

野鳥から採取された羽毛試料に対する無標準定量法の開発

世良耕一郎、鈴木一由¹、田口 清¹、千葉啓子²
伊藤じゅん³、後藤祥子⁴、高橋千衣子⁴、齋藤義弘⁴

岩手医科大学サイクロトロンセンター
〒020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢留が森 348-58

¹ 酪農学園大学獣医畜産学部
〒069-8501 北海道江別市文京区緑町 582

² 岩手県立大学盛岡短期大学部
〒020-0193 滝沢村滝沢字巣子 152-52

³ 日本アイソトープ協会学術部研修課
〒113-8941 東京都文京区本駒込 2-28-45

⁴ 日本アイソトープ協会滝沢研究所仁科記念サイクロトロンセンター
〒020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢留が森 348-58

1 はじめに

我々は、毛髪試料に対する無調製・無標準法の開発を行い¹⁾、それは様々な研究に応用されてきた。特に、有害元素による広域的環境汚染による人体曝露評価の研究においては、フィリピンやモンゴルの Small-scale mining cite における水銀汚染^{2,5)}、中国におけるフッ素汚染、及びヒ素汚染⁶⁾、バングラデッシュにおけるヒ素汚染^{7,8)} など、多くの問題に貢献してきた。毛髪中の元素濃度は体

内元素濃度を反映するため、有害元素曝露のみではなく、必須元素の摂取バランスなどの健康状態管理にも強力なツールとなる。本法は、5 mm 程度の毛髪 1 本の定量分析を可能とし、化学処理などの複雑な試料調製を必要とせず、未処理の毛髪をそのままビームで照射し正確な定量分析を行うものであり、試料調製の手順が省けるため一日に 100 以上の毛髪試料分析を可能とする。しかも複雑な手順の過程で生じる試料のコンタミや元素の試料からの漏出などの不確定要素を排除するため、内部標準法と比較しても、より正確な定量値を与えるものである。

ヒト毛髪との主元素構成の類似性から、家畜や実験動物などの被毛の分析にも応用され⁹⁻¹⁰⁾、動物の健康状態と体内微量元素成分との関係が調べられるなど、獣医学や基礎医学における研究にも貢献している。また愛玩動物の被毛にも応用され、健康状態と微量元素成分との関係が調べられている¹¹⁾。さらに主成分の類似性から、ヒトツメ試料¹²⁾、有蹄類家畜のヒヅメ試料に対する無標準法¹³⁾の開発も行われた。このように体毛・被毛、ツメ・ヒヅメ試料に対して開発された無調製・無標準法は、多分野において広く利用されている。

鳥類に関してはツメの採取は困難であり、羽毛の分析により健康状態の把握が可能となることが期待される。獣医学においても、家禽の健康状態維持のために羽毛試料の分析は一つの強力なツールと成りうる。一方野生鳥類に関しても、それらの健康状態の把握を、採取し易い羽毛分析により行うことは有望な手段と思われる。さらに野鳥の体内元素濃度分布はその生育環境を強く反映し、我々の分析でも特定の野鳥の羽毛から多量の有害元素が検出された例もある(未発表)。野鳥は種により生活圏の範囲が大きく異なり、野鳥羽毛の分析結果は地域的・局所的な汚染、グローバルな汚染両者の指標と成りうるものと期待される。生活環境の変化は、野鳥に対し時として致命的な影響を与えうる。以前、秋田県八郎潟において多数のミヤマカラス(渡り鳥)が死亡する事件が発生し、我々の分析の結果、死因は畑に撒かれた殺鼠剤であることが胃腸からの Tl (タリウム) の検出によって明らかとなった¹⁴⁾。このような人為的・急激な環境変化のみならず、時定数の長い環境変化が生態系に及ぼす影響を調べる上でも、羽毛試料分析は強力な手段になることが期待される。

現在まで、羽毛試料は硝酸灰化・内部標準法に基づいて調製され、定量分析が行われてきたが、同法は熟練と多大な労力を要し、さらに酸処理によりハロゲン族元素が失われるという短所があった。その観点からも無調製・無標準法の開発が望まれるが、その実現の可能性は大である。何故なら、今までの分析の結果、羽毛と体毛の主元素組成は類似しており、従って「無標準法」の基礎情報となる連続 X 線の形状も類似していることから、毛髪試料と同様の精度で無標準法を確立できることが期待されるからである。

本研究においては、野鳥羽毛試料に対する無調製・無標準法が、ヒト毛髪試料にたいするそれを基準として開発され、その精度は、同一の試料に対し従来の硝酸灰化・内部標準法を用いて得られる結果と比較することにより検証される。さらに、同一個体から採取された異なる羽毛試料に対する依存性、同一羽毛における位置依存性などが、詳細に調べられる。

2 実験方法

2.1 試料採取及び調製

野鳥の羽毛試料(feather 及び down)は、捕獲された野鳥・死亡した野鳥から直接、また巣の中及

び周辺の種の確定できる場所から採取された。採取された羽毛はアセトン中で洗浄し、図1に示すように最小単位に分割された羽毛4~5本がターゲットホルダー上に固定され、その中央部が陽子ビームで照射され、無標準法の開発のために使用された。結果の比較の為に硝酸灰化・内部標準法のターゲットは、照射部を取り囲む近接した部分から採取され、秤量の後、内部標準として1000 ppmのInが添加され、テフロン製圧力容器中で電子レンジにより灰化後、その数 μL がProlene film バッキング膜状に滴下され、乾燥することにより調製された¹⁵⁾。

