糞特有ステロイドの分析による屎尿汚染の鑑別例と人畜汚染指標に与える
配合飼料中のステロイドの影響について

本多正夫,^a 篠原利明^b

新潟県警科学捜査研究所,^a 科学警察研究所^b

Case Reports of Discrimination of Animal Species by Analysis of Fecal
Steroids and Effects of Sterol Composition in the Assorted Feed
for Pig or Cattle on the Fecal Pollution Indicators

MASAO HONDA^a and TOSHIKI SHINOHARA^b

Criminal Research Laboratory of Niigata Prefectural Police

Head Quarters,^a 4-1 Shinko-cho, Niigata 950, Japan and

National Research Institute of Police Science,^b 6

Sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 102, Japan

(Received January 5, 1987)

This Article reports on the discrimination of animal species by analysis of fecal steroids with respect to the illegal disposal of fecal polluted matters. The pollution indicator, the compositional ratio of 24-ethylcoprostanol to coprostanol on gas chromatographic profile was satisfactorily put in practical application. Twenty one subjects were examined for the discrimination, given as mostly polluted water by pig, cattle, and human excretions. The indicator values of these samples were ranged from 0.12 to 0.28 for human (9 samples), from 0.50 to 0.62 for pig (7 samples). One example of beef cattle gave a value of 1.30, and two subjects of cow excretion showed the values of 1.0 and 1.1. These results were all in good agreement with the criteria of human ($\bar{x}$, 0.17; σx , 0.06; γ , 0.77), pig ($\bar{x}$, 0.57; σx , 0.18; γ , 0.70), cow ($\bar{x}$, 1.33; σx , 0.20; γ , 0.94), and beef cattle (Holstein, $\bar{x}$, 1.65; σx , 0.40; γ , 0.65), respectively.

Effects of sterol composition in the assorted feeds for pig or cattle on the fecal pollution indicators were investigated. The results showed that main components affecting the indicator value were cholesterol, coprostanol reduced from cholesterol by intestine microorganisms, β -sitosterol, predominantly distributed in plant seeds, and 24-ethylcoprostanol, metabolite from β -sitosterol.

Keywords—fecal steroid; pollution indicator; coprostanol; feed sterol

緒 言

著者らは前報¹⁾において、ヒト並びにブタ、ウシの糞中に排泄されるステロイド成分の分析を行い、特に、コレステロール (cholest-5-en-3 β -ol) から腸内細菌によって還元され変化したコプロスタノール (5 β -cholestan-3 β -ol) と、同じく β -シトステロールが代謝還元され生成したと考えられるエチルコプロスタノール (24-ethyl-5 β -cholestan-3 β -ol) の含有比がヒト、ブタ及びウシの各糞について特徴的な値を示すことを明らかにした。すなわち、ガスクロマトグラフィー (GC) によって示される

各ピーク高比 (エチルコプロスタノール/コプロスタノール) はヒトについて約0.17であり、ブタ (約0.57) 及びウシ (1.1—1.7) と明確に判別できることを示した。今回は、昭和55年から昭和60年にかけて、廃棄物の処理及び清掃に関する法律違反等の不法投棄事案に対して実際にこの鑑別法を適用した事例について報告する。また、これらの人畜汚染指標となる数値を特徴づける要因の1つである養豚並びに牛飼育用の配合飼料中のステロイドの分析を試み、これらステロイドが家畜糞から検出されるステロイドと対比して、GC パターン上どのよう

