

短報

へい死野鳥の農薬分析法について

藤巻照久, 佐藤久美子, 岸美智子

Analysis Method for Agricultural Chemicals which are Causes of Wild Bird's Death

Teruhisa FUJIMAKI, Kumiko SATO
and Michiko KISHI

はじめに

近年, 神奈川県内において野鳥の大量死や毒餌によると思われる不審死が相次いで発見された. このような事例に対して本県では平成14年度から地域住民の安全確保のためウエストナイル症を含めた感染症関連検査, 消化器官内容物の毒性検査及び農薬を含めた理化学検査を当所で定めたマニュアルに従って, 検体搬入時から一連の作業を行っている. まず, 搬入された検体は外観の観察と放射能測定を行う. ついで安全キャビネット内で検体解剖を行い, 感染症の危険性の有無を目視で確認する. 臓器を摘出し, 消化器官内容物を採取した後, 所内で検査方針の検討がなされ, 必要に応じ感染症検査, 毒性検査及び理化学検査が実施される.

今回, 平成14年度に起きた野鳥不審死の原因究明のため, 実際に行った農薬分析について報告する.

方 法

1 試 料

添加回収実験用として横浜市内のスーパーマーケットで購入した鶏肉

- (1) 平成14年10月3日, 県立保土ヶ谷公園内で死亡したハト2羽のそ嚢, 筋胃内容物及び付近に散乱していたペットフード
- (2) 平成14年10月15日, 綾瀬市本蓼川墓園で発生した大量死のカラス2羽の消化管内容物及び肝臓
- (3) 平成15年2月6日, 横浜市神奈川区齊藤分町付近で死亡したヒヨドリ, ツグミ各1羽の筋胃内容物及び吐物様物質

2 試 薬

農薬標準品: ジクロロボス (DDVP), エトプロホス, ダイアジノン, クロルピリホスメチル, トルクロホス

メチル, フェニトロチオン, マラチオン, フェンチオン, パラチオン, フェントエート, メチダチオン, プロチオホス, フェンスルホチオン, エディフェンホス, EPN, ホサロン, チオメトン, テルブホス, エチルチオメトン, メチルパラチオン, ピリミホスメチル, クロルピリホスメチル, ホスチアゼート, α -クロルフェンビンホス (α -CVP), β -クロルフェンビンホス (β -CVP), キナルホス, ブタミドホス, エチオン, ピリダフェンチオン, ピラクロホス, シアノホス (以上, 有機リン系農薬)

α -BHC, β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, デイルドリン, pp'-DDE, op'-DDD, pp'-DDD, op'-DDT, pp'-DDT, シハロメトリン, ベルメトリン, シベルメトリン, デルタメトリン, ヘプタクロール, α -エンドスルファン, β -エンドスルファン, エンドスルファンスルフェート, フルシトリネート, フルバリネート (以上, 有機塩素系及びピレスロイド系農薬)

エプタム (EPTC), イソプロカルブ, クロロプロファム, ピリミカーブ, メトリブジン, アラクロール, エスプロカルブ, トリアジメホン, ピリフェノックスZ, キノメチオネート, ピリフェノックスE, フルトラニル, ミクロブタニル, メプロニル, プロピコナゾール, ジフルフェニカン, ピリブチカルブ, テブフェンピラド, メフェナセット, ビテルタノール, ジフェノコナゾール, チオベンカルブ, ベンディメタリン, トリアジメノール, パクロブタノール, ヘキサコナゾール, フルシラゾール, シプロコナゾール, レナシル, テニクロール, ピリダベン (以上, 含窒素系農薬) は, 和光純薬工業 (株) 及び林純薬工業 (株) 製の残留農薬試験用標準試薬を用いた.

その他の試薬: 残留農薬試験用又はそれに相当する試薬を用いた.

Sep-Pak フロリジルカートリッジカラム: Waters 社製

有機リン系農薬混合液A: DDVP, エトプロホス, ダイアジノン, クロルピリホスメチル, トルクロホスメチル, フェニトロチオン, マラチオン, フェンチオン, パラチオン, フェントエート, メチダチオン, プロチオホス, フェンスルホチオン, エディフェンホス, EPN, ホサロンを各々 $10 \mu\text{g/mL}$ の濃度となるようアセトンで調製した.

