) (図1) が挙げられる<sup>1)</sup>。PFAAsの骨格である炭素-フッ素結合は化学的に安定なため、分解性が非常に低い。そのため天然にはほとんど存在しない物質であるにもかかわらず、広く環境中に拡散していることを示すデータが近年報告し始められ、特に2000年以降にはほ乳類、鳥類や魚類など様々な野生動物および環境水・底質などから検出されているという報告が多数ある<sup>2)-5)</sup>。PFAAsは難分解性、高蓄積性、長距離移動性という残留性有機汚染物質 (POPs; Persistent Organic Pollutants) としての性質を有しているため、C8Sとその塩は世界的な規制対象として2009年5月にストックホルム条約の付属書Bに追加登録された。C8Aはストックホルム条約でC8Sのように規制されていないが、2010/2015 PFOA Stewardship ProgramによってUSEPAや主要メーカー8社による自主規制が行われてきた。また、C8AやC8Sと炭素数が異なるために規制されていない物質も環境中から検出されている<sup>6)-9)</sup>。PFAAs はC8S (スルホン

酸系)の類縁体である「PFSA」とC8A (カルボン酸系)の類縁体である「PFCA」の総称であり、例えば Perfluorohexanoic acid (PFHxA, C6A), Perfluorononanoic acid (PFNA, C9A)などがある。

PFAAsの環境中動態を把握するためには、発生源から生体へ蓄積されるに至る経路を解明することが非常に重要である。また、生体影響はそれらの曝露経路だけでなく曝露濃度を明らかにすることが重要であり、環境中濃度の実態を把握することは意味がある。

環境試料中のPFAAs、農薬、POPs等の分析は、これまでさまざまな方法が報告されているが、おおむね、環境水

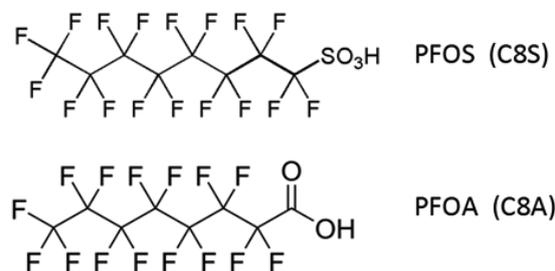


図1 C8S, C8Aの構造

\*Efficient extraction of perfluoroalkyl acids from sediment and soil

\*\*Katsumi Iwabuchi (岩手県環境保健研究センター) Iwate Prefectural Research Institute for Environmental Sciences and Public Health

\*\*\*Norimasa Senzaki (岩手県北広域振興局) Iwate Prefecture Northern Iwate Regional Development Bureau

\*\*\*\*Norihisa Tatarazako (国立環境研究所) National Institute for Environmental Studies

＜報文＞ 底質・土壌からの有機フッ素化合物の効率的な抽出法の検討

については、有機溶媒による液液抽出または固相カートリッジを用いた濃縮・クリーンアップ後にLC/MS/MS等で分析する方法が採られている。底質については、高速溶媒抽出 (ASE) 法等により抽出し、クリーンアップした後にLC/MS/MS等で分析する方法などが採られている。環境試料の場合には、濃度が非常に低い物質も多数存在しているため、分析に使用する器具類等に由来する汚染 (コンタミ) が測定結果に影響を及ぼさないように配慮する必要がある。よってコンタミをなくすための洗浄は、きわめて重要である。特にPFAAsについては、身の回りのさまざまな製品に使用されているため、分析に使用する器具類が非常に汚染されやすく、その除去は非常に難しい。これらの点から、ASE法による底質のPFAAs分析は、ASE部品等から汚染されるリスクが大きいために測定の都度十分にそれらを洗浄しなければならないが、それには非常に煩雑な作業を伴う。さらに、ASE法はコンタミの制御のほかに機器の扱いに一定の技術レベルが要求されるな

どの問題も含んでいる。

そこで我々は、ASEを使用することなく底質や土壌から効率的・簡易的にPFAAsを抽出する方法の開発を目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 試薬及び標準品

抽出に使用した試薬は、すべて市販品を使用した。炭酸ナトリウム (特級)、*t*-ブチルメチルエーテル (MTBE; HPLC用)、25%アンモニア水 (精密分析用)、ギ酸 (LC/MS用)、酢酸アンモニウム (特級)、メタノール (LC/MS用)、アセトニトリル (LC/MS用) は和光純薬工業社製を、硫酸水素テトラブチルアンモニウム 99% (TBAHS; HPLC用) はACROS ORGANICS社製を使用した。