な影響を与えるかについても若干の検討を行ったので併せて報告する。

実験の部

1. 標準試料, 試薬類 GC 用の標準試料としてコプロスタノール, コレスタノール (5 α -cholestan-3 β -ol), コレステロール, ステリグマステロール (24-ethyl-cholest-5,22,-dien-3 β -ol) はガスクロ工業社, エピコプロスタノール (5 β -cholestan-3 α -ol), ステリグマスタノール (24-ethyl-5 α -cholestan-3 β -ol) はシグマ社のものを用いた, また, カンベステロール (24-methylcholesterol) 及び β -シトステロール (24-ethylcholesterol) は東京化成社の混合物標品を Hyde ら²⁾の方法に従い各成分に分離精製したものを用いた. ステロイドのシリル化剤にはクロロメチルジメチルクロロシラン (CMDS, ガスクロ工業) を用い, フロリジルは半井化学社の STD-1 (100—200 メッシュ) を用いた. その他の試薬はすべて市販特級品を用いて実験を行った.

2. 検査試料 鑑別に用いた試料は新潟県内に発生した11件の事案について併せて21検体で, まとめて以下に記載する.

事案1——昭和55年7月, 養豚業者による糞尿の不法投棄被疑事件. 検体(1) 河川の水 1 ℓ , 同(2) 尿尿貯槽内水 1 ℓ .

事案2——昭和55年11月, 牛舎(乳牛)の尿尿槽から尿尿が公共の河川に流れ出し, 魚類の大量へい死を招いた事件, 検体(1) 牛舎の排水 1 ℓ , 同(2) 牛舎の排水口から下流の河川水 1 ℓ .

事案3——昭和56年5月, 駐車中の車の屋根, フロントガラス等に糞便様の汚物を付着させた事件. 検体(1) 車に付着した汚物 少量.

事案4——昭和56年5月, 尿尿処理業者がバキュームカー内容物を不法投棄した事件. 検体(1) 蓮畑の水 1 ℓ , 同(2) 蓮畑から流出する水 1 ℓ .

事案5——昭和57年6月, 尿尿処理場において処理能力を越えた汚水(返送汚泥)を鉄製パイプ及び地下配管類を用い公共河川に不法投棄した事件. 検体(1) 鉄製パイプ (7 cm i.d. $\times$ 1 m) 1本, 同(2) 配管内に残留する水 30 ml, 同(3) 返送汚泥 1 ℓ .

事案6——昭和57年12月, 豚舎の尿尿が河川に漏出し連結する池の養魚が死滅した事件, 検体(1) 河川水 1 ℓ , 同(2) 池の水 1 ℓ , 同(3) 豚舎の貯槽内水 1 ℓ .

事案7——昭和57年12月, 殺人(えい児)死体遺棄事件. 検体(1) 汚物付着のタオル 1枚, 同(2) 汚物付着の脱脂綿 若干.

事案8——昭和58年6月, 養豚業者による尿尿排水の

たれ流しに基因する大量の魚のへい死事件. 検体(1) 養豚場排水口より上流の河川水 1 ℓ , 同(2) 排水口より下流の河川水 1.8 ℓ , 同(3) 養豚場排水口の溜り水 1 ℓ .

事案9——昭和58年10月, 豚舎の未処理尿尿を塩化ビニール製パイプで河川に不法投棄した事件. 検体(1) 塩化ビニール製パイプ内の水 100 ml.

事案10——昭和60年3月, 尿尿処理業者により尿尿約2tを山林に不法投棄した事件. 検体(1) 汚泥様のもの約150g.

事案11——昭和60年8月, 牛舎(乳牛)排水の河川漏出による魚のへい死事件. 検体(1) 牛舎排水 0.5 ℓ , 同(2) 河川に通ずる農業用排水路水 0.5 ℓ , 同(3) 魚のへい死を招いた河川水 1 ℓ .

なお, 参考試料として養豚用の配合飼料4種及び肉牛飼育用配合飼料4種のステロイド成分の分析を行ったが, それらの飼料の種類と原材料名をまとめて以下に記載する.