有機リン系農薬混合液B: チオメトン, テルブホス, エチルチオメトン, メチルパラチオン, ピリミホスメチル, クロルピリホスメチル, ホスチアゼート, α -CVP, β -CVP, キナルホス, ブタミドホス, エチオン, ピリダフェンチオン, ピラクロホスを各々 $10 \mu\text{g/mL}$ の濃度となるようアセトンで調製した.

シアノホスは $10 \mu\text{g/mL}$ の濃度となるようアセトンで調製した.

有機塩素系・ピレスロイド系農薬混合液A: α -BHC,

β -BHC, γ -BHC, δ -BHC, デイルドリン, pp'-DDE, op'-DDD, pp'-DDD, op'-DDT, pp'-DDT, シハロメトリン, ペルメトリン, シペルメトリン, デルタメトリンを各々 10 μ g/mLの濃度となるようアセトンで調製した。

有機塩素系・ピレスロイド系農薬混合液B：ヘプタクロール, α -エンドスルファン, β -エンドスルファン, エンドスルファンスルフェート, フルシトリネート, フルバリネートを各々 10 μ g/mLの濃度となるようアセトンで調製した。

含窒素系農薬混合液A：EPTC, イソプロカルブ, クロプロフロアム, ピリミカーブ, メトリブジン, アラクロール, エスプロカルブ, トリアジメホン, ピリフェノックスZ, キノメチオネート, ピリフェノックスE, フルトラニル, ミクロブタニル, メプロニル, プロピコナゾール, ジフルフェニカン, ピリブチカルブ, テブフェンピラド, メフェナセット, ビテルタノール, ジフェノコナゾールを各々 10 μ g/mLの濃度となるようアセトンで調製した。

含窒素系農薬混合液B：チオベンカルブ, ベンダイメタリン, トリアジメノール, パクロブタノール, ヘキサコナゾール, フルシラゾール, シプロコナゾール, レナシル, テニクロール, ピリダベンを各々 10 μ g/mLの濃度となるようアセトンで調製した。

3 分析法

3・1 試料の調製法

試料の調製法を図1に示す。

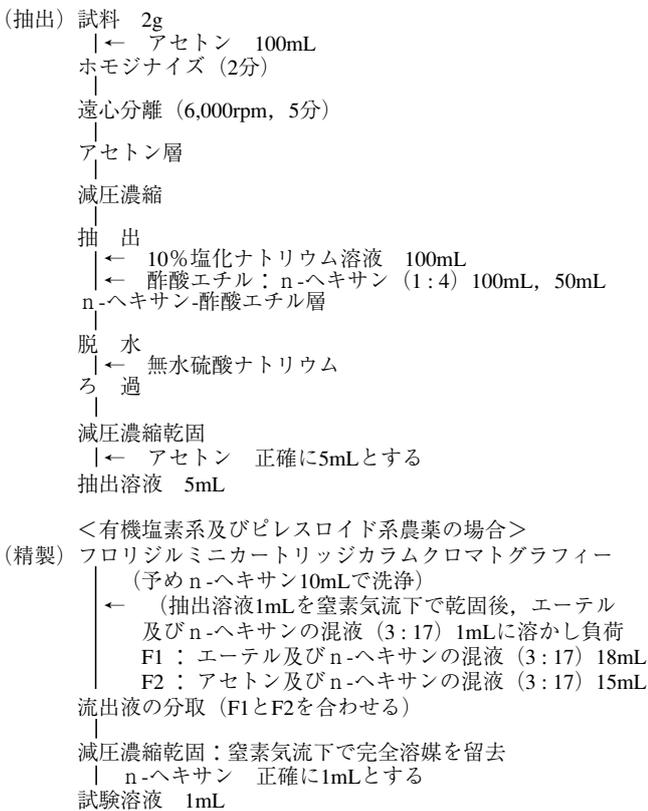


図1 へい死野鳥等試料の調製法

3・2 定性及び定量試験

有機リン系農薬については炎光光度計型検出器付きクロマトグラフ (以下GC-FPDとする) を用いた。

装置：島津製作所製GC-2010i

カラム：J&W社製DB-5

(内径0.25mm, 長さ30m, 膜厚0.25 μ m)

