

# 北九州市山田緑地の過剰肢ガエルの原因究明

門上希和夫 \*・武石全慈 \*\*・柏木昭彦 \*\*\*・倉本満 \*\*\*\*・小野勇一 \*\*

## 1 はじめに

1995年6月、北九州市の自然公園「山田緑地」において過剰肢を持つヤマアカガエル *Rana ornativentris* の幼体（写真1）が発見された<sup>1)</sup>。「山田緑地」は、自然度の高い常緑二次林からなる丘陵地（140ha、標高18m～188m、図1、写真2）であるが、同地を含む一帯352haは山田弾薬庫跡地と称され、1972

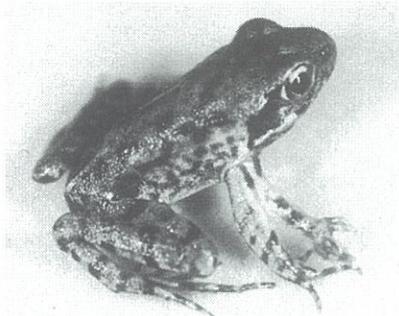


写真1 過剰肢のヤマアカガエル幼体



図1 山田緑地及び対照2地域

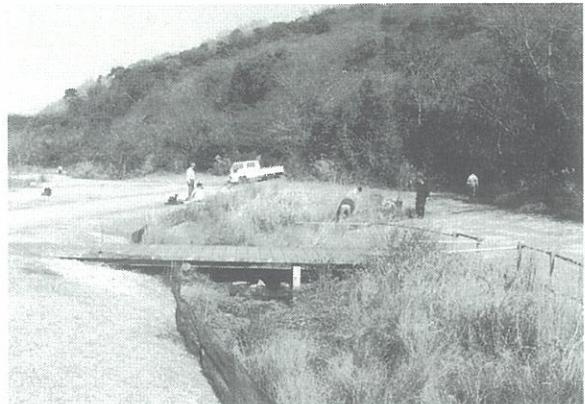


写真2 カエルを採捕した山田緑地内の池

年まで約40年間旧日本陸軍（1934年～1945年）と在日米軍（1945年～1972年）によって弾薬庫として使用されていた。そのため何らかの有害化学物質が、直接的または間接的に過剰肢の原因であるという懸念が生じた。実際、旧日本陸軍関係者からの情報によれば、1941年から1945年までは砲弾・手榴弾等にTNT爆薬を填実する「山田填薬所」が存在し、飛散したTNT粉末により極度の汚染が生じていたという。そこで、北九州市は1996年から2002年にかけて、環境ホルモンを含む有害物質と遺伝の2つの観点から原因究明を行った。本稿では、原因究明結果とその過程で得られた両生類生態系でのダイオキシン類の動態に関して報告する。

## 2 過剰肢発生率調査

1995年から2001年の7年間、山田緑地のヤマアカガエル、ニホンアカガエル *Rana japonica japonica* 及びニホンヒキガエル *Bufo japonicus japonicus* の幼体の四肢異常を調査したが、過剰肢はヤマアカガエ

\*北九州市環境科学研究所 \*\*北九州市立自然史・歴史博物館 \*\*\*広島大学両生類研究施設 \*\*\*\*北九州市における外因性内分泌攪乱化学物質の野生生物に与える影響に関する検討委員会

ルにはほぼ限られた。

また、1997年から2001年に山田弾薬庫跡地内に産卵されたヤマアカガエルの一部の卵を採取し、変態直後まで室内で飼育して過剰肢幼体の出現率を調べた。その結果を表1に示すが、1卵塊当たりの過剰肢幼体の出現率には大きな差があったものの、全卵塊の平均出現率は0.7~2.0%と年による変動はほとんどなかった。なお、過剰肢は、ほぼ前肢に限られた。

