

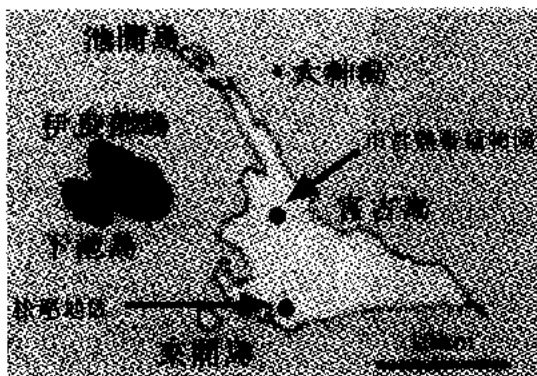


図8 宮古諸島

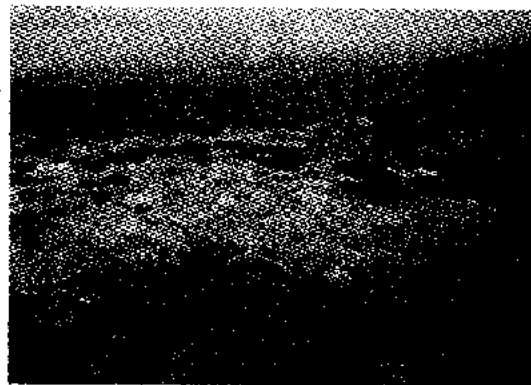


図9 宮古島の航空写真



図10 宮古島市営熱帯植物園

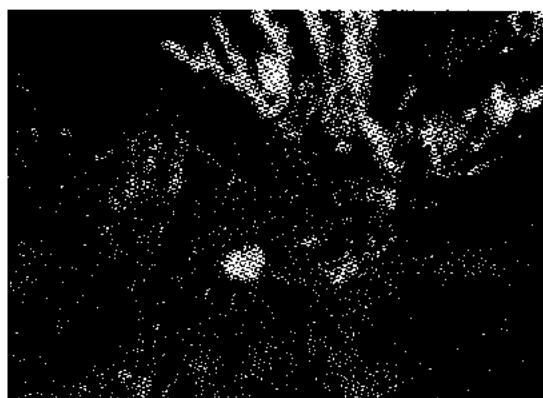


図11 宮古島市営熱帯植物園に現れた
ミヤコヒキガエル



図12 宮古島松尾地区の溜池



図13 宮古島松尾地区の溜池で見つけた
変態直後のミヤコヒキガエル

②考察と今後の展望

今回の調査は2月に行った。述べるまでもなく、この季節は本州に生息しているカエルは冬眠している。しかし、南大東島では数多くのミヤコヒキガエルが観察できた。島民の方にカエルの生息状況について尋ねたところ、夏には無数のカエルが車道に現れ、多くの個体が車に牽かれているとのことであった。南大東島では天敵のヘビがいないこと、また、工場及び宅地のために土地を開発することも殆どないと思われるので絶滅の心配はないと思われる。今回の調査でミヤコヒキガエルの個体数がオオヒキガエルに比べかなり多く観察されたことから、オオヒキガエルが南大東島では絶滅するのではないかと予測される。ただ、オオヒキガエルの原産地は南アメリカであり、日本の固有種ではないことから、進化的にはむしろ良い傾向にあるのかもしれない。

一方、宮古島では、観察された成体の個体数が比較的少ないことから数が減少していると推測される。宮古島は雨が多いものの池がほとんどない。しかし、カエルの繁殖期に多量の雨が降ることによって窪地に小さな水がたまりができる。その水たまりにカエルが産卵し、オタマジャクシは変態するまでそこで水中生活を送ることになる。従って、もし変態前に水が干上がってしまうとオタマジャクシが死滅することは明白で、宮古島のカエルの生息数は降雨量に大きく左右されるものと思われる。宮古島の固有亜種であるミヤコヒキガエルはこの島では数が減少していると推測されるものの、南大東島では害虫駆除のために移入されたという幸運も手伝って新天地で繁殖を続けることができた。しかし、この結果は今回の実態調査で得たものであり、継続的な実態調査を行わない限り最終結論は出せない。