注入口温度：220℃ 検出器温度：280℃

カラム温度：50℃ (2分) - 15℃昇温/分 - 180℃ (2分) - 4℃昇温/分 - 240℃ (2分) - 20℃昇温/分 - 280℃ (10分)

キャリアーガス (He) : 2.4mL/分

注入方式：スプリットレス法 注入量：2 μ L

装置：アジレント社製 HP-6890

カラム：J&W社製DB-5

(内径0.25mm, 長さ30m, 膜厚0.25 μ m)

注入口温度：235℃ 検出器温度：250℃

カラム温度：60℃ (2分) - 30℃昇温/分 - 180℃ (0分) - 5℃昇温/分 - 230℃ (12分)

キャリアーガス (He) : 1.2mL/分

注入方式：スプリットレス法 注入量：2 μ L

有機塩素系及びピレスロイド系農薬については電子捕獲型検出器付きクロマトグラフ (以下GC-ECDとする) を用いた。

装置：アジレント社製 HP-6890

カラム：J&W社製DB-5

(内径0.25mm, 長さ30m, 膜厚0.25 μ m)

注入口温度：220℃ 検出器温度：280℃

カラム温度：50℃ (2分) - 20℃昇温/分 - 280℃ (10分)

キャリアーガス (He) : 1.2mL/分

注入方式：スプリットレス法 注入量：2 μ L

含窒素系農薬については熱アルカリ型検出器付きガスクロマトグラフ (以下GC-FTDとする) を用いた。

装置：島津製作所製GC-17A

カラム：J&W社製DB-5

(内径0.25mm, 長さ30m, 膜厚0.25 μ m)

注入口温度：220℃ 検出器温度：280℃

カラム温度：50℃ (2分) - 15℃昇温/分 - 180℃ (2分) - 4℃昇温/分 - 240℃ (2分) - 20℃昇温/分 - 280℃ (10分)

キャリアーガス (He) : 2.4mL/分

注入方式：スプリットレス法 注入量：2 μ L

各々, ピーク面積法, 絶対検量線法により測定を行った。定量下限値 (S/N \geq 10) は試料濃度で1 μ g/gとした。

3・3 確認試験

ガスクロマトグラフ質量分析計 (以下GC/MSとする) を用いて確認を行った。

装置：

ガスクロマトグラフ アジレント社製 HP-6890

質量分析計 日本電子社製 Automass150

カラム：J&W社製DB-5

(内径0.25mm, 長さ30m, 膜厚0.25 μm)

カラム温度：50℃(1分) - 20℃昇温/分 - 280℃(5分)

注入口温度：220℃

インターフェイス温度：250℃

イオン源温度：200℃

イオン化電圧：70eV

キャリアーガス (He) : 1.2mL/分

注入方式：スプリットレス法 注入量：2 μL

4 添加回収試験

細切均一化した添加回収用鶏肉2gに対して各々標準溶液10 $\mu\text{g/mL}$ を1mL添加した。

結果及び考察

鶏肉を用いた添加回収実験の結果及びガスクロマトグラムの保持時間は表1に示した。保持時間の近接したピークの重なりを避けるため、有機リン系農薬、有機塩素系・ピレスロイド系農薬及び含窒素系農薬は各々、標準溶液を混合溶液A及びBに分けた。表1に示した回収率は有機リン系農薬で61.2～158.6%，有機塩素系・ピレ

スロイド系農薬で47.9～117.9%，含窒素系農薬で25.3～121.8%であった。野鳥へい死の原因農薬の検体濃度は、数十～数百 $\mu\text{g/g}$ が想定されるため野鳥不審死等の危機管理におけるスクリーニング試験を行う場合は、本分析法で大きな問題はないと考える。

