

殺虫剤メソミルによるイヌおよびネコの死亡事例

大城直雅, 佐久川さつき, 古謝あゆ子

Lethal Poisoning of Canine and Feline with Methomyl

Naomasa OSHIRO, Satsuki SAKUGAWA and Ayuko KOJA

要旨: 平成19年11月に大宜味村で、薬殺が疑われるイヌおよびネコの死亡事例が発生した。死亡した動物の近くに弁当箱に入った残飯に緑～青色の物質が付着しており、殺虫剤ランネート(三共(株))の成分であるメソミルによる中毒死の疑いがもたれた。中毒死が疑われたイヌの胃内容物に含まれていた青色物質の抽出物をGC/MS(SCANモード)で測定したところ、主要ピークの一つのマススペクトルがメソミルと一致した。LC/MS法によるメソミルの分析法を検討後、死亡したイヌの血様腹水(321.5 ng/ml)と胃内容物(383.3 μg/g)および、ネコの血様胸水(150.2 ng/ml)と胃内容物(1334.8 μg/g)からメソミルが検出された。

Key words: メソミル methomyl, イヌ canine, ネコ feline, ガスクロマトグラフ-質量分析器 GC/MS, 高速液体クロマトグラフ-質量分析器 LC/MS

I はじめに

平成19年11月9日から15日にかけて、大宜味村内で犬や猫の不審死や、嘔吐、泡を吹くなどの症状を呈する事例が複数確認された(表1)。死体として発見された猫の近くに、弁当の容器があり、残飯に緑～青色の物質が付着しているのが確認された。状況から、残飯に添加された農薬等による毒殺の疑いがもたれた。また、残飯に付着した物質が緑～青色

であったことから、ランネートの成分であるメソミルによる中毒死の疑いで、当研究所に分析の依頼があった。

メソミルはN-メチルカルバメート系の殺虫剤で、商品名ランネート(三共(株))の成分である。我が国におけるカルバメート系農薬の中毒死は、パラコート系除草剤、有機リン系農薬に次いで多く、毎年50～100件の報告があるが、その中でもメソミルが最多である¹⁾。

表1. 中毒が確認された動物の一覧(本県業務衛生課提供)

番号	動物種	日時*	場所	状況	症状等	備考
1	イヌ	11日 6:30	自宅玄関前	不明	嘔吐し、ふるえていた	回復(動物病院で治療)
2	イヌ	11日 7:00	1から500m	散歩中リードを外した	戻った後倒れた	死亡
3	イヌ	11日 10:00	2から2km (パイン畑)	イヌを放した	戻った後泡をふいた	死亡
4	イヌ	11日 14:00	パイン畑	イヌを放した	30分後、戻ってきて泡をふいた	回復(大量の水で催吐)
5	イヌ	不明	集落内 ゴミ集積所	不明	不明	死体発見15日 (分析検体)
6	ネコ	不明	4から200m	1m以内に弁当容器あり**	不明	死亡 (分析検体)
7	ネコ	9日以降	4から3km	家に帰ってこない	外傷、嘔吐の形跡無し	死亡 (通報者飼い猫)
8	ネコ	不明	4から3km	家に帰ってこない	外傷、嘔吐の形跡無し	死亡 (通報者飼い猫)

*: 日時はおおよそ。 **: 容器には弁当の残飯があり、青～緑色の物質が付着

メチルカルバメート系農薬は、アセチルコリンエステラーゼ(AchE)と結合し、アセチルコリン(Ach)の加水分解を阻害することで毒性を発揮する。中毒時の症状は、縮瞳、流涙、発汗、唾液分泌亢進、四肢の痙攣などである。ランネートは青色に着色されており、中毒者の吐物や胃内容物に含まれる青色物質の存在から、原因物質の推定が比較的容易である。

II 材料と方法

1. 検体と試薬

分析の対象は、動物愛護管理センターに搬入された死亡イヌとネコ各1個体で、解剖に立ち会い、それぞれの胃内容物、血様腹水、血様胸水、血液、肝臓、脾臓、腎臓等を採取した。そのうち、イヌは血様腹水と胃内容物、ネコは血様胸水と胃内容物を検査に供した(表2)。

標準品はメソミル標準品(和光純薬(株)、残留農薬用) 20 mg を蒸留水に溶解し、100ml に調製したものを標準原液(200 μg/ml)とし、LC/MS 用移動相で適宜希釈して使用した。前処理の検討用の使用した固相抽出カラムは Waters 社製の OASIS HLB3cc および、OASIS MCX 3cc を使用した。

