

Original Article

Bioconcentration of perfluorinated compounds in wild medaka is related to octanol/water partition coefficient

Katsumi Iwabuchi¹, Norimasa Senzaki¹, Shuji Tsuda¹, Haruna Watanabe², Ikumi Tamura², Hitomi Takanobu² and Norihisa Tatarazako²

¹Iwate Institute of Environmental Health Sciences, 1-11-16 Kita-Iioka, Morioka, Iwate 020-0857, Japan

²Center for Environmental Risk Research, National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan

(Received September 8, 2015; Accepted September 17, 2015)

ABSTRACT — Perfluorinated compounds (PFCs) have been used widely, detected worldwide in the environment, and have accumulated highly in animals. As far as we know, there have been no reports which relate the PFC concentration in wild animals to the physicochemical properties. Therefore, we measured the concentrations of 15 currently available PFCs (perfluorocarboxylic acids with x carbons: Cx, perfluorosulfonic acids with x carbons: CxS) in medaka and the environmental water where medaka live. Samples were obtained from 7 points in Japan (Iwate, Ibaraki, Niigata, Hyogo, Yamaguchi, Ehime, and Nagasaki) from July to September in 2013. Twenty to forty medaka were collected from each point, as well as 2 L of water in a clean PET bottle. PFCs were extracted and concentrated using a solid-phase cartridge, and were measured by LC/MS/MS. The medaka samples were treated individually. C5-C9 and C8S were detected mainly in the water, C11-C13 and C8S were detected mainly in medaka. C8S was always detected in high concentrations in the water and medaka. The bioconcentration factors (BCFs) of PFCs were calculated from PFC concentrations of the water and the medaka. The BCFs of C8-C11 were increased exponentially with the length of carbon chain. The BCF of C8S (approx. 5,500) was far greater than C8 (approx. 330) or C9 (approx. 480). However, the BCFs of C8-C11 and C8S tended to increase in proportion with octanol/water partition coefficient ($\log K_{ow}$).

Key words: Perfluorinated compound (PFC), Medaka, Bioconcentration factor (BCF), $\log K_{ow}$

INTRODUCTION

Perfluorinated compounds (PFCs) are chemically stable and very useful surfactants, and have been used widely. Among them, perfluorooctan sulfonate (PFOS, C8S) is a typical compound of perfluorosulfonic acids (PFSAs), and perfluorooctanoic acid (PFOA, C8) is a typical compound of perfluorocarboxylic acids (PFCAs). C8S has been used in hydraulic oil for planes, fire extinguishers, and etching agents for metal working, while C8 has been used as an additive for polytetrafluoroethylene composition.

C8S was first detected in the serum of 3M employees in 1999 (Olsen *et al.*, 1999), and has also been detected in mammals, birds, fish, and surface waters (Giesy and Kannan, 2001; Stahl *et al.*, 2014; Nakayama *et al.*, 2005; Kannan *et al.*, 2001).

PFCs have a certain characteristic known as persistent organic pollutants (POPs), and C8S and its salts became the subject of worldwide regulations. In May 2009, C8S and its salts were additionally registered in Annex B of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. In Japan, they were additionally registered as Class I Specified Chemical Substances in “The Chemical Substances Control Law” in 2010, and their production or importation have been regulated. As for C8, it was registered with C8S by this Japanese law in 2002. Now it is registered as a general chemical substance. Although regulation of C8 by law has not begun yet, through the 2010/2015 PFOA Stewardship Program in 2006, in which the makers committed to eliminate emissions to the environment and product content by 2015, USEPA and eight major makers of PFOA have started regulating C8 to reduce its use.

Correspondence: Shuji Tsuda (E-mail: I-RIEP_adviser@pref.iwate.jp)

While such these regulations are in effect, PFCs with different carbon numbers from C8S or C8 began to be used. In Japan, Perfluorohexanoic acid (PFHxA, C6) with six carbons has been produced in the Kinki district and detected in the environment. Not much is known about the fate of alternative substances, which includes C6 in the environment. Although there have been several reports which compared the concentration of PFCs in wild animals with their environment (Shirasaka and Kadokami, 2014; Ahrens *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2013), as far as we know, there have been no reports relating the bioconcentration factor (BCF) of PFCs to their physicochemical characteristics.

In this study, we measured PFC concentrations in wild medaka and its environmental water. There were 15 congeners of PFCs we measured, including C8S, C8, and non-regulated PFCs. In this study, we found correlations in PFC concentrations between the water and the medaka, and we first related the BCFs with their physicochemical properties.

MATERIALS AND METHODS

Target PFCs for analysis

We measured 15 congeners of PFCs: PFCAs of C5-C14 and PFSA of C4S, C6S, C7S, C8S, and C10S (Table 1).

Samples

We selected medaka (killifish) as a biological sample,

Table 1. Target PFCs and monitor ions (m/z) for analysis.

compound	abbreviation	m/z
Perfluoropentanoic acid	PFPeA(C5)	263 → 219
Perfluorohexanoic acid	PFHxA(C6)	313 → 269
Perfluoroheptanoic acid	PFHpA(C7)	363 → 319
Perfluorooctanoic acid	PFOA(C8)	413 → 369
Perfluorononanoic acid	PFNA(C9)	463 → 419
Perfluorodecanoic acid	PFDA(C10)	513 → 469
Perfluoroundecanoic acid	PFUdA(C11)	563 → 519
Perfluorododecanoic acid	PFDoA(C12)	613 → 569
Perfluorotridecanoic acid	PFTTrDA(C13)	663 → 619
Perfluorotetradecanoic acid	PFTeDA(C14)	713 → 669
Perfluorobutanesulfonate	PFBS(C4S)	299 → 80
Perfluorohexanesulfonate	PFHxS(C6S)	399 → 80
Perfluoroheptanesulfonate	PFHpS(C7S)	449 → 80
Perfluorooctanesulfonate	PFOS(C8S)	499 → 80
Perfluorodecanesulfonate	PFDS(C10S)	599 → 80

a widely used sample for various studies because they can be found all over Japan and can be obtained easily. We collected the environmental water in which medaka live. Samples were obtained from July to September in 2013. Seven sampling points in Japan, which were intended to be geographically equal, were selected (Iwate, Ibaraki, Niigata, Hyogo, Yamaguchi, Ehime, and Nagasaki) (Fig. 1). The water samples were collected from each point in a 2 L PET bottle which has been cleaned 3 times with methanol, and approximately 20-40 samples of medaka were collected.

Chemicals

Commercially available reagents were used. Sodium carbonate (special grade), tert-butyl methyl ether (MTBE; for LC/MS), 25% ammonia solution (super special grade), ammonium acetate (special grade), acetic acid (for LC/MS), sodium acetate (special grade), methanol (for LC/MS), acetonitrile (for LC/MS) were obtained from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan), and tetrabutylammonium hydrogen sulfate (99%, for HPLC) was provided by ACROS ORGANICS (Geel, Belgium).

Standard chemicals of PFCs were used for calibration. PFC-MXA (mixture of native perfluoroalkylcarboxylic acids), PFS-MXA (mixture of native perfluoroalkylsulfonates) were obtained from Wellington Laboratories (Ontario, Canada).

For surrogate compounds, MPFAC-MXA (mixture of mass-labelled perfluoroalkylcarboxylic acids and mass-labelled perfluoroalkylsulfonates) from Wellington Laboratories was used.