表1 山田弾薬庫跡地で採集したヤマアカガエル卵塊の室内飼育による過剰肢幼体の出現率の年変化

調査場所	調査年	調査卵塊数	過剰肢が出現した卵塊の割合(%) (A)	過剰肢出現卵塊での出現率(%)と範囲(%) (B)	過剰肢幼体出現率(%) (A) × (B)
山田緑地	1997	9	11.1	14.2	1.6
	1998	160	10.6	10.3 (0.4~31.0)	1.1
	1999	74	18.9	10.5 (0.5~28.1)	2.0
	2000	45	15.6	5.6 (0.6~16.1)	0.9
	2001	21	9.5	7.0 (6.4~7.6)	0.7
財務省管理地	2000	14	21.4	9.0 (4.4~12.9)	1.9

2000年には、山田緑地以外の福岡県内4か所、宮城県1か所、青森県2か所から、ヤマアカガエルの3~9卵塊を採集して飼育した。430匹から2,877匹までの幼体を得たが、北九州市内の1か所からの1匹(823匹中1匹で出現率0.1%)を除き、過剰肢を持つ幼体は出現しなかった。

日本国内では1928年以降1993年までに、少なくとも10種26件の過剰肢を持つカエル類の事例が、青森県から沖縄県の範囲で報告されている<sup>1)</sup>。過剰肢個体の出現率を求めた事例はないが、1件当たり1~2匹の過剰肢個体が確認されているだけである。これらから、過剰肢を持つカエル類は時々出現するものの、その出現率はかなり低く、山田緑地におけるヤマアカガエル過剰肢幼体の出現率はかなり高いと考えられた。

### 3 交配試験（遺伝の観点からの原因究明）

遺伝の観点からの原因究明として交配試験を行った。1998年6月に山田緑地でヤマアカガエル幼体を採集し、室内飼育を行ない、2000年1月には成熟期に達した正常肢個体25匹（オス13匹、メス12

匹）と異常肢個体20匹（オス15匹、メス5匹）を得た。これらから、正常前肢のメスと正常前肢のオス、正常前肢のメスと異常前肢のオス、異常前肢のメスと正常前肢のオス、及び異常前肢のメスと異常前肢のオス、の4通りの交配を行なった。その結果を表2に示すが、正常前肢のメスオス同士の組み合わせを除く、他のすべての組み合わせから得られた子孫では発生が著しく阻害された。また、正常前肢のメスと異常前肢のオス、及び異常前肢のメスオス同士の交配から生まれた子孫の中には、異常前肢を示すものはもとより、後肢異常を持つものも見られ、ヤマアカガエルの四肢異常の遺伝子は複数存在する可能性があることが示唆された。

表2-1 正常メスと正常及び異常オスとの交配から生まれた子孫の四肢

メス	オス	前肢		後肢	
		正常	異常	正常	異常
正常3個体	正常2個体	55	0	55	0
	異常3個体	46	11	51	6

表2-2 異常メスと正常及び異常オスとの交配から生まれた子孫の四肢

メス	オス	前肢		後肢	
		正常	異常	正常	異常
異常3個体	正常3個体	26	0	26	0
	異常4個体	55	28	45	38

### 4 有害化学物質調査（環境化学の観点からの原因究明）

過剰肢ガエルが発見された1995年から水質を中心とする有害物質や放射線（空間線量）の調査を毎年行なったが、特に過剰肢の原因と思われる物質は検出されなかった。そこで、1998年に環境庁（現環境省）の協力を得て、総合的な調査を実施した。分析した有害物質は、揮発性化学物質、重金属、半揮発性化学物質、環境ホルモン及びダイオキシン類などで、計400物質以上にのぼる。分析試料は、山田緑地と比較対照とした市内の2地点（図1）の環境（水質及び土壤）、生息する2種のカエル（ヤマアカガエル及びニホンアカガエル）及びメスガエルから採取した卵である。また、バイオアッセイによる水質や土壤の変異原性についても調査を行った。

調査結果の概要であるが、在日米軍が使用した殺虫剤のDDT類と旧日本軍が使用したと考えられる爆薬の2,4,6-トリニトロトルエン(TNT)を除き、山田緑地の水質、土壤からの検出濃度は一般環境と同レベルであった。また、DDT及びTNTの検出濃度も形態異常の原因となる濃度レベルではなかった。以上から、現在の山田緑地の環境からは、調べた限り過剰肢と関連の可能性がある物質は見出されなかつた。

