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

門上希和夫¹⁾, 武石 全慈²⁾, 倉本 満³⁾, 小野 勇一³⁾

¹⁾北九州市環境科学研究所 (〒804-0082 福岡県北九州市戸畑区新池1-2-1)

²⁾北九州市立自然史博物館 (〒805-0061 福岡県北九州市八幡東区西本町3-6-1)

³⁾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
(〒803-8501 福岡県北九州市小倉北区城内1-1)

[平成11年12月16日受理]

Occurrence and Effects of Endocrine-disrupting Chemicals in Frogs and Soil Samples

Kiwao KADOKAMI¹⁾, Masayoshi TAKEISHI²⁾, Mitsuru KURAMOTO³⁾ and Yuichi ONO³⁾

¹⁾Kitakyushu City Institute of Environmental Sciences
(1-2-1 Shin-ike, Tobata, Kitakyushu, Fukuoka 804-0082)

²⁾Kitakyushu Museum and Institute of Natural History
(3-6-1 Nishihonmachi, Yahatahigashi, Kitakyushu, Fukuoka 805-0061)

³⁾Committee of Kitakyushu City on Effects of Endocrine-disrupting Chemicals on Wildlife
(1-1 Jyonai, Kokurakita, Kitakyushu, Fukuoka 803-8501)

[Received December 16, 1999]

Summary

We analyzed the occurrence and effects of endocrine-disrupting chemicals in 2 species of frog, Yama-aka-gaeru (*Rana ornativentris*) and Nihon-aka-gaeru (*Rana japonica*), and in water and soil samples. Our aim was to determine the cause of malformation in Yama-aka-gaeru frogs that had been found with extra forelimbs. Frogs, not including malformed ones, and soil samples were collected at 3 sites: the study site where the malformed frogs had been found, and 2 reference sites where only normal individuals of both frog species were observed. We also performed a histological examination of the gonads of the frogs. We found significant levels of DDTs and oxychlordan in both species and soils collected at the study site. These chemicals are persistent and bioaccumulative. We did not detect less-stable chemicals such as simazine and atrazine. High concentrations of benzo(a)pyrene were detected in the soil samples at the study site, but not in the frogs. In both species the chemicals we detected occurred at significantly higher concentrations in males than in females; this difference was probably caused by transference of chemicals to the eggs. The chemical concentrations that we detected in the frogs were lower than the lowest levels reported to cause adverse effects. However, there was a significant negative correlation between DDT concentrations and testis size, and aspermatogenesis was demonstrated in some of the Nihon-aka-gaeru frogs. We suspect that endocrine-disrupting chemicals present in the eggs affect early embryogenesis.

Key words: Frog, Malformation, Soil, Endocrine-disrupting chemical, DDT

1. はじめに

1995年6月に福岡県北九州市小倉北区山田町の山田緑地において、過剰前肢を持つヤマアカガエル (*Rana ornativentris*) が発見されて以来、毎年緑地内で過剰肢カエルが出現している¹⁾。カエルは外界の影響により奇形を起こしやすい生物であるが、種々の異常を合わせても発生率は1%以下と言われている。日本での過剰肢カエルに関する報告は、1928年以降現在までに少なくとも10種25例があるが、発見個体は1例あたり1~2匹である¹⁾。我々は、環境要因及び遺伝要因の両面から過剰肢発生の原因究明を行っており、1998年までに土壌やカエルの体内から内分泌攪乱化学物質 (EDCs) であるDDT類、ベンゾ(a)ピレン (B(a)P)、TNT等を検出している²⁾。

カエルなどの両生類は、環境汚染に敏感であり、環境汚染の指標生物に適していると言われているが^{3,4)}、環境汚染物質による影響については、急性毒性を除きほとんど調査されていない⁵⁾。また、両生類は食物連鎖の重要な位置に存在し、近年その生息数が急速に減少しているにもかかわらず、環境中に生息するカエルの化学物質による汚染実態は、PCBやDDTなどの有機塩素系物質に関して限られた数の報告があるだけで、日本での報告例はない。さらに、環境濃度とそこに生息するカエルを共に測定したデータは、世界的にもほとんど無い⁵⁾。

本調査は、過剰肢カエルの発生原因調査の一環として、過剰肢発生地及び対照2地域の環境及びカエル中のEDCsを調査し、カエルの汚染実態、環境からカエルへの暴露経路、化学物質濃度の種差及び性差の有無、化学物質の挙動などを解明すると共に、過剰肢以外の異常の有無を調べ、化学物質と異常との関連を探ることを目的として実施したものである。本調査により、EDCsによるカエルの汚染実態、体内濃度の雌雄差などが明らかになり、また検出物質と精巣異常との関連の可能性が示唆された。