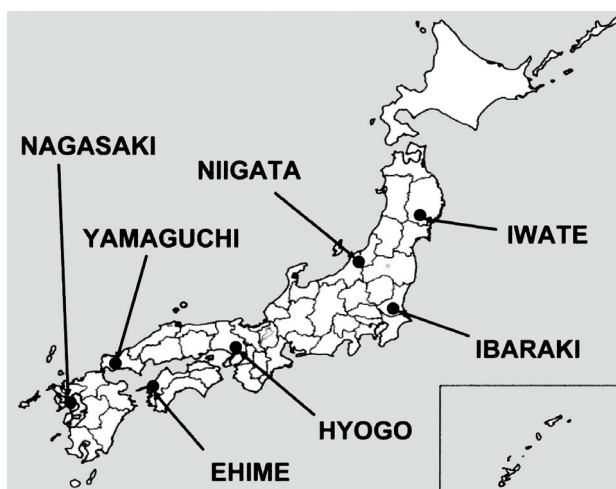


Fig. 1. Sampling points of environmental samples.

Pretreatment of the water samples

The concentration of PFCs in the water samples was very low, so we concentrated them with a concentrator. The concentrator (Sep-Pak Concentrator Plus; Waters Corp., Milford, MA, USA) and a solid phase cartridge (Oasis WAX Plus type 225 mg; Waters Corp.) were used to concentrate the water samples from 2 L to 1 mL. This procedure is shown in Fig. 2. Surrogate compounds were added to the 2 L PET bottle water sample first. The water sample was controlled to approximately pH 4 with a few drops of formic acid. The solid phase cartridge was conditioned with 5 mL of 0.1% ammonia solution-methanol, methanol and acetate buffer successively, where it was then set on the concentrator. The water sample was loaded into the cartridge on the concentrator at a pace of 10 mL/min. The empty PET bottle was washed with 20 mL of ultrapure water, acetate buffer, and methanol successively. The washing was also loaded into the cartridges. PFCs were eluted from the cartridge with 5 mL of 0.1% ammonia solution-methanol and concentrated using N₂ gas to approximately 0.5 mL, where they were then reconstituted to 1 mL by methanol. The prepared samples were measured by LC/MS/MS.

Pretreatment of the medaka samples

PFCs in the medaka samples were extracted with organic solvent, and concentrated by using a solid phase cartridge. The medaka were individually weighed and treated. The aliquot of 2.5 mL of sodium carbonate solution (0.25 M) was added to the medaka samples. The samples were stirred or shaken, then left to stand overnight. Surrogate compounds were added to the samples, together with 1 mL of tetrabutylammonium hydrogen sulfate (0.5 M). After stirring, 5 mL of tert-butyl methyl ether (MTBE) was added. The samples were shaken for 2 min and centrifuged (3,000 rpm) for 10 min. The MTBE layers were moved to another sample tube, and the remaining water layers were re-treated similarly. The resulting MTBE layers were again moved, and combined with the former MTBE layers. The MTBE was purged with N₂ gas, and 2 mL of 2% formic acid-methanol solution (1 mL twice) was added to the dried samples. The samples were dissolved and mounted (1 mL twice) to solid phase cartridges conditioned with 5 mL of 0.1% ammonia water-methanol solution, 5 mL of methanol and 5 mL of 2% formic acid. The cartridges were also successively washed with 2 mL of methanol and

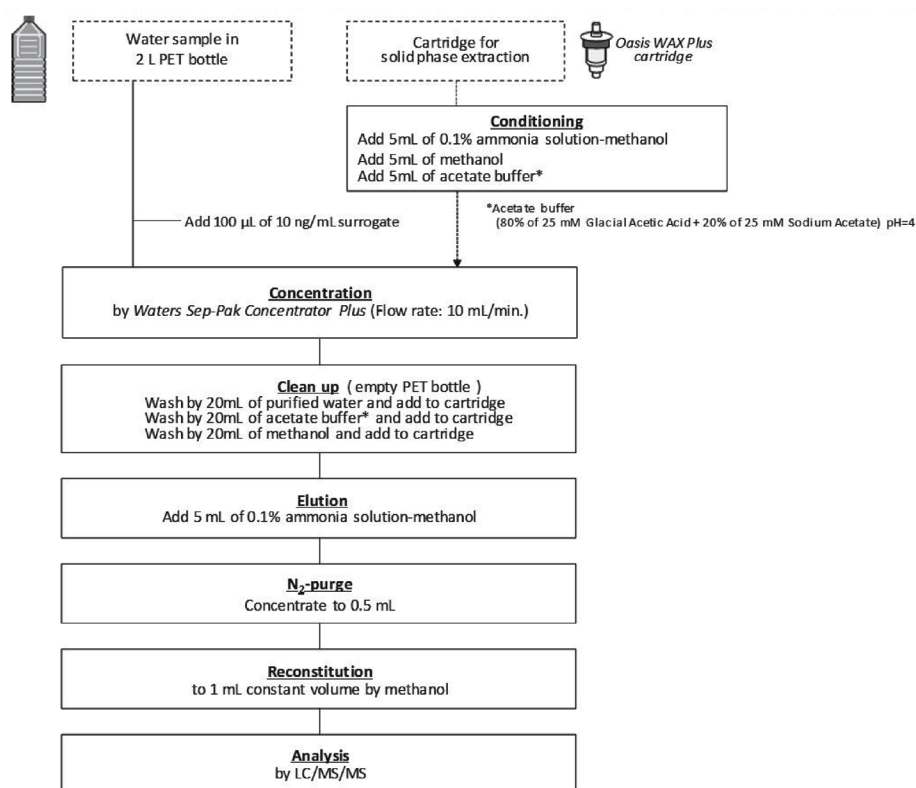


Fig. 2. Flow chart of the pretreatment procedure for water samples.

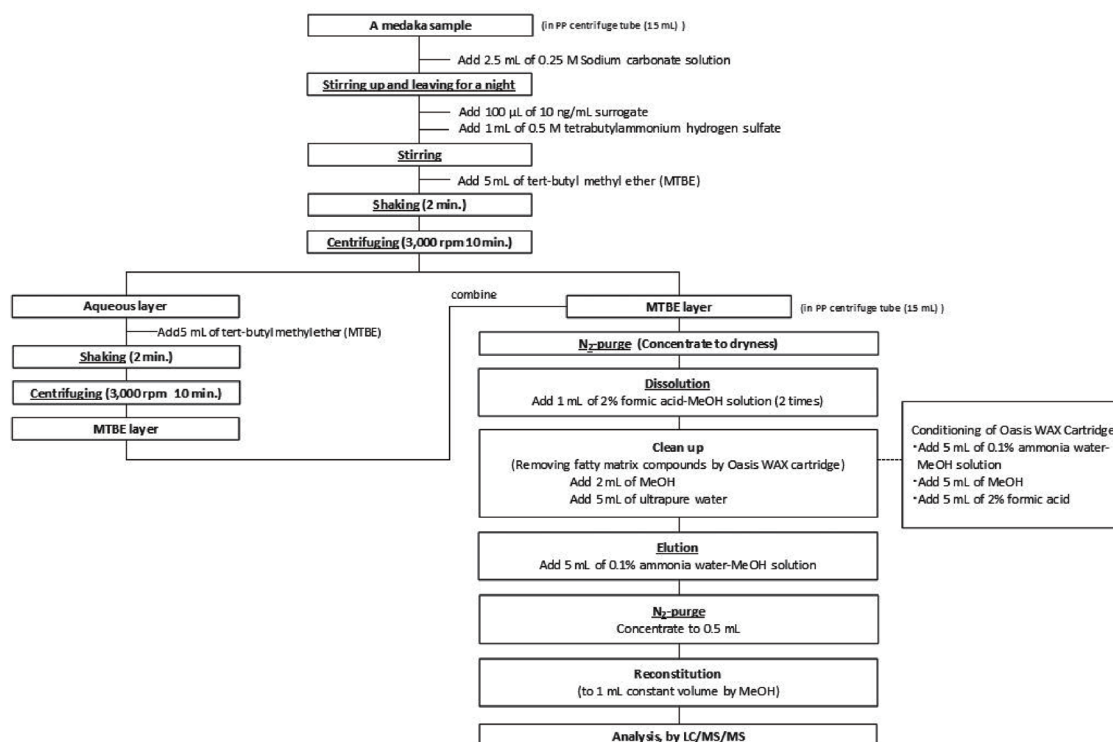


Fig. 3. Flow chart of the pretreatment procedure for medaka samples.