(1) 県立保土ヶ谷公園管理事務所から発見されたハトは、嘔吐を繰り返し、唾液を口から流して死亡したという情報が提供された。また、急性毒性試験の結果、ペットフードの試験溶液においてマウスにアセチルコリン様中毒症状の発現及び死亡例が認められたため有機リン系農薬が原因物質であることが疑われた。ハトから採取した筋胃内容物、そ嚢内容物(パンくず、ペットフード)、現場より採取したペットフードを検体として有機リン系農薬の分析を行った結果、いずれからも有機リン系農薬のDDVPと同じ保持時間にピークが認められた。分析値の詳細は表2にまとめた。GC-FPDクロマトグラムは図2に示した。GC/MSによる確認試験の結果、いずれの試験溶液からもDDVP標準品溶液と同じ保持時間に同様のマススペクトルが検出され、DDVPであることが確認された。濃度の低いハトA筋胃内容物から得られた抽出溶液のトータルイオンクロマトグラム(TIC)及びマススペクトルを図3に示した。

表1 鶏肉における農薬の添加回収実験結果及びガスクロマトグラムの保持時間

有機リン系農薬※1			有機塩素系・ピレスロイド系農薬			含窒素系農薬		
農薬名	保持時間(分)	回収率(%)	農薬名	保持時間(分)	回収率(%)	農薬名	保持時間(分)	回収率(%)
DDVP	5.82	86.5	α -BHC	7.21	47.9	EPTC	9.97	29.5
エトプロホス	8.03	87.4	β -BHC	7.62	65.4	イソプロカルブ	11.82	31.6
ダイアジノン	9.43	82.8	γ -BHC	7.73	54.9	クロルプロファミン	13.31	107.5
クロルピリホスメチル	10.43	93.1	δ -BHC	8.13	67.5	ピリミカール	16.56	36.8
トリクロホスメチル	10.53	85.5	pp'-DDE、デイルドリン※2	12.34	117.9	メトリブジン	17.09	48.5
フェントロチオン	11.04	99.3	op'-DDD	12.57	85.7	アラクロール	17.62	104.6
マラチオン	11.29	106.1	pp'-DDD	13.54	81.0	エスプロカルブ	18.49	52.4
フェンチオン	11.50	97.1	op'-DDT	13.63	72.6	トリアジメホン	19.31	96.6
パラチオン	11.57	89.0	pp'-DDT	14.83	111.5	ピリフェノックスZ	20.57	115.3
フェントエート	12.70	102.2	シハロトリン	20.56,21.19	82.6	キノメチオネート	21.26	76.9
メチダチオン	13.04	121.7	ペルメトリン	23.06,23.45	88.8	ピリフェノックスE	21.60	117.0
プロチオホス	13.85	72.6	シベルメトリン	25.54,25.81,25.97,26.09	93.1	フルトラニル	23.18	109.5
フェンスルホチン	15.11	94.1	デルタメトリン	28.85,29.30	94.8	マイクロプタニル	25.15	81.4
エディフェンホス	16.16	158.6	ヘプタクロル	9.06	66.8	メプロニル	25.91	110.6
EPN	18.31	90.9	α -エンドスルファン	11.65	59.5	プロピコナゾール	26.17	116.9
ホサロン	19.98	113.1	β -エンドスルファン	13.20	68.2	ジフルフェニカン	26.99	77.5
チオメトン	8.70	61.2	エンドスルファンスルフェイト	14.60	30.4	ピリブチカルブ	27.67	80.7
テルブホス	9.25	82.8	フルシトリネート	26.14,26.32,26.64	91.3	テブフェンピラド	28.89	109.4
エチルチオメトン	9.55	62.5	フルバリネート	28.24,28.42	93.6	メフェナセツト	30.31	121.8
メチルパラチオン	10.42	104.7				ビテルタノール	31.81,31.96	88.5
ピリミホスメチル	11.08	89.1				ジフェノコナゾール	36.05,36.20	99.0
クロルピリホスメチル	11.55	86.4				チオベンカルブ	18.74	91.1
ホスチアゼート	11.97,12.04	144.6				ベンディメタリン	20.41	43.5
α -CVP	12.30	96.0				トリアジメノール	20.95	94.8
β -CVP	12.61	93.9				バクプロタゾール	21.63	96.9
ブタミドホス	13.69	91.8				ヘキサコナゾール	22.41	104.3
エチオン	15.45	94.6				フルシラゾール	23.32	68.4
ピリダフェンチオン	18.12	99.0				シプロコナゾール	23.74	70.0
ピラクロホス	22.63	136.2				レナシル	26.11	25.3
シアノホス	9.25	102.5				テニクロール	26.61	101.0
						ピリダベン	32.11	80.7