2. 調査方法

2. 1 調査地域及び調査期間

調査対象とした山田緑地及び対照地2ヶ所をFig. 1に示す。各調査地の詳細は、次の通りである。

2. 1. 1 山田緑地

山田緑地 (Fig. 2) がある旧山田弾薬庫跡地は、北九州市のほぼ中央に位置する面積350ha、標高18~188mの森林である。同地の北と東には市街地が存在し、南には採石場、西は森林が続いている。同地は、1934年から旧日本陸軍により、戦後は1972年まで米軍により弾薬庫として使用され、米軍から返還後も立ち入りが禁止されて

Fig. 1 Location of the study site (Yamada green zone) and two reference sites

いた地域であり、北九州市などが実施した生態調査において、16種のは乳類、94種の鳥類、12種の両生類及び646種の植物が確認されている⁶⁾。1995年5月に旧弾薬庫跡地の一部が自然公園 (山田緑地) として開園した。

2. 1. 2 対照地

対照地1は、山間部の周囲を森に囲まれた場所にあり、ヤマアカガエルが生息している。対照地2は、農業地域に位置し、周囲を水田、雑木林及びため池で囲まれた場所である。ここには、ニホンアカガエル (*Rana japonica*) が生息している。

2. 2 試料の採取

2. 2. 1 カエル

調査したカエルは、ヤマアカガエルとニホンアカガエルの2種である。山田緑地では、池 (Fig. 2 地点12) の周囲に罠を仕掛け、1999年1月20日から24日にかけて両種を採取した。2ヶ所の対照地では、1999年1月19日から25日の間に、対照地1ではヤマアカガエルを、対照地2ではニホンアカガエルをそれぞれ捕獲した。これら捕獲したカエルは、繁殖のために池など水たまりに集まってきたものであり、全てが成体である。また、産卵済みの一部のメスを除き、メスは全て卵を持っていた。

なお、別に1998年1及び2月に捕獲して冷凍保存して

Fig. 2 Location of sampling points in Yamada green zone

■: water and soil (or sediment) samples were collected; ▲: soil (or sediment) samples were collected;
●: water samples were collected

いた20個体をDDT類の分析に供した。

2. 2. 2 水質及び土壌（底質）

山田緑地では、Fig. 2に示す地点で水質試料及び土壌（底質）試料をそれぞれ15検体採取した。なお、水質と土壌（底質）の採取地点は、一部異なっている。対照地1及び2では、各2地点で試料を採取した。

2. 3 化学分析

調査を行ったEDCsをTable 1及びTable 2に示す。これらの分析は、「外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル（水質、底質、水生生物）」⁷⁾に従って行った。但し、17 β -エストラジオールは、ELISA法により分析した。カエルの分析は、全身（メスは卵を除く）を試料とした。また、化学分析に合わせて脂肪分を測定した。なお、カエルについては、1個体を1検体として分析したため、試料の重量により検出限界値が若干異なる。

2. 4 カエルの解剖検査及び組織検査

山田緑地で採取した2種のオス・メス各10個体の計40個体、対照地1及び2で捕獲した2種のオス・メス各10個体の計40個体、合計80個体について、外部形態を調査後、解剖を行って卵巣または精巣の状況を観察すると共に、左の精巣の大きさ（長径及び短径）を測定した。さ

らに、オスについては、以下の操作を行って精巣の切片を染色して組織検査を行った。即ち、精巣をナウシン氏液で固定して1日流水洗浄した後、エタノールで脱水、キシレンを経てパラプラストに包埋した。次に、回転式ミクロトームで厚さ10 μ mの連続切片とし、精巣中央部の切片約150片をスライドガラスに貼付した。キシレンでパラプラストを溶解し、エタノールのシリーズを通して水まで降ろし、デラフィールドのヘマトキシリン液で染色した。再度エタノールで脱水してエンテランニューで封じ顕微鏡を用いて組織検査を行った。

2. 5 統計解析

化学分析及び解剖等で得られたデータの解析は、統計ソフトのSTATISTICA^{TM}（Stat Soft社）を用いて解析した。

3 結果及び考察

3. 1 調査に用いたカエルの状況

調査3地域で捕獲したカエル2種の頭胴長（SVL）、体重、左側精巣の長径（オスのみ）、及び脂肪分をTable 3に示す。両種とも報告されている⁸⁾平均体長に比較し、大型である。