【2】北九州市山田緑地における性比異常カエルの原因究明

①研究成果

(1) 有機塩素系農薬及びPCB

分析に供した卵塊の母ガエルの体内中の有機塩素系農薬及びPCB濃度を表1に示す。カエル体内からは、湿重量換算でPCBが13ng/g wet (検出頻度 1/10)、DDT類が5~97ng/g wet (検出頻度 7/10)、ディルドリンが3ng/g wet (検出頻度 1/10) 及びオキシクロルデンが4ng/g wet (検出頻度 1/10) 検出されている。特に高濃度で検出された物質はDDT類で、山田緑地では10mg/g fatを超えた個体があった(表1-2)。

次に、卵の湿重量濃度を表2に示すが、母体から検出された物質は、卵からも検出されており、さらに卵だけから検出された物質も多い。卵の検出濃度は、PCBが1~40ng/g wet (検出頻度 5/10)、DDT類が3~349ng/g wet (検出頻度 9/10)、ディルドリンが2~18ng/g wet (検出頻度 3/10) 及びクロルデン類が4~32ng/g wet (検出頻度 10/10) であり、母体の数倍である。検出物質の中では母体同様DDT類濃度が特に高く、山田緑地のニホンアカガエルの卵では6mg/g fatを超えるものもあった(表2-2)。

卵生の生物では、母体中の疎水性物質は脂肪と共に卵に移行することが知られている。調査した2種のカエルの体内及び卵の脂肪分は、それぞれ1%と5%であり、卵の脂肪分の高さが卵の高濃度の原因と考えられた。そこで、母ガエルとその卵の脂肪換算濃度を比較することとし、両者から検出されたデータを用いて、母体から卵への化学物質の移行率を計算して表3にまとめた。卵への移行率は、脂肪換算で平均0.59(幾何平均値の範囲0.30~1.10)であり、有機塩素系農薬やPCBが脂肪と共に卵へ移行していることが確認された。

次に、母体内の有機塩素系物質が、絶対量としてどの程度卵に移行しているかを検討した。その結果を表4に示す。母体内に存在する化学物質の2倍(0.14~5.6倍)の量が卵から検出されており、カエルの場合は、体内に

蓄積した有機塩素系物質の 2/3 が、1 回の産卵により卵に移行することが確認された。

(2) ダイオキシン類 (含 Co-PCB)

分析に供した卵塊の母ガエルの体内中のダイオキシン類濃度及び TCDD 毒性当量 (TEQ 値) を表 5 に示す。母体からは、湿重量換算で PCDD/DF が 18.7~207.5pg/g wet (平均 53.6pg/g wet)、コプラナー PCB が 131.1~375.2pg/g wet (平均 242.4pg/g wet)、総ダイオキシン類が、173.2~424.5pg/g wet (平均 295.9pg/g wet) 検出されている。また、それらの平均脂肪換算濃度は、PCDD/DF が 5,333pg/g fat、コプラナー PCB が 21,519pg/g fat、総ダイオキシン類が 26,852 pg/g fat である (表 5-2)。

一方、卵 (表 6) からは、湿重量換算で PCDD/DF が 37.9~540.9pg/g wet (平均 158.1pg/g wet)、コプラナー PCB が 289.2~1,958pg/g wet (平均 952.2pg/g wet)、総ダイオキシン類が、327.1~2,114pg/g wet (平均 1,110pg/g wet) 検出されている。卵の湿重量濃度は、有機塩素系農薬と同様に母体より大きく約 3.8 倍であった。また、卵の平均脂肪換算濃度は、PCDD/DF が 2,828pg/g fat、コプラナー PCB が 17,034pg/g fat、総ダイオキシン類が 19,861 pg/g fat であり、母体の約 70% であった。母体と卵の TEQ 値を比較したところ、湿重量濃度と同様に卵の TEQ 値は母体より 3.8 倍大きかった。このことから、土壌からカエルへの移行で見られた 2,3,7,8-体の選択的な生物濃縮は、母体-卵間では見られないことが確認された。