2. 定性試験

イヌの胃内容物を採取後、胃内に残存していた少量の青色物質(28 mg)を 10ml 共栓付試験管に採取し、アセトニトリル 1ml を加え、超音波抽出した。上清を別の試験管に移し、ヘキサン 1ml で2回脱脂した。残った下層に無水硫酸ナトリウムを加えて振り混ぜて脱水し、その上清を GC/MS で測

表 2. 採取した試料の一覧

番号	動物	採取試料	分析	備考
1	イヌ	血様腹水	実施	開腹時に既に貯留
2		腎血管内血液		腎臓切除時に流出
3		血様胸水		開胸時に既に貯留
4		胃内容物	実施	やや青緑色を帯びた液状物質
5		肝臓		
6		脾臓		
7		腎臓		
8	ネコ	腸内容物		液状
9		血様腹水		開腹時に既に貯留
10		血様胸水	実施	開胸時に既に貯留
11		胃内容物	実施	固体(葉野菜、ゴーヤ、人參、青色物質)
12		肝臓		
13		脾臓		
14		腎臓		
15		腸内容物		泥状

定した。GC/MS の測定条件は以下のとおりである。

機種： JEOL JMS-K9

カラム： HP-5MS (0.25mm×30m 膜厚 0.25 μm)

カラム温度： 50℃ (1分) -25℃/分-125℃-10℃/分-300℃ (11.5分)

気化室温度： 250℃

イオン源温度： 200℃

GCITF温度： 250℃

キャリアガス： ヘリウム, 0.9ml/min

注入方法： パルスドスプリットレス

注入量： 1 μl

モード： SCAN

3. 定量試験

LC/MS 法による定量試験は、薬毒物分析実践ハンドブック¹⁾記載の方法を一部改変して実施した。

(1) LC/MS 分析条件

1) 移動相

a. 添加剤

カラムに接続せず、MS への直接導入で、20%のメタノールを含有する超純水、0.1%ギ酸、0.5%ギ酸、1%酢酸でメソミル標準品を測定し、ピーク強度を比較した。

b. 有機溶媒

メタノール/水とアセトニトリル/水で、保持時間が 10 程度になるように組成を調製した後に、両者のピーク強度を比較した。

(2) 前処理

操作が簡便で、迅速性の高い固相抽出法による前処理法を検討した。固相抽出カラムは、Waters 社製の逆相系カラム(OASIS HLB)とイオン交換カラム(OASIS MCX)の 2 製品とした。イヌ血様腹水試料および、それにメソミル 200ng を添加したのものについて、それぞれのカラムで前処理を行った試料液のピーク強度を比較した。

1) 逆相系固相抽出

イヌ血様腹水 1ml に水 9ml を加えて、よく混合し、超音波抽出をおこなった。このうち 0.5ml をあらかじめメタノール 3ml、蒸留水 3ml でコンディショニングした OASIS HLB に注入した。カラムを蒸留水 2ml で洗浄した後、メタノール 2ml で溶出し、溶出液を濃縮乾固した。乾固した残渣を 20%メタノール 0.5ml で溶解し、さらに 20%メタノールで 10 倍希釈したものを LC/MS で測定し

た。

2) 陽イオン交換系固相抽出

犬血様腹水 1ml に 0.1N 塩酸 9ml を加えて、よく混合し、超音波抽出をおこなった。このうち 0.5ml をあらかじめメタノール 3ml、蒸留水 3ml、0.1N 塩酸 3ml でコンディショニングした OASIS MCX に注入した。カラムを 0.1N 塩酸 2ml、蒸留水 2ml で洗浄した後、メタノール 2ml で溶出し、溶出液を濃縮乾固した。乾固した残渣物を 20%メタノール 0.5ml で溶解し、さらに 20%メタノールで 2 倍希釈したものを LC/MS で測定した。

(3) 動物試料の測定

1) 胃内容物試料

イヌ胃内容物は全量(165.1g)を、ホモジナイザーで均一化した。ネコ胃内容物(22.3 g)は、水分が少なかったため、同量の水 (22.3ml) を加えて同様に均一化した。