脂肪分は、オスの場合その体内に脂肪体があるため、

Table 1 Concentrations of endocrine disruptors in soil (or sediment) samples at Yamada green zone and reference sites
 $\mu\text{g/kg}$ (dry)

Chemicals	Yamada green zone, n=15					Reference site 1, n=2			Reference site 2, n=2			Detection limits
	Detected number	Max	Min	Mean	SD	Detected number	Max	Min	Detected number	Max	Min	
Monochlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	1
Dichlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	1
Trichlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	1
Tetrachlorinated biphenyls	1	5	ND	5	-	0	ND	ND	0	ND	ND	1
Pentachlorinated biphenyls	1	42	ND	42	-	0	ND	ND	0	ND	ND	1
Hexachlorinated biphenyls	1	14	ND	14	-	0	ND	ND	0	ND	ND	1
Heptachlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	1
Octachlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	1
Nonachlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	1
Decachlorinated biphenyl	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	1
Tributyltin compounds	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	20
Dibutyltin compounds	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	100
Monobutyltin compounds	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	200
Triphenyltin compounds	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	20
Diphenyltin compounds	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	20
Monophenyltin compounds	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	200
HCB	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	5
α -HCH	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	5
β -HCH	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	5
γ -HCH	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	5
δ -HCH	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	5
p,p'-DDT	6	93	ND	43.2	31.0	0	ND	ND	0	ND	ND	5
o,p'-DDT	2	9	ND	9	0	0	ND	ND	0	ND	ND	5
p,p'-DDE	9	154	ND	37.8	49.8	0	ND	ND	0	ND	ND	5
o,p'-DDE	1	24	ND	24	-	0	ND	ND	0	ND	ND	5
p,p'-DDD	6	425	ND	83.5	167.6	0	ND	ND	0	ND	ND	5
o,p'-DDD	2	122	ND	68.0	76.4	0	ND	ND	0	ND	ND	5
Heptachlor	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	5
Heptachlor epoxide	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	5
Dieldrin	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	5
trans-Chlordane	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	5
cis-Chlordane	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	5
Oxychlordane	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	5
trans-Nonachlor	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	5
cis-Nonachlor	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	5
Atrazine	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	0.7-3.5
Simazine	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	0.7-3.5
Trifluralin	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	0.7-3.5
Nonylphenol	2	692	ND	683	12.7	0	ND	ND	0	ND	ND	10.5-87
4-t-Octylphenol	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	1.5-10.5
4-n-Octylphenol	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	1.5-10.5
Benzo(a)pyrene	15	341	25	128.9	89.6	1	21	21	2	56	15	5
Styrene dimer	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	5
Styrene trimer	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	5
Bisphenol A	2	152	ND	103	69.3	0	ND	ND	2	128	32	10~35
Diethyl phthalate	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	10-70
Di-n-butyl phthalate	1	99	ND	99	-	0	ND	ND	0	ND	ND	25-145
Buthyl benzyl phthalate	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	10-58
Di(2-ethylhexyl) phthalate	7	1586	ND	596	518.7	2	1344	226	2	1766	837	25-145
Di(2-ethylhexyl) adipate	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	10-58
Styrene monomer	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	1~3
17 β -Estradiol	15	9	ND	2.1	2.2	1	1.6	ND	2	4.2	0.9	0.2
Ethinylestradiol	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	0	ND	ND	0.5

SD: standard deviation, ND: not detected

メスと比較して高いことが予想されたが、ヤマアカガエルではオス・メス間に脂肪分の差はなかった。ニホンアカガエルでは、山田緑地及び対照地2で捕獲した40個体のデータ全てを用いて比較した場合、メスの脂肪分がオスに比べ有意に ($p < 0.05$) 大きかったが、山田20個体と対照地2の20個体に分けて別々に検定した結果では、オス・メスで脂肪分に差は認められなかった。

ヤマアカガエルのオス・メスの各々の体長、体重、脂肪分、及びオスの左精巣の長径に関して、山田緑地と対照地1の地域差の有無を検定した。その結果、オスの体重及び脂肪分については、対照地1が山田緑地と比較し