母体から卵へのダイオキシン類の絶対量の移行率を求めた。その結果を表 7 に示すが、母体中のダイオキシン類量の約 2.5 倍が卵から検出されており、有機塩素系農薬と同様ダイオキシン類も体内蓄積量の 2/3 が卵に移行することが確認された。さらに、個々のコンジェナーで移行率に差があり、OCDD など高塩素の異性体ほど卵へ移行しにくいことが分かった。PCDD/DF が土壌や水質など環境媒体から体内への移行する場合、高塩素化体ほど

取り込みにくくなることが多数報告されており、平成 10 年度に実施した土壌とカエル調査においても確認されている。しかし、高塩素化 PCDD/DF が、母体から卵へも低塩素化体と比べて移行しにくいことが明らかにされたのは、我々が知る限り初めてである。

調査 3 地域の土壌、カエル及び卵のダイオキシン類の TEQ 値 (TEF は、「WHO 1997 ほ乳類」を使用) を表 8 に示す。土壌及び卵の TEQ 値は、地域間で大きな差があったが、カエルの TEQ 値にはほとんど差がなかった。この理由として、対照 2 地域の土壌と卵塊の試料数が少ないことと、母体濃度の高い卵塊を調査対象としたことが考えられる。そこで、最も試料数の多い山田緑地の試料を用いて、土壌・カエル・卵間のダイオキシン類の動態を検討した。その結果を表 9 に示すが、土壌の TEQ 値を 1 としたときのオスガエル及び卵の TEQ 値は、それぞれ 0.36 及び 0.75 であった。なお、調査卵塊の母体の TEQ 値は、山田緑地の全メス (20 個体) の平均 TEQ 値の 1.39 倍であり、それを考慮すると全メスの卵塊の平均 TEQ 値は、土壌の 0.53 倍となる。即ち、カエル卵中のダイオキシン類の TEQ 値濃度は、生息地の土壌濃度の約半分であることが分かった。

②今後の展望

TEQ 最大値を示した卵塊は、田園地帯の小敷 (30.6 pg-TEQ 値/g wet) から採集したものであった。小敷の土壌の異性体構成比から、そのダイオキシン類の由来は水田用除草剤の CNP であることが分かっているため、高濃度は CNP の影響によると考えられる。北九州地方は、全国的に見て CNP の使用量が特に多い地域ではないため、カエルへの影響を考えるには CNP 使用量が多い地域のダイオキシン類分析調査が必要である。また、ダイオキシン類の卵への影響に関しては、五大湖に生息する魚を餌とする鳥の卵に悪影響 (孵化しない) を与える最低濃度は 10pg-TEQ/g wet と報告されている。また、この TEQ 値はラットの H4IIE 肝細胞を用いたバイオアッセイで得ら

れた値であり、GC/MS の分析値から計算で求める TEQ に比べ2～4倍の値であることを考慮すると、今回の調査で卵塊から検出された TEQ 値のカエルの胚に対する影響を更に調査する必要がある。また、ほぼ同程度のダイオキシン類の体内濃度で肝臓や血中のビタミンA濃度が低下することが報告されている。ビタミンAは、胚発生時に重要な役割をするホルモンであり、その不足及び過剰により四肢形成を含む種々悪影響を生じさせる可能性が指摘されている。その為、カエルへのビタミンA濃度の影響についても詳細な検討が求められる。

【3】環境汚染モニター動物（トランスジェニックカエル）の作製

①研究成果

結果を図5と図6に示した。図5で明らか

なようにカエル *FTZ-F1* 遺伝子の転写調節領域が GFP のプロモーターとして初期胚で機能していることがその蛍光から分かる。オタマジャクシでは部域特異的に発現している。この幼生はこの時期で死んだため、性腺で発現するかどうかを確認することができなかった。

②今後の展望

今回の実験でツチガエルの性腺で発現する遺伝子の転写調節領域がアフリカツメガエルの生体内で機能することが判った。今後は、導入個体数の増加、プロモーター活性の強化、他の候補遺伝子の導入等を行うことによってトランスジェニックカエルの作製を試みる予定である。もし成功すれば、極めて有効な環境汚染指標動物となるものと思われる。

Investigation of the actual circumstances of amphibians in danger of extermination and making a Web site to gather informations of amphibian malformations in Japan, and production of transgenic frogs to monitor the environmental pollution

Masahisa Nakamura, Laboratory for Amphibian Biology, Faculty of Science, Hiroshima university, Professor

Key words: actual circumstances, amphibians, Web site, malformation, EDC, dioxins, transgenesis, model animal

The research consists of 3 parts: 1) investigation of the actual circumstances of amphibians and making a Web site to gather information of amphibian malformations in Japan. 2) the investigation to clarify unbalance of sexual ratio in frogs in the Yamada-Ryokuchi area in the city of Kita-Kyushu. 3) production of transgenic frogs to monitor the environmental pollution.