※1：有機リン系農薬の保持時間と添加回収率の測定はアジレント社のHP6890を用いた。

※2：pp'-DDE、デイルドリンはピークが重なったため合算した総量から回収率を算出した。

表2 ヘイ死野鳥の消化管内容物及び臓器等の分析結果

検体採取試料	試料量 (g)	分析使用量 (g)	検出成分名	分析値 (μg/g)	総検出量 (μg)
ハトA筋胃内容物	4.00	1.27		333	1330
ハトBそ嚢内容物	10.20	3.40		—	16980
パン屑	7.86	2.02	DDVP	1013	7960
ペットフード	2.34	1.38		3855	9020
ペットフード	—	2.00		5078	—
カラスA筋胃内容物	1.20	1.20	不検出	—	—
カラスA腸管内容物	4.12	2.11	不検出	—	—
カラスA肝臓	4.30	2.20	不検出	—	—
カラスB筋胃内容物	0.60	0.60	不検出	—	—
カラスB腸管内容物	3.03	1.51	不検出	—	—
カラスB肝臓	4.80	2.18	不検出	—	—
ヒヨドリ筋胃内容物	1.47	1.47		70	103
ツグミ筋胃内容物	0.60	0.60	シアノホス	319	191
吐物様物質	1.05	1.05		5	5

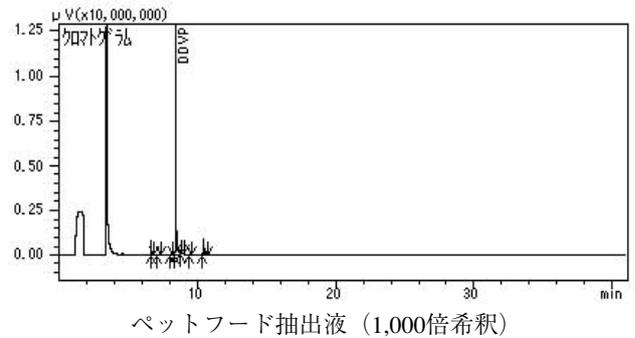
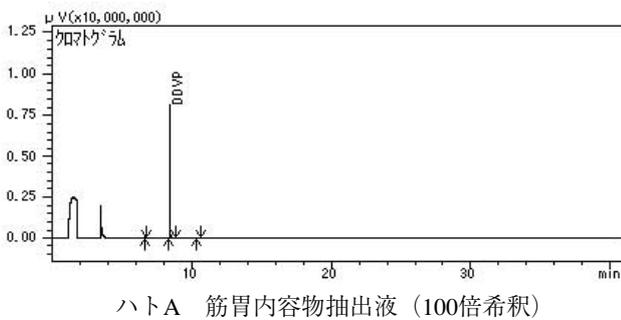
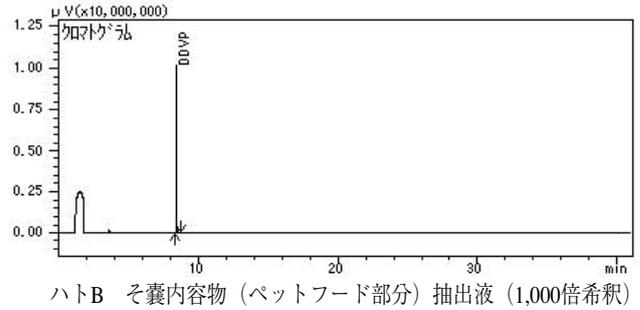
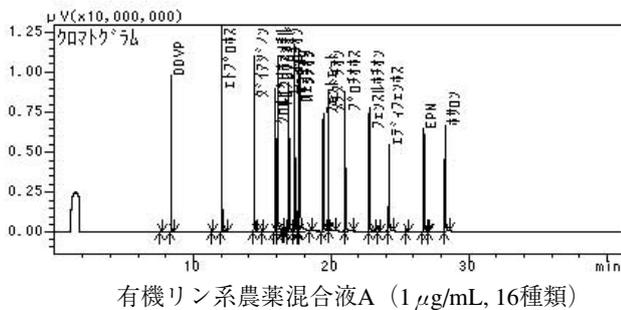
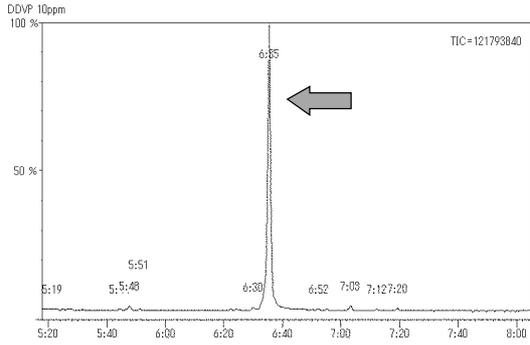