有意 (共に $p < 0.01$) に大きく、メスでは、対照地1の体重が山田緑地に比べ有意 ($p < 0.01$) に大きいことが確認された。

一方、ニホンアカガエルでは、山田緑地と対照地2のオス・メス共に体長、体重及び脂肪分に有意な差は認められず、またオスの左精巣長径にも有意な差はなかった。

次に、外部形態観察及び解剖結果であるが、2種のオス・メス計80個体の外部形態、卵巣及び精巣には外見上の異常は認められなかった。しかし、精巣の組織検査の結果、Fig. 3に示すように山田緑地のニホンアカガエルの精子形成が対照地2と比べ若干悪い (精子が少なく、

Table 2 Concentrations of endocrine disruptors in frogs captured at Yamada green zone and reference sites $\mu\text{g/kg}$ (wet)

Chemicals	Yama-aka-gaeru (Female)										Yama-aka-gaeru (Male)									
	Reference site 1					Yamada green zone					Reference site 1					Yamada green zone				
	Detected number	Max	Min	Mean	SD	Detected number	Max	Min	Mean	SD	Detected number	Max	Min	Mean	SD	Detected number	Max	Min	Mean	SD
Monochlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Dichlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Trichlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Pentachlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Hexachlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Heptachlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Octachlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Nonachlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Decachlorinated biphenyl	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
HCB	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
α -HCH	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
γ -HCH	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
δ -HCH	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
p,p'-DDT	2	11	4	7.5	4.9	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
p,p'-DDE	1	3	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
p,p'-DDE	4	7	2	4.5	2.1	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
p,p'-DDE	1	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
p,p'-DDD	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
p,p'-DDD	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Heptachlor	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Heptachlor epoxide	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Dieldrin	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
trans-Chlordane	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
cis-Chlordane	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Oxychlordane	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
trans-Nonachlor	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
cis-Nonachlor	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Atrazine	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Simazine	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Benzo(a)pyrene	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Lipid %	11	172	0.64	1.068	0.349	9	2.82	0.77	1.33	0.615	10	1.38	0.84	1.048	0.161	11	2.09	1.09	1.455	0.319

Chemicals	Yama-aka-gaeru (Female)										Yama-aka-gaeru (Male)									
	Reference site 2					Yamada green zone					Reference site 2					Yamada green zone				
	Detected number	Max	Min	Mean	SD	Detected number	Max	Min	Mean	SD	Detected number	Max	Min	Mean	SD	Detected number	Max	Min	Mean	SD
Monochlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Dichlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Trichlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Pentachlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Hexachlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Octachlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Nonachlorinated biphenyls	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Decachlorinated biphenyl	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
HCB	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
α -HCH	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
γ -HCH	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
δ -HCH	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
p,p'-DDT	1	5	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
p,p'-DDT	6	28	3	13.5	9.5	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
p,p'-DDT	17	185	1	29.8	54.5	2	10	ND	1	0	9	164	4	28.6	55.7	3	7	ND	33	33
p,p'-DDE	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
p,p'-DDD	2	4	3	3.5	0.7	0	ND	ND	-	-	1	5	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Heptachlor	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Heptachlor epoxide	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Dieldrin	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
trans-Chlordane	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
cis-Chlordane	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Oxychlordane	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
trans-Nonachlor	2	4	2	3	1.4	0	ND	ND	-	-	9	7	4	5.3	1.1	3	6	5	5.3	0.6
cis-Nonachlor	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Atrazine	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Simazine	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Benzo(a)pyrene	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-	0	ND	ND	-	-
Lipid %	18	3.23	0.5	1.625	0.952	13	2.55	0.66	1.073	0.419	10	1.75	0.94	1.22	0.257	18	2.36	0.48	0.921	0.2800

Table 3 Description of frogs captured at Yamada green zone and reference sites

Items		Yama-aka-gaeru				Nihon-aka-gaeru			
		Yamada green zone		Reference site 1		Yamada green zone		Reference site 2	
Number of samples		Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Snout-vent lengths, mm	Max	10	11	11	9	10	18	18	13
	Min	61	86	64	91	57	72	62	73
	Mean	53	56	53	67	47	47	44	58
	SD	58	75.1	59.2	82.2	53.9	63.7	54	66.5
		2.49	9.05	3.22	7.14	3.18	5.85	5.18	3.78
Weights, g	Max	16	37.1	21.9	49.6	15.6	25.3	20	23.7
	Min	9.5	10	10.8	22.2	7.8	8.6	7.8	14
	Mean	14	25.9	17.8	7.44	12.2	17.3	11.6	19.5
	SD	2.32	8.32	3.5	38.3	2.23	4.65	3.41	3.08
Lipids, %	Max	1.38	1.72	2.09	2.82	1.73	3.23	2.36	2.53
	Min	0.84	0.64	1.09	0.77	0.94	0.5	0.48	0.66
	Mean	1.05	1.07	1.45	1.33	1.22	1.63	0.921	1.07
	SD	0.161	0.349	0.319	0.615	0.257	0.952	0.428	0.62
Testis lengths, mm	Max	6.1	-	6.7	-	5	-	4.8	-
	Min	2.7	-	4.2	-	3.4	-	2.9	-
	Mean	4.69	-	5.45	-	4.22	-	4.03	-
	SD	0.87	-	0.907	-	0.48	-	0.64	-