養豚用配合飼料

原材料の区分	配合割合 (%)			
	a	b	c	d
穀類(とうもろこし他)	63	65	76	68
そうこう類(ふすま, 米ぬか油かす他)	10	17	0	0
植物性油かす類(大豆油)	8	8	18	12
動物質性飼料(魚粉他)	6	6	3	13
その他(動物性油脂, 無機物他)	13	4	3	7

a. 種豚肥育用(日魯漁業社製); b. 種豚飼育用(同); c. 子豚育成用(同); d. 哺乳豚育成用(同).

肉牛飼育用配合飼料

原材料の区分	配合割合 (%)			
	a	b	c	d
穀類(とうもろこし, 小麦粉, 大麦他)	51	69	70	98
そうこう類(ふすま, 米ぬか油かす他)	25	18	14	0
植物性油かす類(大豆油)	17	7	7	0
動物質性飼料(魚粉)	0	0	0	2.0
その他(糖密, 無機物他)	7	6	9	0

a. 若齢牛育成用(日魯漁業社製); b. 肉用牛肥育用(同); c. 肉用牛肥育用(新潟くみあい肥料社製); d. 混合用(日魯漁業社製).

3. 試料からのステロイドの分離法

各検体からのステロイド成分の抽出分離は前報¹⁾に従った。その操作手順を要約する。まず、固型物については1—5gを1N水酸化カリウムを含む90%エタノール溶液50mlに懸濁させ、湯浴上4時間ケン化を行った。水溶液試料についてはあらかじめ浮遊物質の多いものと少ないものとに分け、前者はその10—30mlに1N水酸化カリウム-90%エタノール溶液の50—70mlを加え、ケン化処理を行った。後者は30—500mlをMurtaugh³⁾の方法に従い、ヘキサン抽出したものについて同様にケン化処理した。ケン化後ヘキサン抽出操作を行い、ステロイド成分をヘキサン層に移し、その一部又は全量をChapman⁴⁾によるCMDS法に従いシリル化した。得られたCMDS誘導体をフロリジルカラム(1cm i.d.×30cm)にかけたのち、0.5%エチルエーテルを含むヘキサン溶液25mlで溶出した。続いて2%エチルエーテルを含むヘキサン溶液15mlで同様に溶出を行った。スタノール類を主成分とするはじめの溶出画分をfraction 1とし、あとの2%エーテル-ヘキサン溶出液をfraction 2とした。得られた画分の一部を各々GC用の試料とした。なお、鑑別に用いた各検体(Table I)についてはfraction 1のみGCの対象とした。配合飼料から分離したステロイドについてはfraction 1及びfraction 2をGC分析の対象とした。

4. GC 条件 GCは前報¹⁾と同様に以下に示す条件で行った。

装置——GC-5A型又はGC-9A型(島津製作所製), 検出器, ⁶³N線源 ECD付。

カラム充填剤——ガラスカラム(2.6mm i.d.×2.5m)にクロモソルブW(AW-DMCS, 80—100メッシュ)を担体とするOV-225とOV-25の混合物(1+0.3%)を充填剤としてつめ、更にキャリアガスの出口側に5%ヨードカリをコーティングした同担体を10cmの長さにつめたもの。

カラム温度——250°C

注入口温度——290°C

キャリアガス——N₂ (50 ml/min)

5. GC パターンからの人畜判別 Table Iに記載した各検体についてfraction 1のGCパターンを前報¹⁾の判別法に従い解析した。すなわち、GCで検出される4成分、ピーク(1)コプロスタノール、ピーク(2)メチルコプロスタノール(24-methyl-5 β -cholestan-3 β -ol), ピーク(3) 24-ethyl-5 β -cholest-22-en-3 β -ol, 及びピーク(4)エチルコプロスタノールのうち、ピーク(1)に対するピーク(4)の割合(ピーク高比)を求めた。

結果及び考察

各事案について検体を分析し、求めた汚染指標値、すなわち、ピーク(1)に対するピーク(4)の高比の値を一括してTable Iに記載する。また、人糞と判定された事案3, 4, 5, 7及び10の各検体のうち、代表例として事案4における分析例をFig. 1に、同様に、ブタについての代表例に事案8の分析結果をFig. 2に示す。ウシについては事案2の分析結果をFig. 3に示した。

