

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310039

研究課題名(和文) 成長初期における低線量放射線被ばくが高次脳機能と自律神経におよぼす影響の研究

研究課題名(英文) Studies for evaluation of effects of low-dose irradiation on higher brain and autonomic nervous activities in vertebrate development

研究代表者

尾田 正二(Oda, Shoji)

東京大学・新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：50266714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：亜致死線量の放射線照射よりも拘束ストレスの方がメダカ成魚の心拍により大きな影響を及ぼしたことから、低線量の放射線照射が脊椎動物の自律神経に与える影響も極めて小さく誤差レベルと結論する。ただし低線量率での慢性的な放射線の影響は未検証であり今後の課題である。マウス頭部への高線量放射線照射によって認知機能の一時的な低下を確認した。メダカ稚魚、成魚の遊泳を自動追尾して軌跡を数値化する手法を開発し、首都圏ホットスポットでの空間線量に相当する極低線量率にてメダカ胚、稚魚、成魚を慢性照射し、その高次脳機能への影響を検証・評価する手法を開発した。低線量慢性曝露実験の実施が将来のタスクとして残された。

研究成果の概要(英文)：Restriction of adult medaka with anesthesia before irradiation decreased medaka's heart rate much more than sub-lethal dose irradiation of carbon ion beam, indicating that the effects of low dose irradiation upon the autonomic nervous activity regulating heart beating in medaka are very little and can be ignored. Effects by chronic irradiation is not examined and must be addressed in future. Irradiation of mouse head with high-dose gamma rays (10 Gy) induced transient cognitive impairment. The methods to digitalize tracks of swimming adults and fries of medaka and the protocols to irradiate medaka chronically with ultra-low dose rate (about 2 microSv/hour) have been established in this study, however, the planned low- and ultra-low irradiation experiments on medaka has not conducted yet and remained to be our task in near future.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線被ばく メダカ マウス 自律神経 心拍 高次脳機能 遊泳軌跡 低線量

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類胎児が 200mGy を超える線量のガンマ線を被ばくした場合、小頭症などの脳神経系の形態形成異常が誘発されることが広く知られている。より低線量のガンマ線被ばくでは明瞭な形態形成異常は誘発されないが脳神経系の機能面に障害が誘発されることは十分に予想されるにもかかわらず、低線量 (100mSv 以下) の放射線被ばくによる神経系の機能面での発生・発育への影響を否定する明確な研究結果はない。このような背景によって、発育中の胎児、小児における低線量放射線被ばくが高次脳機能、自律神経機能へ将来影響を及ぼすのではないかという放射能汚染地域住民の不安が増長されている。低線量放射線 (200mSv 以下) が発育中の脳神経系、自律神経系の機能に影響を及ぼすか否かを検証することが緊急に求められている。

## 2. 研究の目的

小頭症などの形態形成異常を誘起しないレベルの低線量放射線 (10-200mSv) に胎児、小児が被ばくした場合に、発育後に脳機能および自律神経機能に生じる影響のリスクを評価することが急務となっている。本課題では、ヒトと同じ脊椎動物である小型魚類 (メダカ) とマウスをモデルとして、脳形成期であるマウス胎児、メダカ発生初期胚に低線量放射線を照射し、当該個体が成長した段階でその行動を画像解析により数値化して非照射個体と比較するための手法を開発し、記憶、学習、不安などの情動行動等、脳機能の発達異常の有無を検証することを目指した。体躯が小さく実験環境下においてマウスより自然な行動を示すメダカの特性を活かし、メダカの全行動を網羅的に 24 時間 7 日間記録、数値化する手法を開発し、低線量放射線影響の新規行動指標を探索することを目指した。また、照射メダカ個体の心拍と遊泳活動の日周リズムを解析して自律神経系への影響の有無を検証する手法を開発し、低線量放射線影響の指標化を図ることを目指した。

## 3. 研究の方法

### 3 - 1) メダカ成魚の概日リズムへの放射線影響

水質監視システム「めだか de モニタ」(株式会社四国総合研究所) に所定の改造を加え、6 匹のメダカ成魚 (SK2 系統) の遊泳を 24 時間 3 週間トラッキングし数値化し、フリーデータベースアプリケーション XAMPP を用いてデータ処理・解析を行った (Oda et al., 2014)。