We successfully made Web site to gather information of deformed amphibians which might be caused by chemical compounds such as EDC and dioxins. Investigation was also carried out to see the actual circumstances of amphibians (frogs and newts) in selected areas in the districts of Kanto, Hokuriku, Tokai, Shikoku and Okinawa. The number of amphibians seems to be declining in all areas examined. Interestingly, six malformed frogs (*Rana catesbeiana*) were found in a few months by this investigation.

In order to elucidate a reason for induction of unbalance of sexual ratio in frogs living in the Yamada-Ryokuchi area in the Kita-Kyushu city, we analyzed the contents of environmentally disruptive compounds and dioxins in frog eggs and found that organochlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls (PCB) and dioxins which were accumulated in frog bodies were transferred to the eggs. It is, therefore, very likely that the malformed frogs might be caused during development by the chemicals that had been accumulated in the eggs.

Finally, we tried to produce transgenic frogs to monitor environmental pollution by injecting a DNA construct of the 5'-untranslated region of the frog *FTZ-F1* gene, which is expressed in the frog gonad and a pEGFP vector into the eggs of *Xenopus laevis*. The expression of green fluorescence protein (GFP) was tissue-specific in the transgenic embryos. Unfortunately embryos died before reaching the tadpole stage, so that we could not confirm the *FTZ-F1* gene was expressing in the gonad.

We successfully obtained many results, but this research was performed in a period less than one year. Thus, we cannot draw a conclusion for the relationship between the deterioration of living conditions and the change in the number of amphibians at the present time. Further investigations are required to elucidate why the number of amphibians are declining and why frogs are deformed.

表 1-1 カエルの PCB 及び有機塩素系農薬濃度 (湿重量換算)

No.		山田7	山田8	山田9	山田11	山田13	山田14	山田16	山田18	田代17	小敷18
地域		山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	田代	小敷
種類		YA	YA	YA	NA	NA	NA	NA	NA	YA	NA
体長	mm	81	86	80	67	66	64	67	66	80	72
脂肪分	%	0.94	1.63	1.07	1.16	0.93	0.85	1.15	0.5	1.1	0.84
体重	g	30.9	37.1	31	17.8	19.3	15	17.6	15.8	34.9	22.5
P C B	塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	二塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	三塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	四塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	五塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	六塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	9	<2
	七塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	八塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	九塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	十塩化ビフェニル	<2	<1	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
農 薬 類	HCB	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	α-HCH	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	β-HCH	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	γ-HCH	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	δ-HCH	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	pp'-DDT	<2	4	17	<4	17	6	19	6	<2	<2
	op'-DDT	<2	<2	3	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	pp'-DDE	5	4	7	<4	76	5	55	11	<2	<2
	op'-DDE	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	pp'-DDD	<2	<2	3	<4	<4	<4	<4	<4	<2	<2
	op'-DDD	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	All DDTs	5	8	24	0	37	11	74	19	0	0
	γ'-カダリン	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	γ'-カダリン	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	3
	trans-カダリン	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	cis-カダリン	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	オキシカダリン	<2	<2	<2	24	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	trans-ノカド	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2
	cis-ノカド	<2	<2	<2	<4	<2	<4	<4	<4	<2	<2

表 1-2 カエルの PCB 及び有機塩素系農薬濃度 (脂肪換算)