得られた値はTable Iに示すように、本法¹⁾の汚染指標値であるヒト0.167(σx , 0.057; γ , 0.767)及びウシ1.33(σx , 0.20; γ , 0.944)及びブタ0.57(σx , 0.175; γ , 0.703)の範囲内にあり、検査したすべての事案について糞の鑑別を行うことができた。

コプロスタノールをはじめとするこれらの糞特有スタノール類の成分比の有意の差はヒト及び哺乳動物による代謝機能の違いと食餌による天然ステロール類の供給の違いによるものと考えられるが、後者については配合飼

Fig. 1. Gas Chromatographic Profile of a Sample (#1) in the Case 4

The solvent extraction and hydrolysis of esters to free sterols were performed following the procedure of Murtaugh and Bunch³⁾ throughout from Fig. 1 to Fig. 7. The final extract containing free sterols was led to CMDS derivatives,⁴⁾ applied on a Florisil column (1cm i.d.×30cm), and eluted with 25 ml of hexane containing 0.5% ethyl ether (v/v). The first eluate (15 ml) was discarded, and the subsequent eluate (10 ml, fraction 1) was pooled. An aliquot (1—2 μ l) of fraction 1 was applied on GC-column.

GC conditions; GC-9A (Shimadzu) equipped with ECD (⁶³Ni); Column, OV-225 (1%) and OV-25 (0.3%) on Chromosorb W, AW-DMCS, 80—100 mesh (2.6 mm i.d.×2.5 m); Column temperature, 250°C; Injection temperature, 290°C; Carrier gas, N₂ (50 ml/min).

The four components (peak 1—peak 4) in fraction 1 have been identified as coprostanol (5 β -cholestan-3 β -ol, 1), 24-methylcoprostanol (2), 24-ethyl-5 β -cholest-22-en-3 β -ol (3), and 24-ethylcoprostanol (4) in the previous paper.¹⁾ In this case, 200 ml of the polluted water was treated for the examination.

Fig. 2. Gas Chromatographic Profile of Samples (#1, #2, #3) in the Case 8

Five hundred ml of the sample (#1), 200 ml of the sample (#2), and 10 ml of the sample (#3) were each treated for the extraction of sterols. The subsequent experimental procedure was the same as indicated in Fig. 1 (legend). The amount of coprostanol in the sample (#3) was estimated as 0.4 $\mu\text{g/l}$.

Fig. 3. Gas Chromatographic Profile of a Sample (#1) in the Case 2

Two hundred ml of the polluted water was treated for the extraction of sterols, and the subsequent experimental conditions were the same as in Fig. 1 (legend).

料中のステロイドの分析を試みた結果、興味ある知見が得られた。まず、養豚用配合飼料cについてしらべたところ、fraction 1 (スタノール画分) にはピークは検出されず、fraction 2 (おもにステロール画分) には Fig. 4 に示すように、コレステロール(B)、カンペステロール(D)、スチグマステロール(E)及び β -シトステロール(F)と各々一致するピークが検出された。他の配合飼料(a, b, d)についても Fig. 4 と同様の結果が得られ、GC パターンからは飼料cと有意の差は認められなかった。つぎに、この飼料cによって飼育されたブタ(#18,

Fig. 4. Gas Chromatography of Free Sterols in the Assorted Feed for Pig

Free sterols were isolated from a small amount of a commercial assorted feed (Sample c) for young pig by the solvent extraction and subsequent hydrolysis according to the method of Murtaugh and Bunch.³⁾ A portion of the CMDS derivatives of the sterols (1 mg) was applied on a Florisil column, and eluted with 0.5% ethyl ether in hexane as described in the legend to Fig. 1. No Components were detected in fraction 1, and sequentially the column was passed through with 15 ml of 2% ethyl ether in hexane. The whole eluate (fraction 2) was pooled. An aliquot of fraction 2 (1–2 μl) was then applied on GC-column. The GC conditions were followed by the procedure as shown in Fig. 1 (legend). Several components identical with cholesterol (B), campesterol (D), stigmasterol (E), and β -sitosterol (F) were detected in comparison with the retention time of each authentic compound. Presence of minor sterols, cholestanol and stigmasterol, was not examined.