しかし、DDTとTNTの検出は、第二次世界大戦前・中及び米軍進駐時に、山田緑地がTNTやDDTにより高濃度に汚染されていたことを裏付けるものである。即ち、現在の山田緑地には、過剰肢を発生させる程の化学物質汚染は存在しないが、過去に存在した可能性は否定できない。特に、TNT及びその代謝物(2-アミノ-4,6-ジニトロトルエン及び4-アミノ-2,6-ジニトロトルエン、共に土壤から検出)は、催奇形性、変異原性、染色体異常能を有していることがバイオアッセイの結果明らかとなつた。2-アミノ-4,6-ジニトロトルエンは、催奇形性が特に大きく、TNTは強い染色体異常能を示した。これらの毒性は、過剰肢の発生に結びつく可能性があるため、TNTとその代謝物の過剰肢との関連について今後調査研究が進められることが期待される。

## 5 カエル生態系におけるダイオキシン類の動態

両生類の化学物質への暴露実態の把握や生息環境における化学物質の挙動の解明は、化学物質の両生類への影響を評価(生態リスク評価)する上で非常に重要である。しかし、カエルとその生息環境の両方を対象として化学物質を調査した例は少なく、さらにカエルとその卵を共に測定した報告はないため、化学物質の両生類生態系での挙動は、現在までほとんど分かっていない。そこで、今回の調査で得られたカエルの生息環境、カエル及びその卵中のダイオキシン類の調査結果を基に、生息環境から体内へ<sup>2,3)</sup>、さらに母体から卵へのダイオキシン類の

動態の検討を行った。

### 5.1 土壤とカエル間でのダイオキシン類濃度の関係

陸上の両生類では疎水性化学物質は主に経口経由で体内に蓄積される<sup>4)</sup>ため、土壤中のダイオキシン類がカエルの体内濃度に直接影響を与える可能性は少ない。しかし、カエルの栄養段階は低く、今回調査した2種は共に昆虫、その幼虫、ミミズやナメクジ等を餌としていることから、土壤中のダイオキシン類は間接的ではあるがカエルの体内濃度に強く影響を与えていていると考えられる。このことは、図2に示したカエルと土壤の異性体構成比が調査地域毎にそれぞれ類似していることから裏付けられた。

カエルにおけるPCDD/DF及びCo-PCBの摂取と排泄を明らかにするために、山田緑地の土壤とオスガエルのダイオキシン類の濃度比を検討した。オスガエルの脂肪換算濃度と土壤濃度(乾重量換算)の比を図3に示すが、次の3点が明らかとなった。第一に、PCDD/DFの生物濃縮率は、Co-PCBよりもかなり低いことが確認された。カエル中のCo-PCB濃度(脂肪換算)は、土壤(3,3',4,4'-T4CBは除く)に比べて85~330倍あったが、PCDD/DFは土壤に対し70倍以下であった。PCDD/DFの濃縮率が低い理由としては、PCBに比べて生分解が速いことと、他の水生生物で報告<sup>5,6)</sup>されているようにPCDD/DFの吸収効率が低いためと考えられる。これらの結果から、カエルにおけるPCDD/DFの生物濃縮率は、PCB等の疎水性の塩素化芳香族炭化水素よりもかなり低い事が確認された。

第二に、PCDD/DFの生物濃縮率は、塩素数が増すにつれて減少することが分かった。これは高塩素化体ほど分子サイズが大きくなり膜を通過しにくくなるためである<sup>6)</sup>。一方、Co-PCBでは、塩素数に比例して生物濃縮率が大きくなり、さらに塩素の置換位置が生物濃縮に強く関与していることが分かった。例えば、3,3',4,4'-P4CBでは、土壤に対するカエルの脂肪換算濃度は10倍以下であり、他のCo-PCBに比べてもかなり低かった。3,3',4,4'