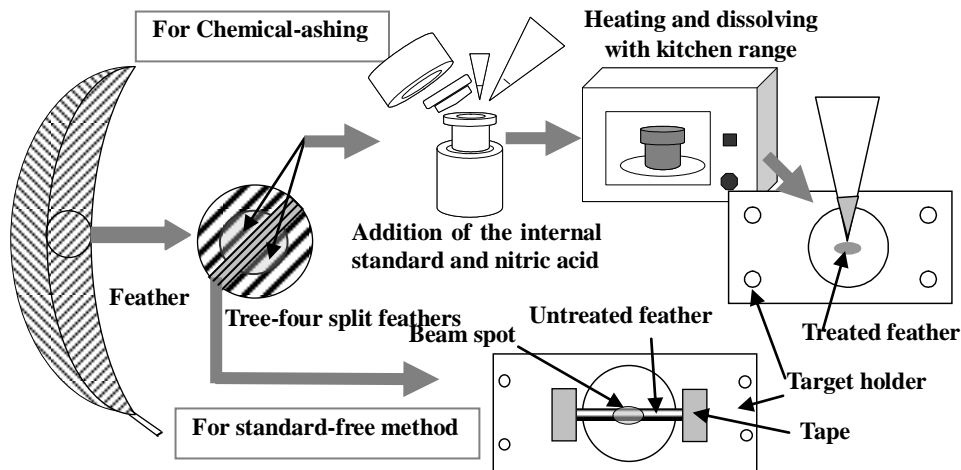


Fig.1 Schematic view of the procedure of target preparation for a feather sample. Three or four split feathers were picked out nearly the center of the feather, and the target for the standard-free method was prepared using these untreated hairs. The target for the internal-standard method is prepared using the split feathers just around the irradiated portion for the standard-free method.

羽毛試料は全6試料で、5種の異なる野鳥から採取された。それらはゴイサギ; Black crowned night heron (*Nycticorax*)、ミサゴ; Osprey (*Pandion haliaetus*)、コハクチョウ Bewick's swan (*Cygnus columbianus*)、キレンジャク; Bohemian waxwing (*Bombycilla*)、そしてハシボソカラス; Carrion crow (*Corvus corone*)である。この中で、キレンジャクからは feather に加え、down 試料も採取された。

2.2 照射及び測定条件

サイクロトロンにより加速された 8.3 MeV H_2^+ ビームは、2枚のTiフォイル、He雰囲気中で減速・分離され、2.9 MeVの陽子ビームとなり、グラフィイトコリメータにより6 mm ϕ に整形され試料を照射する。ビーム電流は、無調製・無標準法、硝酸灰化法、いずれの場合もおよそ80 nAであった。

試料から発生するX線は、2台のSi(Li)検出器で測定されるが、1台(検出器1)の窓にはMylar filmがX線吸収体として装着され、K以上の中・重元素からのX線を測定する。もう1台(検出器2)は吸収体を用いず、Na~Caまでの軽元素分析を目的とするが、計数率を調整するため2 mm ϕ のグラフィイトコリメータとともに用いられる¹⁶⁾。検出器1に装着される吸収体は、ヒト毛髪試料・ヒトツメ試料の無調製・無標準法のために用いられる300 μm Mylar filmが選択された。

2.3 羽毛試料に対する無標準法

図2に、検出器1により300 μm Mylar filmを用いて得られたスペクトルを、5種の野鳥から採取された6種の羽毛試料に対して比較して示す。図中には、タイ人、日本人から採取された毛髪試料のスペクトルも、比較のため示されている。図から明らかなように、連続X線の形状は中間エネルギー領域においてヒト毛髪を含む全ての試料に対して一致しており、このことから種の異なる野鳥の羽毛試料は、downも含めてほぼヒト毛髪試料と同一の主元素組成であることが確認される。この事実により、ヒト毛髪試料に対して開発された無調製・無標準法は、ほぼそのまま野鳥の羽毛試料にも適用可能であることが予測できる。しかしこの図から、微量成分であるK、Ca、Mn、Feは、ヒト毛髪と比較し野鳥の羽毛に多く含まれていることが確認できた。