Weights of females were body masses excluding eggs.
SD: standard deviation

(A)

(B)

Fig. 3 Example of aspermatogenic testis of Nihon-aka-gaeru collected at Yamada green zone. (A) Aspermatogenic testis: the number of sperm is less than normal (B), and tubulus seminiferus is filled with spermatids. These kinds of aspermatogenic testes were found in a part of Nihon-aka-gaeru at Yamada green zone. (B) Normal testis.

細精管内が精細胞で満たされている)ことが確認された。この精子形成不良が、生殖サイクルの一段階を示しているのか、本当の異常なのか、現在不明である。

3. 2 内分泌攪乱化学物質濃度

山田緑地の水質からは、ノニルフェノール (検出範囲 $0.1 \sim 0.2 \mu\text{g}/\ell$, 検出頻度 5/15), ビスフェノール A ($0.01 \sim 0.02 \mu\text{g}/\ell$, 2/15), アジピン酸-2-ジエチルヘキシル ($0.33 \mu\text{g}/\ell$, 1/15) 及び 17β -エストラジオール ($0.003 \sim 0.0091 \mu\text{g}/\ell$, 10/15) が検出された。また、対照 2 地域の水質からは、ノニルフェノール ($0.1 \mu\text{g}/\ell$, 1/4), ビスフェノール A ($0.01 \sim 0.03 \mu\text{g}/\ell$, 2/4) 及び 17β -エストラジオール ($0.003 \sim 0.005 \mu\text{g}/\ell$, 2/4) が検出された。これらの検出濃度は、全国調査結果⁹⁾と比較して低いレベルである。

調査 3 地域の土壌 (底質) 及びカエル中の EDCs 濃度を Table 1 及び Table 2 に示す。

山田緑地の土壌 (底質) 試料からは、1997 年調査²⁾と同様に DDT 類及び B(a)P が比較的高濃度で検出された。これらの調査結果から、DDT が山田緑地内で過去大量に使用されていたことは間違いないと考えられる。また、1997 年調査において、B(a)P 以外の多環芳香族炭化水素も高濃度で検出されており (未発表), 今回の調査と合わせ緑地内において過去に大量の化石燃料やコaltar などが使用された可能性があることが確認された。

山田緑地のカエルからは、Table 2 に示すように DDT 類及びオキシクロデンがほぼ全ての個体から、HCH 及びデルドリンが一部の個体から検出されたが、アトラジン、シマジン及び B(a)P は検出されなかった。また、DDT 類では、DDE > DDT > DDD の順で検出率及び濃度が高かった。DDT 類の検出濃度は、実際の環境に生息するカエルに関する海外の報告値と比べて、やや低い同程度であった¹⁰⁻¹⁵⁾。

カエルの DDT 類は、山田緑地が明らかに対照 2 地域に比べ検出頻度及び濃度とも高いが、オキシクロルデンの検出頻度は、対照 2 地域でも比較的に高かった。また、DDT 類濃度には、相当な個体差があるのに比べ、オキシクロルデン濃度にはほとんど個体差がない。この理由としてクロルデンと DDT の蒸気圧が関係していると考えられる。クロルデンの蒸気圧は 1.3mP と、DDT の 0.025mP^[6]と比べて大きく、容易に揮発拡散することが予想される。その為、DDT 汚染が散布された場所を中心に局所的であるのに対し、散布場所から広範囲に拡散していることが、今回の結果から推定される。また、生物では、一般にオキシクロルデンのクロルデン類全体に占める比率は小さい^[7]が、カエルでは Russell ら^[11]の調査及び本調査共、オキシクロルデンが大半を占めている。Kawano ら^[18]は、海洋生態系でのクロルデン類の挙動を調査し、食物連鎖の上位生物において、クロルデン類組成に大きな差があることを見出し、代謝能が生物により大きく異なるとしている。以上から、カエルではクロルデン類の代謝能が高いと考えられる。