標準品には、WELLINGTON社製のPFC-MXA (PFCA11種の混合品、各成分2 μg/mLメタノール溶液) 及びPFS-MXA (PFSA5種の混合品、各成分2 μg/mLメタノール溶液) を

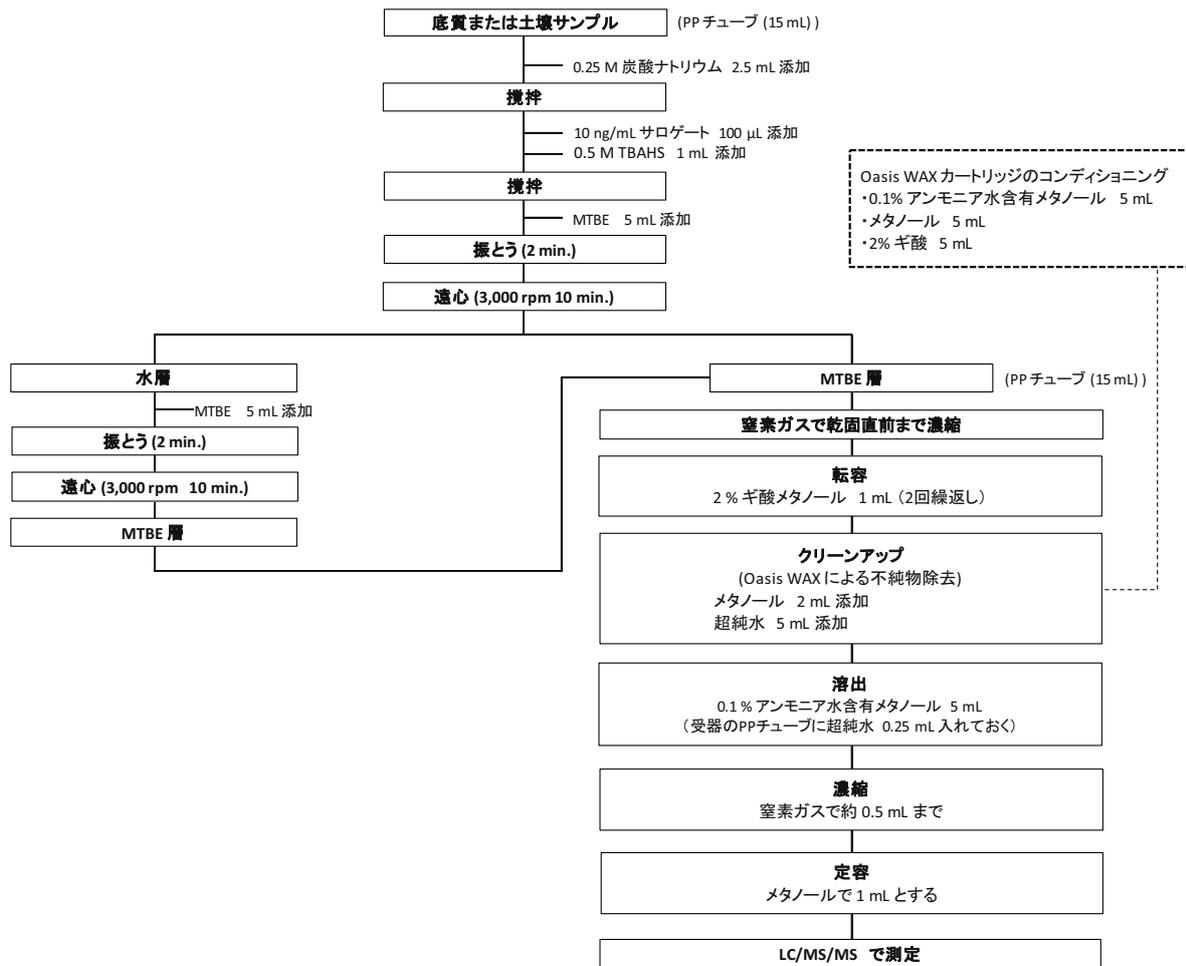


図2 底質・土壌サンプルからのPFAAs分析フロー

使用した。

サロゲートには、同社製のMPFAC-MXA (PFCA, PFSAのマスラベル化体の9種混合物, 各成分2 μg/mLメタノール溶液) を使用した。

## 2.2 サンプル

サンプルは、2014年から2016年にかけて採取した。底質は、2014年は9地点(岩手, 茨城, 新潟, 石川, 静岡, 兵庫, 山口, 福岡(2か所)のメダカ生息地), 2015年及び2016年は5地点(岩手, 茨城, 石川, 兵庫, 福岡のメダカ生息地) から採取し, 土壌は、2016年に5地点(上記底質サンプルと同地点)から採取した。底質は、採取後, 底質調査法<sup>10)</sup>を参考に2 mm目のふるいを通し, ふるいを下をサンプルとした。なお, サンプル調製時のコンタミを防止するため, 使用する器具類(スコップ, ふるい等)を使用前にメタノールによる洗浄と乾燥を3回行った。採取した底質と土壌は, 新品のポリエチレン製のチャック付き袋に入れて, 分析時まで4°Cで冷蔵保管した。

## 2.3 分析

分析及び測定に使用するすべての器具類は, サンプル調製に使用した器具類と同様, 使用前にメタノールによる洗浄と乾燥を3回行った。

検量線は, 2つの標準品を混合したものをメタノールで希釈して0~5.0 ng/mLの範囲で作成された。なお, 各希釈段階の標準液には, サロゲート1 ng (MPFAC-MXAメタノール希釈液10 ng/mL, 100 μL) を添加した。

検討した底質・土壌サンプルのPFAAs分析フローを図2に示す。均一に攪拌したサンプル約3 gを15 mLのポリプロピレン (PP) チューブに量り採り, 0.25 M炭酸ナトリウム2.5 mLを添加し, よく攪拌した。これにサロゲートを1 ng (10 ng/mL, 100 μL) と0.5 M TBAHS 1 mLを添加した。攪拌後にMTBE 5 mLを添加して2分間振とうし, 遠心分離してMTBE層と水層に分離させた。水層は, 再度MTBE抽出操作を行い, 1回目に得たMTBE層と合わせた。2回分のMTBEを窒素ガスで乾固近くまでページし, 2% ギ酸メタノールに転容した。