Fig. 5. Gas Chromatography of Pig Fecal Steroids

The fecal sterols were isolated from a sample (#18), as previously reported.¹⁾ This specimen was fed only by the combination foods (sample c) as shown in Fig. 4. The fecal specific stanols (peak 1–4) in Fig. 1–3 were detected in fraction 1, and significant increase of cholesterol (peak B) was observed in fraction 2.

4ヵ月齢)¹⁾ の糞について同様の実験条件で分析を行ったところ、Fig. 5 に示すように、fraction 1 に前述の糞特有の4成分が検出され、また、fraction 2 には Fig. 4 に示したピーク (B, D, E, F) のほか、新たにピーク

TABLE I. Discrimination of Animal Species from an Indicator of Fecal Pollution by Using Gas Chromatography

Case	Test sample (amount)	Indicator value ^{a)}	Discrimination of animal species
1. IDW ^{b)}	#1 Polluted water in river (1 ℓ)	0.50	Pig
	#2 Polluted water in the storage of pig excretion (1 ℓ)	0.53	Pig
2. IDW	#1 Draining water (1 ℓ)	1.0	Cow
	#2 Water down the river from drainage of the cow-house (1 ℓ)	1.1	Cow
3. A minor offence	#1 Fecal matter on a car (small amount)	0.20	Human
4. IDW	#1 Water in the lotus farm (1 ℓ)	0.12	Human
	#2 Water issued from the lotus farm (1 ℓ)	0.13	Human
5. IDW	#1 An iron tube (7 cm i.d. × 1 m)	0.25	Human
	#2 Water remained in a running pipe (30 ml)	0.24	Human
	#3 Over-charged human fecal pollutant in the public disposal facilities (1 ℓ)	0.24	Human
6. IDW	#1 Polluted water in a river (1 ℓ)	0.59	Pig
	#2 Water in a pond (1 ℓ)	0.58	Pig
	#3 Polluted water in the storage of pig excretion (1 ℓ)	0.60	Pig
7. An infanticide with abandonment of the sacrifice	#1 A towel polluted with fecal matter	0.24	Human
	#2 A piece of cotton stuck with fecal matter	0.28	Human
8. IDW	#1 Water up the river from drainage of the pig-house (1 ℓ)	Not detected	-
	#2 Water down the river from drainage of the pig house (1.8 ℓ)	0.58	Pig
	#3 Water in the drainage of the pig-house (1 ℓ)	0.51	Pig
9. IDW	#1 Water remained in a polyvinyl chloride tube (100 ml)	0.62	Pig
	#1 Fecal matter (150 g)	0.24	Human
10. IDW	#1 Polluted water issued from drainage of the cow-house (500 ml)	1.30	Cow
11. IDW	#2 Water in the farm-creek (500 ml)	Not detected	-
	#3 Water down the river from an outlet of the farm-creek (800 ml)	Not detected	-

a) The indicator value is expressed as the peak height ratio of 24-ethylcoprostanol to coprostanol on the gas chromatographic profile under the experimental conditions described in the text. Mean values of the ratio were given as 0.167 (σx , 0.057; r , 0.767; n 40) for human, 0.569 (σx , 0.715; r , 0.703; n , 45) for pig, and 1.33 (σx , 0.199; r , 0.944; n , 32) for cow, respectively.¹⁾

b) Illegal disposal of waste matters.

