

## 瀬戸内海・播磨灘堆積物中の コプロスタノールの鉛直分布

門谷 茂, 和泉知加子, 東 和也, 岡市友利

### VERTICAL DISTRIBUTION OF COPROSTANOL IN CORE SEDIMENTS, HARIMA-NADA, THE SETO INLAND SEA

Shigeru MONTANI, Chikako IZUMI, Kazuya AZUMA and Tomotoshi OKAICHI

Fecal pollution of Harima-Nada, the Seto Inland Sea, was investigated by using coprostanol (5 $\beta$ -cholestan-3 $\beta$ -ol) as an indicator. Coprostanol, which is produced by reduction of cholesterol by microorganisms in the intestines of mammals, has been thus far used as an indicator of fecal pollution of aquatic environments.

Coprostanol in the core sediment, was extracted by benzen: methanol (7:3 v/v). Silylated coprostanol was determined by using a gas chromatograph.

Concentration of coprostanol in core sediments at St. 64 and St. 9 (northern part of Harima-Nada) were 0.53  $\mu\text{g g}^{-1}$ , and 1.00  $\mu\text{g g}^{-1}$  at 0-2 cm depth, and decreased rapidly with depth, respectively. On the other hand, relatively high concentrations (0.5 - 0.6  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) were found in the 10-30 cm level at St. 15 (central part of Harima-Nada) which were accumulated before 1967 according to the  $^{210}\text{Pb}$  dating technique. This result shows higher load of fecal waters before 1973 (enforcement of the prohibition law) at central part of Harima-Nada.

コプロスタノール (5 $\beta$ -cholestan-3 $\beta$ -ol) を指標として用いて、瀬戸内海・播磨灘の尿尿汚染の実態を調査した。コプロスタノールは、哺乳動物の腸内細菌によってコレステロールが還元されて生成する物質であることから、水圏環境の尿尿汚染の指標として用いられる。

播磨灘の3測定点から柱状堆積物を採取し、適当間隔に切断し、凍結乾燥した試料をベンゼン:メタノール (7:3 v/v) を用いてステロール類を抽出し、シリル化してからガスクロマトグラフを用いて定量した。

その結果、灘北部沿岸域の定点 (St. 9, 64) では、表層 (0~2 cm) で高濃度 (1.00, 0.53  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) で深度と共に急減していたが、灘中央部の定点 (St. 15) では、10-30 cm深でも0.5~0.6  $\mu\text{g g}^{-1}$  と、表層部の60-70%の値であった。このコプロスタノールの鉛直分布と $^{210}\text{Pb}$ 法による年代測定の結果から、瀬戸内海環境保全特別措置法が施行され、尿尿の海上投棄が禁止された1973年以前には、現在の2倍近くのコプロスタノールが灘中央部に負荷されていたことがわかった。

#### 結 言

瀬戸内海では、瀬戸内海環境保全特別措置法が施行された1973年3月まで、尿尿の海上投棄が行われており、1972年には瀬戸内海沿岸の各府県の全尿尿収集量の21%に相当する約4,000  $\text{K l d}^{-1}$ の尿尿が、大阪湾、播磨灘、燧灘、安芸灘、周防灘等の中央部に投棄されていた。このため多量の有機物が海水中に負荷され、瀬戸内海の富栄養化の一因となり、赤潮発生の背景ともなっていることが予想される。

この尿尿汚染の状況を知る一つの手懸りとして、近年コプロスタノール (5 $\beta$ -cholestan-3 $\beta$ -ol) が指標として用いられている。コプロスタノールは、哺乳類、特に人間やブタ、ウシなどの腸内細菌によって、コレステロール (5-cholestan-3 $\beta$ -ol) が還元されて生成する物質であり、これらの動物の糞便中にもみ見出される特異的なステロールである。また、

ステロイド化合物は他の生脂質よりもかなり長期間微生物による分解に耐えることが知られている。このため、コプロスタノールを河川、湖、海洋沿岸域および港湾の水中や堆積物中の尿尿汚染の指標としたいくつかの報告がある<sup>(1-6)</sup>。

赤潮多発海域である播磨灘では、高松市、岡山市、高砂市などからの尿尿が海上に投棄されていた。1969年には年間約 $1.0 \times 10^8$  kgの尿尿が、主に小豆島東部海域に投棄されており、人間の糞便中には約3.5%のコプロスタノールが含まれている<sup>(7)</sup> ことから計算すると、1969年当時では年間約 $2.8 \times 10^6$  kgのコプロスタノールが播磨灘に負荷されていたことになる。

そこで著者らは、播磨灘全域から合計72地点で柱状堆積物試料を採取し、コプロスタノールおよび他のステロールの抽出、定量を行った。ここでは、そのうちの3地点について鉛直的に分析、定量した結果について報告し、水平分布や沈降堆積過程の推定などについては、別に(Montani and Okaichi, in prep.)<sup>(8)</sup> 報告する。

### 試料および方法

#### 1. 堆積物試料の採取

堆積物試料は、Fig. 1に示した各定点で柱状採泥器を用いて各定点各々4~5本を採取した。これらのうち、今回報告するのはSt. 9, 15, 64の各定点の柱状試料についてである。採取した柱状堆積物試料は、船上にて直ちに2~3cm毎に切断し、凍結保存して実験室まで持ち帰った。この試料を凍結乾燥した後、メノウ乳鉢を用いて粉末状とし、貝殻や小石を除いたものを分析用の堆積物試料とした。