ガンマ線照射滅菌装置 (GammaCell, MDS Nordion) を用いて 7.8 Gy/min の線量率に

てガンマ線を照射した。

### 3 - 2) メダカ成魚の心拍への放射線影響

群馬県高崎市に所在する日本原子力研究開発機構量子ビーム応用研究センターの重粒子線照射装置 TIARA を用いて、メダカ成魚 (SK2) の背側もしくは腹側のみに 15 Gy の炭素線を照射した。その後、千葉県柏市の研究室に連れ帰り通常の飼育を行った。照射後 7 日、14 日において、高速度カメラ (EX-F1, カシオ) を装着した倒立実体顕微鏡 (自作, Watanabe-Asaka et al., 2012 参照) を用いて、体躯が透明なメダカ系統 (SK2) 成魚の心拍を高速度 (300 fps) 撮影し、画像解析ソフトウェア「Bohboh」を用いて解析した。

### 3 - 3) 仔マウス記憶機能への放射線影響の解明

6 週齢のマウスにガンマ線 (10 Gy) を照射し、contextual fear conditioning test によって記憶機能への影響の有無を検証した。

ガンマ線照射滅菌装置 (GammaCell) を用いて 7.8 Gy/min の線量率にてガンマ線を照射した。

### 3 - 4) メダカの高次脳機能への放射線影響を評価・検証するための、メダカ稚魚の行動解析法の確立

孵化後 1 週間から 2 週間の稚魚 (Hd-rR 系統) を直径 35 mm のプラスチックシャーレに 1~16 匹を入れ、赤色の LED 照明の下でハイビジョンカメラ (HC-9, SONY) にて全体の遊泳の様子を 10 分間撮影した。映像を PC にて再生して稚魚のバースト遊泳の回数を目視にて計数した。また、稚魚を瞬間凍結して全身よりコルチゾールを抽出し、ERISA ベースの市販キット (Cortisol Parameter Assay Kit (KGE 008)、R&D SYSTEM) を用いて定量した。「2 次元行動モニタリングソフト Larvae」(長崎県工業技術センター) および「めだか de モニタ」を用いて、稚魚の遊泳行動を数値化した。

### 3 - 5) メダカの高次脳機能への放射線影響を評価・検証するための、メダカ成魚の行動解析法の確立

直径 51 cm の白い皿 (たらい) の中央に白色の乳鉢 (直径 24 cm) を設置して水深 5 cm となるように水を満たし、メダカ成魚 (最大 8 匹) を静かに移して群れを形成させ、移送後 3 分後から 10 分間の遊泳の様子をハイビジョンカメラ (HC-9, SONY) を用いて撮影した。Final Cut Pro (Adobe) を用いて映像を編集した後、東京大学理学系研究科岩崎渉准教授、福永津嵩氏が作成したメダカ群の自動トラッキングソフトウェア "Group Tracker" (Fukunaga et al., 2015)

を用いて 10 分間の遊泳軌跡を数値化し、統計処理を施した。

#### 4 . 研究成果

##### 4 - 1 ) メダカ成魚の概日リズムへの放射線影響

メダカ(SK2)成魚にガンマ線(10 Gy)を照射した後に明暗サイクル条件下にて飼育した場合には活動の概日リズムは照射後 3 週間にわたって影響を受けなかった。明暗サイクル下にて飼育した放射線を照射していないメダカ成魚を恒暗条件下に移すと 15 日間は活動の概日リズムは保たれるが、その後マウスで知られているように位相がずれるのではなく、活動の概日リズム自体が消失し明瞭な活動期と非活動期の区別がなくなった。メダカは昼行性の動物であり、活動の概日リズムの補正においての明暗の意義が、夜行性のマウスとは異なる可能性があるものと考えられる。ガンマ線(10 Gy)を照射後に恒暗条件下に移すと、照射後数日の間、遊泳活動のリズムが明らかに低調となり、照射後 11 日で活動の概日リズムが消失し遊泳活動のリズムが 24 時間周期から 8 時間周期に変化した。これらの放射線は高線量ではあるがメダカ成魚の致死線量ではないことから、上記の結果は、高線量の放射線照射が脊椎動物の自律神経の活動もしくはメダカの概日リズムの保持が乱された可能性がある。10 Gy のガンマ線照射では、メダカ胚脳、成体マウス脳において神経細胞のアポトーシスが誘導されることが知られていることから、ガンマ線照射によって概日リズムの記憶を担う神経細胞が死滅し、概日リズムの保持に支障が生じた可能性がある。