図2 ハトの消化管内容物及びペットフード抽出液のGC-FPDクロマトグラム

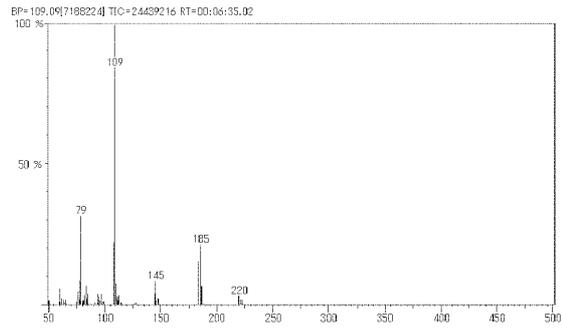
一般的に有機リン化合物の毒性は、ほ乳類よりも鳥類に対して強いことが知られている。今回、検出されたDDVPの量から体重263.4gのハトBのそ嚢中含有量を体重(kg)あたりで算出すると約64.5mg/kgとなる。DDVPの鳥類(ウズラ)に対する急性毒性値24mg/kg²⁾であることから、本検体のそ嚢内容物中のDDVP量は致死量に達していた。また、ペットフードから約5mg/gのDDVPが検出されたことから、約300gのハトがこの餌を約1.5g食べると、致死量のDDVPを摂取することになる。また、イヌやネコに対する急性毒性値

は不明であるが、ラットの急性毒性値が56~140mg/kg³⁾を参考にすると、このペットフードを体重10kgのイヌが食べたとして致死量に至るには約300g以上、摂食する必要がある。付近に散乱していたペットフードの餌を摂食した場合は死亡に至らなくとも何らかの被害があると思われるため、注意が必要であると考えられる。

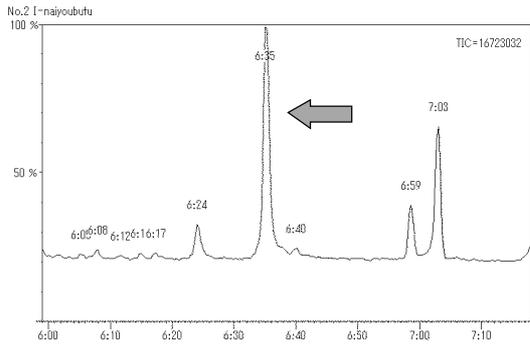
(2) カラスA, Bの筋胃内容物, 腸管内容物及び肝臓について有機リン系農薬30種類, 有機塩素系・ピレスロイド系農薬20種類, 含窒素系農薬31種類の合計81



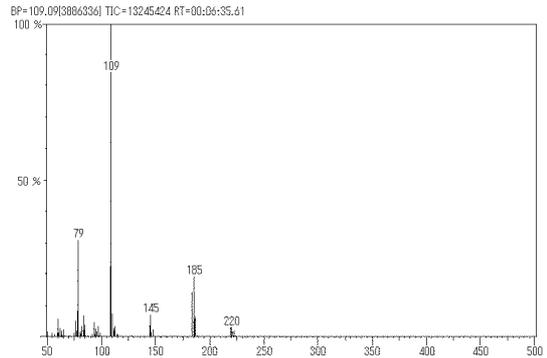
DDVP (1 μg/mL) のトータルイオンクロマトグラム (TIC)