#### 2. コプロスタノールの分析法

凍結乾燥した堆積物試料を用い、Fig. 2に示した方法によってステロール類の抽出、定量を行った。

先ず乾燥試料を、予め抽出溶媒で洗浄後乾燥した円筒濾紙に一定量(10~20 g)を取り、ソックスレー抽出器を用

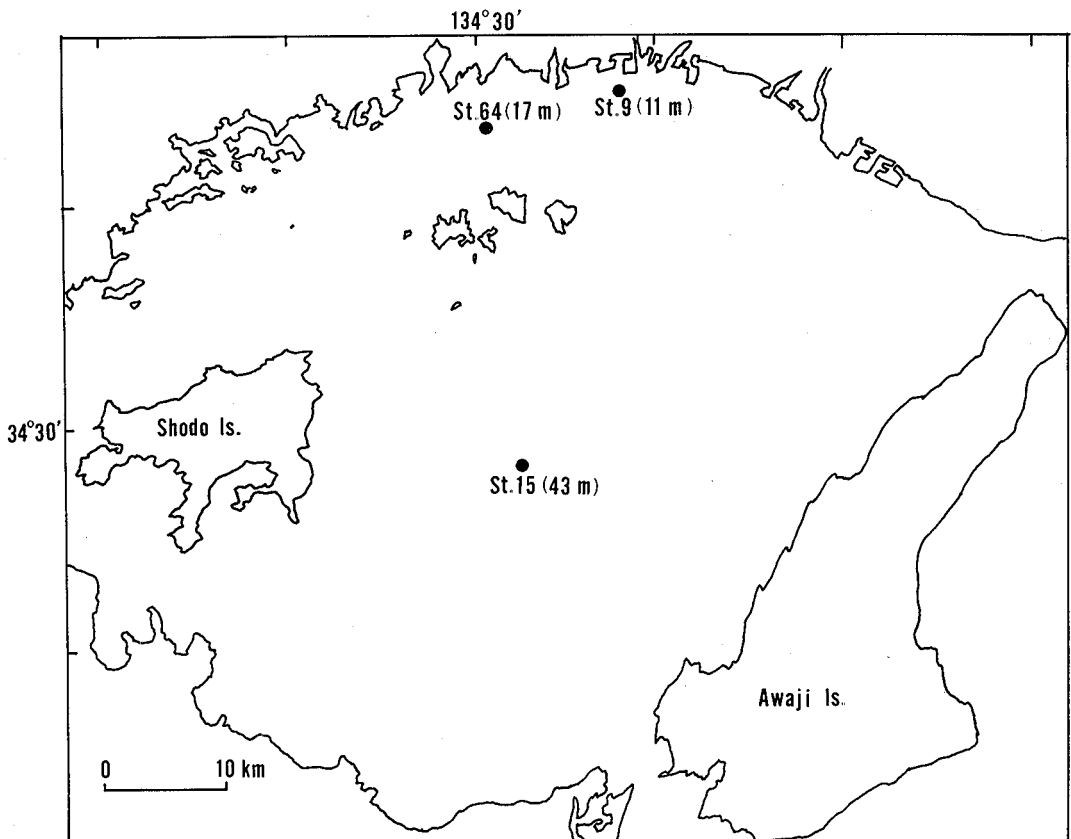


Fig. 1 Location map of sampling stations in Harima-Nada, the Seto Inland Sea.

