

2. 和食川での魚類へい死事案調査結果 —分析手法の検討を中心として—

西山泰彦

Mass fish death accident by the agricultural chemical in the Wajiki-gawa River

Yasuhiko Nishiyama

【要旨】 2011（平成23）年11月，安芸郡芸西村を流れる和食川で発生した魚類へい死事案について，分析化学的手法により原因物質と考えられる農薬（トルフェンピラド）を特定できた．この農薬は登録が2002（平成14）年と比較的新しいが魚毒性が高く，公共用水域周辺での使用については注意が必要と考えられる．

分析を試みたところGC/MS法では河川水から確認できたが，へい死魚は比較的小さかったことからコレステロールの妨害が大きく確認が困難だった．

Key words：魚類へい死，農薬，トルフェンピラド，GC/MS，マスフラグメント，経時変化

1. はじめに

県内河川では，毎年魚類へい死事案が報告されており，なんらかの農薬や毒性のある物質が原因ではないかと考えられるものも多い．発生事案については，福祉保健所・主管課を経由して，原因物質が特定できないかといった検査依頼が持ち込まれる．

このような場合，魚毒性物質は不特定・多種類存在するため，速やかな試料採取と分析化学的労力が求められる．

今回，へい死魚数が多かった事案で原因と考えられる物質を特定することができたので報告する．



図1 本川でのへい死状況（安芸土木事務所撮影）

2. 事案の概要

2.1 現場での初動

平成23年11月17日昼頃，安芸郡芸西村を流れる2級河川和食川（流域面積22.77 km²，流路延長6.3km）で大量の小魚が河川一面に浮いているとの報告が村教育委員会・村役場から福祉保健所に入り，所轄する立場から福祉保健所・土木事務所が，河川水の採取とへい死魚の回収をおこなった．へい死魚の状態を図1に示した．

各種証言を総合すると，へい死事故が発生し始めてから試料採取までに2時間弱経過しているのではないかと考えられる．

2.2 へい死魚の状況

回収されたへい死魚の一部を図2-1～2-3に，観察結果を表1-1に示した．また，高知県内水面漁業センターでの光学顕微鏡を使った解剖・魚病検査の結果を表1-2に引用した．へい死魚はほとんどがオイカワ（*Zacco platypus*）であり，一部カワムツ（*Nipponocypris temminckii*）が混じっていた。⁴⁾

現場からは目視で1万匹以上へい死しているとみられるとの報告があり，魚毒性の高い農薬，毒劇物や有害物質など急性毒性が高いものが原因と考えられた．



図2-1 へい死魚の一部（安芸福祉保健所撮影）



図2-2 へい死魚（比較的大きい個体）



図2-3 へい死魚（比較的小さい個体）

表1-1 へい死魚観察結果（目視）

観察部位	観察ポイント	結果
体表	色	変化なし
	粘液	変化なし
	硬直化	なし
眼球	色	透明・変化なし
出血	エラ	確認できず
	ヒレ	確認できず

表1-2 へい死魚魚病検査等結果⁴⁾

検査部位		結果
出血	内臓	確認されず(200倍)
	エラ	確認されず(200倍)
うっ血	2次鰓弁	血液確認できず(200倍)
	入鰓動脈	血液確認(200倍)
	出鰓動脈	血液確認(200倍)
消化管	へい死時期確認	未消化内容物残存
病原菌	メレンブル染色法	確認されず
	TSA培地	検出されず

2.3 試料採取地点の概況

試料採水地点を図3-1, 概況を図3-2に示した。採水は, 5地点(流入側溝1地点, 本川4地点)でおこない, へい死魚は地点③周辺で回収したものを検査に使用した。なお, 河川水からは通常の範囲の溶存酸素濃度が確認された。

図3-2に示したとおり, 事案発生当日は, 幅6m, 長さ52mの溜まり水の部分にしか河川水が残っていなかった。水深は0.1~0.2mであり, 滞水量は31.2~62.4m³と算出された。