AとピークCが検出された。特に、コレステロールに相当するピークBは糞中に強く観察された。配合飼料及び糞のステロイド成分の分析をウシ(ホルスタイン肉牛 #8)¹⁾についても検討したところ、それぞれ、Fig. 6 及び Fig. 7 に示すような成績が得られた。Fig. 6 は牛用配合飼料bについて分析したもので、GC チャート上では他の配合飼料(a, c, d)の分析結果と有意の差はなかった。Fig. 7 の fraction 1 には糞特有スタノール成分(ピーク(1)–(4))が観察され(ピーク高比 1.23),¹⁾ fraction 2 には飼料中に認められるピークB(コレステロー

ルに相当)、ピークD(カンペステロールに相当)、ピークE(スチグマステロールに相当)及びピークF(β -シトステロールに相当)のほか、ピークA(エピコプロスタノールに相当)とピークC(24-エチルエピコプロスタノールに相当)が顕著に見出された。なお、ピークAとピークCについては質量分析その他の手法によって化合物の確認を試みたが、詳細は別に発表する予定である。これらの実験結果から、汚染指標となるヒト、ブタ及びウシについての各ピーク高比(ピーク(4)/ピーク(1))において、コプロスタノールに由来するピーク(1)には体内で生合成

Fig. 6. Gas Chromatography of Free Sterols in the Assorted Feed for Cattle

Free sterols were isolated from a small amount of a commercial assorted feed (sample b) for beef cattle by the same procedure described in the legend to Fig. 4. No components were detected in fraction 1.

されるコレステロール量と腸内細菌によって還元されたコプロスタノールの含有量が関与しており、また、ピーク(4)には食餌に由来する β -シトステロールが還元されて生成すると考えられる24-エチルコプロスタノールの糞中含有量が寄与していることが判明した。配合飼料中の植物ステロール成分については伊藤らの総説⁵⁾があり、とうもろこし中には61-73%の β -シトステロール、約20%のカンペステロール及び5-7%のスチグマステロールが存在し、これらのステロール成分が他の穀物にもおおむね主成分となっている。また、Enerothら⁶⁾も食餌療法でコントロールしたヒトの糞便中のステロイドの分析を詳細に行い、特徴的なステロイド成分としてコ

Fig. 7. Gas Chromatography of Cattle Fecal Steroids

The fecal steroids were isolated from a sample (#8, holstein) as previously reported.¹⁾ This specimen was fed only by the combination foods (sample b) as shown in Fig. 6. The GC-profile of fraction 1 indicated a specific peak height ratio (peak 4/peak 1; 1.23) for beef cattle. The two components observed in fraction 2, peak A and C, may be the other specific pollution indicators for cattle feces. The structural elucidation of these compounds will be accounted elsewhere.

プロスタノールとその前駆物質であるコレステロール、また、24- β -エチルコプロスタノールとその前駆物質、 β -シトステロール（食餌由来）を挙げている。

結 語

糞中特異ステロイドの分析から、人畜尿尿汚染の鑑別法を確立させ、この鑑別法を廃棄物不法投棄等の事案に対して応用した。また、配合飼料中のステロイド成分の分析も併せて行い、糞中ステロイドとの関連性を考察した。

引 用 文 献

- 1) 本多正夫, 篠原利明, 衛生化学, **32**, 114 (1986).
- 2) P.M. Hyde, W.H. Elliott, *J. Chromatogr.*, **67**, 170 (1972).
- 3) J.J. Murtaugh, R.L. Bunch, *J. Water Pollut. Control Fed.* **39**, 404 (1967).
- 4) J.R. Chapman, *Anal. Chem.*, **45**, 1636 (1973).
- 5) 伊藤俊博, 松本太郎, 油化学, **27**, 745 (1978).
- 6) P. Eneroth, K. Hellström, R. Ryhage, *J. Lipid Res.*, **5**, 245 (1964).