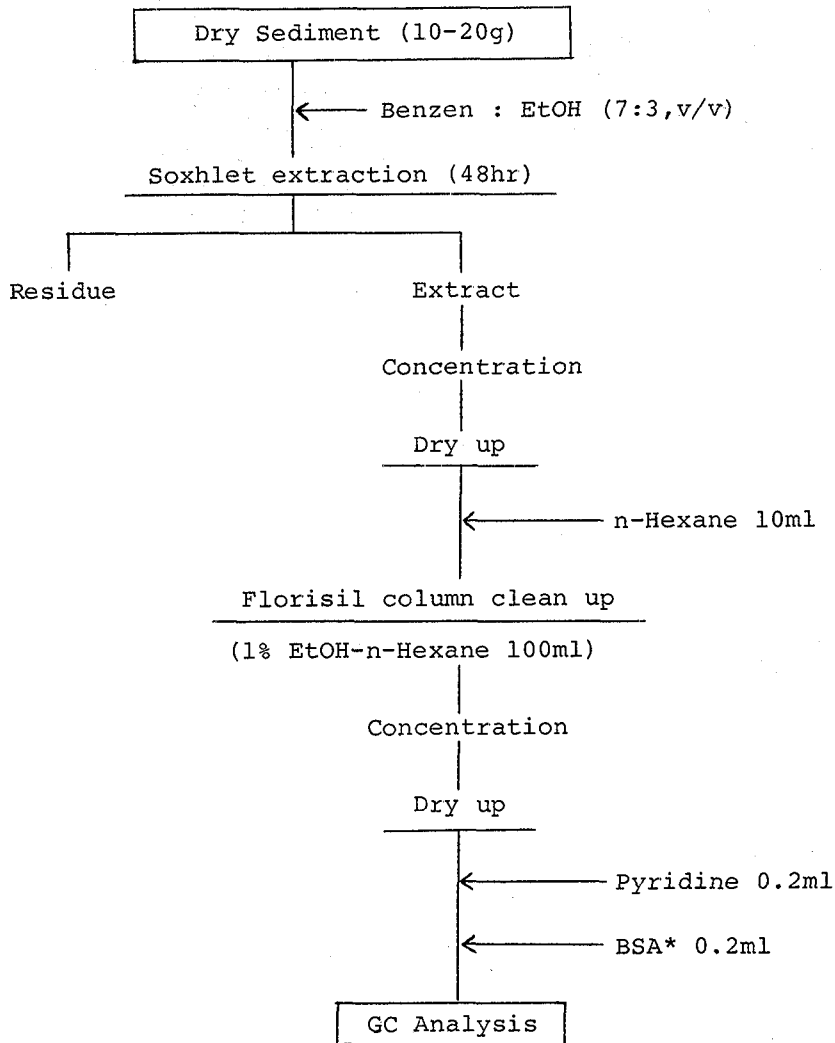
いて, ベンゼン : エタノール (7 : 3 v/v) 130 ml を加え, 80°C で 48 時間抽出を行った。抽出液は, 乾固後 n-ヘキサン 10 ml に溶解し, 一晚 120°C で活性化したフロリジルカラム (10 mm × 100 mm) に吸着させ, 1% エタノール-n-ヘキサン 100 ml で溶出した。溶出液は, 乾固後ピリジンに溶解し, N, O-ビストリメチルシリルアセトアミドを用いて TMS 化してガスクロマトグラフ分析を行った。

ガスクロマトグラフ分析には, 内径 3 mm, 長さ 2 m のガラスカラムを用い, カラム充填剤には, 2% OV-17 on Chromosorb W を, カラム温度は 250~290°C で毎分 2°C の昇温条件とした。

ステロール類の同定は, コプロスタノール, コレステロール, カンベステロール, スティグマステロール, β-シトステロールの標準物質と保持時間を比較して行った。定量は, コレスタン (5α-cholestane) を内部標準物質として一定量加え, これとのピーク面積比から各々のステロール標準物質について検量線を求めた。この時のガスクロマトグラムの一例を Fig. 3 に示した。

3. 有機態炭素の定量

乾燥堆積物試料約 2 g を 200 ml 容ナス型フラスコに取り, 0.5 N-HCl 20 ml を加えて, 一昼夜放置した後, ロータリー



\*N,O-bis-trimethyl silyl-acetamide

Fig 2 Analytical method of sterols.