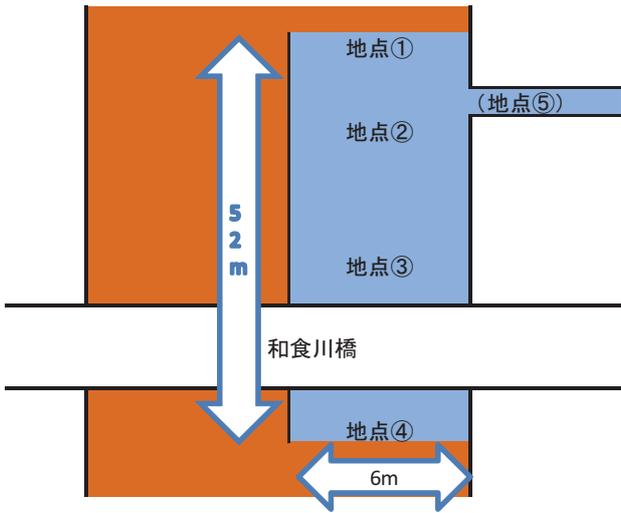


図3-1 採水地点位置関係図



図3-2 へい死地点状況図 (安芸土木事務所撮影)

3. 分析手法

原因を特定するため、河川水とへい死魚のエラ周辺から有機成分を抽出し、GC-MSでスクリーニングする方法を用いた。河川水からの抽出手順を図4に、へい死魚からの抽出手順を図5に示した。この抽出法は既報²⁾を参考としたものである。

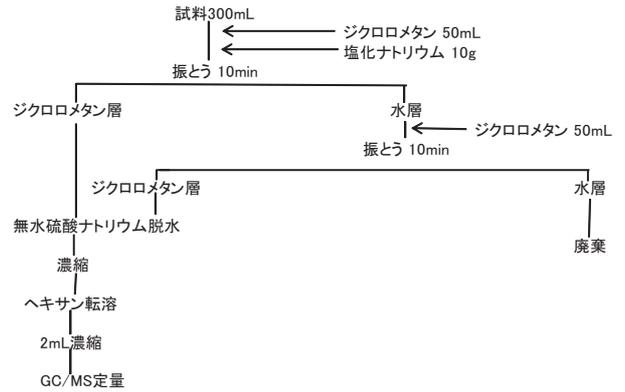


図4 河川水検査手順

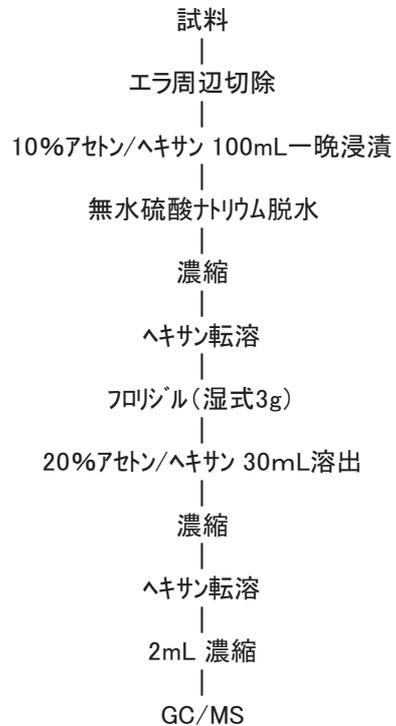


図5 へい死魚検査手順

また、GC-MSは、ガスクロマトグラフ部 (Agilent Technologies社製6890N)、質量分析装置部 (日本電子社製JMS K-9)、データ処理部 (日本電子社製) を使用した。質量数の検索範囲は30から500までとした。

カラムはDB-5MS (Agilent Technologies社製) を使用した。カラム長30m, カラム径0.25mm, 被服厚さ0.25 μ mのものを使用し、スプレットレス法を用いた。