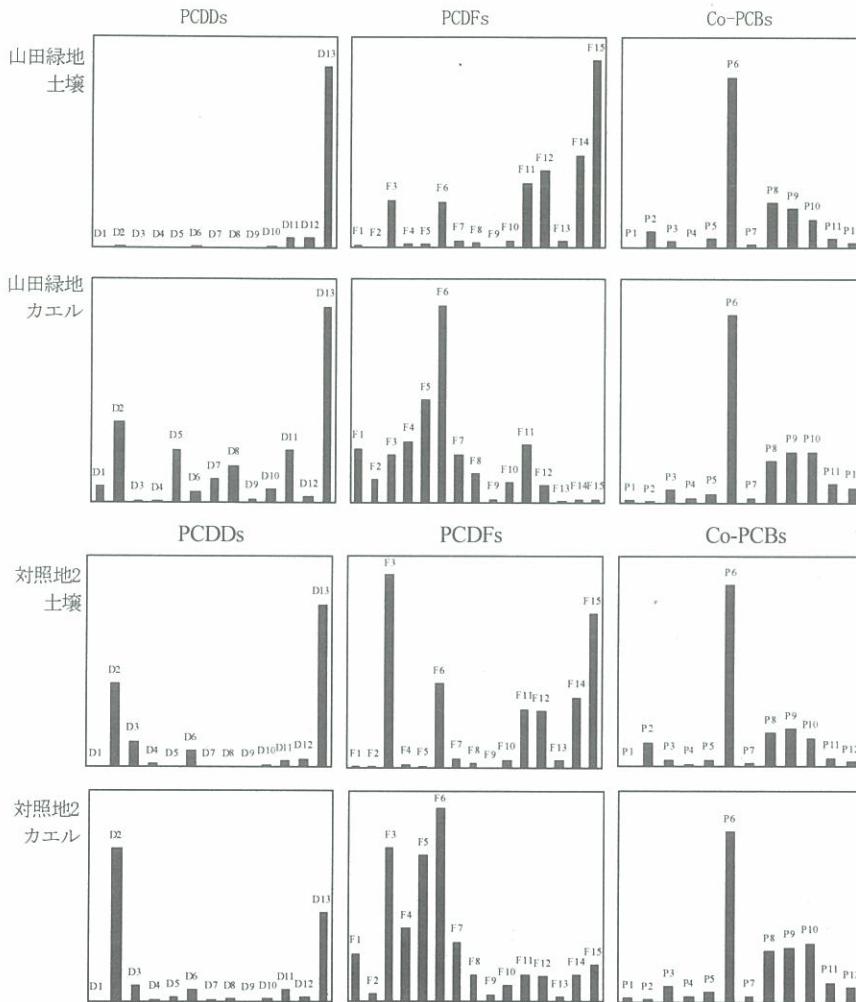


図2 山田緑地及び対照地2のPCDD/PCDF及びCo-PCBの異性体構成比  
コンジエナー濃度は幾何平均である。土壤はdryベース、カエルは  
脂肪ベースで算出。

D1, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (T4CDD); D2, 1,3,6,8-T4CDD; D3, 1,3,7,9-T4CDD; D4, Other T4CDDs; D5, 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzo-*p*-dioxin (P5CDD); D6, Other P5CDDs; D7, 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzo-*p*-dioxin (H6CDD); D8, 1,2,3,6,7,8-H6CDD; D9, 1,2,3,7,8,9-H6CDD; D10, Other H6CDDs; D11, 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-*p*-dioxin (H7CDD); D12, Other H7CDD; D13, octachlorodibenzo-*p*-dioxin; F1, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran (T4CDF); F2, 1,3,6,8-T4CDF; F3, Other T4CDFs; F4, 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzofuran (P5CDF); F5, 2,3,4,7,8-P5CDF; F6, Other P5CDFs; F7, 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzofuran (H6CDF); F8, 1,2,3,6,7,8-H6CDF; F9, 1,2,3,7,8,9-H6CDF; F10, 2,3,4,6,7,8-H6CDF; F11, Other H6CDFs; F12, 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzofuran (H7CDF); F13, 1,2,3,4,7,8,9-H7CDF; F14, Other H7CDFs; F15, octachlorodibenzofuran; P1, 3,4,4',5-tetrachlorobiphenyl (T4CB); P2, 3,3',4,4'-T4CB; P3, 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (P5CB); P4, 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (H6CB); P5, 2',3,4,4',5-P5CB; P6, 2,3',4,4',5-P5CB; P7, 2,3,4,4',5-P5CB; P8, 2,3,3',4,4'-P5CB; P9, 2,3',4,4',5,5'-H6CB; P10, 2,3,3',4,4',5-H6CB; P11, 2,3,3',4,4',5'-H6CB; P12, 2,3,3',4,4',5,5'-heptachlorobiphenyl である。