一方、山田緑地の全調査地点で検出された B(a)P は、カエルからは全く検出されなかった。しかし、我々が 27 匹を対象にして行った 1998 年調査では、ヤマアカガエルとニホンアカガエルのオス各 1 匹から 40~70 $\mu\text{g/kg}$ (wet) を検出している (未発表)。この様に B(a)P の検出濃度及び頻度が低い理由としては、B(a)P の代謝速度が速いためと考えられる^[19]。

3. 3 カエルの性及び種による検出化学物質の濃度差

オスとメスの検出物質濃度を比較した結果、オスの濃度が高い傾向が見られた。そこで、1998 年調査結果を含む山田緑地のヤマアカガエル及びニホンアカガエルの全ての測定値を用いて、オス・メスの濃度に有意な差があるか検定した。

総 DDT 濃度は、正規分布及び対数正規分布を取っていないため、代表的なノンパラメトリック検定法であるマン・ホイットニーの U 検定を行った。その結果、ニホンアカガエルでは有意な差はなかったが、ヤマアカガエル及び 2 種のカエル全体では、オスの濃度がメスに比較して有意 ($p < 0.01$) に高濃度であることが分かった。

オキシクロルデンも同様にマン・ホイットニーの U 検定で濃度に性差があるかどうかを検定した結果、山田緑地のオスはメスに比較して有意 ($p < 0.001$) に高濃度であることが分かった。

以上から、疎水性の高い有機塩素系化学物質の濃度は、オスがメスに比べ体内濃度が高いことが確認された。今回捕獲分析したメスでは、卵を除いた全身を分析に供しており、鳥類^[20]や爬虫類^[21, 22]と同様に有機塩素系化学物質が卵に移行している可能性がある。ヤマアカガエルで

は、メスの総 DDT 濃度はオスの 1/3 (幾何平均値で計算) であり、その差が卵に移行したと仮定すると、卵は体重の約 1/3 を占めるため、高濃度の個体では卵中の総 DDT 濃度が 0.5 $\mu\text{g/g}$ (wet) 程度に達すると推定される。

次に、カエルの種により体内濃度に違いがあるか検討を行った。その結果、2 種のメスの総 DDT 濃度に有意な差 (ニホンアカガエル > ヤマアカガエル, $p < 0.05$) が認められた。しかし、オスの DDT 類やそれ以外の検出物質には、両者の濃度に有意な差はなかった。両者は、生育場所が同一地域であるだけでなく、変態後は繁殖時以外は陸上に住むという生活史が似ていること、さらにエサもほぼ同一であることから、体内濃度に差がないことは妥当と考えられ、本当にメスの DDT 濃度に種差があるのか、またあるならばその原因は何か、今後検討が必要である。

3. 4 検出物質の土壤中濃度とカエル中濃度の関連

カエルの皮膚は、水を非常に通しやすい性質を持つため、カエルが化学物質を暴露する可能性は、経皮または経口が考えられる。Johnson ら^[23]は、PCB と TNT を用いてサンショウウオ (Tiger salamander) の暴露実験を行い、水溶解度が大きいほど経皮経由の暴露が増すことを明らかにしている。また、Aroclor 1260 経皮暴露試験の結果、サンショウウオの体内濃度 (湿重量当たり) は土壌 (乾重量当たり) の約 2 倍になっている。

一方、我々の調査では、カエル体内中の DDT 濃度 (湿重量当たり) は土壌濃度 (乾重量当たり) と同レベルである。DDT と 6 及び 7 塩素化ビフェニールが組成の大半を占める Aroclor 1260 の水溶解度は共に $\mu\text{g/l}$ レベルであるため、Johnson らの結果から見て山田緑地のカエルの DDT は主に経皮経由の暴露と思われる。また、カエルの体内濃度に大きな差があるが、この差は緑地内の土壌濃度の差を反映しているものであろう。

3. 5 検出物質のカエルに対する毒性評価

カエルに対する有機塩素系農薬の急性毒性は、LC50 で mg/l レベル^[5]であり、本調査結果よりはるかに大きい。また、DDT の致死濃度以下の影響が、Cooke^[24]によって調べられ、20 $\mu\text{g/l}$ 以上の DDT によりオタマジャクシに体重減少、多動症、脊柱前湾、鼻の奇形などが生じることが報告されているが、本調査での水中濃度はこれよりも低く、外部形態異常も見出されなかった。以上から、本調査で得られた DDT 類の汚染レベルでは、カエルに対する直接的な影響はないと考えられる。