胃内容物 1.0 g 相当量に 0.1 N 塩酸 20 ml を加え、5 分間の超音波抽出をし、遠心分離(3,000 rpm, 15 分間, 25℃)を行い、その上清をメスシリンダー(50ml)に取った。残った沈査はさらに 0.1 N 塩酸 20 ml を加え、超音波抽出、遠心分離を行った。その上清を先の上清にあわせて、0.1 N 塩酸で全量 50 ml とし、そのうち 1ml を 0.1 N 塩酸で 10 倍希釈した。この 10 倍希釈液 0.5ml をあらかじめメタノール 3ml、蒸留水 3ml、0.1N 塩酸 3ml でコンディショニングした固相抽出カラム(OASIS MCX 3 cc)に注入した。カラムを 0.1N 塩酸 2ml、蒸留水 2ml で洗浄した後、メタノール 2ml で溶出し、溶出液を濃縮乾固した。乾固した残渣物を 20%メタノール 1ml で溶解

し、さらに 20%メタノールで適宜希釈したものを LC/MS 測定液とした。

ネコ試料は添加回収試験用試料として胃内容物にメソミルを 1,400 µg 添加したものを調製し、同様に処理した。

2) 血液試料

イヌ血様腹水および、ネコ血様胸水 1ml に 0.1N 塩酸 9ml を加えてよく混合し、超音波抽出を行った。その 0.5ml を胃内容物と同様に MCX で処理し、溶出液を濃縮乾固した。乾固した残渣物を 20%メタノール 0.5ml で溶解し、さらに 20%メタノールで適宜希釈したものを LC/MS 測定液とした。

イヌ血様腹水試料は添加回収試験用試料として、メソミル 200 ng を添加したものを調製し、同様に処理した。

III 結果と考察

1. 定性試験

GC/MS 測定のトータルイオンクロマトグラムは図 1 のとおりで、各ピークのマスマスペクトルについてライブラリ検索を行った結果、保持時間 9'43" のピークのマスマスペクトルがメソミルと一致した(図 1)。

2. 定量試験法の検討

(1) LC/MS 分析条件

20%のメタノールを含有する超純水, 0.1%ギ酸, 0.5%

表 3. LC/MS の測定条件

装置 : Agilent1100 Series LC/MSD

【HPLC】

カラム : Cadenza CD-C18 2.0×150mm, 3µm

移動相 : 20%メタノール

流速 : 0.2 ml/min

カラム温度 : 40℃

注入量 : 5 µl

【PDA】

測定波長 : 230 nm

【MS】

測定モード : SIM (ポジティブ)

モニターイオン : m/z 163 ([M+H]⁺)

ネブライザーガス : 30 psi

ドライガス : 10 ml/min, 350℃

キャピラリー電圧 : 4,000V

フラグメンター電圧 : 80V

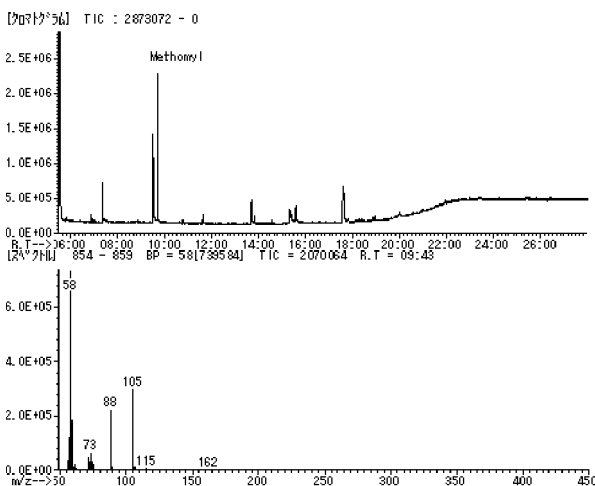


図 1. イヌ胃内から採取した青色物質の GC/MS クロマトグラム(上)とマスマスペクトル(下)