—P4CBについては、魚においても生物濃縮率が低い事が報告<sup>7)</sup>されており、3,3',4,4'-P4CBは代謝されやすいことが認められた。

第三に、他の水生生物と同様に、カエルにおいても、2,3,7,8－体の生物濃縮率が、非2,3,7,8－体と

比べて非常に大きいことが認められた<sup>5,8)</sup>。2,3,7,8－体は、非2,3,7,8－体と比べて代謝を受けにくく体内残留性が高いためである。しかし例外もあり、1,3,6,8-T4CDFの生物濃縮率は、2,3,7,8-T4CDFとほぼ同じであった。以上から、カエルに

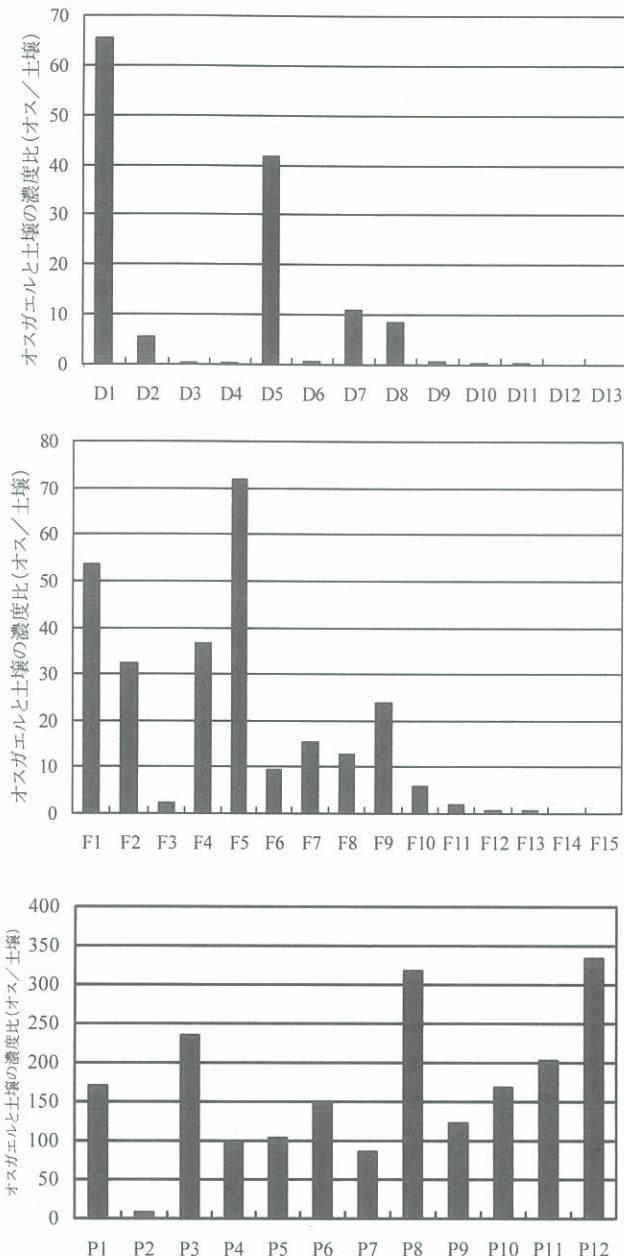


図3 山田緑地の土壤とオスガエルのダイオキシン類の濃度比

注) 略号は図2参照

おいても PCDD / DF の 2,3,7,8 一体が、選択的に体内に濃縮されると結論できる。この 2,3,7,8 一体の選択的濃縮は、カエルにとっては大きな問題になると思われる。なぜならば、PCDD / DF では、2,3,7,8 一体だけが毒性のある化合物として分類されるからである。カエルの PCDD / DF 濃度（湿重量換算）は、土壤の 0.5% しか占めていないが、その TEQ 値は土壤に対して 36 % に達する。