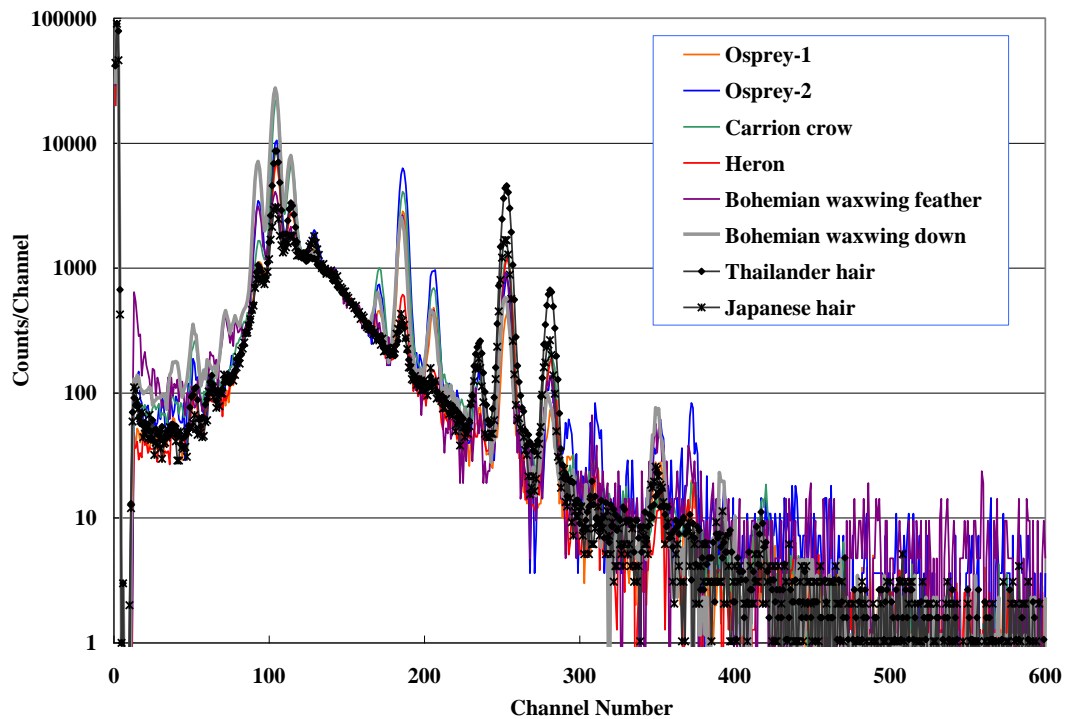


Fig. 2. Comparison of x-ray spectra among six feather samples and two human hair samples. These spectra are normalized by the yield of continuous X-rays in the energy region between 4.4-5 keV. A 300 μm Mylar film was used as an X-ray absorber.

羽毛試料に対する無標準法の手順は、ヒト毛髪^{1,17)}・ツメ¹²⁾・ヒヅメ¹³⁾試料に対するものと同様であり、図3に示されている。図のスペクトルは、ハシボソカラスの羽毛試料を2.9 MeVの陽子ビームで照射し、300 μm Mylar吸収体を用いて得られたものである。図中には無標準法の基礎となる連続X線収量をとる領域(2.6-15.2 keV)が示されているが、これはヒト毛髪試料に対するものと同じである。連続X線収量 Y_{CX} はこの領域中の全収量から、ピーク fittingにより求められる全ピーク

収量を差し引いて求められる。添字 s で示される指標元素の濃度 C_s は、連続 X 線収量 Y_{CX} の指標元素ピーク収量 Y_s に対する比 $R_s=Y_s/Y_{CX}$ から、変換係数 K_s を用いて $C_s=R_s \cdot K_s$ を用いて求められる。変換係数 K_s は、数種の試料に対して硝酸灰化・内部標準法により求めた C_s と、無標準法による R_s を比較し、 $K_s = C_s/R_s$ よりあらかじめ決定されるが、本研究においては、図 2 において確認されたヒト毛髪との主成分の類似性から、ヒト毛髪に対するものをそのまま使用し、内部標準法による結果と比較し修正を加える手順とした。無標準法の手順の詳細は、参考文献 18) を参照されたい。変換係数 K_s と採択した連続 X 線領域の妥当性は、9 の羽毛試料に対し本法と内部標準法で得られた指標元素濃度を比較することにより、確認される。指標元素としては、ヒト毛髪と同様 Zn が選ばれた。Zn は毛髪の主成分であり、強い位置依存性を示さず試料中にはほぼ均一に安定して存在することが確認されているためである。

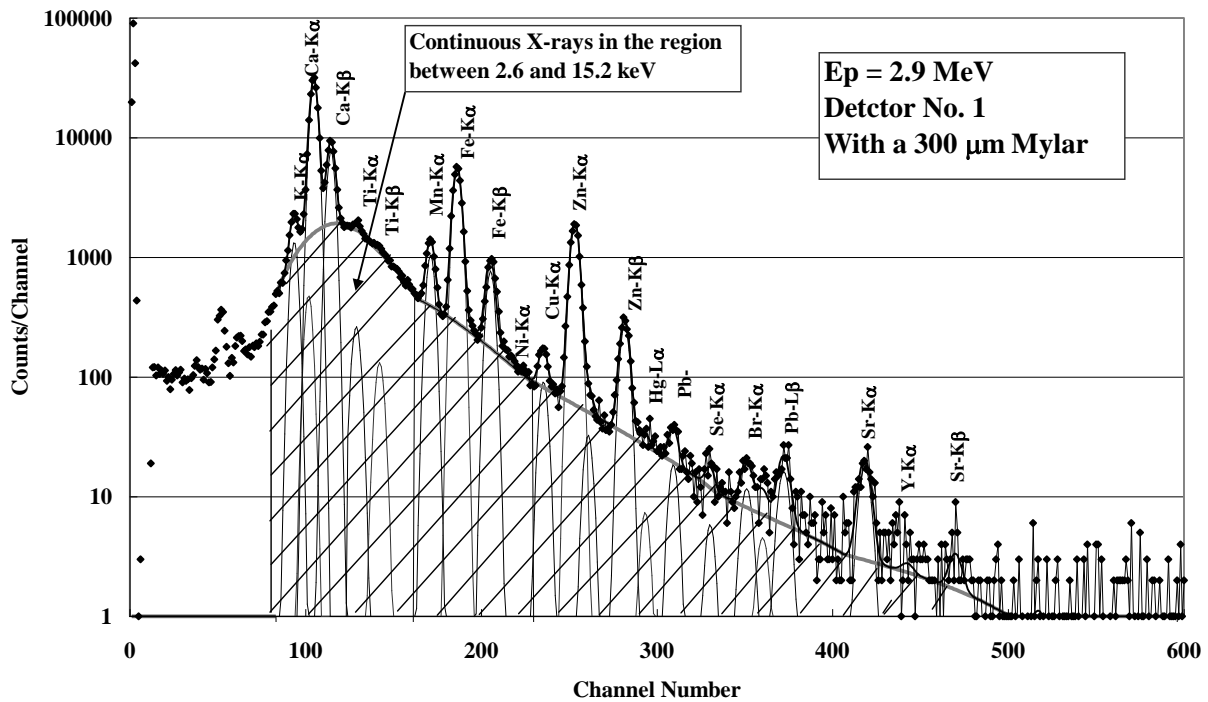


Fig. 3 Procedure for the standard-free method for feather sample. All peak functions are subtracted from the spectrum in the region between 2.6 and 15.2 keV indicated by the shadowed portion and the total yield of continuous X-rays Y_{CX} is obtained. Zinc was designated as the index element in the same manner as in the case of human nails