DDVP (1 μg/mL) のマススペクトルグラム

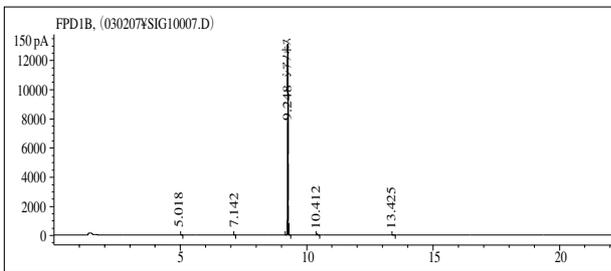


ハトA筋胃内容物のTIC

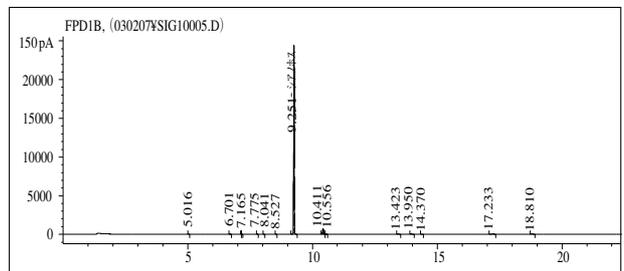


ハトA筋胃内容物のマススペクトル

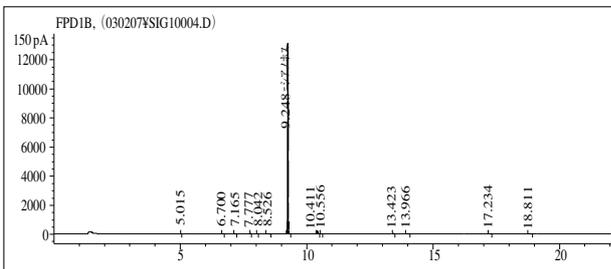
図3 ハトのA筋胃内容物のTIC及びマススペクトルグラム



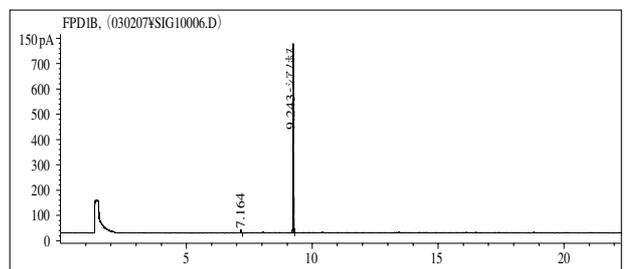
有機リン系農薬シアノホス標準溶液 (1 μg/mL)



ツグミ筋胃内容物抽出液 (100倍希釈)



ヒヨドリ筋胃内容物抽出液 (100倍希釈)



吐物様物質抽出液 (100倍希釈)