B(a)P などの多環芳香族炭化水素は、光存在下で毒性が増すことが知られている^[25, 26]が、一方で代謝速度も速いことが知られている^[19]。今回の調査では、土壌から比較的高濃度の B(a)P が検出されているが、ほとんどの

個体からは検出されなかった。捕獲から解剖までの時間は長くて1～2日（一部は3日）であるため、捕獲後の分解の可能性は少ないと考えられ、自然状態においても体内のB(a)P濃度は低いと考えられる。

3. 6 検出物質濃度と精巢の関係

カエルから検出されたDDT類及びオキシクロルデン濃度と山田緑地のオスガエルの精巢の大きさに有意な差があるかどうか検定を行った。その結果、山田緑地のヤマアカガエルのオス10個体の総DDT濃度と左精巢長径の間に負の相関($r = -0.7373$, $p < 0.05$)が認められた。また、総DDT濃度と長径と体長の比(長径/体長)にも負の相関($r = -0.6735$, $p < 0.05$)が認められた。さらに、同様の負の相関は、総DDTだけでなくDDT, DDE, DDDにも認められた。以上から、DDT類濃度が高い個体ほど精巢が小さいことが確認された。

一方、オキシクロルデンとは相関が見られず、またニホンアカガエルでは、DDT類と精巢の大きさに関係は認められなかった。

4. まとめ

本調査は、有機塩素系物質などEDCsに関してカエル及びその生息環境を対象として実施された調査としては、日本における最初の報告である。

本調査において山田緑地のカエル体内から検出された化学物質濃度は、急性毒性や慢性毒性を示す濃度ではないと考えられる。しかし、山田緑地内では、代表的なEDCsであるDDT類が一般の環境より高濃度であり、それらのカエル中濃度も、日本に生息する水生生物に比べて高濃度であった。さらに、オスの体内濃度はメスに比べて高く、疎水性化学物質が卵に移行している可能性がある。また、山田緑地のヤマアカガエルのDDT総濃度と左精巢長径の間に負の相関が認められ、山田緑地のニホンアカガエルの精巢に軽微ながら異常と思われる所見があった。

以上のことから、EDCsの影響が最も懸念されている発生期に、検出物質がカエルに対して何らかの悪影響を及ぼしている可能性がある。しかし、これらに関する既存の知見は全くなく、今後詳細な検討が必要である。

謝 辞

本研究の一部は、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」の一環として実施したものであり、試料採取及び化学分析は、その一部を(株)九州テクノリサーチ及び(財)日本食品分析センターに委託して行った。U.S. National Biological Service, Patuxent Environmental Science CenterのD.W. Sparling博士からは、Ecotoxicology of Amphibians and Reptilesの原稿として

記述した両生類の化学物質汚染及びその影響に関する総説を提供して頂いた。ここに深謝いたします。

要 約

過剰肢ガエルの発生地及び対照2地域において、カエル及び環境中のEDCs調査と過剰肢以外の異常の有無に関する調査を行い、次の結果を得た。1) カエル及び土壌試料からは、DDT類やオキシクロルデンなどの難分解性で生物濃縮され易い物質が高頻度で検出されたが、シマジンなどの易分解性物質は検出されなかった。また、土壌から高濃度かつ高頻度で検出されたB(a)Pは、カエルからは検出されなかった。2) カエルへの暴露経路は、主に土壌からの経皮経由と考えられた。3) オスの体内中化学物質濃度は、メスに比べて有意に高く、その差は卵への移行と推測された。4) 検出濃度は、カエルに対して急性及び慢性的な影響を与えるレベルではなかったが、体内DDT濃度と精巢の大きさに負の相関が認められ、一部のカエルで精子形成異常が見られるなど、最もEDCsの影響を受けやすいとされる初期発生段階での悪影響が疑われた。

文 献

- 1) 武石全慈：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 (1996)
- 2) 門上希和夫, 武石全慈：過剰肢カエル発生地における化学物質調査, 第7回環境化学討論会講演要旨集, 76-77 (1998)
- 3) Read, J.L. and Tyler, M.J.: Natural levels of abnormalities in the trilling frog (*Neobatrachus centralis*) at the Olympic Dam mine. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **53**, 25-31 (1994)
- 4) Sheffield, S.R., Matter, J.M., Rattner, B.A. and Guiner, P.D.: Fish and wildlife species as sentinels of environmental endocrine disruptors. pp369-430, "Principles and Processes for Evaluating Endocrine Disruption in Wildlife", Edited by Kendall R., Dickerson R., Giesy J. and Suk W., SETAC Press, Pensacola, FL (1998)
- 5) Sparling, D.W.: Ecotoxicology of Organic Contaminants to Amphibians and Reptiles, Part A: Amphibians, "Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles", SETAC Press, Pensacola FL (2000)
- 6) 開館10周年記念出版物編集委員会編, 山田緑地の自然, 北九州市立自然史博物館 (1992)
- 7) 環境庁水質保全局水質管理課：外因性内分泌攪乱化学物質調査暫定マニュアル (水質, 底質, 水生生物), 東京 (1998)