図 4 には、検出器 2 により得られた軽元素側のスペクトルを、4 種の野鳥から採取された羽毛試料とヒト毛髪を比較する形で示す。吸収体は用いず、計数率調製のためのグラフアイトコリメータ (2 mmφ) を用いて得られたものである。図から、ヒト毛髪同様、最も主要な元素は S であることが確認できる。一方、Na、Mg、Al、P、K、Ca などの軽元素は、ヒト毛髪よりも高濃度で存在していることが分かるが、図 3 に見られるように中・高エネルギー領域におけるスペクトルの形状に影響するほどの違いではない。

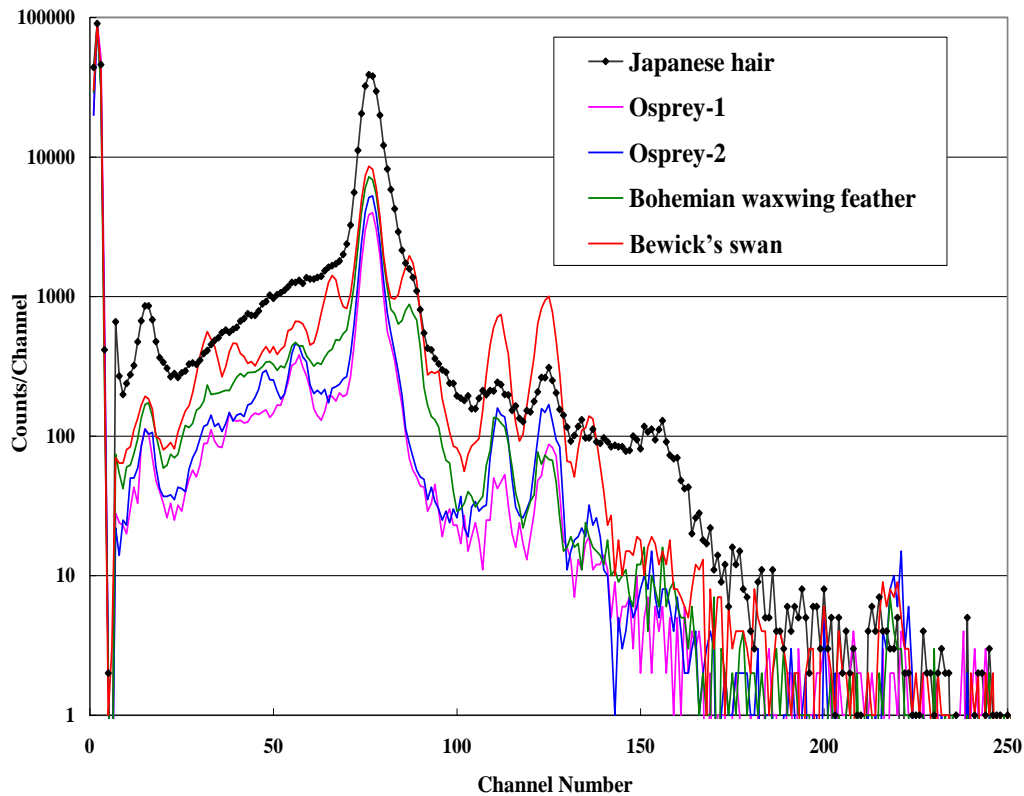


Fig.4. Comparison of X-ray spectra among four feather samples and one human hair taken from Japanese, where no X-ray absorber was used. The spectrum for human hair is displayed as the line with symbols.

2.4 スペクトル・データ解析

得られた二つのスペクトルは解析プログラム SAPIX により解析され、各ピーク収量及び連続 X 線収量 Y_{CX} が求められる^{19, 20)}。それらを用い指標元素 Zn の濃度値が専用プログラムにより先ず求められ、それを内部標準濃度とみなして定量解析プログラム KEI¹⁹⁾ により各元素濃度が求められる。

3 結果と議論

図 5 に 5 種の野鳥から採取された羽毛試料に対し、本法と従来の内部標準法により得られた亜鉛濃度を比較して示す。図から、両法による結果は概ね一致しており、両法において全く同一の部分が分析されたわけではないことを考慮すると、満足すべき精度であると言える。このことから、ヒト毛髪試料に対して開発された無調製・無標準法は、ほぼそのままの形で野鳥の羽毛試料にも適用可能であることが確認できた。