5 mL of ultrapure water. The target PFCs were eluted from the cartridge with 5 mL of 0.1% ammonia water-methanol solution, concentrated to approximately 0.5 mL using N_2 gas, and reconstituted to 1 mL by methanol. The prepared samples were measured by LC/MS/MS. This procedure is shown in Fig. 3.

Instruments

Due to repeated measurement of PFCs, experimental instruments may have been contaminated. To eliminate the PFCs contaminants, all experimental instruments that were used to extract and concentrate PFCs were washed thoroughly 3 times with methanol. The concentrator was washed with methanol for 2 hr or more. It was then rinsed with ultrapure water for no less than 2 hr with its respective sole circulating operation.

Analyzing devices

Prepared samples were measured by the LC/MS/MS system, which consists of HPLC (1200 series; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and mass spectrometer (6410; Agilent Technologies). The conditions for analyzing devices were as follows;

HPLC : Agilent Technologies 1200 series

guard column : ZORBAX Eclipse Plus C18
(2.1*30 mm 1.8 μ m)
(Agilent Technologies)
analysis column : ZORBAX Eclipse Plus C18
(2.1*100 mm 1.8 μ m)
(Agilent Technologies)

column temperature : 40°C

mobile phase : (A) 10 mM Ammonium acetate
(B) Acetonitrile

gradient (linear)

time (min)	0	4	20	28
(B) (%)	25	25	75	75

post time 17 min (Acetonitrile 95% to 25%)

flow : 0.2 mL/min

injection volume : 10 μ L

MS : Agilent Technologies 6410

ionization : ESI (Negative)

gas temperature : 350°C

gas flow : 5 L/min

nebulizer : 60 psi

capillary voltage : 2000 V

monitor ion (m/z) : see Table 1

Calibration, LOD and LOQ

A standard sample for each of the 15 PFCs was prepared for calibration on a range of 0.05-80 ng/mL. For accurate measurement, two calibration curves were prepared for each PFC: a low concentration curve of 0.05-5.0 ng/mL and a high concentration curve of 5.0-80 ng/mL. They showed high linearity, and their coefficients of correlations were above 0.995 for all 15 PFCs. The S/N ratio of the lowest concentration of each sample was close to or above 3, therefore the limit of detection (LOD) was set to 0.05 ng/mL for each PFC. The S/N ratio of 0.1 ng/mL concentration was close to or above 10 for each PFC, thus the limit of quantitation (LOQ) was set to 0.1 ng/mL.

RESULTS

PFCs concentration of the water samples

As shown in Table 2, PFCAs of C5-C10 were detected in all of the water samples, with 73.0 pg/mL for C7 as the highest total concentration. PFCAs in C11-C14 were hardly detected or under the limit of detection (ND). As for PFSAs, C8S was detected in all of the water samples, with 14.0 pg/mL as the highest total concentration. The others were detected only in some areas at low concentrations. The highest concentration among PFCs was detected in Hyogo with 34 pg/mL for C6. The total amount of PFCs was the highest in Hyogo, followed by Ehime.

PFCs concentration of the medaka samples

The mean concentrations (arithmetical mean \pm S.E.) of PFCs in medaka samples are shown in Table 3. Long-chain-PFCAs (C11-C13) and C8S were detected at high concentrations in almost all of the medaka samples. Among PFCAs, C11 showed the highest total concentration with 66 ng/g, while C8S was the highest with 26 ng/g among PFSAs.

Short-chain-PFCAs such as C5-C8 were detected in some samples at low concentrations, while they showed high concentrations in all of the water samples. In the Hyogo sample, C8S was detected with the highest concentration at 13 ng/g, and was approximately 2-14 times higher than the other samples. C8S was detected in both the water and medaka samples. The total amount of PFCs was the highest in Nagasaki, followed by Hyogo.

Relation between the water and the medaka

C8-C10 and C8S were detected in both the water and medaka samples, so the relation in the concentrations between water and medaka of each of those PFCs was examined by scatter graph (Fig. 4). The concentrations

of C8S, C9 and C10 in the medaka increased with those of the water, with the coefficients of correlation between them being 0.99, 0.96 and 0.86, respectively. The coefficients of correlation for C9 and C10 were 0.99 and 1.00 respectively, after eliminating the unexpectedly high Nagasaki sample data. However, C8 showed no clear relation between water and medaka concentrations, with the coefficient of correlation of 0.43.

Bioconcentration factor of PFCs and carbon number

We calculated the BCFs of C8, C9, C10, C11, and C8S, which were detected at high rates in both the water and medaka samples. Each BCF was calculated from the PFC concentration ratio of the mean medaka concentration and the mean water concentration. BCFs were approximately 330 (C8), 480 (C9), 8,700 (C10), 110,000 (C11), and 5,500 (C8S). As shown in Fig. 5, the larger the carbon numbers of the PFC, the greater the BCFs are among the PFCAs. The BCF of C8S was far greater than the BCF of C8 with the same carbon number.

BCF and log K_{ow}

The log K_{ow} values of PFCs have been reported as 4.30 (C8), 4.84 (C9), 5.30 (C10), 5.76 (C11), and 5.25 (C8S), respectively (Arp *et al.*, 2006). As shown in Fig. 6, BCF of the PFC was related to the log K_{ow} with the coefficient of determination of 0.90.

DISCUSSION

The typical PFCs of C8 and C8S, of which production had been stopped, were still detected in the water. Measurement of the concentrations in the sediment samples of these PFCs is necessary in order to understand the environmental fate of these PFCs more thoroughly.

New PFCs which are not regulated were also detected. C6 was detected at a high concentration in Hyogo's water sample, which indicates the dominant source of the new PFC may be located in or near Hyogo.

The reason for the unexpectedly high concentration in the Nagasaki medaka samples compared to those in the water samples may be due to the fact that the medaka had been exposed to water with higher concentrations before the sampling. The reason for why C8 showed no clear relation between water and medaka concentrations is still unknown and should be clarified.

The BCF of the PFC was related to the log K_{ow} for wild medaka. The BCF and log K_{ow} of PFCAs were both related to the carbon numbers. Therefore, C5-7 may not concentrate in the biological body because of a short carbon

Table 2. PFCs concentration of environmental water samples (pg/mL).

Sampling points	Perfluorocarboxylic acids										Perfluorosulfonates					total
	PFPeA (C5)	PFHxA (C6)	PFHpA (C7)	PFOA (C8)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFUdA (C11)	PFDoA (C12)	PFTeDA (C13)	PFTeDA (C14)	PFBS (C4S)	PFHxS (C6S)	PFHpS (C7S)	PFOS (C8S)	PFDS (C10S)	
Iwate	1.8	0.2	0.5	0.4	0.1	0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.1	ND	3.1
Ibaraki	10.5	6.0	5.7	4.9	1.4	0.2	0.1	ND	ND	ND	0.2	0.2	ND	0.1	ND	29.4
Niigata	0.6	2.5	4.4	2.1	0.9	0.2	0.1	ND	ND	ND	0.8	0.1	ND	0.4	ND	12.2
Hyogo	24.7	34.2	26.0	33.3	13.9	3.8	3.1	0.3	0.1	ND	2.0	2.1	0.2	7.7	ND	151.3
Yamaguchi	0.3	0.9	2.1	1.5	0.2	0.1	ND	ND	ND	ND	0.1	ND	ND	0.3	ND	5.4
Ehime	13.0	8.2	25.3	16.9	2.0	0.4	0.1	ND	ND	ND	2.4	0.6	0.1	4.6	ND	73.7
Nagasaki	4.8	3.3	8.8	6.5	1.0	0.1	0.1	ND	ND	ND	0.6	0.5	ND	0.9	ND	26.5

ND : below LOD

Table 3. PFCs concentration of medaka samples (ng/g).