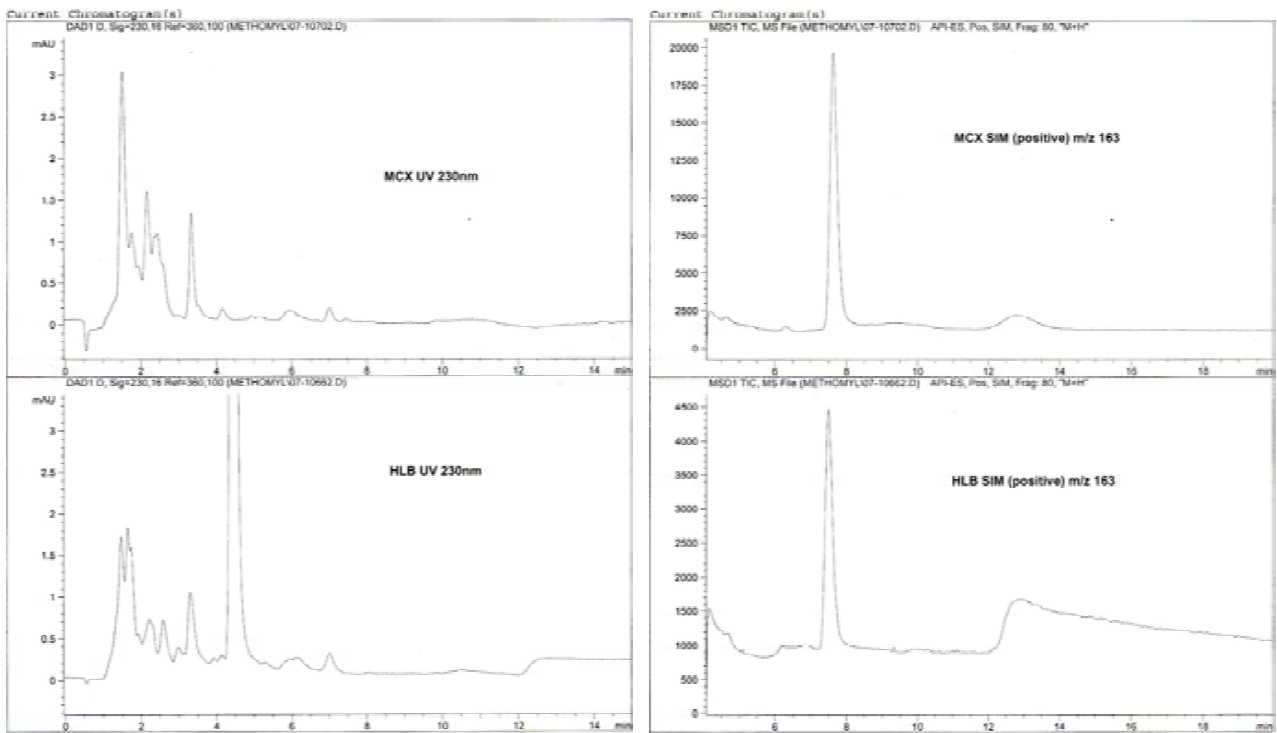


図 2. イヌ血様腹水試料を MCX(上)または HLB(下)で処理した試料の HPLC クロマトグラム(左)と LC/MS(クロマトグラム)

ギ酸, 1%酢酸でメソミル標準液(500 ng/ml)を測定し, ピーク強度を比較した結果, 超純水のイオン強度が最も強かった。

カラムを接続し, メタノール/水 (20:80) とアセトニトリル/水 (10:90) で標準液(5 ng/ml)を測定したところ, S/N 比はそれぞれ 95, 104 と同等であったため, メタノール系で行うこととした。なお, アセトニトリル系に 0.1%になるようギ酸を添加した場合もピーク強度が低下した。

この溶媒系で, フラグメンター電圧等を調整し, LC/MS 分析条件の最適化を行った(表 3)。

この条件下で, 0.1~100 ng/ml の範囲で作成した検量線の近似曲線は濃度を Y, ピークの積分値を X とした場合, $Y=13384849X^2+18209004X-2737.2004$ であらわされ, r^2 は 0.9999 と良好であった。

なお, 本分析法の検出下限値 (0.10 ng/ml)および, 定量下限値(0.25 ng/ml)は, それぞれ標準品を測定した際の, S/N 3 および, S/N 10 となる濃度とした。

(2) 前処理

イヌ血様腹水試料について, HLB および, MCX で添加回収試験を行った結果, 回収率はそれぞれ 90.6%および, 98.7%で, MCX の回収率が良好であった。さらに, MCX で処理をした試料はクロマトグラム上の夾雑ピークも少なかったので, MCX による前処理法を採用した(図 2)。

(3) 動物試料の測定

死亡イヌの胃内容物から 383.3 μg/g, 血様腹水からは 321.5 ng/ml のメソミルが検出された。一方, 死亡ネコは胃内容物から 1335 μg/g, 血様胸水からは 140.2 μg/ml が検出された。

死亡イヌ胃内容物の総重量が 165.1 g であったため, 胃内には 63.28 mg のメソミルが残存していたことになる。また, このイヌの体重は 7.9kg であったため, 8.01 mg/kg 以上のメソミルを経口摂取したものと推定される。同様に死亡ネコ(2.4kg)の胃内容物総重量は 22.3 g で, メソミルの残存量は 29.8 mg となり, 12.4 mg/kg 以上を経口摂取したと推定される。なお, ラットに対する経口急性毒性(LD₅₀)は 50 mg/kg であるが¹⁾, 体内に吸収されず胃内に残存していたメソミルを測定したことや, 生物種が異なることを考慮すると, 中毒死を起こす程度の量であると結論づけた。