## 5. 2 ダイオキシン類濃度の性差

ダイオキシン類濃度（湿重量換算）に性差がある

か、3 地域で捕獲した全てのカエルを使用して検討を行なった。その結果を図4に示すが、オスがメスに比べて有意に高濃度であることが確認された。しかし、有意さが認められたのは、PCDD では主に 4 ~ 6 塩素化体、PCDF では 4 及び 5 塩素化体であった。一方、Co - PCB では塩素数に拘わらず有意な差があった。

そこで、母体と卵を合わせた濃度とオスの濃度の比較を行った。卵の分析を行ったメスガエルは、調査したカエルの中でも比較的高濃度の個体であるため、その平均濃度と全個体の平均濃度の比から全個体の卵濃度を推定した上で、全個体の母体と卵を合わせた濃度を求めた。その結果、図4に示したように全ての異性体において、オス・メス間で有意に認められた濃度差が無くなかった。即ち、卵を含むメスの湿重量換算濃度とオスの濃度はほぼ同一となり、母体から卵への移行が性差の原因であることが確認された。

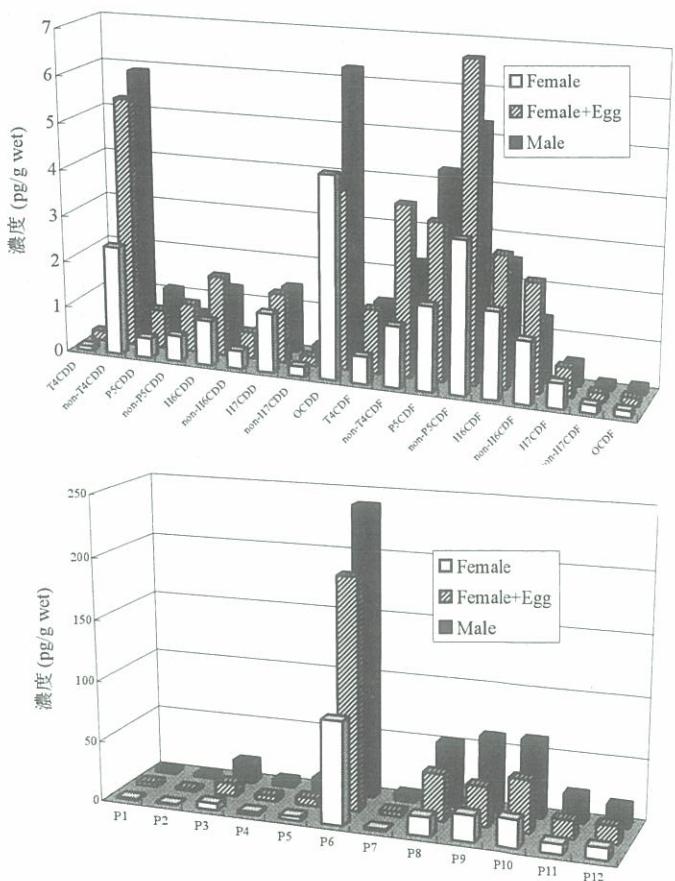


図4 ダイオキシン類濃度の性差

注) 略号は図2参照

### 5.3 メスから卵へのダイオキシン類の移行

卵生生物において疎水性化学物質が卵に蓄積するメカニズムは、フガシティーモデルと考えられている<sup>9,10)</sup>。この場合、脂肪換算濃度において卵/母体比が1となる。魚類を中心とした実際の生物では、95%が0.5~2.5の範囲に収まるが、1より有意に小さい例も報告されている<sup>9)</sup>。数は少ないものの、両生類に関しても1より有意に小さい報告がある<sup>9)</sup>。また、フガシティーモデルでは、卵中の化学物質の代謝はほとんどないとされている。