##### 4 - 2 ) メダカ成魚の心拍への放射線影響

脊椎動物における自律神経活動を評価する指標として、心拍変動に着目した。メダカ成魚に、背側半身と腹側半身に局限して放射線(15 Gy)を照射し、照射 7 日後に、腹側照射した個体群において心拍が一過的に低下することを見出した。照射個体群がその後死亡することはなく、照射 14 日後には異常は認められず、致死線量以下の線量の放射線照射により、メダカの自律神経活動が一過的に生理的影響を受けることを示す初めての成果を得ることができた。

麻酔下において重粒子線を照射する際の魚体のハンドリングの丁寧さが少ない場合に心拍の低下がみられ、丁寧に扱えば放射線照射による心拍の変動は起こらないことが判明した。平成 25 年度において見出したメダカ成魚心拍への放射線影響はアーティファクトであり、放射線照射時にメダカを拘束するストレスの方が垂致死線量(15 Gy)の重粒子線照射よりも心拍への影響が大きいことが判明した。従って、低線量の

放射線照射によるメダカ成魚の自律神経への影響は極めて小さくて誤差レベルであり、日常的なストレスの方が格段に影響が大きいものと結論する。

##### 4 - 3 ) 仔マウス記憶機能への放射線影響の解明

ガンマ線(10 Gy)を頭部に照射したマウスは、contextual fear conditioning test において照射後に認知機能の一過的な低下が認められ、照射 4 カ月後にはコントロール群との差異は認められず、記憶機能への障害は回復したものと考えられる。さらに、認知機能の一過的低下がみられた照射後の時点において、海馬ネットワークの機能的コネクションが放射線照射により障害を受けていることを示唆する結果が functional MRI により得られた。マウス海馬の神経幹細胞が障害を受けて一過的にその数が減少することが認知機能障害の原因と考えられる。また、高雄医科大学を訪問し、上咽頭がん患者において認知機能への放射線治療の影響を評価することを目的とする共同研究を行った。

##### 4 - 4 ) メダカの高次脳機能への放射線影響を評価・検証するための、メダカ稚魚の行動解析法の確立

放射線影響を評価するための指標とする高次脳機能として、メダカ稚魚が示すバースト遊泳行動の評価方法および稚魚の cortisol を同時に定量する手法を確立した。個体密度が増加するにつれてメダカ稚魚がバースト遊泳行動を示す頻度が増加したが、大きな個体差がみられた。バースト遊泳行動がストレス行動であることを予想しバースト遊泳行動の頻度と cortisol 濃度を個体ごとに測定したところ、両者の間に相関性は認められなかったことから、バースト遊泳は cortisol の分泌を伴う内分泌系の動作によるストレス行動ではなく、アドレナリン分泌を伴う自律神経系の動作によるストレス行動である可能性が考えられた。

##### 4 - 5 ) メダカの高次脳機能への放射線影響を評価・検証するための、メダカ成魚の行動解析法の確立

直径 51 cm の白い皿(たらい)の中央に白色の乳鉢(直径 24 cm)を設置して水深 5 cm となるように水を満たすと、メダカが自然な感じで群れを形成して 10 分以上にわたり安定して遊泳することを発見した。

また、東京大学理学系研究科岩崎渉准教授、福永津嵩氏が作成したメダカ群の自動トラッキングソフトウェア "Group Tracker" (Fukunaga et al., 2014) を用いてメダカ成魚 8 匹の 10 分間の遊泳軌跡を同時にトラッキングして数値化することに成功した。これにより、被ばくしたメダカ稚魚が成長して成魚となった際の行動異常