昇温条件は、表2の方法を試みた。

表2 GC-MS昇温条件

昇温条件①:農薬一斉分析				
(25°C/min)	(4°C/min)	(25°C/min)	(2°C/min)	(15°C/min)
50°C(2min) →	125°C →	133°C →	158°C →	184°C → 280°C(2min)
昇温条件②:トルフェンピラド				
(20°C/min)	(15°C/min)			
80°C (1min) →	180°C →	300°C(5min)		

4. 測定結果

4.1 昇温条件①での調査結果

昇温条件①で得られたクロマトグラムを図6に示した。

この条件では殺菌剤系農薬のプロシミドンが検出された(図7)。プロシミドンの魚毒性はA, コイ (*Cyprinus carpio*) に対するLC₅₀ (半数致死濃度) は10mg/L (96h) 以上と報告されており魚毒性は低い。³⁾

簡易定量をおこなったところ0.1mg/L程度であり主原因と考えられなかった。他のピークも詳細に検討したが、これ以外の農薬等の成分は確認できなかった。

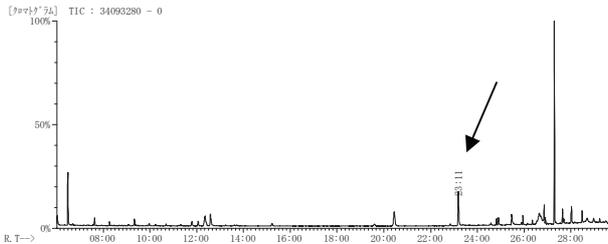


図6 地点④のクロマトグラム

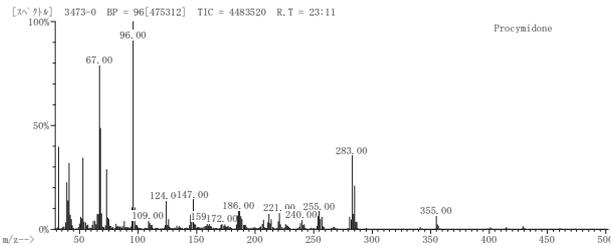


図7 プロシミドン同定結果

4.2 昇温条件②での調査結果

図1に示したとおり河川に生息していた小魚は短時間にほぼ死滅していると考えられ、原因物質はきわめて魚毒性が高いと推定された。

次の候補として魚毒性が高い登録農薬 (魚毒性C相当), あるいは登録失効農薬を中心に探索してみることにした。

芸西村と隣接する安芸市では数年にわたり秋季を中心に魚類へい死事案が散発していたが、平成22年度に殺虫剤系のトルフェンピラド含有農薬と特定された。²⁾ この時は昇温条件①で、ナフタレン化合物が主要成分として検出され、乳剤系農薬を中心に探索を進め、原因を特定できた。

今回、図6のクロマトグラムを解析したがナフタレン化合物は検出されず安芸市でのへい死事故とは使用されている薬剤が違うと考えられた。

ただ、農薬は乳剤だけでなく、水和剤(フロアブル)もあり、事案の発生時期や地域が重なり、農薬使用量が増えているとみられることから原因物質の第1候補として検討してみることにした。

まず、トルフェンピラドの標準物質(残留農薬試験用・和光純薬社製)を用い保持時間を求めた。得られたクロマトグラムを図8に示した。このことから、16:05のピークと特定した。