図4 ヒヨドリ、ツグミ筋胃内容物及び吐物様物質抽出液のGC-FPDクロマトグラム

種類の農薬を分析したが、すべて不検出であった。

(3) 剖検の結果、ヒヨドリ、ツグミともに臓器の色調は良好で死後変化がほとんどなく、死亡直前まで健康体

であることが窺えた。そのため感染症等の可能性がないと思われることから毒物による中毒死を想定した。試料調製法 (図1) に従い、筋胃内容物及び吐物様物

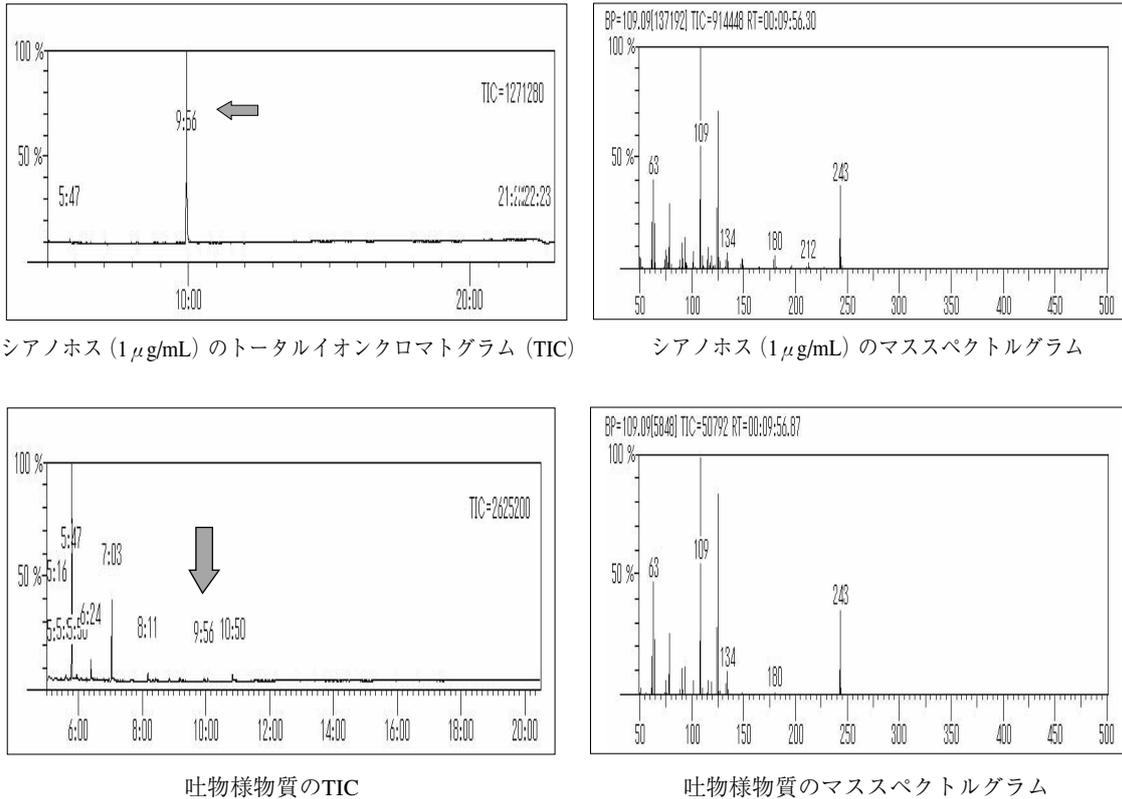


図5 吐物様物質抽出液のTIC及びマススペクトルグラム

質の抽出を行った。有機リン系農薬30種について検討したところ、いずれの抽出液からも標準品のシアノホスと同じ保持時間にピークが認められた(図4)。分析値の詳細は表2にまとめた。検出されたこれらのピークはGC/MSでによりシアノホスであることを確認した。濃度の低い吐物様物質から得られた抽出溶液のトータルイオンクロマトグラム(TIC)及びマススペクトルを図5に示した。

シアノホスは一般的に果樹、アブラナ科野菜、マメ科作物の害虫防除に使用される¹⁾。通常の使用法³⁾は40%水和剤を使用した場合、1000倍希釈液(400 µg/mL)を作製し、その1L(400 µg/mL × 1000mL = 400mg)を10m²に散布する。散布された場合の単位面積当たりの量は400mg/10m² = 40000 µg/10000cm² = 4 µg/cm²であるから農産物の表面積1平方センチメートル当たり4 µgのシアノホスが付着している。仮に野鳥が1gの農産物を食べる場合に1平方センチメートルの表面積を深さ1cmまで食べたと仮定しても4 µgの摂取量となる。表2から胃内総検出量(胃内残存量)がヒヨドリで103 µg、ツグミで191 µgであった。このことから今回の野鳥の不審死が自然の状態では農産物を摂取した結果、農産物表面に付着した農薬で死亡したとは想定しにくい。また、冬季の農薬の散布は考

えにくい。以上のことからヒヨドリとツグミの死因はシアノホスの毒餌等による中毒死の可能性が極めて高いと考える。

まとめ

平成14年度に起きた野鳥不審死原因究明のため、実際に行った農薬の分析結果を報告したが、原因が特定できた事例は3例中2例であった。2例に共通していることは、筋胃内容物の濃度が極めて高く、分析装置で測定する際に希釈する必要があった。さらに死亡した野鳥は、いずれも外傷がなく、急性中毒死は短時間に起きたため死亡直前まで健康体であったことが容易に想像された。

また、今回の事例から野鳥の不審死等の原因究明において本法が農薬分析に適用可能であることがわかった。

(平成15年8月14日受理)

文献

- 1) 上路雅子, 小林裕子, 中村幸二編: 2002年度版残留農薬分析法, ソフトサイエンス社(2001)
- 2) Tomlin, C.D.S.: The Pesticide Manual 12th Ed., British Crop Protection Council, Farnham(2000)
- 3) 農薬ハンドブック2001年版, 社団法人日本植物防疫協会(2001)