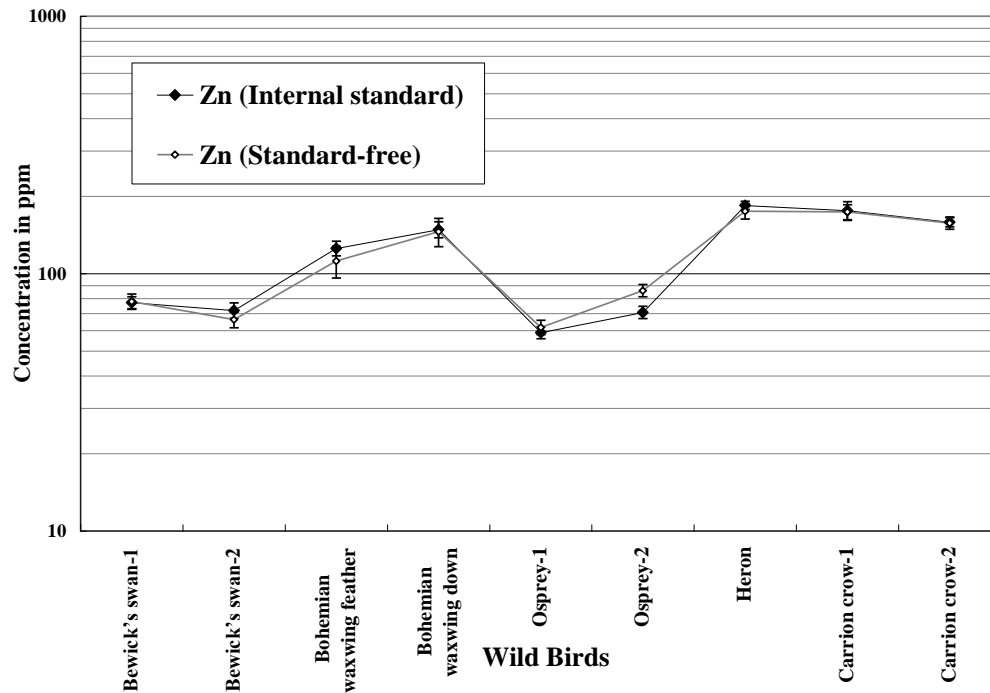


Fig.5. Results of zinc concentration in nine feather samples taken from five species of wild birds, where the results obtained by the present method are compared with those obtained by the internal-standard method combined with chemical ashing method.

図6には、ハシボソカラスの羽毛を例に全元素の分析結果を示す。図中には分析可能だった23元素の濃度値と実験誤差が示されており、比較のため250人の健常日本人の平均値と標準偏差も示されている。図に見られるようにハロゲンを含む23以上の元素が常に検出され、それらの情報は野鳥の生態や健康状態に関する研究ばかりではなく、環境汚染等の環境変化調査研究に対しても貴重な情報をもたらすものと期待される。実際、多量のHg、Pbなどの汚染元素が一部の野鳥羽毛から検出されており(未発表)、その原因を調査中である。ヒト毛髪との比較においては、Al、P、Ca、Ti、V、Mn、Fe、Moなどの元素が高い濃度を、一方Cl、Cu、Brが低い濃度を示していることが分かる。しかしこの中で、Br濃度に関しては日本人が他国の人々より5~10倍高い値を示すことが我々の分析で確認されており(未発表)、日本人以外との比較においてはほぼ同等の濃度と言える。

ここで、毛髪のどの部分を測定すべきか検討する必要がある。ヒトツメの場合のように、元素濃度分布が強い位置依存性を示すのであれば、意味のある情報か否かの判断が難しくなるためである。一本の羽毛中の位置依存性を調べるため、図7に示すように13の試料がコハクチョウの一本の羽毛内から採取され、ターゲットとされた。図に示すように、上から下に順番に5mm間隔で羽毛が切り出され、それらの中央部が照射され、無標準法で定量分析が行われた。

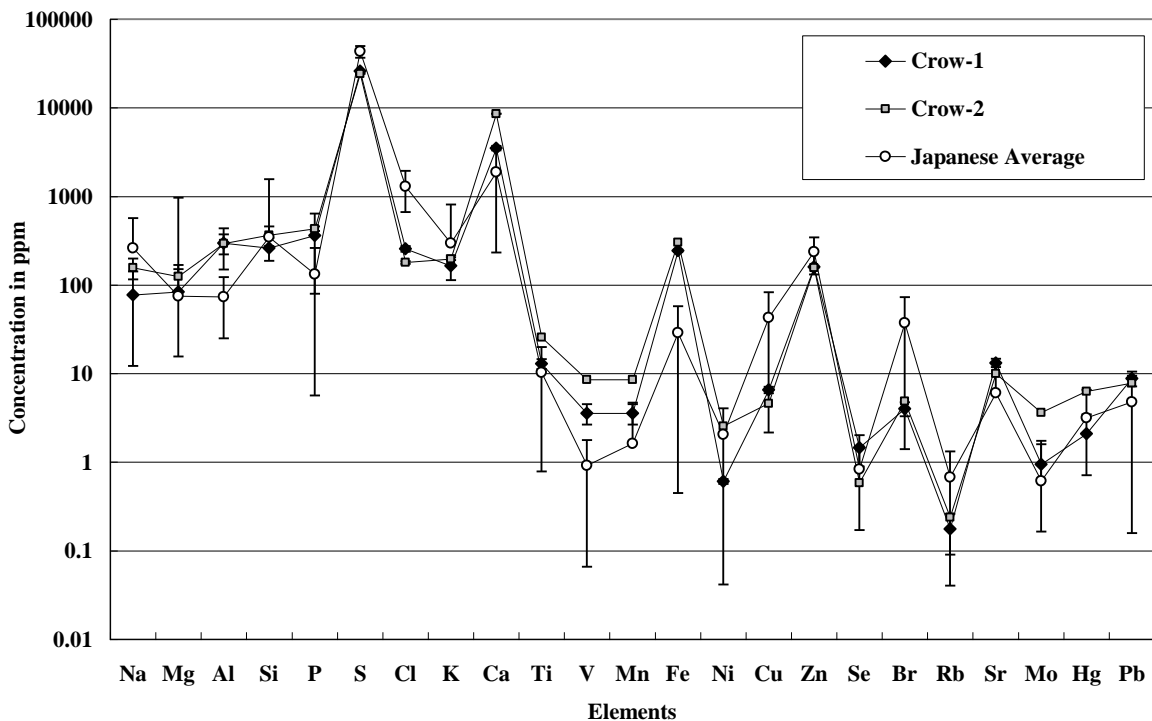


Fig. 6 Results of analysis of feather samples taken from carrion crow as examples. In this figure, the mean values of elemental concentration of 20 elements in hair samples taken from 250 healthy Japanese are also shown for comparison.