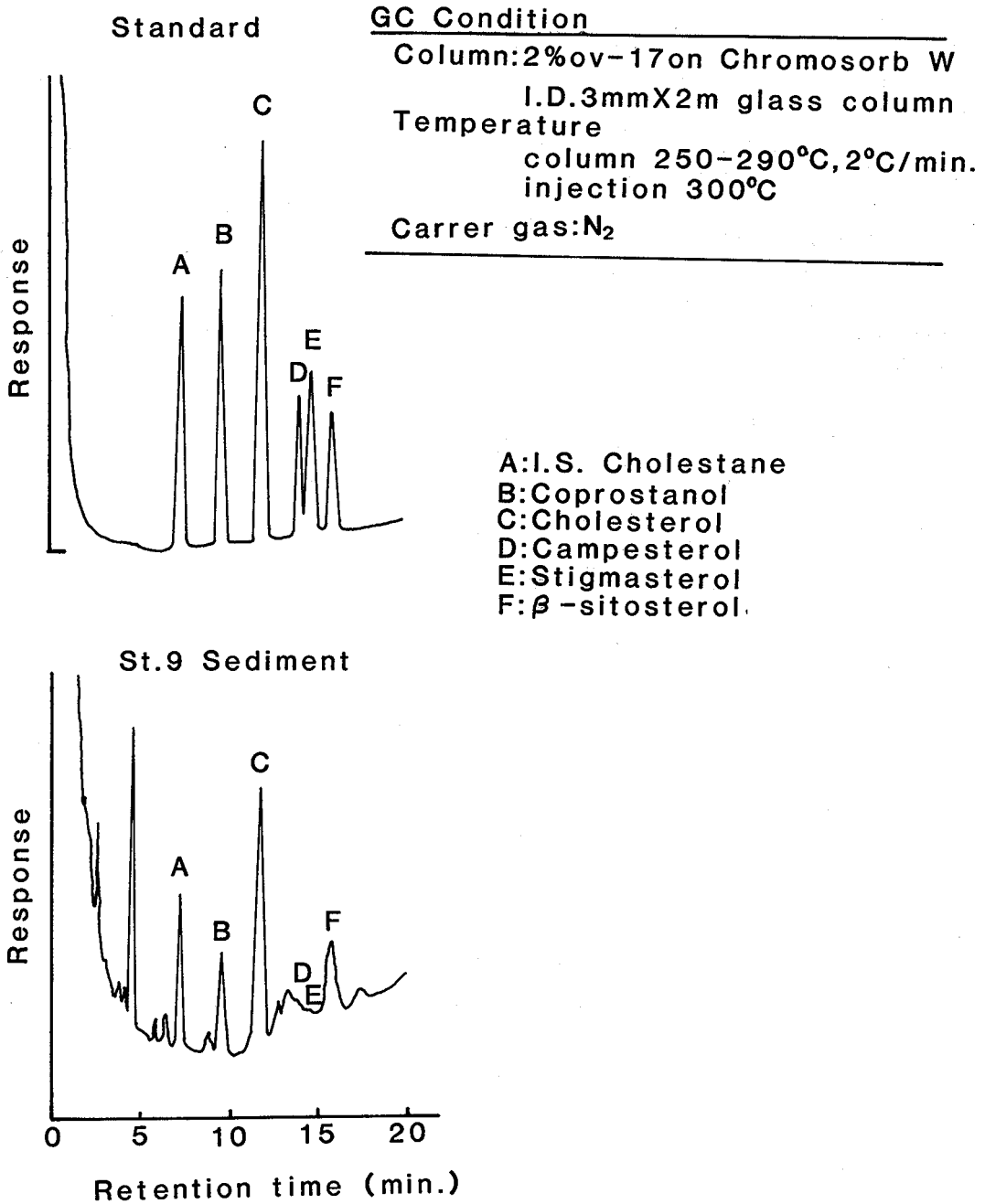


Fig. 3 Gaschromatograms and GC condition of sterol analysis.

エバポレーターを用い、45°C以下の温度で減圧乾固し無機態炭素を除去した。この試料を再度精秤し、柳本社製 MT-500型 CN コーダーを用いて有機態炭素の定量を行った。

4. フェオ色素の定量

乾燥堆積物試料約 1 g を精秤し、10 ml 容遠沈管に取り、それに 90% アセトン 5 ml を加えてから約 15 分間超音波抽出を行った。これをさらに 4 時間冷蔵庫中 (3 ~ 5°C) で抽出した後、遠心分離 (3,000 rpm, 15 分間) を行った。この上澄液を 1 cm セルを用いて 665 nm で比色し、次にこれに 1 N-HCl を数滴加えてから、再び 665 nm で比色し、Strick-