Sampling Points	Perfluorocarboxylates										Perfluorosulfonates					total
	PFPeA (C5)	PFHxA (C6)	PFHpA (C7)	PFOA (C8)	PFNA (C9)	PFDA (C10)	PFUdA (C11)	PFDoA (C12)	PFTeDA (C13)	PFTeDA (C14)	PFBS (C4S)	PFHxS (C6S)	PFHpS (C7S)	PFOS (C8S)	PFDS (C10S)	
Iwate (n=30)	ND	ND	ND	0.2 ± 0.06	0.2 ± 0.06	0.2 ± 0.05	0.7 ± 0.08	0.2 ± 0.05	0.4 ± 0.06	ND	ND	ND	ND	1.4 ± 0.18	ND	3.3
Ibaraki (n=22)	ND	ND	ND	0.5 ± 0.17	0.2 ± 0.05	0.8 ± 0.17	4.8 ± 0.84	6.5 ± 0.98	6.1 ± 0.83	0.8 ± 0.12	ND	ND	0.0 ± 0.02	1.1 ± 0.22	ND	20.9
Niigata (n=29)	0.4 ± 0.16	ND	0.2 ± 0.11	1.3 ± 0.34	0.0 ± 0.02	0.8 ± 0.18	9.3 ± 1.62	7.9 ± 1.39	6.7 ± 0.88	0.8 ± 0.13	ND	ND	0.2 ± 0.17	1.0 ± 0.23	ND	28.7
Hyogo (n=21)	ND	ND	ND	2.0 ± 0.33	2.4 ± 0.26	7.6 ± 0.53	16.2 ± 1.09	13.7 ± 1.44	17.9 ± 1.73	3.0 ± 0.28	ND	ND	ND	12.5 ± 1.36	ND	75.4
Yamaguchi (n=42)	0.3 ± 0.09	ND	ND	1.5 ± 0.26	0.0 ± 0.02	0.6 ± 0.09	4.6 ± 0.48	2.6 ± 0.27	3.3 ± 0.28	0.2 ± 0.05	ND	ND	ND	0.9 ± 0.13	ND	14.0
Ehime (n=35)	0.2 ± 0.05	ND	ND	0.2 ± 0.06	0.2 ± 0.03	0.9 ± 0.12	3.9 ± 0.47	3.2 ± 0.47	2.1 ± 0.31	0.3 ± 0.07	ND	ND	0.0 ± 0.01	6.5 ± 1.06	0.0 ± 0.01	17.6
Nagasaki (n=19)	ND	ND	ND	0.3 ± 0.09	0.7 ± 0.09	4.4 ± 0.72	26.6 ± 5.36	21.6 ± 5.06	25.5 ± 5.35	3.1 ± 0.56	ND	ND	0.1 ± 0.1	2.3 ± 0.50	0.1 ± 0.06	84.7

Average concentrations of medaka are shown as mean ± S.E.

Bioconcentration of PFCs in Medaka

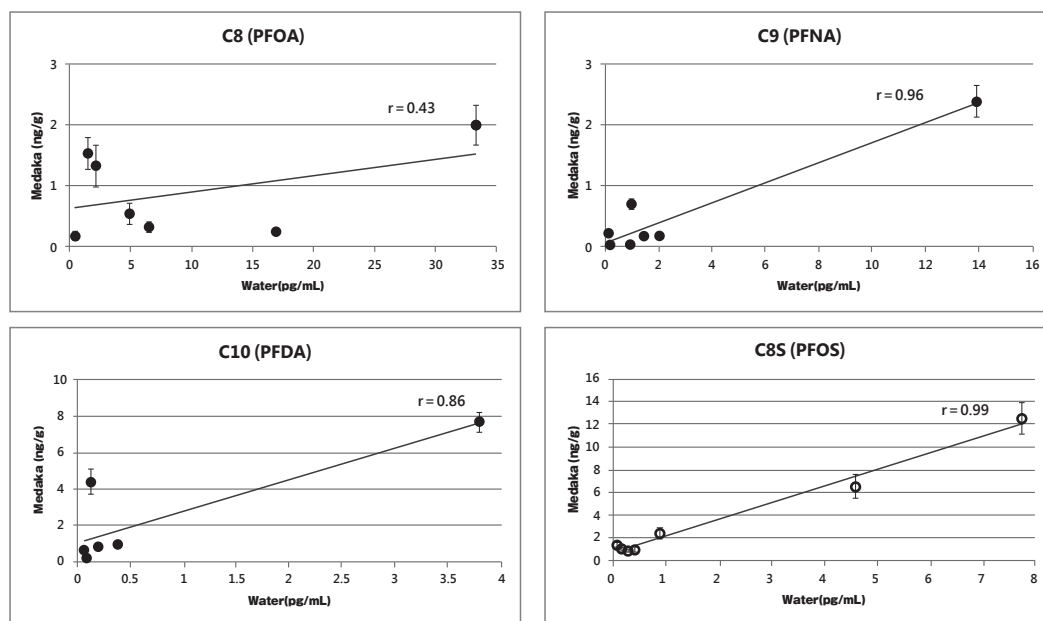


Fig. 4. Correlation between PFCs(C8-C10, C8S) concentrations of water and medaka. Each point \pm vertical line = mean \pm S.E. \bullet : PFCA \circ : PFSA (PFOS).

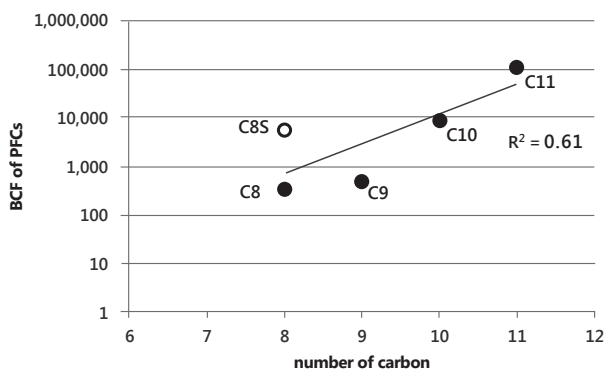


Fig. 5. Correlation between number of carbon (C8-C11, C8S) and BCF.

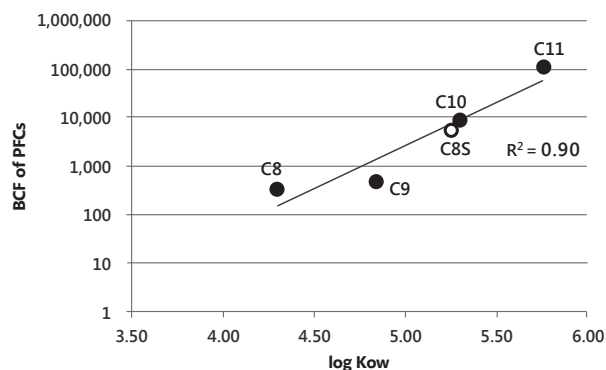


Fig. 6. Correlation between $\log K_{ow}$ (C8-C11, C8S) and BCF.

chain and a small $\log K_{ow}$ value. If the lipid solubility is a main determinant of $\log K_{ow}$ and BCF, this accumulation of PFCs in wild medaka may be applied to other aquatic life.

Inoue *et al.* (2012) reported the BCFs in carp (*Cyprinus carpio* L.) which was examined according to OECD test guideline (TG) 305. Their results were considerably lower than our results, as shown in Table 4. In their study, the BCF was not related to the $\log K_{ow}$. The reasons

behind these results are unclear, but may be due to:

- (1) The samples of OECD TG 305 were exposed to a much higher concentration than our environmental samples.
- (2) A different species was used (carp vs medaka).
- (3) According to OECD TG 305 the exposure phase was 28-60 days, but environmental samples had been exposed for about 1 year, considering the life-cycle of medaka.