そこで、調査した全個体から検出されたダイオキシン類の結果を用いて母体から卵への化学物質の移行を検討した。その結果を図5に示す。大半の4~5塩素化PCDD/DF及びCo-PCBの脂肪換算濃度の卵/母体比については、1と有意な差が認められず、フガシティーモデルに従って卵に移行したものと考えられた。しかし、6塩素以上のPCDD/DFでは、卵/母体濃度比が1より有意に小さかった。このことが、卵を除いたメスとオスとの性差が、低塩素のPCDD/DFのみで有意であった（前述5.2参照）ことの理由である。調査した2種のカエルは、体内に脂肪体を持っており、卵の生産には主にその脂肪を利用しているため、高塩素化体の卵/母体比が1より小さい理由は脂肪体から卵への移動を阻害する原因があることによると考えられる。

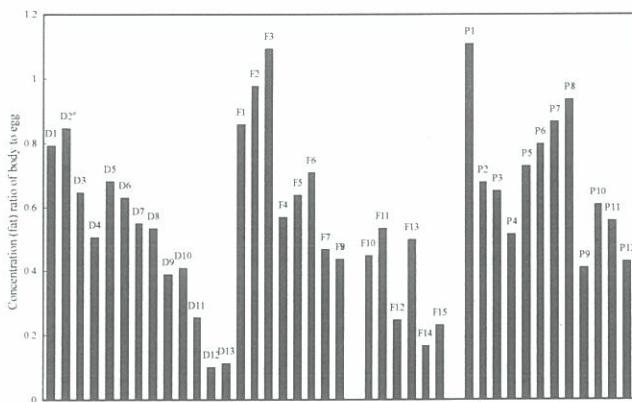


図5 卵と体内のダイオキシン類の脂肪換算濃度比（卵/母体）

注) 略号は図2参照

そこで、オクタノールー水分配係数が得られた物質に関して、脂肪換算濃度の卵/母体比を求めた。その結果を図6に示す。化学物質のオクタノールー

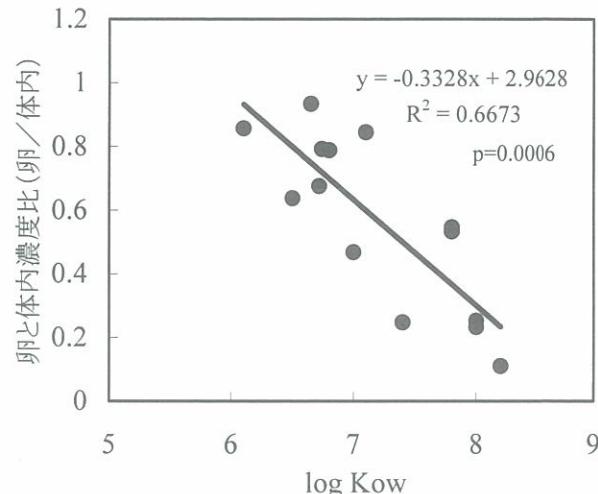


図6 オクタノールー水分配係数と母体と卵の濃度比（脂肪換算値）

水分配係数と卵/母体濃度比との関係を調べた報告では、関係が認められないという報告と分配係数が大きくなるにつれ濃度比が低下するという報告があるが、図6からは明らかにオクタノールー水分配係数が大きな物質ほど卵に移行しにくくなることが確認された。そのため、フガシティーモデルからのすれば、オクタノールー水分配係数に関連する要因によると見なされた。PCDD/DFの体内への移行に関しては、分子サイズが大きい高塩素化体ほど取り込みにくくなることが報告されている<sup>6)</sup>ため、高塩素化体ほど母体から卵へ移行しにくくなる原因も分子の大きさによるものと推測された。

次に、卵中での化学物質の代謝であるが、土壌・カエル間で見られた2,3,7,8-4体の選択的濃縮が図5のように母体-卵間では認められないことから、卵中での代謝がないことが確認された。

母体と卵のダイオキシン類の絶対量比を求めたところ、母体中のダイオキシン類の約2倍が卵に存在しており、体内蓄積量の2/3が卵に移行することが分かった。魚類においては、一生に1回しか産卵しない種では母体中の大半の化学物質が卵に移行するものの、毎年産卵する種では卵への移行率が小さいことが報告されている<sup>9,10)</sup>。毎年産卵する対象2種の移行率はこれとは異なるが、フガシティーモデルでは体内と卵の脂肪分が卵への化学物質の移行に関連していると考えられ、卵の脂肪分の高さ（母体