これを, あらかじめ0.1% アンモニア水含有メタノール5 mL, メタノール5 mL, 2% ギ酸5 mLでコンディショニングしておいたOasis WAXカートリッジに負荷し, メタノール2 mL, 超純水5 mLで洗浄した後, 0.1%アンモニア水含有メタノール5 mLで15 mLのPPチューブに抽出した。窒素ガスで約0.5 mLまで濃縮し, メタノールで1 mLに定容して, 分析用のサンプルとした。

各サンプルは, 抽出操作と分析を3連の繰返しで行い, 回収率は, 検量線用の標準液に添加したサロゲートと, 前処理したサンプルに添加したサロゲートとの比から算

出した。

LC/MS/MSによる分析条件等は表1のとおり, 対象物質(サロゲート)名及びそれらのトランジションは表2のとおりである。

## 3. 結果及び考察

### 3.1 装置の検出下限, 定量下限 (IDL, IQL)

検量線は, サロゲートの各物質のnative体で作成した。検量線の最低濃度を0.05 ng/mLとし, 5 ng/mLまでの範囲では, すべての物質で相関係数が0.998以上であり, 良好な直線性が確認できた。

IDL及びIQLは, 化学物質環境実態調査の手引き(平成27年度版)<sup>11)</sup>に従い算出した。検量線の最低濃度のS/Nは, 各物質とも10程度以上であったことから, この標準液を7回装置に導入し, 標本標準偏差 (SD) を求め, 以下の①及び②の式からIDLとIQLを算出した。

表1 分析条件

【HPLC】			
装置	Agilent Technologies 1260 series		
ガードカラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1×30 mm 1.8 μm) (Agilent Technologies)		
分析カラム	ZORBAX Eclipse Plus C18 (2.1×100 mm 1.8 μm) (Agilent Technologies)		
カラム温度	40°C		
移動相	(A) 10 mM 酢酸アンモニウム (B) アセトニトリル		
グラジエント条件	(linear gradient)		
時間 (min)	0	4	20
(B) (%)	25	25	75
流速	0.2 mL/min		
試料注入量	2 μL		
【MS】			
装置	Agilent Technologies G6490A		
イオン化方法	ESI Negative		
測定モード	SRM		
ガス温度	200°C		
シースガス温度	400°C		
ネブライザ	50 psi		