Table 4. Comparison of concentration of exposure and BCFs between wild medaka (environmental samples) and carp (OECD TG 305 samples).

PFCs	wild medaka (environmental samples) (a)		carp (OECD TG 305 samples) ¹⁾ (b)		ratio (b)/(a)	
	concentration of exposure ²⁾³⁾	BCF	concentration of exposure ²⁾	BCF	concentration of exposure	BCF
C8	9.4	330	4,710-47,600	3.1-9.4	501-5,063	0.0094-0.028
C9	2.8	480	-	-	-	
C10	0.7	8,700	-	-	-	
C11	0.6	110,000	91.1-946	2,300-3,700	152-1,577	0.020-0.034
C8S	2.0	5,500	1,880-16,000	720-1,300	940-8,000	0.13-0.24

1) Results of Inoue *et al.*

2) Concentrations are in pg/mL

3) Mean concentration of 7 samples of environmental water

The BCF data derived by the OECD test guidelines may be verified by the environmental data.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was conducted as commissioned business from the National Institute for Environmental Studies.

The authors would like to thank Mr. Nicholas Oakden and Ms. Yumie Cho for proofreading our paper.

Conflict of interest---- The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Ahrens, L., Norström, K., Viktor, T., Cousins, A.P. and Josefsson, S. (2015): Stockholm Arlanda Airport as a source of per- and polyfluoroalkyl substances to water, sediment and fish. *Chemosphere*, **129**, 33-38.
- Arp, H.P.H., Niederer, C. and Goss, K.U. (2006): Predicting the partitioning behavior of various highly fluorinated compounds. *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 7298-7304.
- Giesy, J.P. and Kannan, K. (2001): Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 1339-1342.
- Inoue, Y., Hashizume, N., Yakata, N., Murakami, H., Suzuki, Y., Kikushima, E. and Otsuka, M. (2012): Unique physicochemical properties of perfluorinated compounds and their bioconcentration in common carp *Cyprinus carpio* L. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **62**, 672-680.
- Kannan, K., Koistinen, J., Beckmen, K., Evans, T., Gorzelany, J.F., Hansen, K.J., Jones, P.D., Helle, E., Nyman, M. and Giesy, J.P. (2001) : Accumulation of perfluorooctane sulfonate in marine mammals. *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 1593-1598.
- Nakayama, S., Harada, K., Inoue, K., Sasaki, K., Seery, B., Saito, N. and Koizumi, A. (2005): Distributions of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) in Japan and their toxicities. *Environ. Sci.*, **12**, 293-313.
- Olsen, G.W., Burris, J.M., Mandel, J.H. and Zobel, L.R. (1999): Serum perfluorooctane sulfonate and hepatic and lipid clinical chemistry tests in fluorochemical production employees. *J. Occup. Environ. Medicine*, **41**, 799-806.
- Shirasaka, H. and Kadokami, K. (2014): Accumulation and Spatial Distribution of Perfluorinated Compounds in Crucian Carp (*Carrasius auratus* (gibelio) langsdorffii) in Japan. *J. Environ. Chem.*, **24**, 67-76.
- Stahl, L.L., Snyder, B.D., Olsen, A.R., Kincaid, T.M., Wathen, J.B. and McCarty, H.B. (2014): Perfluorinated compounds in fish from U.S. urban rivers and the Great Lakes. *Sci. Total Environ.*, **499**, 185-195.
- Zhou, Z., Liang, Y., Shi, Y., Xu, L. and Cai, Y. (2013): Occurrence and transport of perfluoroalkyl acids (PFAAs), including short-chain PFAAs in Tangxun Lake, China. *Environ. Sci. Technol.*, **47**, 9249-9257.

岩手県におけるヒトスジシマカの分布とその生息条件の推移*

佐藤 卓**・千崎 則正**・西井 和弘***・小泉 英誉**

キーワード ①ヒトスジシマカ ②地理情報システム ③地球温暖化 ④有効積算温度 ⑤一般化線形混合モデル

要 旨

デング熱やチクングニア熱等のウイルス性疾患を媒介する感染症対策上重要な節足動物であるヒトスジシマカについて、2009～2014年の6年間、岩手県における生息分布調査を行った。生息分布調査結果および過去30年間の3次メッシュ気温データを基に、地理情報システム(GIS)および統計モデリング手法を用いて解析した結果、ヒトスジシマカの生息条件は、「1月平均気温」、「10.8℃を閾値とする有効積算温度」および「人口密度」が大きく関連することが示唆された。また、岩手県におけるヒトスジシマカの生息可能な地域が年々拡大していることが明らかとなった。

1. はじめに

東南アジアを原産地とするヒトスジシマカ、*Aedes albopictus* は、デング熱やチクングニア熱等のウイルス性疾患を媒介する感染症対策上重要な節足動物である。世界的に生息分布域が拡大しており、現在28カ国で新たに定着が確認され、米国では過去25年間でテキサス州から東部諸州へ広範に生息分布域が広がっている¹⁾。ヨーロッパにおいても古タイヤの輸入によりイタリア、ギリシャ、フランス、スイスなどに定着が認められ、2007年のイタリアでのチクングニア熱の流行を引き起こした²⁾。わが国では1948年までは栃木県が生息北限とされていたが³⁾、その後、東北地方中央部低地における生息北限が徐々に北上しており、1968年には宮城県仙台市⁴⁾、1996年には宮城県古川市⁵⁾、2000年には岩手県一関市⁶⁾、2006年

には花巻市⁷⁾で発生が確認されている。現在ヒトスジシマカの生息分布域は、岩手県内の北上盆地沿いを北上・南下を繰り返しながら次第に北に拡大しつつある。

2014年夏以降、海外渡航歴がなく都内の公園等で蚊に刺された方からデング熱の患者が発生し、最終的に国内で160名の患者が報告されるに至った⁸⁾。これは日本において約70年ぶりに発生したデング熱の地域流行であり、デング熱等のウイルスを媒介するヒトスジシマカの生息分布域の拡大は、そのままデング熱等の感染リスクの拡大を意味する。これらの事象を受けて、厚生労働省は平成27年4月28日に「蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針⁹⁾」を策定し、自治体はヒトスジシマカの調査を含むデング熱等の感染症予防対策を講じることとなった。

筆者らは岩手県内で分布域が拡大しつつあるヒ

*Distribution of *Aedes albopictus* in Iwate Prefecture and Transition of Climatic Conditions

**Takashi SATOU, Norimasa SENZAKI, Hideyo KOIZUMI (岩手県環境保健研究センター) Research Institute for Environmental Sciences and Public Health of Iwate Prefecture

***Kazuhiro NISHII (沿岸広域振興局大船渡保健福祉環境センター) Coastal Regional Development Bureau Health, Welfare and Environment Center Ofunato Branch

トスジシマカの生息地域および生息条件を明らかにし、今後の疾病媒介蚊対策に資するため、2009～2014年の6年間、岩手県内ほぼ全域にわたる蚊類の生息分布状況の調査を行った。またヒトスジシマカの生息条件について、同蚊の生息分布域調査結果および1 km メッシュ気温データ¹⁰⁾についてGISを用いて解析を行い、また同データをパラメータとした一般化線形混合モデルにより気温等に関する生息条件について知見を得たので報告する。

2. 方法

2.1 蚊類の生息分布域調査

岩手県全域を対象とした蚊類の生息分布域調査を2009～2014年の6～10月に行った。調査地点はヒトスジシマカの生息分布域が拡大している北上盆地を中心に、県内でも比較的温暖な太平洋沿岸地域および北上盆地と沿岸地域を結ぶ主要道の沿道地域を重点的に選定し、延べ431地点で実施した。調査地点を図1に示す。