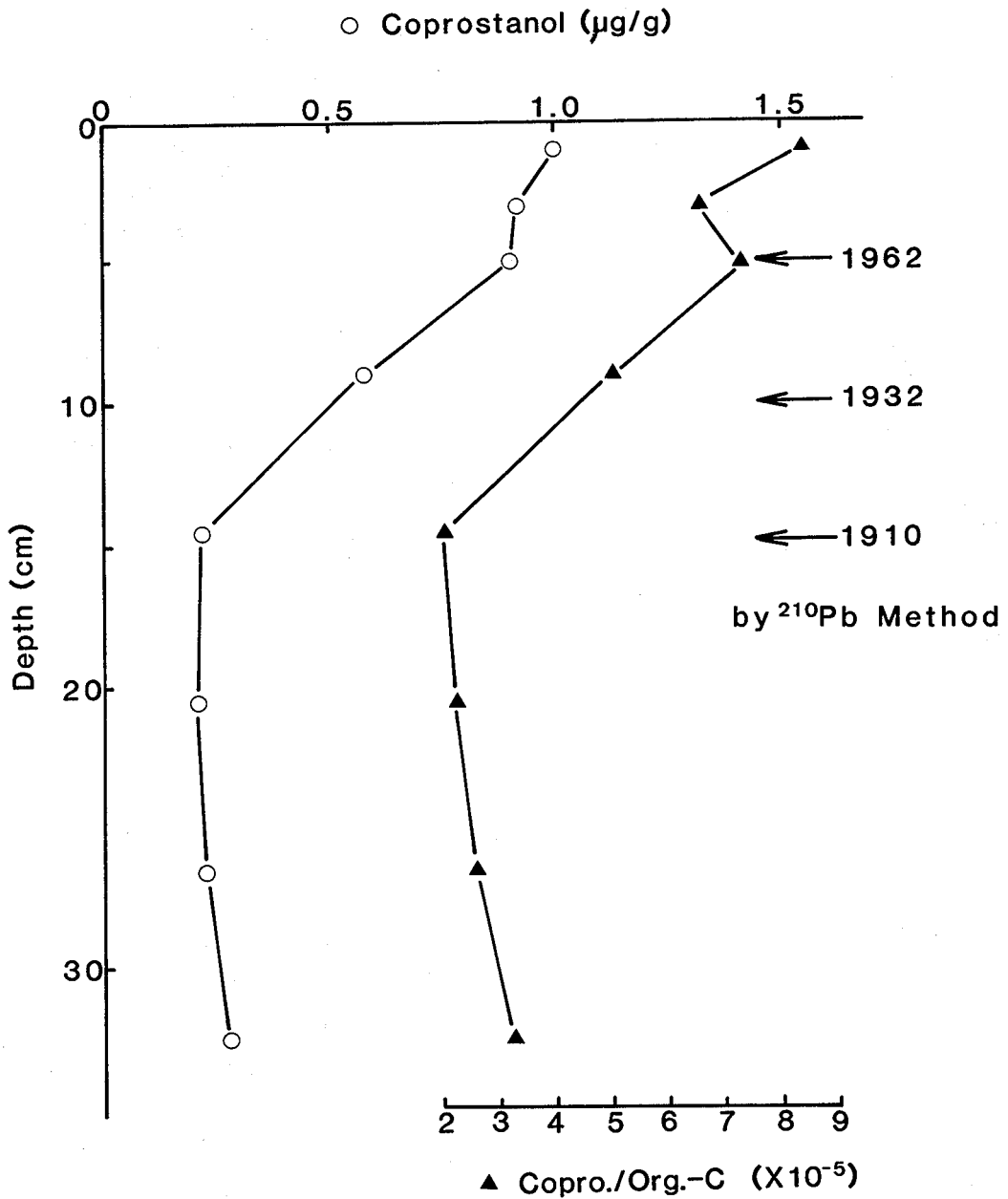


Fig. 4 Vertical distribution of coprostanol and coprostanol/organic-carbon ratio in St. 9 sediment core sample.

land and Persons (1968)<sup>(9)</sup>によってフェオ色素量を求めた。

#### 結果および考察

St. 9, St. 64およびSt. 15における堆積物中のコプロスタノール量とコプロスタノールの全有機態炭素に対する重量比の鉛直分布を Fig. 4 ~ Fig. 6に示した。

St. 9においては, 0 ~ 5 cm深では $0.9 \sim 1.0 \mu\text{g g}^{-1}$ でほぼ一定の値であったが, 5 cmから15 cm深にかけて急激に減少しており, 15 cm以深では,  $0.2 \sim 0.3 \mu\text{g g}^{-1}$ のほぼ一定の値であった。また, St. 64でも表層 ( $0.53 \mu\text{g g}^{-1}$ ) から5 cm

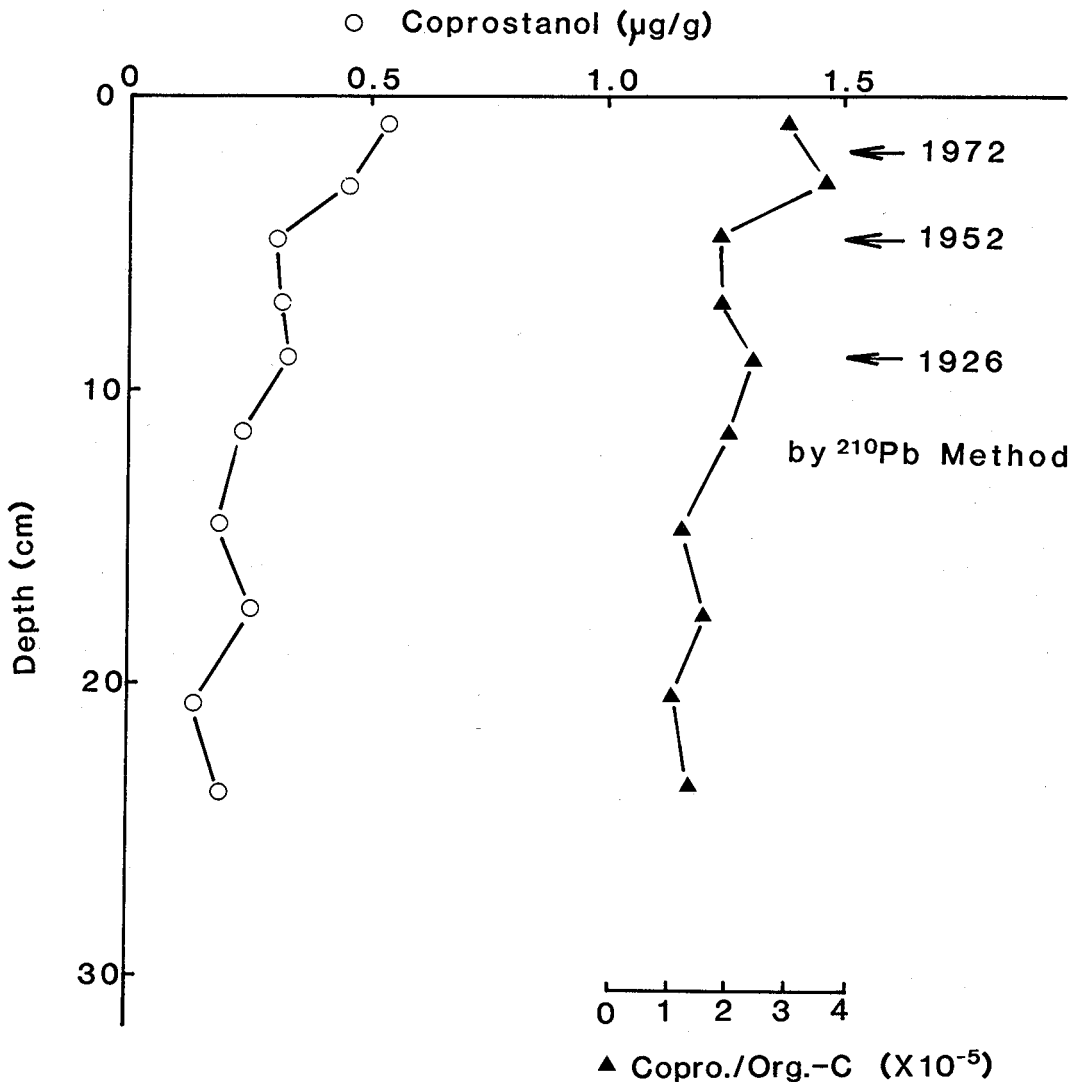


Fig. 5 Vertical distribution of coprostanol and coprostanol/organic-carbon ratio in St. 64 sediment core sample.