表2 対象物質

サロゲート	略称	m/z
Perfluoro-n-[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]hexanoic acid	MPFHxA (MC6A)	315 → 270
Perfluoro-n-[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ]octanoic acid	MPFOA (MC8A)	417 → 372
Perfluoro-n-[1,2,3,4,5- <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]nonanoic acid	MPFNA (MC9A)	468 → 423
Perfluoro-n-[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]decanoic acid	MPFDA (MC10A)	515 → 470
Perfluoro-n-[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]undecanoic acid	MPFUdA (MC11A)	565 → 520
Perfluoro-n-[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ]dodecanoic acid	MPFDoA (MC12A)	615 → 570
Perfluoro-1-hexane[ <sup>18</sup> O <sub>2</sub> ]sulfonate	MPFHxS (MC6S)	403 → 103
Perfluoro-1-[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ]octane sulfonate	MPFOS (MC8S)	503 → 99

表3 native体PFAAとサロゲートのIDL, IQL

		(ng/mL)							
		C6A	C8A	C9A	C10A	C11A	C12A	C6S	C8S
native体	SD	0.001	0.006	0.004	0.003	0.006	0.003	0.003	0.004
	IDL	0.005	0.023	0.014	0.013	0.023	0.013	0.012	0.017
	IQL	0.013	0.060	0.036	0.034	0.058	0.035	0.031	0.043
サロゲート/native体 ピーク面積比		1.1	2.0	0.99	0.97	1.0	2.5	0.29	0.40
サロゲート	IDL	0.005	0.012	0.014	0.014	0.022	0.005	0.042	0.042
	IQL	0.012	0.030	0.036	0.035	0.056	0.014	0.11	0.11

native体のIDL, IQLは、検量線の最低濃度の標準液を7回装置に導入して得られた結果から算出した値。

サロゲートのIDL, IQLは、native体のIDL, IQLを「サロゲート/native体 ピーク面積比」で除して算出した。

$$IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2 \quad \dots \textcircled{1}$$

$$IQL = 10 \times \sigma_{n-1, I} \quad \dots \textcircled{2}$$

ここで、

n : 測定回数

t(n-1, 0.05) : 危険率5%, 自由度 n-1のt値 (片側)

n = 7の場合, 1.9432

$\sigma_{n-1, I}$  : IDL算出のための測定値の標本標準偏差 (SD)  
サロゲートとnative体では、同じ1 ng/mL濃度でも感度差があるため、サロゲートとしてのIDL, IQLは、native体とサロゲートの比で補正する必要がある。これにより算出した各物質のnative体のIDL, IQLとnative体とサロゲートのピーク強度比、及びこの比で補正したサロゲートのIDL, IQLを表3に示す。

### 3.2 サロゲート添加量の検討

化学物質環境実態調査の手引き (平成27年度版)<sup>11)</sup>によると、開発される分析法のサロゲート回収率は50~120%が必要とされる。今回の試験では、調製した検量線の範囲と装置の定量下限を考慮し、サンプルに添加するサロゲートを1 ngとした。この量であれば、最終のサンプル溶液が1 mLであることから、定量値で少なくとも0.5 ng/mLを測定できる感度が分析機器に求められる。各サロゲートのIQLは、0.012~0.11 ng/mLであったため、1 ngの添加量で分析機器の感度は十分担保できた。また、検量線の範囲も5.0 ng/mLまでとしたため、120%の回収率 (= 1.2 ng/mL) でも十分定量範囲であった。これらのことより、本試験における回収率を確認するには、1 ngのサロゲート添加量が適当と考えられた。