調査対象は主に寺院の境内や墓地などの手水鉢や花生けあるいは屋外に放置された古タイヤなどの水たまり(コロニー)とし、生息している蚊の幼虫および蛹を太口ピペットで捕獲し、約50ml 容ポリスチレン製広口容器にたまり水ごと採集した。検体数は1地点につき1～12コロニーであった。また、幼虫等採集時に飛来してきた成虫も、捕虫網で捕獲し検体とした。採集した蚊の幼虫等は容器内で2～3日に1回程度給餌および飼育水の交換を行い、羽化した成虫をエーテルで殺生後、実体顕微鏡で形態学的に種を同定した。

2.2 ヒトスジシマカの生息条件の解析

「東北地方1 km メッシュ気温データ表示・検索システム」¹⁰⁾により、岩手県全域に当たる3次メッシュごとに1978～2014年の37年間の日平均気温を選び出し、年ごとメッシュごとの①「年平均気温」および②「1月平均気温」を算出した。ヒトスジシマカの生息地点にもっともよく一致する年平均気温を10.0～11.2℃まで0.2℃間隔で検討した結果、生息地点の年平均気温が10.8℃以上であったことから、③「日平均気温10.8℃を超える年間日数」および④「10.8℃を閾値とする有効積算温度」を算出した。統計モデリングは、一般化

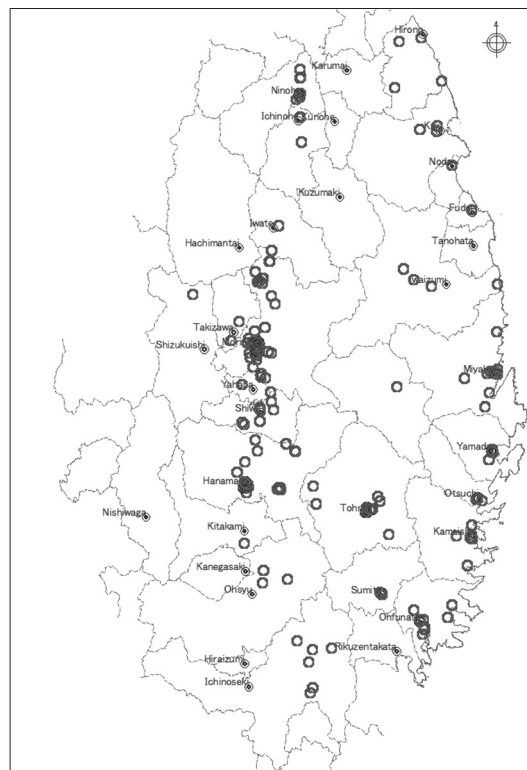


図1 岩手県における蚊類の生息分布調査地点 (2009～2014年)

線形混合モデル(リンク関数はlogit, ランダム効果は調査対象メッシュ(n=235))を用いた。応答変数は年ごとメッシュごとのヒトスジシマカの検出割合(検出地点数/調査地点数), 説明変数は①～④の5年移動平均値および3次メッシュ人口密度¹¹⁾, 3次メッシュ全産業事業所数¹²⁾を用いた。パラメータ選択は、AICを評価基準とした。GISアプリケーションはGisway light ver.2.2.4, 統計計算アプリケーションはR ver.3.1.2パッケージglmmMLを用いた。

3. 結果

3.1 ヒトスジシマカの生息分布

成虫の羽化が確認された蚊類の採集結果を表1に示す。2009～2014年に採集された蚊の種類はヤマトヤブカ, ヒトスジシマカ, ヤマダシマカ, オオクロヤブカ, トウゴウヤブカ, フタクロホシチビカ, トラフカクイカ, キンバラナガハシカおよびイエカ類であった。このうちヤマトヤブカは全

表1 岩手県における蚊類採集結果(種別の検出地点数 2009~2014年)

年	調査市町村	調査地点数	ヒトスジシマカ	ヤマダシマカ	ヤマトヤブカ	その他*
2009	盛岡市	24	1	0	19	4
	大船渡市	7	5	1	5	7
	花巻市	22	12	1	12	4
	一関市	5	3	0	4	3
	釜石市	4	1	0	3	2
	奥州市	2	2	0	1	0
	住田町	2	1	1	1	1
	大槌町	2	1	0	2	1
計	68	26	3	47	22	
2010	盛岡市	67	27	1	56	10
	宮古市	7	0	5	3	6
	大船渡市	9	2	0	9	0
	花巻市	8	5	0	5	1
	北上市	1	1	0	0	0
	遠野市	13	0	3	13	0
	一関市	5	0	3	5	1
	釜石市	6	0	2	5	3
	二戸市	1	0	0	1	0
	奥州市	1	0	0	1	0
	岩手町	2	0	0	2	0
	紫波町	7	0	1	6	1
	矢巾町	1	0	0	1	0
	住田町	3	0	3	3	0
大槌町	4	2	2	3	1	
山田町	2	0	0	2	0	
一戸町	3	0	2	3	0	
計	140	37	22	118	23	
2011	盛岡市	34	10	0	31	19
	計	34	10	0	31	19
2012	盛岡市	32	4	0	30	3
	宮古市	4	0	4	2	2
	久慈市	4	0	2	4	2
	二戸市	4	0	1	4	5
	岩手町	3	0	0	3	0
	岩泉町	4	0	1	3	0
	普代村	1	0	1	1	0
	洋野町	4	0	1	4	0
	野田村	1	0	1	1	0
	一戸町	4	0	2	4	2
計	61	4	13	56	14	
2013	盛岡市	34	6	0	31	12
	宮古市	6	0	3	5	8
	二戸市	6	0	0	6	0
	滝沢市	2	0	0	1	0
	岩手町	3	0	0	3	1
	岩泉町	4	0	1	4	3
	一戸町	3	0	1	1	2
計	58	6	5	51	26	
2014	盛岡市	41	9	1	35	3
	宮古市	3	0	3	3	2
	花巻市	4	1	1	4	0
	遠野市	14	0	0	13	2
	二戸市	1	0	0	0	1
	雫石町	1	0	0	1	0
	大槌町	1	0	0	1	0
	山田町	2	0	1	2	1
	一戸町	3	0	0	3	1
計	70	10	6	62	10	
総計	431	93	49	365	114	

*: オオクロヤブカ, トウゴウヤブカ, フタクロホシチビカ, トラフカクイカ, キンバラナガハシカ
およびイエカ類の合計

採集地点431地点のうち365地点で確認され、調査地点全域において優先種であった。

県内でヒトスジシマカの生息が確認された地点および今回の調査で明らかとなった生息北限ラインを図2に示す。6年間の調査でヒトスジシマカの生息が確認された地点は、盛岡市、花巻市、北上市、奥州市、一関市、大船渡市、釜石市、住田町および大槌町の7市2町の計93地点であった。ヒトスジシマカの生息北限は、2009年では盛岡市仙北2丁目(39° 41' 15" N, 141° 9' 11" E)であったが、2010年では盛岡市玉山区(39° 51' 28" N, 141° 10' 33" E)であり、2009年に比べて約20km北上したことになる。ただし、今回の報告では、岩手県における生息北限を2年以上継続して生息が確認された盛岡市天昌寺町(39° 42' 42" N, 141° 07' 16" E)とした。一方、太平洋沿岸地域では釜石市で2009年に発見されたにもかかわらず2010年には確認されなかった。しかし、それより北に位置する大槌町の海岸に近い寺

院でヒトスジシマカの生息が2年連続確認された。

また、同一地点または同一コロニーで2種類以上の蚊が採集された地点は延べ209地点、163コロニーであった。2種類以上の蚊が確認された地点数およびコロニー数の内訳を表2に示す。ヒトスジシマカと共存する幼虫としては、ヤマトヤブカがもっとも多く、同時に確認された地点は延べ61地点、60コロニーであった。そのほか、ヤマダシマカ、キンバラナガハシカ、オオクロヤブカ、イエカ類があげられる。一方ヤマトヤブカはヤマダシマカとの共存がもっとも多く、その他今回採集されたすべての種との共存が確認された。