深にかけて急減しており、5~12 cm深ではほぼ一定の値( $0.3 \mu\text{g g}^{-1}$ )を示していた。15 cm以深では増減を繰り返しているが、 $0.13 \sim 0.24 \mu\text{g g}^{-1}$ の範囲であった。一方、St. 15では、表層の $0.93 \mu\text{g g}^{-1}$ から2 cmにかけて一度急減して( $\sim 0.68 \mu\text{g g}^{-1}$ )、その後漸減の傾向を示し、10 cm~30 cmでは $0.5 \sim 0.6 \mu\text{g g}^{-1}$ の範囲で一定しており、St. 9, St. 64にみられたような指数関数的な減少は、極く表層(0~2 cm)を除いては見られなかった。

このように、堆積物中のコプロスタノール量の鉛直分布(Fig. 4~6)は、灘北部沿岸域のSt. 9およびSt. 64と、灘中央部のSt. 15では、そのプロファイルが明らかにな異なっていた。

St. 9とSt. 64においては、各々~15 cm、~5 cm深までの層で指数関数的減少がみられた。このことは、St. 9とSt. 64がともに沿岸域に位置していることにより、この期間中は両地点とも同程度の負荷量であったと考えられることと、ステロールの物理化学的分解による半減期がきわめて長い<sup>(10)</sup>ことから、微生物による分解によるものと推定される。

$^{210}\text{Pb}$ 法によって求めた堆積速度<sup>(11,12)</sup>から、各々の測定点での堆積年代を計算すると、St. 9の5 cm深は1962年に当り、St. 64の5 cm深は1952年に相当する。このことから、St. 9の0~5 cm深でコプロスタノール濃度の変化が小さい