- 8) 前田憲男, 松井正文: 日本カエル図鑑, 文一総合出版, 東京 (1989)
- 9) 環境庁: 内分泌攪乱化学物質緊急全国一斉調査中間報告, 東京 (1999)
- 10) Russell, R.W., Gillan, K.A. and Haffner, G.D.: Polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in southern Ontario, Canada, green frogs. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**, 2258-2263 (1997)
- 11) Russell, R.W., Hecnar, S.J. and Haffner, G.D.: Organochlorine pesticide residues in southern Ontario spring peepers. *Environ. Toxicol. Chem.*, **14**, 815-817 (1995)
- 12) Rico, C., Hernandez, L.M., Gonzalez, J., Fernandez, M.A. and Montero, M.C.: Organochlorine and metal pollution in aquatic organisms sampled in the Donana National Park during the period 1983-1986. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **39**, 1076-1083 (1987)
- 13) Gendron, A.D., Bishop, C.A., Fortin, R. and Hontela, A.: In vivo testing of the functional integrity of the corticosterone-progesterone axis in mudpuppy (Amphibia) exposed to chlorinated hydrocarbons in the wild. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16**, 1694-1706 (1997)
- 14) Bonin, J., DesGranges, J.L., Bishop, C.A., Rodrigue, J., Gendron, A. and Elliott, J.E.: Comparative study of contaminants in the mudpuppy (Amphibia) and the common snapping turtle (Reptilia), St. Lawrence River, Canada, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **28**, 184-194 (1995)
- 15) Hall, R.J., Ashton, Jr. and Prouty, R.M.: Pesticide and PCB residues in the Neuse River waterdog, *Necturus lewisi*, *Brimleyana*, **10**, 107-109 (1985)
- 16) "The Pesticide Manual 11th. ed.", Edited by Tomlin C.D.S., British Crop Protection Council, Surrey UK (1997)
- 17) 環境庁環境保健部環境安全課: 平成10年版化学物質と環境, 東京, 109-144 (1998)
- 18) Kawano, M., Inoue, T., Wada, T., Hidaka, H. and Tatsukawa, R.: Bioconcentration and residue patterns of Chlordane compounds in marine animals: invertebrates, fish, mammals, and seabirds. *Environ. Sci. Technol.*, **22**, 792-797 (1988)
- 19) Monson, P.D., Call, D.J., Cox, D.A., Liber, K. and Ankley, G.T.: Photoinduced toxicity of fluoranthene to northern leopard frogs (*Rana pipiens*). *Environ. Toxicol. and Chem.*, **18**, 308-312 (1999)
- 20) EPA: "EPA Special Report On Endocrine Disruption: an Effects Assessment and Analysis", Washington DC (1997)
- 21) Bergeron, J.M. and Crews, D.: Effects of estrogenic compounds in reptiles: turtles, pp291-300, "Principles and Processes for Evaluating Endocrine Disruption in Wildlife", Edited by Kendall R., Dickerson R., Giesy J. and Suk W., SETAC Press, Pensacola, FL (1998)
- 22) Skaare, J.U., Ingebrigtsen, K., Aulie, A. and Kanui, T.I.: Organochlorines in Crocodile Eggs from Kenya. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **47**, 126-130 (1991)
- 23) Johnson, M.S., Franke, L.S., Lee, R.B. and Holladay, S.D.: 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 (1999)
- 24) Cooke, A.S.: The influence of rearing density on the subsequent response to DDT dosing for tadpoles of the frog *Rana temporaria*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **21**, 837-841 (1979)
- 25) Fernandez, M. and l'Haridan, J.: Influence of lighting conditions on toxicity and genotoxicity of various PAH in the newt in vivo. *Mutat. Res.*, **298**, 31-41 (1992)
- 26) Fernandez, M. and l'Haridan, J.: Effects of light on the cytotoxicity and genotoxicity of benzo(a)pyrene and oil refinery effluent in the newt. *Environ. Mol. Mutagen.*, **24**, 124-136 (1994)