図 8 には主要 13 元素に対する濃度の位置依存性を示す。この図に見られるように、元素濃度は羽毛の下部に近くなるとやや分散する傾向がある。特に Cl と Na が下部に向かい濃度を上昇させ、Cu と Fe が減少する傾向が見られる。しかし羽毛の中央部近くでは、多くの元素が殆ど位置依存性を示さず、中央部を試料として測定することにより、安定した情報が得られることが確認できる。

次に確認が必要なことは、同一個体から採取された異なる羽毛試料が、類似した結果を提供するか否か、である。ヒト体毛の場合には、採取部に対する依存性はさほど強くないことが、我々の以前の研究により確認されている¹⁷⁾。それに対しヒトツメの場合には、1 試料の中の位置依存性だけでなく、どの指から採取されるかの試料依存性も極めて強く、安定した情報を得ることが困難であることも確認されている¹²⁾。そのため、同一個体から採取された異なる羽毛間の、元素濃度の依存性も確認しておかなければならない。

図 9 に同一の野鳥 (コハクチョウ) から採取された 6 本の羽毛中の主要 11 元素濃度を示す。いずれも羽毛中央部の同一の部分ターゲットとしたものである。図から確認できるように、いずれの元素も大きな差異を見せておらず、多数の羽毛の平均値を取ることなく、1 本の羽毛の分析が意味のある情報を提供し得るものであることが確認できる。

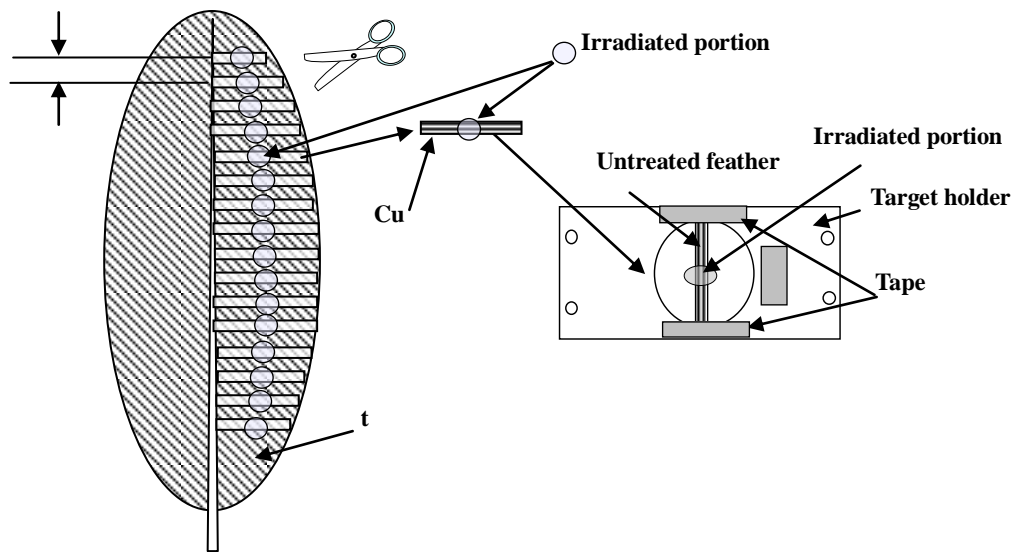


Fig.7 Target preparation for investigating position dependence in a feather sample, where thirteen split feather samples were cut from a feather one by one at intervals of 5 mm from the top to the bottom.

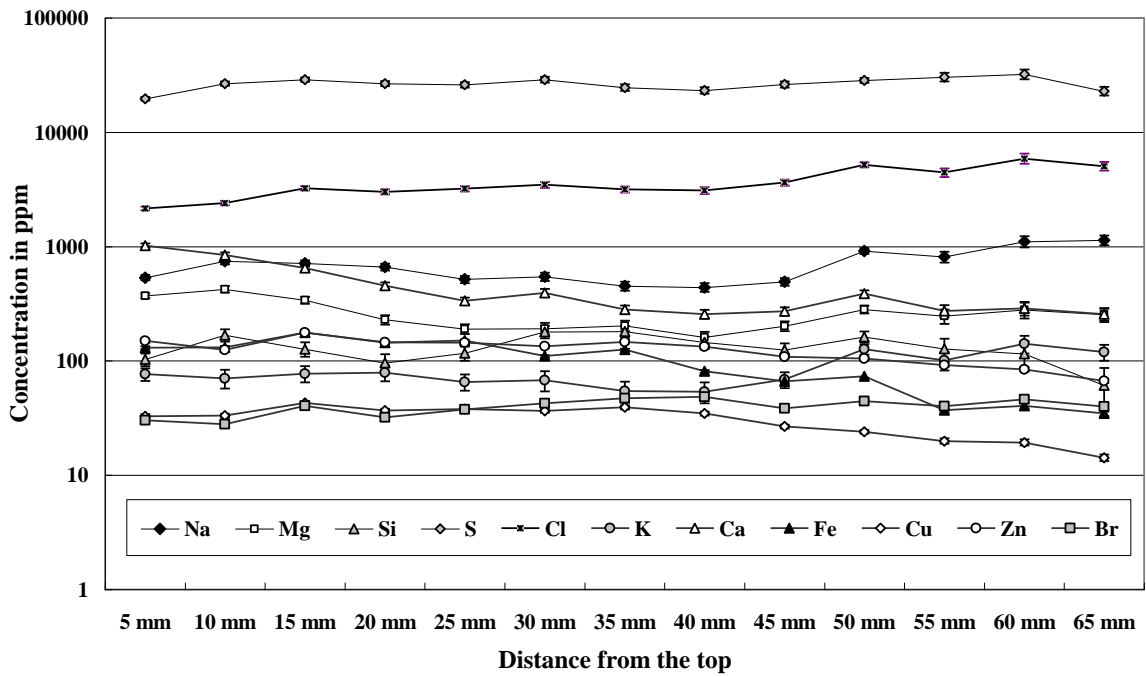


Fig.8 Changes in elemental concentration of principal 11 elements depending on the position in the feather.