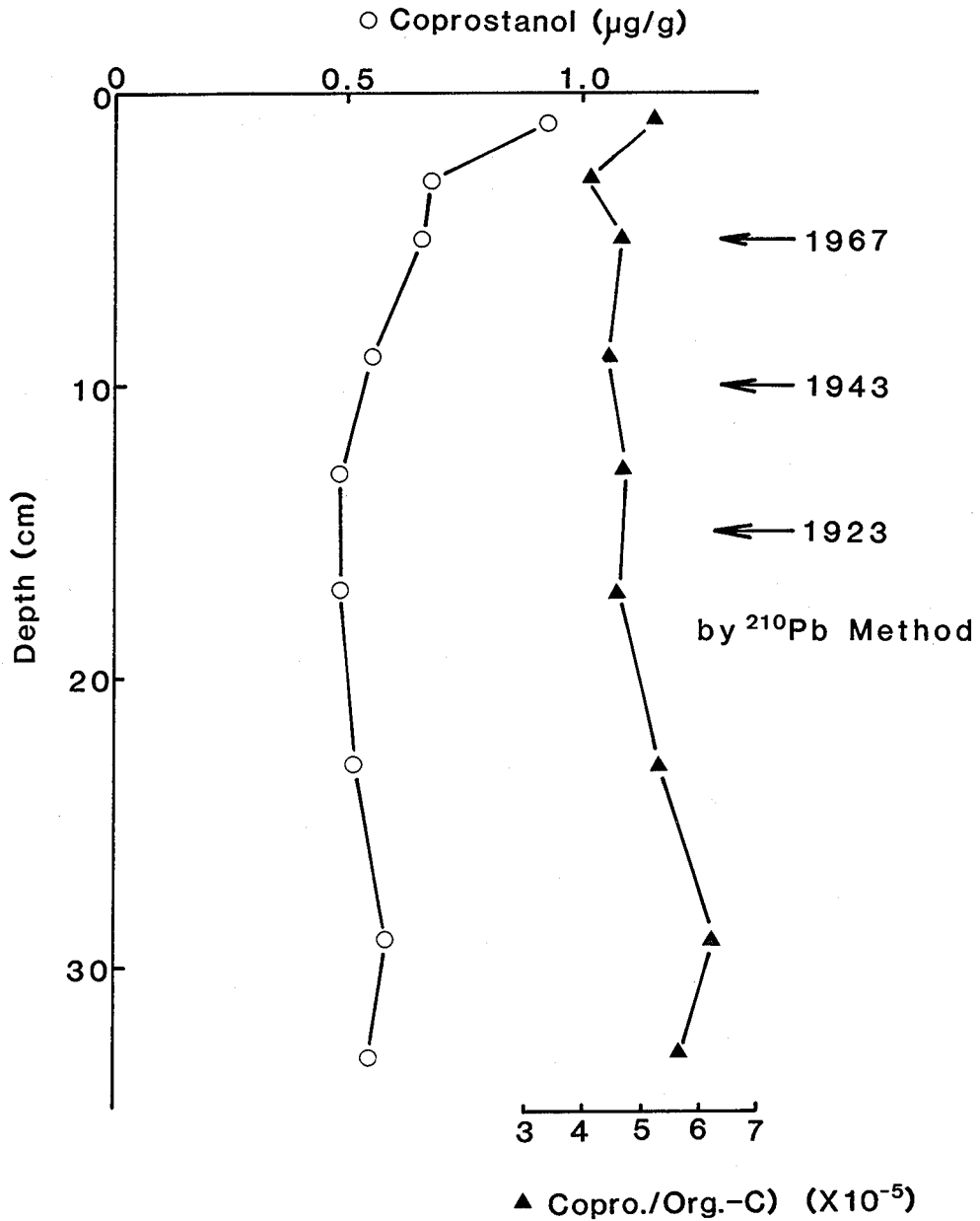


Fig. 6 Vertical distribution of coprostanol and coprostanol/organic-carbon ratio in St. 15 sediment core sample.

のは、10年ほど前からこの地域の尿尿処理施設の増設等により、尿尿の負荷量が減少したことによると考えられる。St. 64では、1952年以後1970年ごろまで負荷量が急増し、1970年以降は負荷量が除々に減少しているのが見てとれる。

また、St. 9の堆積物中の有機態炭素の鉛直分布とコプロスタノール量のプロファイルは大きく異なっており、有機態炭素量に対するコプロスタノール量の比は、表層から15 cm深で大きく減少していた (Fig. 4)。一方、フェオ色素量の鉛直分布 (Fig. 7)は、3測定点とも良く似たプロファイルを示しており、約15 cm深までどちらにも分解しやすいものが消失し、それ以深では一定量のものが安定な形で保持されていると推定される。このことは、3測定点間での堆積物中の微生物の有機物分解能が、それ程大きく異なっていないことを示している。

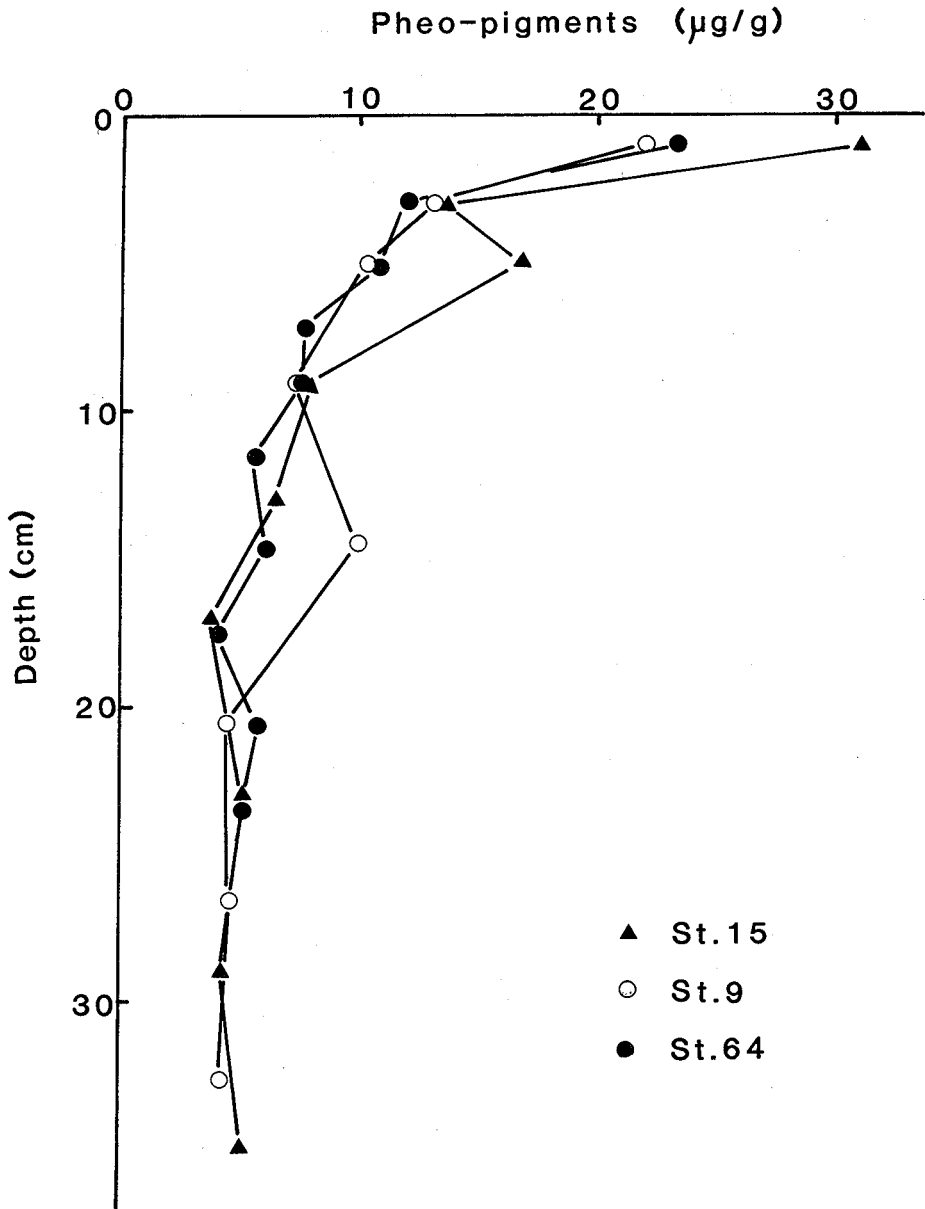


Fig 7 Vertical distribution of pheo-pigments in the 3 sediment core samples.