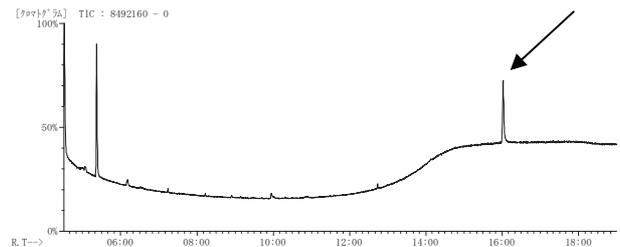


図8 トルフェンピラド標準液クロマトグラム

次に得られたクロマトグラムから16:05のピークのマススペクトルを検討してみることにした。

検討は、本川で最も原因物質が高濃度にあると考えられた地点④とした。得られたクロマトグラムを図9に示した。

16:05のマススペクトルを図10に示したが、質量数383のところに分子イオンではないかと考えられるピークが確認でき、これはトルフェンピラドのモノアイソトピック質量383.1401と一致する。

マススペクトルを検索すると、βカロテンに最も近いと判定されたが、図10では強度の高い444のピークは確認できない。

このことから、16:05のピークはトルフェンピラドの可能性がないか再確認をおこなった。

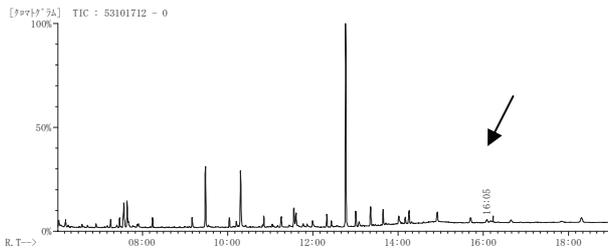


図9 地点④のクロマトグラム

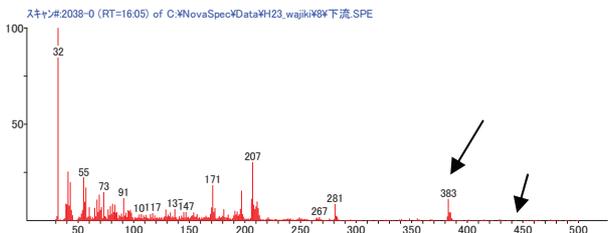


図10 16:05のマススペクトル

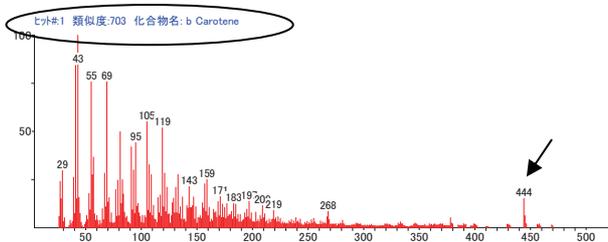


図11 マススペクトル同定結果

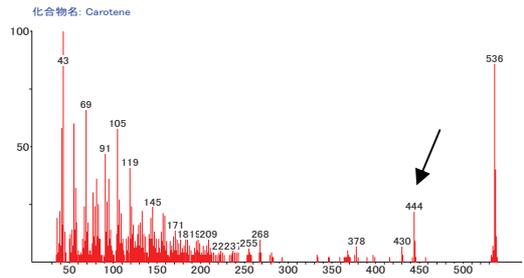


図12 βカロテン標準マススペクトル

4.3 各質量別経時変化モニタリング

4.3.1 地点④の各質量別マクロマトグラム

データベースに登録されているトルフェンピラド標準マススペクトルを図13に示した。ピーク強度は質量数171, 197, 383, 211, 181の順番であった。

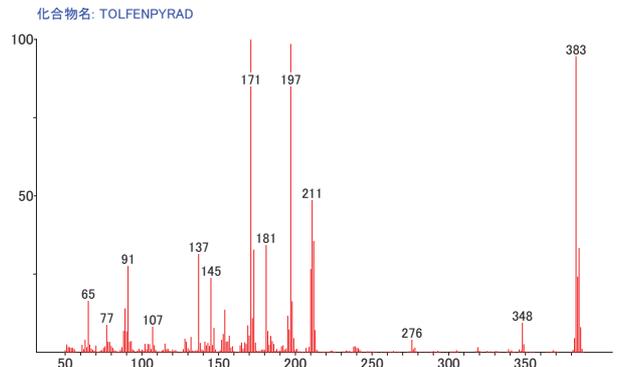


図13 トルフェンピラド標準マススペクトル

このことから各質量数の経時変化をモニタリングすることとした。その結果を図14に示した。ピーク保持時間は完全に一致しておりピークはトルフェンピラドと推定された。このため手作業で16:05付近のマススペクトルを丹念に解析した結果を図15に示した。これを標準マススペクトル(図13)と比較すると一致していると考えることができた。