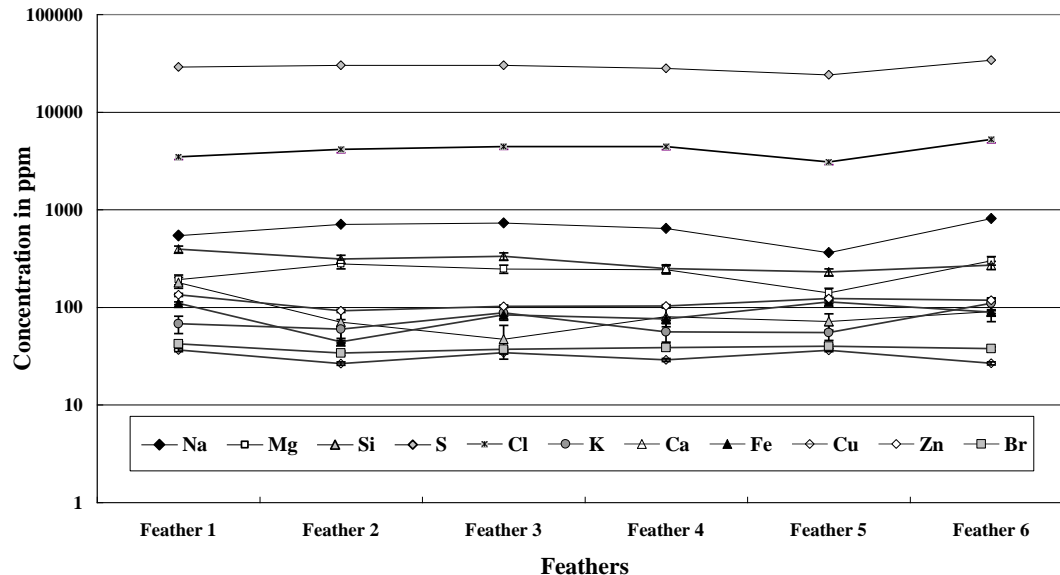


Fig.9 Changes in elemental concentration of principal 11 elements in six feather samples taken from the same bird (Bewick's swan).

野鳥の羽毛はそれを捕獲/殺害することなく容易に採取可能であり、本法は野鳥の生態や健康状態の調査研究、さらに環境変化の評価研究に対し貴重な情報をもたらすものと期待される。野鳥は種により様々な生活圏を持っており、特定の地域にのみ生息する野鳥はローカルな情報を、渡り鳥など地球規模の範囲を移動する野鳥はグローバルな環境変化に関する情報を、それぞれ提供することが期待される。さらに本法は野鳥だけではなく家禽の羽毛に対しても適用可能であり、家禽の健康状態把握のため重要な情報をもたらすものと期待されることから、獣医学の見地からも有用であると思われる。

4 要約 (Summary)

以上の事項は、以下に要約される。

1. A new method of quantitative analysis of untreated feather samples has been developed on the basis of the standard-free method.
2. The method is confirmed to be valid for feather samples taken from various kinds of wild birds.
3. The method enables us to perform accurate quantitative analysis of many elements without complicated sample preparation procedure, which sometimes brings ambiguous factors such as elemental loss from the sample and contamination of the sample. It is also confirmed that

halogens can be accurately analyzed.

4. It is expected to become a powerful tool for estimating the state of the mode of life of wild birds and also for evaluating environmental contamination.
5. The method is expected to be useful for estimating the state of health of poultries.

謝辞

共同利用の円滑な運営のために日々献身的な働きをしておられる日本アイソトープ協会 NMCC のスタッフの方々、及び岩手医大サイクロトロンセンターのスタッフに謝意を表します。