3.2 ヒトスジシマカの生息条件

一般化線形混合モデルによる解析の結果、メッシュごとのヒトスジシマカの検出割合は、「1月平均気温」、「10.8℃を閾値とする有効積算温度」および「人口密度」が大きく関連し、パラメータごとの標準化偏回帰係数をみると、「10.8℃を閾値とする有効積算温度」が1.446とヒトスジシマカの生息にもっとも大きく影響を与えることが示唆された。パラメータ選択によるAIC評価の結果を表3に、統計モデリング結果を表4に示す。

当該モデルにより、県内の任意の3次メッシュにおけるヒトスジシマカの生息確率を算出することができた。すなわち、 q_i をメッシュごとのヒトスジシマカ生息確率としたとき以下の式で算出される。

$$\text{logit}(q_i) = -19.71 + [1\text{月平均気温}]_i \times 0.779 + [10.8\text{℃を閾値とする有効積算温度}]_i \times 0.0117 + [\text{人口密度}]_i \times 0.000329$$

岩手県内のすべての3次メッシュについて、1982～2014年における年ごとメッシュごとのヒトスジシマカの生息確率を算出した。メッシュごとのヒトスジシマカ生息確率を5%未満、5～20%、20～50%、50%以上の4段階に分類し、3次メッシュ面積 = 1 km²と近似して、ヒトスジシマカ生息確率別面積を算出した年次推移結果を図3に示す。ヒトスジシマカ生息確率5%以上の地域は1989年頃から増加し始め、約10年周期で増減しながらも増加傾向にあり、2011年には県土の10.8%に当たる1672 km²に達した。2014年における岩手県のヒトスジシマカ生息ポテンシャルマッ

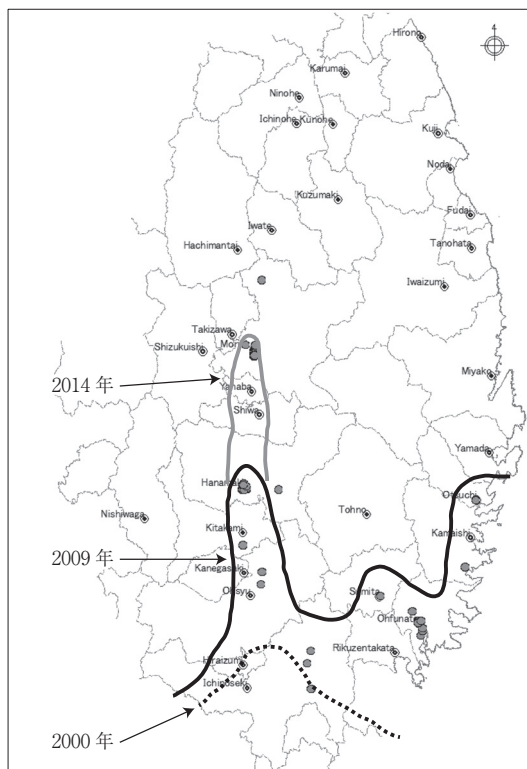


図2 岩手県のヒトスジシマカ生息地点と生息北限ラインの推移

表2 岩手県において同一地点で2種以上の蚊が確認された地点数およびコロニー数の内訳

		地点数							コロニー数						
		2009	2010	2011	2012	2013	2014	計	2009	2010	2011	2012	2013	2014	計
2種の蚊が同一地点で生息	ヒトスジシマカ+ヤマトヤブカ	9	23	9	2	8	10	61	5	22	11	2	9	11	60
	ヒトスジシマカ+イエカ類	0	1	4	0	4	1	10	0	1	4	0	1	1	7
	ヒトスジシマカ+ヤマダシマカ	0	2	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	1
	ヒトスジシマカ+オオクロヤブカ	1	0	1	0	0	0	2	1	0	1	0	0	0	2
	ヒトスジシマカ+キンバラナガハシカ	2	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	2
	ヤマトヤブカ+イエカ類	0	7	13	1	13	4	38	0	7	7	1	7	4	26
	ヤマトヤブカ+オオクロヤブカ	1	4	3	3	3	3	17	0	1	1	3	0	1	6
	ヤマトヤブカ+ヤマダシマカ	0	19	0	9	5	7	40	0	18	0	11	5	7	41
	ヤマトヤブカ+キンバラナガハシカ	4	1	0	4	5	1	15	0	0	0	4	3	1	8
	ヤマトヤブカ+フタクロホシチビカ	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
	ヤマトヤブカ+トウゴウヤブカ	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	ヤマダシマカ+オオクロヤブカ	1	3	0	0	0	2	6	0	2	0	0	0	1	3
	ヤマダシマカ+キンバラナガハシカ	1	1	0	1	4	0	7	1	0	0	1	3	0	5
	ヤマダシマカ+フタクロホシチビカ	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
	イエカ類+オオクロヤブカ	0	0	2	0	2	0	4	0	0	0	0	0	0	0
	イエカ類+キンバラナガハシカ	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0
	オオクロヤブカ+キンバラナガハシカ	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3種の蚊が同一地点で生息*	ヒトスジシマカ+ヤマトヤブカ+イエカ類	0	2	3	0	3	1	9	0	1	1	0	1	1	4
	ヒトスジシマカ+ヤマトヤブカ+オオクロヤブカ	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
	ヒトスジシマカ+ヤマトヤブカ+ヤマダシマカ	0	2	0	1	0	0	3	0	1	0	1	0	0	2
	ヤマトヤブカ+ヤマダシマカ+オオクロヤブカ	0	2	0	1	0	0	3	0	0	0	1	0	0	1
	ヤマトヤブカ+ヤマダシマカ+フタクロホシチビカ	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	ヤマトヤブカ+ヤマダシマカ+キンバラナガハシカ	0	0	0	1	4	0	5	0	0	0	1	0	0	1
	ヤマトヤブカ+イエカ類+キンバラナガハシカ	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	ヤマトヤブカ+イエカ類+オオクロヤブカ	0	0	2	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0
イエカ類+オオクロヤブカ+キンバラナガハシカ	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	

*：2種の蚊が同一地点で生息数の内数

表3 一般化線形混合モデルによるパラメータ選択結果

切片	パラメータ推定値			自由度	AIC	ΔAIC	ランダム効果(σ)
	1月平均気温	10.8℃を閾値とする有効積算温度	人口密度				
-19.71	0.779	0.0117	0.000329	224	209.6*	0.0	2.00
-20.79	0.713	0.0128		231	211.8	2.2	2.20
-14.34		0.0072	0.000278	225	219.9	10.3	2.60
-15.73		0.0084		232	220.6	11.0	2.83
-3.50	0.455		0.000459	225	222.2	12.6	2.21
-6.25			0.000437	226	223.7	14.1	5.04
-6.16	0.135			232	226.0	16.4	6.24
-11.34				233	244.2	34.6	23.69

*：AICがもっとも小さいパラメータの組み合わせのモデルを採用した

表4 ヒトスジシマカ生息条件の一般化線形混合モデルリング結果

パラメータ	偏回帰係数	標準誤差	標準化偏回帰係数	p
(切片)	(-19.71)	5.035		<0.001
1月平均気温	0.779	0.242	1.185	0.001
10.8℃を閾値とする有効積算温度	0.0117	0.00344	1.446	<0.001
人口密度	0.000329	0.000165	0.696	0.046

ブを図4に示す。

4. 考 察

2009～2014年に行った岩手県ほぼ全域にわたる蚊類の生息分布域調査結果から、岩手県内では内陸部から太平洋沿岸部にかけて広範囲にヒトスジシマカが生息していることが確認された。2000年までの調査⁶⁾では、ヒトスジシマカの生息分布域