### 3.3 サロゲートの回収率

図2の方法で分析したサンプルからの回収率を表4に示す。2014年のサンプルは、9地点 (n = 3) の27例、2015年及び2016年のサンプルは、5地点 (n = 3) の15例から算出した (算術平均±SE (%))。サロゲート回収率は、底質では50~85%, 土壌では56~110%であった。PFAAによって回収率にばらつきが見られたが、PFAAsの物理的・化学的性質に基づくような一定の傾向は認められなかった。また、回収率はMC11Aを除いて底質よりも土壌の方が高い傾向が見られた。今回の分析方法では、サンプルごとの分析精度は非常に高く、SEは最大でも2.2%であった。底質・土壌ともに、回収率は50~120%の範囲に収まっており、図2に示した方法は、PFAAs抽出・分析法として妥当であることが確認された。しかし、平均で50%程度の回収率のPFAAsは、サンプルによっては50%を下回ったものもあり、この分析方法には、改良の余地があることも示唆された。Mengら<sup>12)</sup>は、我々が今回検討した方法に似たMTBEによる液液抽出法を採用しており、そのPFAAs回収率はPFCAsで76~96%, PFSAsで76~97%と報告している。処理開始時の液性が酸性であること、MTBEによる抽出を3回行っていること、攪拌時間が長いこと、固相カートリッジによるクリーンアップを行っていないこと、などの点が我々の方法と異なっている。一方、Naileら<sup>13)</sup>は、MTBEによる抽出は行わず、1%酢酸と少量の酢酸含有メタノールで超音波による抽出を行っており、PFAAs回収率はPFCAsでInsufficient Recovery ~135%, PFSAsで32~134%と報告している。回収率は各PFAAによって非常に差があり、SDもPFHxS (C6S)で38% (n = 12) とばらつきが大きい。ASE法による抽出は内山ら<sup>14)</sup>が報

表4 底質・土壌サンプルからのサロゲート回収率

		(%)							
		MC6A	MC8A	MC9A	MC10A	MC11A	MC12A	MC6S	MC8S
2014	底質	59±1.1	61±0.9	56±1.1	56±0.9	53±0.7	51±0.9	52±1.3	50±1.5
2015	底質	52±1.0	57±1.1	68±1.6	85±2.2	79±2.1	56±1.3	50±0.6	51±0.5
2016	底質	81±1.5	75±1.0	68±1.0	63±0.6	54±0.6	53±0.7	64±2.0	73±1.3
2016	土壌	110±0.9	98±0.9	83±1.0	72±1.0	61±1.3	56±1.2	66±0.6	87±1.3

平均値±SE。2014年は27例、2015・2016年は15例から算出した。

告している。この報告では、超音波抽出法とASE法を比較しており、ASE法は最低でも回収率が60%以上で、超音波抽出法よりも回収率が高い結果となっている。しかし、C8AやC8Sの回収率が100%を大きく超え、試験によっては300%を超える値もあった。この原因として、ASE機器に由来するコンタミの影響としており、装置の洗浄等のブランクコントロールの重要性を指摘している。

これらのことから、底質・土壌からのPFAAsの抽出及び分析は、MTBEを使用した抽出と固相カートリッジによるクリーンアップを組み合わせた方法が、ASEに内在するコンタミのリスクなどもなく、回収率にも問題がないうえに、効率的で且つ簡易であることから、妥当な方法と考えられる。回収率を更に向上させるためには、今回行わなかった超音波による抽出工程を加えることや液性をコントロールすることを検討することが必要と考えられ、これらは今後の課題である。

今回検討した方法では、サンプル間でのばらつきは少なかった。これは添加回収の試験であったことから、PPチューブにサンプルを量り採った後でサロゲートを添加したため、サンプル自体の性状によるPFAAsの不均一分散に由来するばらつきを考慮する必要がなかったためであると考えられる。サンプル中のPFAAs濃度を測定する際には、今回検討した抽出方法に由来するばらつきのほかに、サンプルの性状によってPFAAsが不均一に分散していることに由来するばらつきも含まれる。つまり、チューブに量り採る際にサンプルを均一にすることが非常に重要である。サンプルの性状が砂質あるいは粘土質なのか、含水率はどの程度か、植物の破片や小石等が混入していないか、などによりサンプル中のPFAAsの均一性は異なってくると考えられる。サンプルを保存していたチャック付き袋等の容器から量り採る際に、十分に均一にすることで、サンプル間の測定値のばらつきを小さくできると考えられるが、その効率的な方法を確立することは今後の課題である。また、サンプル採取の段階で、地点の代表性を担保するために、数箇所から採取して混合したものをその地点のサンプルとすることもきわめて重要である。このばらつきの検討も、今後検討していくべき課題である。