同定がうまくいかなかった原因について調査したところ、標準物質を使った検討では、低濃度になるとデータベースによる同定が難しくなることが確認された。トルフェンピラドが低濃度になると分子イオンピークは低くなる傾向が認められ(図10)、自動検索では強度比による判定で棄却されたのではないかと考えられる。このため、低濃度のマススペクトルパターンを新たにデータベース登録することによりこの問題は解消されることが考えられる。

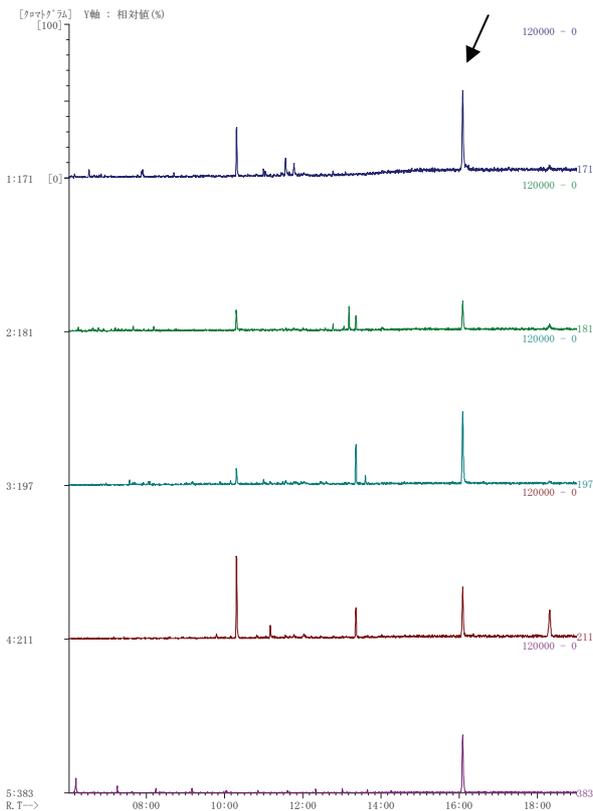


図14 地点④各質量別マスクロマトグラム

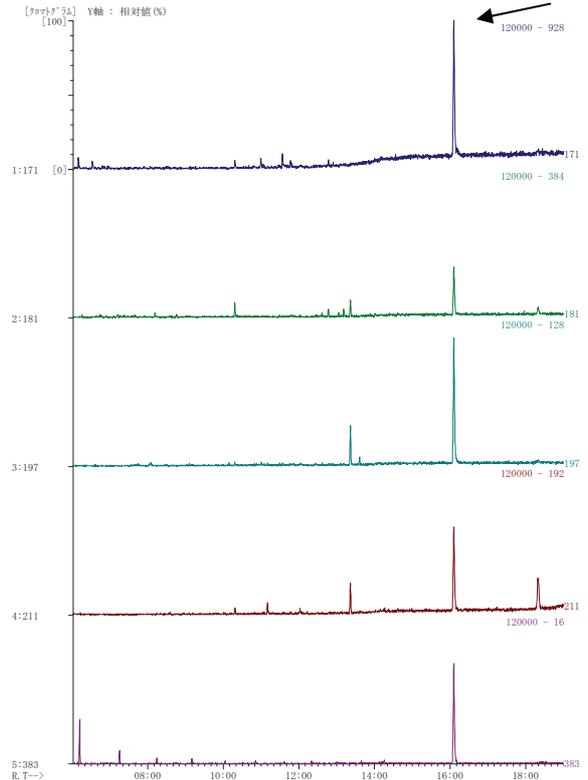


図16 地点⑤各質量別マスクロマトグラム

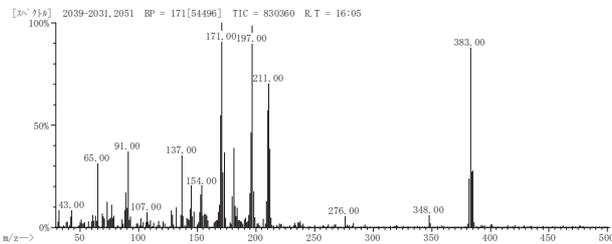


図15 16:05マススペクトル

4.3.2 地点①～③, ⑤の各質量別マスクロマトグラム

地点①～③の各質量数経時変化を図17～19に、地点⑤の経時変化を図16に示した。地点①～③は縦軸をイオン強度100000, より濃度の高い地点④, ⑤はイオン強度120000で規格化した。

ピーク高さから側溝である地点⑤の濃度が最も高く、本川では、最下流の地点④が最も濃度が高いことが確認できた。また、地点②, ③でもピークは確認できた。最上流地点①でも微小なピークが確認でき微量なトルフェンピラドが拡散していると考えられた。