メソミルを含有する農薬は青色水和性微粒の「ランネート 45 水和剤」(メソミル 45%), と類白色微粒の「ランネート微粒剤」(メソミル 1.5%)の 2 製品があるが, 本事例においては, 青色物質にメソミルが含まれることが確認されたため, 使用された農薬はランネート 45 水和剤と思われる。ランネート 45 水和剤に換算した際の胃内容物中の量はイヌが 140.6 mg, ネコが 66.20 mg である。

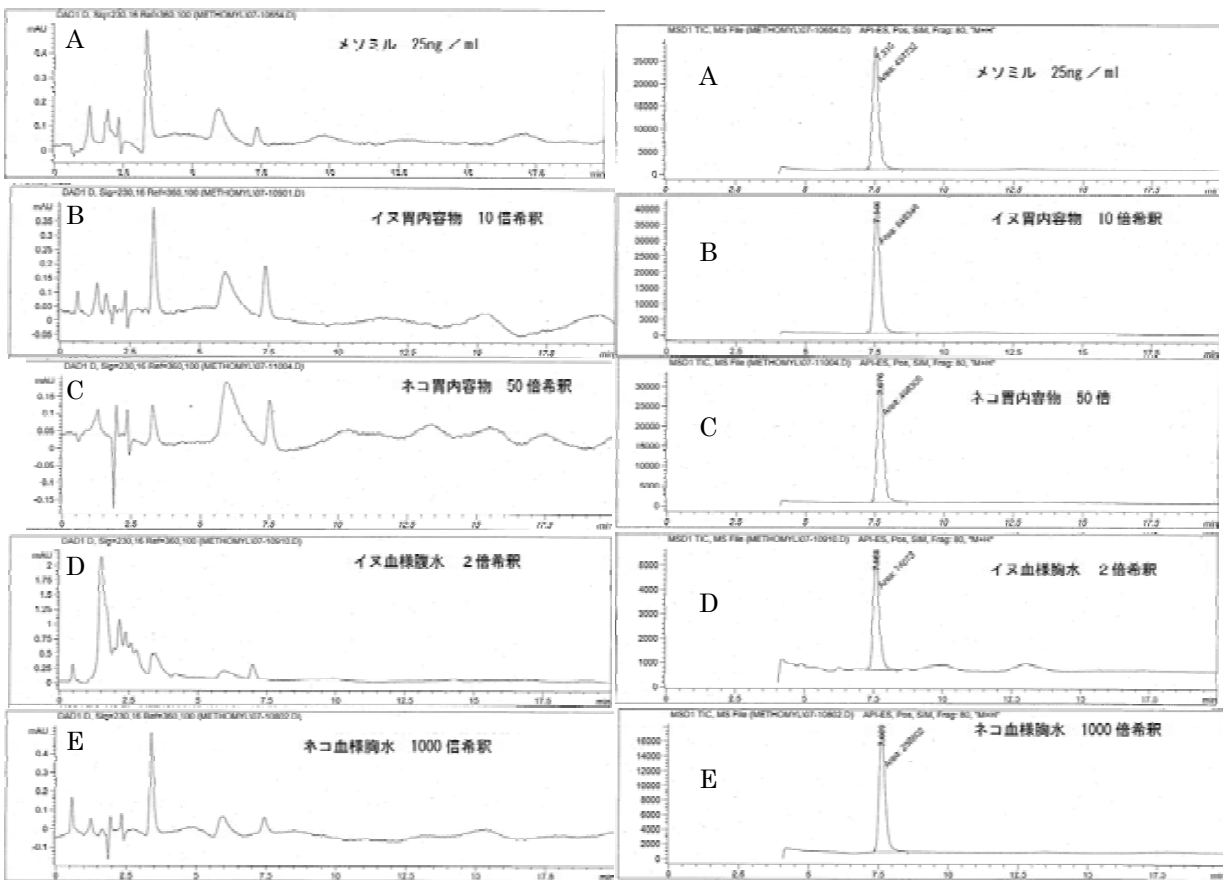


図3. 標準品および測定試料のHPLCクロマトグラム(左)およびLC/MSクロマトグラム(右)

pp482-492.

IV 参考文献

- 1) 飴野清(2002)カルバメート系農薬. 鈴木修・屋敷幹雄編. 薬毒物分析実践ハンドブック, (株)じほう, 東京,