#### 4. まとめ

底質及び土壌からのPFAAsの抽出法について検討を行った。ASEを使用せずに効率的・簡易的に抽出する方法として、MTBEによる液液抽出と、固相カートリッジを使用したクリーンアップを組み合わせた方法を検討した。この方法を用いてサロゲートの回収率を測定したところ、底質で50～85%、土壌で56～110%であり、底質・土壌ともに、回収率が50～120%の範囲に収まっていたことから、

PFAAs抽出・分析法として妥当であることが確認された。しかし、サンプルによっては回収率が50%を下回ったものもあり、回収率を高めるための更なる改良の余地があることも示唆された。また、サンプル間での測定値のばらつきは小さく、これはサンプル自体の性状によるPFAAsの不均一分散に由来するばらつきが含まれなかったためであると考えられた。今後は、更なる回収率向上のための抽出方法の改良や、サンプルを保存していた容器等から量り採る際のサンプルの均一性を担保する方法を検討していくことが必要である。

#### 5. 謝辞

本研究は、環境省の「POPs及び関連物質等に関する日韓共同研究」の一環として行いました。サンプル採取等にご協力くださいました関係各位に深謝いたします。

#### 6. 引用文献

- 1) Lau C., Anitole K., Hodes C., Lai D., Pfahles-Hutchens A., Seed J. : Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol. Sci.*, **99**, 366-394, 2007
- 2) Giesy J.P., Kannan K. : Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 1339-1342, 2001
- 3) Stahl L.L., Snyder B.D., Olsen A.R., Kincaid T.M., Wathen J.B., McCarty H.B. : Perfluorinated compounds in fish from U.S. urban rivers and the Great Lakes. *Sci. Total Environ.*, **499**, 185-195, 2014
- 4) Nakayama S., Harada K., Inoue K., Sasaki K., Seery B., Saito N., Koizumi A. : Distributions of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) in Japan and their toxicities. *Environ. Sci.*, **12**, 293-313, 2005
- 5) Kannan K., Koistinen J., Beckmen K., Evans T., Gorzelany J.F., Hansen K.J., Jones P.D., Helle E., Nyman M., Giesy J.P. : Accumulation of perfluorooctane sulfonate in marine mammals. *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 1593-1598, 2001
- 6) Lam N.H., Cho C.R., Lee J.S., Soh H.Y., Lee B.C., Lee J.A., Tatarozako N., Sasaki K., Saito N., Iwabuchi K., Kannan K., Cho H.S. : Perfluorinated alkyl substances in water, sediment, plankton and fish from Korean rivers and lakes: a nationwide survey. *Sci. Total Environ.*, **491-492**, 154-162, 2014
- 7) Ahrens L., Norström K., Viktor T., Cousins A.P., Josefsson S. : Stockholm Arlanda Airport as a source

- of per- and polyfluoroalkyl substances to water, sediment and fish. *Chemosphere*, **129**, 33-38, 2015
- 8) De Solla S. R., De Silva A. O., Letcher R. J. : Highly elevated levels of perfluorooctane sulfonate and other perfluorinated acids found in biota and surface water downstream of an international airport, Hamilton, Ontario, Canada. *Environ. Int.*, **39**, 19-26, 2012
- 9) Lu Z., Song L., Zhao Z., Ma Y., Wang J., Yang H., Ma H., Cai M., Codling G., Ebinghaus R., Xie Z., Giesy J.P. : Occurrence and trends in concentrations of perfluoroalkyl substances (PFASs) in surface waters of eastern China. *Chemosphere*, **119**, 820-827, 2015
- 10) 環境省：底質調査方法（平成24年8月），2012
- 11) 環境省：化学物質環境実態調査の手引き（平成27年度版），2016
- 12) Meng J., Wang T., Wang P., Giesy J.P., Lu Y. : Perfluorinated compounds and organochlorine pesticides in soils around Huaihe River: a heavily contaminated watershed in Central China. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **20**, 3965-3974, 2013
- 13) Naile J. E., Khim J. S., Wang T., Chen C., Luo W., Kwon B. O., Park J., Koh C. H., Jones P. D., Lu Y., Giesy J. P. : Perfluorinated compounds in water, sediment, soil and biota from estuarine and coastal areas of Korea. *Environ. Pollut.* **158**, 1237-1244, 2010
- 14) 内山善基, 谷口省吾, 尾崎博明: 土壌等の有機フッ素化合物の抽出方法の検討について, 土木学会第66回年次学術講演会(平成23年度)講演概要集, 387-388, 2011