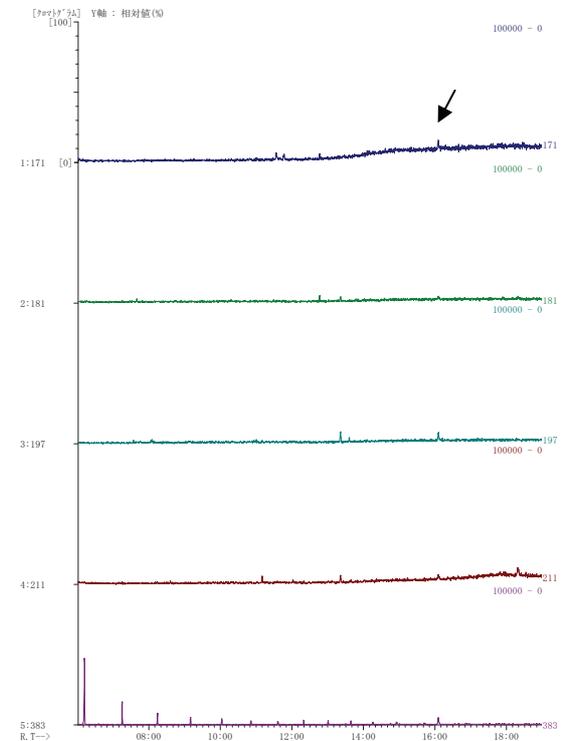


図17 地点①各質量別マスクロマトグラム

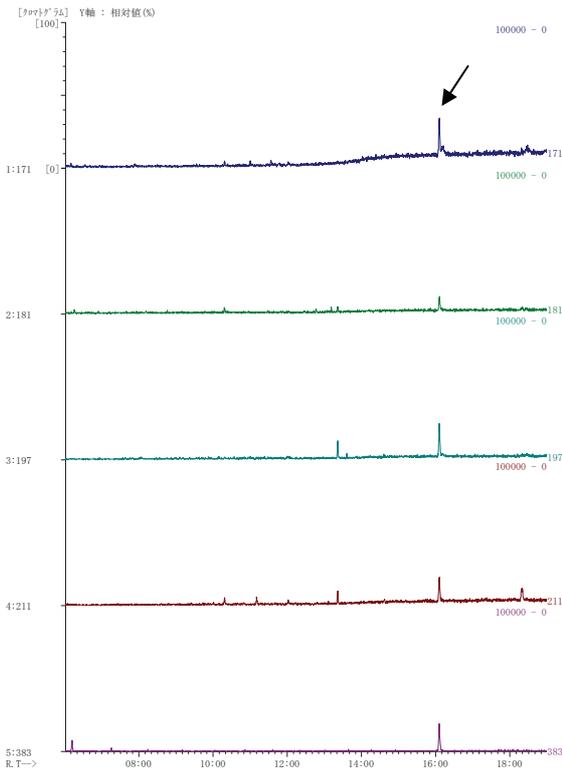


図18 地点②各質量別マスクロマトグラム

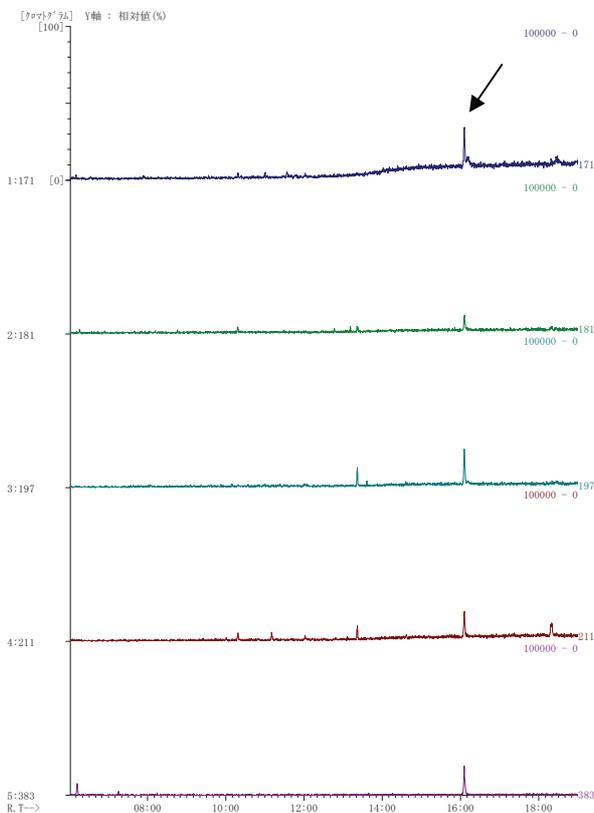


図19 地点③各質量別マスクロマトグラム

4.4 定量操作

4.4.1 河川水の分析

TICを用い定量操作をおこなった。定量結果を表3に示した。この結果から側溝地点⑤からトルフェンピラドが流入、流下し、経時変化により下流方向に希釈・拡散していたと推定できる。

なお、定量結果は採水時点での濃度であり、回収率や採取時間、混合拡散効果などを考慮すると実際の濃度はもう少し高かったと考えるのが自然である。

河川中濃度はコイに対するLC₅₀（半数致死濃度）と同程度であり、この農薬が主原因と考えても問題ないのではないかと考えられる。

表3 トルフェンピラド地点別定量結果

採水地点	へい死	($\mu\text{g/L}$)	LC ₅₀
⑤ (側溝)	対象外	3.14	2.90 (コイ(96h))
① (本川上流)	×	<0.01	
② (本川)	○	0.55	
③ (本川)	○	0.55	
④ (本川下流)	○	1.66	

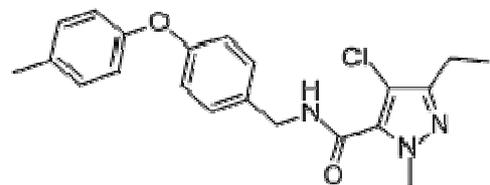


図20 トルフェンピラド構造式

4.4.2 へい死魚の分析

へい死魚のエラ抽出物から得られたクロマトグラムを図21に、16:05のマススペクトルを図22に示した。また、コレステロール標準マススペクトルを図23に示した。

このピークでは、コレステロールが主成分と判定され、トルフェンピラド単独でのピーク確認は難しく、実用的な定量には脂肪除去手法の再検討を含む新たな方法が必要と考えられた。