No.		山田7	山田8	山田9	山田11	山田13	山田14	山田16	山田18	田代17	小敷18
地域		山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	田代	小敷
種類		YA	YA	YA	NA	NA	NA	NA	NA	YA	NA
体長	mm	81	86	80	67	66	64	67	66	80	72
脂肪分	%	0.94	1.63	1.07	1.16	0.93	0.85	1.15	0.5	1.1	0.84
体重	g	30.9	37.1	31	17.8	19.3	15	17.6	15.8	34.9	22.5
P C B	塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	二塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	三塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	四塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	五塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	364	0
	六塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	818	0
	七塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	八塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	九塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	十塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
農 薬 類	HCB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	α-HCH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	β-HCH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	γ-HCH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	δ-HCH	0	0	0	0	0	0	0	1000	0	0
	pp'-DDT	0	245	1028	0	1828	706	1652	1600	0	0
	op'-DDT	0	0	280	0	0	0	0	0	0	0
	pp'-DDE	532	245	654	0	8172	588	4763	2200	0	0
	op'-DDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	pp'-DDD	0	0	280	0	430	0	0	0	0	0
	op'-DDD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	All DDTs	532	491	2243	0	10430	1294	6433	3800	0	0
	γ'-カダリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	γ'-カダリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	357
	trans-カダリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	cis-カダリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	オキシカダリン	0	0	0	345	0	0	0	0	0	0
	trans-ノカド	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	cis-ノカド	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表 2-1 卵の PCB 及び有機塩素系農薬濃度 (湿重量換算)

(ng/g wet)										
検体番号	山田7	山田8	山田9	山田11	山田13	山田14	山田16	山田18	田代17	小敷18
地域	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	田代	小敷
種類	YA	YA	YA	NA	NA	NA	NA	NA	YA	NA
卵黄重量(g)	17.30	17.35	16.73	8.39	10.17	8.68	11.29	10.58	19.05	15.85
脂肪分(%)	5.4	6.5	5.5	6.0	5.8	6.5	5.4	5.3	4.9	4.6
塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
二塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
三塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
四塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
五塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	15	ND
六塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22	ND
七塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	ND
八塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
九塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
十塩化ビフェニル	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
HCB	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
α-HCH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
β-HCH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
γ-HCH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
δ-HCH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
p,p'-DDT	8	ND	4	ND	65	12	37	47	ND	ND
o,p'-DDT	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
p,p'-DDE	20	3	2	6	270	23	99	92	ND	4
o,p'-DDE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
p,p'-DDD	ND	ND	ND	ND	14	3	10	12	ND	ND
o,p'-DDD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
全DDT	23	3	6	6	349	38	146	151	0	4
Δ ² -DDE	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Δ ² -DDD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Δ ² -DDD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
trans-カドリン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
cis-カドリン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
trans-ノナリン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
cis-ノナリン	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: 検出せず

PCB検出限界: 1 ng/g, その他の検出限界: 2 ng/g

表 2-2 卵の PCB 及び有機塩素系農薬濃度 (脂肪換算)

(ng/g fat)										
検体番号	山田7	山田8	山田9	山田11	山田13	山田14	山田16	山田18	田代17	小敷18
地域	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	山田緑地	田代	小敷
種類	YA	YA	YA	NA	NA	NA	NA	NA	YA	NA
卵黄重量(g)	17.30	17.35	16.73	8.39	10.17	8.68	11.29	10.58	19.05	15.85
脂肪分(%)	5.4	6.5	5.5	6.0	5.8	6.5	5.4	5.3	4.9	4.6
塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
二塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
三塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
四塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
五塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	306	0
六塩化ビフェニル	19	15	0	17	0	15	0	0	449	0
七塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	61	0
八塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
九塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
十塩化ビフェニル	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HCB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-HCH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
β-HCH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
γ-HCH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
δ-HCH	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pp'-DDT	56	0	73	0	1121	185	685	887	0	0
op'-DDT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pp'-DDE	370	46	36	100	4655	354	1833	1736	0	87
op'-DDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pp'-DDD	0	0	0	0	241	48	185	226	0	0
op'-DDD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
All DDTs	426	46	109	100	6017	585	2704	2849	0	87
Δ ² -DDE	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Δ ² -DDD	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Δ ² -DDD	37	0	0	0	0	0	0	75	0	391
trans-カドリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
cis-カドリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
trans-ノナリン	130	62	91	133	121	185	74	151	82	652
cis-ノナリン	0	0	0	0	0	0	0	0	0	43