Predicting the Start of the *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Female Adult Biting Season Using the Spring Temperature in Japan

Osamu Komagata, Yukiko Higa, Atsushi Muto, Kimio Hirabayashi, Masahiro Yoshida, Takashi Sato, Naoko Nihei, Kyoko Sawabe and Mutsuo Kobayashi

Abstract

*Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) is distributed widely and is common in much of Japan. In Japan, female adults begin to bite in between April and June, except in the southern subtropics where the mosquito has no dormant period. It is difficult to estimate the first *Ae. albopictus* biting day because it varies annually depending on the location. Over several years, we surveyed the mosquitoes at different locations that covered a range of warmer to cooler areas of Japan. We found an association between the timing of first biting day by *Ae. albopictus* and spring temperature. In spring months, the strongest correlation was found with mean April temperatures, followed by March. Based on these data, it may, therefore, be possible to apply a simple formula to predict the timing of the first biting day at various geographical locations in Japan. Forecasting maps were created using a simple prediction formula. We found that the first biting day for *Ae. albopictus* changed depending on early spring temperatures for each year. There was an approximate 20-d difference in first biting day between years with warmer and cooler springs. This prediction model will provide useful insight for planning and practice of *Ae. albopictus* control programs, targeting larvae and adults, in temperate regions globally.

Tick surveillance for *Borrelia miyamotoi* and phylogenetic analysis of isolates in Mongolia and Japan.

Iwabu-Itoh Y, Bazartseren B, Naranbaatar O, Yondonjamts E, Furuno K, Lee K, Sato K, Kawabata H, Takada N, Andoh M, Kajita H, Oikawa Y, Nakao M, Ohnishi M, Watarai M, Shimoda H, Maeda K, Takano A.

#### Abstract

*Borrelia miyamotoi*, recently recognized as a human pathogenic spirochete, was isolated from *Ixodes persulcatus* and *I. ovatus* in northern Mongolia and Honshu Island, a major island in Japan. Although no human *B. miyamotoi* infections have been reported in Mongolia, the prevalence of *B. miyamotoi* in ticks from Mongolia is higher than that in ticks from Hokkaido, Japan, where human cases have been reported. Moreover, the multi-locus sequence analysis of cultured isolates revealed that *B. miyamotoi* isolates in Mongolia belong to the Siberian type, a sequence type that was originally reported from isolates from *I. persulcatus* in Hokkaido. Thus, there is a possibility of unrecognized human *B. miyamotoi* infections in Mongolia. Moreover our data support the hypothesis of clonal expansion of the Siberian type *B. miyamotoi*. In contrast, although the isolates were found to belong to the Siberian type *B. miyamotoi*, two isolates from *I. persulcatus* in Honshu Island were identified to be of a different sequence type. Furthermore, *B. miyamotoi* isolates from *I. ovatus* were distinguishable from those from *I. ricinus* complex ticks, according to genetic analysis. In this study, we show that there may be some genetic diversity among *B. miyamotoi* in ticks from Honshu Island.

Tissue toxicokinetics of perfluoro compounds with single and chronic low doses in male rats

Iwabuchi, K., Senzaki, N., Mazawa, D., Sato, I., Hara, M., Ueda, F., Liu, W., Tsuda, S.

Abstract

To examine the kinetics of low doses of perfluoro compounds (PFCs), we administered perfluorohexanoic acid (C6A), perfluorooctanoic acid (C8A), perfluorononanoic acid (C9A) and perfluorooctane sulfonate (C8S) with a single oral dose (50-100 µg/kg BW), and in drinking water at 1, 5, and 25 µg/L for one and three months to male rats; and examined the distribution in the brain, heart, liver, spleen, kidney, whole blood and serum. C6A was very rapidly absorbed, distributed and eliminated from the tissues with nearly the same tissue  $t_{1/2}$  of 2-3 hr. Considering serum  $V_d$ , and the tissue delivery, C6A was mainly in the serum with the lowest delivery to the brain; and no tissue accumulation was observed in the chronic studies as estimated from the single dose study. For the other PFCs, the body seemed to be an assortment of independent one-compartments with a longer elimination  $t_{1/2}$  for the liver than the serum. The concentration ratio of liver/serum increased gradually from C0 to a steady state. The high binding capacity of plasma protein may be the reason for the unusual kinetics, with only a very small fraction of free PFCs moving gradually to the liver. Although the tissue specific distribution was time dependent and different among the PFCs, the  $V_d$  and  $k_e$  of each tissue were constant throughout the study. The possibility of extremely high C6A accumulation in the human brain and liver was suggested, by comparing the steady state tissue concentration of this study with the human data reported by Pérez et al. (2013).