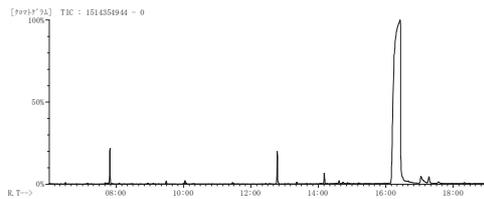


図21 エラ抽出物のクロマトグラム

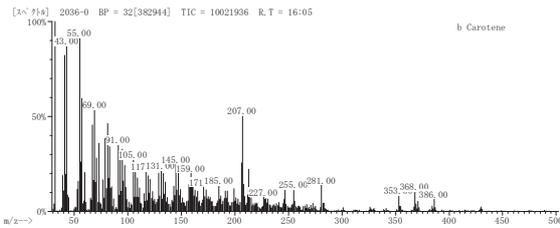


図22 16:05ピークのマスマスペクトルと同定結果

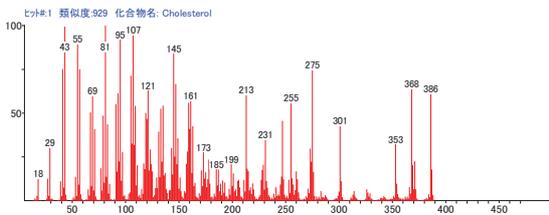


図23 コレステロール標準マスマスペクトル

5. まとめ

平成23年度に和食川で多量の小魚がへい死した原因を巡りGC/MS法により原因物質を特定することができた。原因はトルフェンピラド含有農薬と推定され、側溝から本川の溜まり水に流入したと考えられる。河川からナフタレン化合物がほとんど確認されなかったため、乳剤ではなく水和剤と推定されている。

へい死魚からは、検体が比較的小さかったためコレステロールの妨害が大きかった。今後同様な事案に対処するためには、脂肪除去や別の機器を使った手法についても検討しておく必要が感じられた。

トルフェンピラドを主成分とする農薬の登録は比較的最近だが、へい死事案で検出が続いていることから一部の現場営農者には魚毒性の高さが十

分認識されていないと考えられる。今回、溜まり水に流入していることから試算を試みたところ原液1.2~2 mL程度の流入で多数のへい死魚が発生すると算定される。今回のように自流が少ない場合、河川水による希釈効果がほとんど期待できず、使用後の空き容器を水洗し、廃液を側溝に流しただけで同様事案が発生しかねないと考えられる。

この農薬は、農作物に対して有効であり、一方で農薬取締法や毒物及び劇物取締法の劇物の対象となっている。県内での使用量も引き続き増えていることから²⁾ 使用者に対し、魚毒性の高さを再認識してもらうとともに、使用後の原液や廃液は適切に再利用し、誤って公共用水域に流出させないことや使用後の容器を適正に廃棄してもらうよう、⁶⁾ 一層周知徹底することが今後とも必要ではないかと考えられた。

最後に、へい死魚類の解剖・病理検査所見に関し高知県内水面漁業センターの皆様から有用なご教示とご協力をいただき深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 国土交通省水質連絡会編 水質事故対策技術 (2001年版) 技報堂出版 (2001)
- 2) 十川絃一ら 安芸市内の河川におけるへい死魚調査事例 (2010年度) 高知県環境研究センター所報 (2010)
- 3) (社)日本植物防疫協会編 農薬ハンドブック 2005年版 (改定新版) (社)日本植物防疫協会 (2005)
- 4) 高知県内水面漁業センター 和食川における魚のへい死について (2011)
- 5) 厚生労働省 食品に残留する農薬、飼料添加物又は動物用医薬品の成分である物質の試験法 (H17) (2005)
- 6) (社)緑の安全推進協会・農薬工業会 パンフレット「農薬を使ったあとは…きちんと後片付けをしよう！」(2004)