1%，卵5%）が、化学物質の大半が卵へ移行する原因である。

## 6 おわりに

1980年以降、全世界でカエルの減少が報告されている<sup>11～13)</sup>。この原因として、種々の要因が挙げられ、それらの複合的な影響も指摘されている。原因の1つに化学物質が挙げられているが、その影響を見る時は、成体への影響だけでなく、母体から卵への化学物質の移行を踏まえて発生期や幼生期の化学物質の影響を調査する必要がある。また、カエルなどの両生類は、冬眠という特殊な生活史をもっている。ダイオキシンなどの疎水性化学物質は脂肪に溶け込んでいるため、冬眠時に脂肪をエネルギーとして消費する時に、化学物質が体内に放出される。そのため、化学物質の影響を見るとときは、冬眠というカエルにとって大きなストレス時での影響を検討する必要もある。

山田緑地で発見された過剰肢ガエルの原因是、交配試験の結果から遺伝によることがほぼ間違いないことが確認されたが、化学物質の面から実施した原因究明を通して、これまで十分に分かっていなかつたカエル生態系での化学物質の動態の一部が明らかになった。得られた成果が、両生類の減少の原因究明に役立てられることを希望する。

## 謝辞

本研究は、「北九州市における外因性内分泌攪乱化学物質の野生生物に与える影響に関する検討委員会」及び環境庁の「内分泌攪乱化学物質による野生生物影響実態調査」の資金を用いて実施したものである。記して感謝する。また、その結果の全ては、「北九州市における外因性内分泌攪乱化学物質の野生生物に与える影響に関する検討委員会最終報告書」（平成15年3月、北九州市）として公表されている。

## 文献

- 1) 武石全慈 (1996) 北九州市山田緑地で見られた過剰肢を持つヤマアカガエル*Rana ornativentris*について. *Bull. Kitakyushu Mus. Nat. Hist.*, 15, 119－131.
- 2) 門上希和夫 他.(2000) 過剰肢カエル発生地におけるカエル及び環境中の内分泌攪乱化学物質調査, 環境化学, 10, 35－43.
- 3) K Kadokami, et al. (2002) Congener-specific analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls in frogs and their habitats, Kitakyushu, Japan, *Environ Toxicol Chem*, 21, 129－137.
- 4) M. S. Johnson. (1999) Bioaccumulation of 2,4,6-trinitrotoluene and polychlorinated biphenyls through two routes of exposure in a terrestrial amphibian : Is the dermal route significant ? *Environ. Toxicol. and Chem.*, 18, 873－878.
- 5) D.C.G.Muir, et al.(1985) Bioconcentration of PCDDs by fish, effects of molecular structure and water chemistry. *Chemosphere*, 14, 829－833.
- 6) A. Opperhuizen and D.T.H.M.Sijm.(1990) Bioaccumulation and biotransformation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in fish. *Environ Toxicol Chem*, 9, 175－186.
- 7) Y.C.Ling, et al. (1995) PCDD/DFs and coplanar PCBs in sediment and fish samples from the Er-Jen River in Taiwan. *Chemosphere*, 31, 2863－2872.
- 8) H.Loonen, et al.(1994) Effect of sediment on the bioaccumulation of a complex mixture of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofuran (PCDFs) by fish. *Chemospher.*, 28, 1433－

- 9) R. W. Russell, et al. (1999) Maternal transfer and in ovo exposure of organochlorines in oviparous organisms : a model and field verification, Environ Sci Technol, 33, 416 – 420.
- 10) K. Kleinow, et al. (1999) Exposure, uptake, and disposition of chemicals in reproduction and developmental stage of selected oviparous vertebrates, 9–111, "Reproductive and developmental effects of contaminants in oviparous vertebrates", Edited by R. T. Di Giulio and D. E. Tillitt, SETAC Press, Pensacola, FL.
- 11) D. B. Wake. (1991) Declining amphibian populations, Science, 253, 860.
- 12) M. Barinaga. (1990) Where have all the froggies gone? Science, 247, 1033 – 1034.
- 13) J. Pelley. (1998) No simple answer to recent amphibian declines, Environ. Sci. Technol. 32, 352A.