そこで、St 9におけるコプロスタノール量の鉛直分布から、現場でのコプロスタノールの分解速度定数を求めるために、以下の計算を行った。

5 cm深のコプロスタノール濃度を  $C_0$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )、15 cm深での濃度を  $C_x$  とし、 $^{210}\text{Pb}$  法から求めた 5 cm深と 15 cm深での堆積年代の差から求まる経過年数を  $t$  (y) とすると、分解速度定数  $k$  は次式により求めることができる。

$$k = \frac{1}{t} \cdot \ln \frac{C_0}{C_x} \quad \text{..... (1)}$$

Fig 4の数値を使って計算すると、St. 9におけるコプロスタノールの分解速度定数  $k$  は、 $k = 3.6 \times 10^{-2} \text{g}^{-1}$  となった。

ところで、St. 15の堆積物中のコプロスタノール量の鉛直分布 (Fig. 6) は、St. 9, St. 64に見られたような深度と共に濃度が急減する傾向は顕著ではなかった。尿尿負荷量が定常的であったとすれば、フェオ色素の鉛直分布 (Fig. 7)



のように, St. 9, St. 64 と同様のプロファイルを示すと思われるが, St. 15 ではコプロスタノールの主要供給源であった尿尿の海上投棄の影響が非常に大きく, 近年では海上投棄の禁止により尿尿負荷量がかなり減少したことが原因と考えられる。

そこで, St. 9 で求めたコプロスタノールの分解速度定数  $k$  を用いて, St. 15 における過去の尿尿負荷量を見積もることとする。

St. 15 の 10 cm 深の堆積物は,  $^{210}\text{Pb}$  法による年代決定では 1945 年に相当するので, それぞれ必要な数値を(1)式に代入すると,

$$3.6 \times 10^{-2} = 1/40 \cdot \ln x / 0.5$$

であるので,  $x = 1.8$  となる。つまり, この当時には約  $1.8 \mu\text{g g}^{-1}$  のコプロスタノールが表層堆積物中に存在していたことがわかる。これから, 海上投棄禁止以前には, 現在の約 2 倍量の尿尿起源物質が灘中央部に負荷され, 富栄養化に寄与していたことがわかる。

### 謝 辞

最後に, 試料採取に御協力いただいた, 香川大学農学部浜垣孝司技官および, 広島大学生物生産学部豊潮丸の乗組員の皆さんに記して感謝します。また, 本研究の一部は, 文部省科学研究費 59760151 の補助の下に実施された。

### 引 用 文 献

- (1) DUTKA, B. J., A. S. Y. CHAU and J. COBURN: Relationship between bacterial indicators of water pollution and fecal sterols, *Water Res.*, **8**, 1047-1055 (1974).
- (2) CHURCHLAND, L. M., G. KAN and A. AGES: Variation in fecal pollution indicators through tidal cycles in the Fraser River estuary, *Can. J. Microbiol.*, **28**, 239-247 (1982).
- (3) HATCHER, P. G., L. E. KEISTER and P. A. MCGILLIVARY: Steroids as sewage specific indicators in New York Bight sediment, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **17**, 491-498 (1977).
- (4) 伊藤治郎・立川 涼: 瀬戸内海西部周防灘における尿尿汚染指標としてのステロール *地球化学*, **11**, 70-74 (1977).
- (5) KANAZAWA, A. and S. TESHIMA: The occurrence of coprostanol an indicator of fecal pollution in sea water and sediments, *Oceanol. Acta*, **1**, 39-44 (1978).
- (6) 小椋和子: 東京湾におけるし尿汚染の指標としてのコプロスタノールの挙動, *地球化学*, **17**, 68-75 (1983).
- (7) MURTAUGH, J. J. and R. L. BUNCH: Sterols as a measure of fecal pollution, *J. Water Poll. Contr. Fed.*, **39**, 404-409 (1967).
- (8) MONTANI, S. and T. OKAICHI: Coprostanol as an indicator of fecal pollution in Harima-Nada, the Seto Inland Sea, Japan. (in prep.).
- (9) STRICKLAND, J. D. H. and T. R. PARSONS: *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. Fish. Res. Bd. Can. Bull., No. 167 (1968).
- (10) RHEAD, M. M., G. EGLINTON and G. H. DRAFFAN: Hydrocarbons produced by the thermal alteration of cholesterol under conditions simulating the maturation of sediments, *Chem. Geol.*, **8**, 277-297 (1971).
- (11) 星加章・塩沢孝之・松本英二: 播磨灘における堆積速度と重金属汚染, *日本海洋学会誌*, **39**, 82-87 (1983).
- (12) 門谷茂・岡市友利:  $\text{Pb-210}$  法による播磨灘の堆積速度, *香川大学農学部学術報告*, **36**, 25-30 (1984).

(1987年5月30日受理)