KEYWORDS:

Human tissue accumulation; Perfluoro compounds; Perfluorohexanoic acid; Tissue specific distribution

## Integration of wild and captive genetic management approaches to support conservation of the endangered Japanese golden eagle

Y. Sato, R. Ogden, M. Komatsu, T. Maeda, M. Inoue-Murayama

### ABSTRACT

The loss of biological diversity within species has the potential to significantly reduce resilience in the face of environmental change. Conservation of genetic variation needs to consider all available sources of diversity within a species, and approaches are required to integrate population management across traditionally separate wild and captive population domains. Here we report on a study that utilises different types of genetic analysis at different taxonomic scales and across an in situ – ex situ transition to support conservation planning for the Japanese golden eagle, a subspecies in serious regional decline. Mitochondrial DNA sequencing and nuclear DNA profiling are used to investigate subspecies differentiation and diversity in the natural population, revealing relatively high levels of variation in Japan. These results are compared with data from a newly established conservation breeding programme that indicates good representation of wild genetic variation in the captive founders. However, subsequent population viability analysis (PVA) to examine the demographic and genetic future of the captive population demonstrates the severe effects of existing reproductive skews, suggesting that this population is not sustainable without intensive genetic management. Lastly, the use of available molecular tools to validate and reconstruct pedigrees in Japanese golden eagle are evaluated and discussed in the context of captive and wild conservation management. The paper highlights the importance of producing and utilizing comparative molecular genetic data across the population management spectrum and the benefits of PVA to support the implementation of integrated conservation plans.

First record of the Golden Eagle *Aquila chrysaetos* at Lake Izunuma-Uchinuma, Miyagi Prefecture, Japan, and succeeding long distance migration

Yusuke Takahashi, Taku Maeda, Toshio Honda

Abstract

An immature Golden Eagle *Aquila chrysaetos* was observed at Lake Izunuma-Uchinuma, Miyagi Prefecture, Japan, on December 9, 2016. This is the first record of this species from Lake Izunuma-Uchinuma. An individual reasonably presumed to be the same bird, based on plumage peculiarities, was observed around Mt. Goyo, Iwate prefecture, on March 28, 2017. These observations reveal a 72 km northeastward migration of this individual.

Detailed genetic analyses of the HN gene in human respirovirus 3 detected in children with acute respiratory illness in the Iwate Prefecture, Japan.

Takahashi M, Nagasawa K, Saito K, Maisawa SI, Fujita K, Murakami K, Kuroda M, Ryo A, Kimura H.

#### Abstract

We performed detailed genetic analyses of the partial hemagglutinin–neuraminidase (*HN*) gene in 34 human respirovirus 3 (HRV3) strains from children with acute respiratory illness during 2013–2015 in Iwate Prefecture, Japan. In addition, we performed analyses of the evolutionary timescale of the gene using the Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) method. Furthermore, we analyzed pairwise distances and performed selective pressure analyses followed by linear B-cell epitope mapping and N-glycosylation and phylodynamic analyses. A phylogenetic tree showed that the strains diversified at around 1939, and the rate of molecular evolution was  $7.6 \times 10^{-4}$  substitutions/site/year. Although the pairwise distances were relatively short ( $0.03 \pm 0.018$  [mean  $\pm$  standard deviation, SD]), two positive selection sites (Cys544Trp and Leu555Ser) and no amino acid substitutions were found in the active/catalytic sites. Six epitopes were estimated in this study, and three mouse monoclonal antibody binding sites (amino acid positions 278, 281, and 461) overlapped with two epitopes belonging to subcluster C3 strains. Bayesian skyline plot analyses indicated that subcluster C3 strains have been increasing from 2004, whereas subcluster C1 strains have declined from 2004. Based on these results, Iwate strains were divided into two subclusters and each subcluster evolved independently. Moreover, our results suggested that some predicted linear epitopes (epitopes 3 and 5) are candidates for an HRV3 vaccine motif. To better understand the details of the molecular evolution of HRV, further studies are needed.