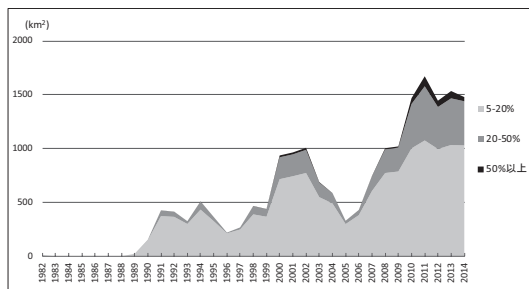


図3 岩手県におけるヒトスジシマカ生息確率別面積の年次推移(1982~2014)

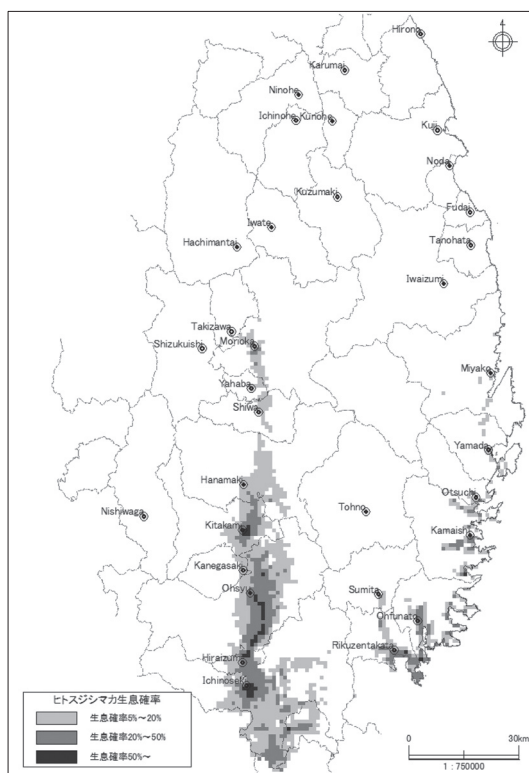


図4 ヒトスジシマカ生息ポテンシャルマップ(岩手県, 2014)

が年平均気温11℃以上の地域にほぼ限局しており、当時の解析では岩手県内では一関市周辺のみが分布可能な地域であり、実際の生息北限と一致していた。その後10年を経た調査の結果、北上盆地を中心に一関市から盛岡市まで同蚊の生息分布域が拡大していることが明らかとなった。この10年間で約100km 生息北限が北上したことになる。また、太平洋側沿岸部においても釜石市を除き大

船渡市から大槌町までの生息分布が明らかとなった。

ヒトスジシマカの生息北限について、2010年の調査における生息北限となった玉山区は盛岡市街地から北へ約20km に位置しており、寒冷的な地域である。同地点では2011年以降の調査でヒトスジシマカを確認できなかったことから、2010年におけるヒトスジシマカの発生は夏季の一時的なものであり、定着できなかったと推測される。2014年までの生息北限である盛岡市街地においては、1～3 km 程度離れた複数の地点(ヒトスジシマカ生息確率5～50%)において2～4年間連続してヒトスジシマカの生息が確認されたことから、これらの地点ではヒトスジシマカの卵の越冬が可能であり、すでに定着していることが示唆された。同地域内には JR 東北本線の主要ターミナル駅である盛岡駅などが位置しており、乗降客やバスの便も多い。蚊の繁殖期にはこれらの交通機関により広範囲に蚊が輸送され、生息分布域が拡大する一因になると考えられる。

ヒトスジシマカは庭のある住宅地や藪のある公園、林に隣接した墓地など、潜伏場所が散在する環境に生息しており、その移動範囲は最大で100～200m の範囲であると考えられる¹³⁾ことから、ヒトスジシマカの生息に影響する環境要因として、気温等の条件に加え新たに人口密度をパラメータとして統計モデリングを行い、岩手県におけるヒトスジシマカ生息ポテンシャルマップを作成した。これらの結果は、現在ヒトスジシマカの生息が確認されていない地域でも生息条件を具備した場合、定着リスクが高いことを示しており、今後同蚊の監視および防除体制を構築する際には、生息分布の現状を把握するだけでなく生息条件に関わる地理情報等を利用して、将来の分布の可能性を予測するなどの手法が有効であると考えられる。

ヒトスジシマカやヤマトヤブカは非生息地に侵入した際に在来種と種間競争を生じることが知られている^{1),14)}。今回の調査で、ヒトスジシマカが生息した地点においてヤマトヤブカがもっとも多く採集されたことから、在来主要種はヤマトヤブカであり、気温の上昇に伴うヒトスジシマカの分布拡大により種間競争が生じているものと考え

られ、今後同蚊の侵入・定着に生息条件がどのように影響するか調査する必要がある。

これらの結果から、ヒトスジシマカの生息分布域は地球規模での温暖化に伴い今後も引き続き拡大するものと考えられる。今回明らかとなったヒトスジシマカの生息ポテンシャルが高い地域においては、現在同蚊の生息が確認されていなくても、今後定着することが予測され、定期的なモニタリングが必要である。

謝 辞

ヒトスジシマカの生息条件の解析に用いた東北地方1 km メッシュ気温データは、農研機構東北農業研究センター菅野洋光先生のご厚意により利用することができた。ここに深謝する。この研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金(H21 新興一般-005およびH24 新興一般-007)および環境省の環境研究総合推進費(S-8)によって行われた。

—引用文献—

- 1) Andreadis T. G., Wolfe T. J.: Evidence for reduction of native mosquitoes with increased expansion of invasive *Ochlerotatus japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) in the northeastern United States. *J. Med. Entomol.*, **47**, 43-52, 2010
- 2) ECDC [European Centre for Disease Prevention and Control] TECHNICAL REPORT, Development of *Aedes albopictus* risk maps, p. v, European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, 2009
- 3) LaCasse W. J., Yamaguchi S.: Mosquito fauna of Japan and Korea, p. 57, Office of the Surgeon, United States, 1950
- 4) 上村清: 日本における衛生上重要な蚊の分布と生態, 衛生動物, **19**, 15-34, 1968
- 5) Kurihara T., Kobayashi M., Kosone T.: The northward expansion of *Aedes albopictus* distribution in Japan, *Med. Entomol. Zool.*, **48**, 73-77, 1997
- 6) Kobayashi M., Nihei N., Kurihara T.: Analysis of Northern Distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Japan by Geographical Information System, *J. Med. Entomol.*, **39**, 4-11, 2002
- 7) Kobayashi M., Komagata O., Nihei N.: Global Warming and Vector-borne Infectious Diseases, *J. Disaster Res.*, **3**, 105-112, 2008
- 8) 東京都蚊媒介感染症対策会議報告書, p. 1, 東京都蚊媒介感染症対策会議, 東京, 2014
- 9) 蚊媒介感染症に関する特定感染症予防指針, 厚生労働省告示第260号, p. 1, 厚生労働省, 東京, 2015
- 10) 菅野洋光: ヤマセ吹走時におけるメッシュ日平均気温の推定, 農業気象, **53**, 11-19, 1997
- 11) 平成17年国勢調査に関する地域メッシュ統計(世界測地系)(03岩手県), (財)統計情報研究開発センター(Sinfonica), 東京, 2010
- 12) 平成18年度事業所・企業統計調査に関する地域メッシュ統計(世界測地系)(03岩手県), (財)統計情報研究開発センター(Sinfonica), 東京, 2010
- 13) 小林陸生: チクングニヤ熱媒介蚊対策に関するガイドライン, H21厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業「節足動物が媒介する感染症への効果的な対策に関する総合的な研究」, p. 9, 国立感染症研究所, 東京, 2009
- 14) Juliano S. A., Lounibos L. P.: Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health, *Ecology Letters*, **8**, 558-574, 2005