参考文献

1. K. Sera, S. Futatsugawa and K. Matsuda, "Quantitative Analysis of Untreated Bio-samples." *Nucl. Instr. and Meth.*, B 150 226-233 (1999)
2. K. Sera, S. Futatsugawa, S. Murao, K. Tanno, E. B. Daisa, V. B. Maglambayan and H. Cabria, "Preliminary PIXE measurement of human hairs from small-scale mining sites of the Philippines.", Proceedings on The 12th Annual Geological Convention "Geology Challenges in the 21st Century", December (1999) (Manila)
3. S. Murao, E. Daisa, K. Sera, V. Maglambayan and S. Futatsugawa, "PIXE Measurement of Human Hairs from a Small-scale Mining Site of the Philippines.", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* B189, 168-173 (2002)
4. E. Clemente, K. Sera, S. Futatsugawa and S. Murao, "PIXE Analysis of Hair Samples from Artisanal Mining Communities in the Acupan Region, Benguet, Philippines.", *Nucl. Instr. Meth.*, B219-220 161-165 (2004)
5. S. Murao, B. Tumenbayar, K. Sera, S. Futatsugawa and T. Waza. "Finding of High Level Arsenic for Mongolian Villagers' Hair.", *Int'l Journal of PIXE* Vol. 14-3,4, 125-132 (2004)
6. Characteristics of Arsenic Poisoning in China.
H. Yamauchi et al., *Biomed. Res. Trace Elements*, 11, (2000) 301-311 (in Japanese)
7. M. A. Habib, S. Miono, K. Sera and S. Futatsugawa, "PIXE analysis of hair in arsenic pollution, Bangladesh", *Int'l Journal of PIXE* Vol. 12, No.1,2 19-34 (2002)
8. M. A. Habib, "A Study of arsenic pollution in Bangladesh by PIXE analysis", *Master thesis of Osaka City University*, February, (2002) (M00S131)
9. K. Asano, K. Suzuki, M. Chiba, K. Sera, R. Asano and T. Sakai,
"Twenty-Eight Element Concentrations in Mane Hair Samples of Adult Riding Horses Determined by Particle-Induced X-ray Emission.", *Biological Trace Element Research*, Vol. 107 No.2 135-140 (2005)
10. K. Asano, K. Suzuki, M. Chiba, K. Sera, R. Asano and T. Sakai, "Relationship Between Trace Elements Status in Mane Hair and Atrial Fibrillation in Horse.", *Journal of Veterinary Medical Science*, Vol. 68-7 761-771 (2006)
11. 梶山巖、伊藤伸彦、加藤澄枝、古川義宣、三谷のり子、二ツ川章二、世良耕一郎、"愛玩動物の血清と被毛中微量元素濃度の測定"、NMCC 共同利用研究成果報文集、第一巻、113-119 (1993)
12. K. Sera, S. Futatsugawa, S. Murao and E. Clemente
"Quantitative Analysis of Untreated Nail Samples for Monitoring Human Exposure to Heavy Metals.", *Int'l Journal of PIXE* Vol. 12, No.3, 4 (2002) 125-136
13. 世良耕一郎、鈴木一由、田口清、後藤祥子、高橋千衣子、齋藤義弘、伊藤じゅん、"有蹄類家畜のヒヅメに対する無標準定量法の開発"、本報文集
K. Sera, K. Suzuki, K. Taguchi, K. Chiba, J. Itoh, S. Goto, C. Takahashi and Y. Saitoh, "Quantitative Analysis of Feather Samples Taken from Wild Birds such as Swan, Waxwing, Osprey, Heron and Crow.", *Int'l Journal of PIXE* (in print)

14. K. Saitoh, T. Kobayashi, K. Sera, M. Yasuda and J. Kakino, "Presumed Cause of Mass Deaths of Rooks (*Corvus Frugilegus Pastinator*) Using PIXE Analysis.", *Int'l Journal of PIXE* Vol. 17-1,2 47-52 (2007)
15. S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitou and K. Sera, "Present Status of NMCC and Sample Preparation Method of Bio-Samples.", *Int'l Journal of PIXE* Vol. 3-4, 319-328 (1993)
16. K. Sera, T. Yanagisawa, H. Tsunoda, S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh, S. Suzuki and H. Orihara., "Bio-PIXE at the Takizawa facility (Bio-PIXE with a baby cyclotron)", *Int'l Journal of PIXE* Vol. 2, No.3 325-330 (1992)
17. K. Sera, S. Futatsugawa and S. Murao, "Quantitative Analysis of Untreated Hair Samples for Monitoring Human Exposure to Heavy Metals.", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* B189, 174-179 (2002)
18. K. Sera, S. Futatsugawa, K. Matsuda and Y. Miura, "Standard-free method of quantitative analysis for bio-samples", *Int'l Journal of PIXE*, Vol. 6, No.3, 4 467-481 (1996)
19. K. Sera and S. Futatsugawa, "Personal Computer Aided Data Handling and Analysis for PIXE." *Nucl. Instr. and Meth. B* 109/110 (1996) 99-104
20. K. Sera and S. Futatsugawa, "Spectrum Analysis Taking Account of the Tail, Escape Functions and Sub-lines. (SAPIX version 4)" *Int'l Journal of PIXE*, Vol. 10, No. 3, 4 101-114 (2000)

Quantitative analysis of feather samples taken from wild birds such as swan, waxwing, osprey, heron and crow

K. Sera, K. Suzuki¹, K. Taguchi¹, K. Chiba², J. Itoh³, S. Goto⁴, C. Takahashi⁴ and Y. Saitoh⁴

Cyclotron Research Center, Iwate Med. University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

¹Department of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University
582 Bunkyou dai Midorichou, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

²Science of Living Department, Morioka Junior College, Iwate Prefectural University
152-52 Sugo, Takizawa, Iwate 020-0193, Japan

³Training section, Japan Radioisotope Association
2-28-45 Honkomagome, Bunkyo, Tokyo 113-8941, Japan

⁴Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

Abstract

The standard-free method developed by ourselves 13 years ago has been widely applied to quantitative analyses of hairs such as human head hair and body hair taken from companion and domestic animals. In the present work, the standard-free method for feather and down samples taken from wild birds such as swan, waxwing, osprey, heron and crow was developed. It is found that the standard-free method developed for human hairs can be successfully applied to feather samples without essential modification since the main constituents of feather are almost the same as those for human and animal hairs and, consequently, the shape of continuous X-rays is also the same. The method allows us to quantitatively analyze untreated feather samples of very small quantities and to prepare the target without complicated preparation technique. Accuracy and sensitivity of the present method were examined by comparing the results with those obtained by an internal-standard method combined with a chemical-ashing method, and it is confirmed that the method is applicable to feather and down samples taken from birds of various species. It is expected that the method will become a powerful tool for the studies not only on the mode of life of wild birds but also on environmental contamination by toxic elements.

Keywords : PIXE, Feather, Down, Standard-free, Wild bird, Untreated, Elemental concentration, Quantitative analysis, Environmental contamination