を検出・評価する手法が構築できた。

#### 4 - 6) 極低線量慢性照射実験法の確立

ホルミシスシートを活用して福島原発事故以降の首都圏「ホットスポット」空間線量にほぼ相当する 2  $\mu$ Sv/hour の空間線量率での極低線量慢性照射をメダカ稚魚およびメダカ成魚を対象として実施するための手法を構築した。

もって、平成 26 年度をもって極低線量被ばくの高次脳機能影響を検出・評価する準備を完了させたが、時間的制限により極低線量慢性照射の実施には至っておらず、極低線量慢性照射実験が近々の将来におけるタスクとして残された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. GroupTracker: Video Tracking System for Multiple Animals under Severe Occlusion. Fukunaga T., Kubota S., Oda S., Iwasaki W. Computational Biology and Chemistry doi:10.1016/j.compbiolchem.2015.02.006, (in press) (査読あり)

2. Global Analysis of Medaka by Whole Body Histology and 24-Hours Tracking. 連続全身組織切片と 24 時間トラッキングによるメダカの組織形態と活動性の網羅的な解析 Oda S., Nishimaki T., Katsumura T., Katada Y., Oga A., Ikemoto K., Taniguchi Y., Oota H. Cytometry Research 24(2), 9-14 (2014) (査読あり)

3. Nuclear and cytoplasmic changes in erythrocytes of p53-deficient medaka fish (*Oryzias latipes*) after exposure to gamma-radiation. Sayed A.E., Oda S., Mitani H. Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 771, 64-70, (2014) (査読あり)

4. Regular heartbeat rhythm at the heartbeat initiation stage is essential for normal cardiogenesis at low temperature. Watanabe-Asaka T., Sekiya Y., Wada H., Yasuda T., Okubo I., Oda S., Mitani H. BMC Dev Biol. 14, 12-24, (2014) (査読あり)

5. p53-Dependent suppression of genome instability in germ cells. Otozai S., Ishikawa-Fujiwara T., Oda S., Kamei Y., Ryo H., Sato A., Nomura T., Mitani H., Tsujimura T., Inohara H., Todo T. Mutation Research. 760, 24-32, (2014) (査

読あり)

6. Increased radiation dose issues in Tokatsu Area in Chiba Prefecture, Japan –How the situation and measures were explained to the local residents–, Fujii H., Umeda OI., Imoto T., Oda S., Someya S., Iizumi S. Radiation Emergency Medicine. 2, 76-81, (2013) (査読あり)

7. Gamma-ray irradiation promotes premature meiosis of spontaneously differentiating testis-ova in the testis of p53 deficient medaka (*Oryzias latipes*). Yasuda T., Oda S., Li Z, Kimori Y., Kamei Y., Ishikawa T., Todo T., Mitani H. Cell Death & Disease, 3, e395, (2012) (査読あり)

[学会発表](計 9 件)

1. メダカシステムの行動解析に向けた遊泳軌跡生成手法  
小野瑛人、高橋悟、川端邦明、尾田正二、金子俊一  
ViEW2014 2014 年 12 月 4 日 パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜)

2. GroupTracker: A Video tracking system for analysis of social behaviors in a medaka school. Tsukasa Fukunaga, Shoko Kubota, Shoji Oda, Wataru Iwasaki.  
第 20 回小型魚類研究会 2014 年 9 月 21 日 慶應義塾大学薬学部(芝共立キャンパス)(東京都、港区)

3. メダカ心拍変動は交感神経と副交感神経の制御を受けている  
浅香智美、尾田正二、新堀真希、岩崎賢一、寺田昌弘、馬場昭次、須藤正道、三谷啓志、向井千秋  
日本生理学会  
2013 年 3 月 27 日 ~ 29 日 タワーホール船橋 (東京都、江戸川区)

4. メダカの体と動きをまるごと全部数値化する研究  
尾田正二、浅香智美、保田隆子、三谷啓志、谷口善仁、太田博樹、勝村啓史、西槇俊之、埴原恒彦  
第 23 回日本サイトメトリー学会学術集会  
2013 年 6 月 22 日 日本医科大学 (東京都、文京区)

5. Single gene transgenesis changed schooling behavior in medaka

Shoko Kubota, Shoji Fukamachi, Hiroshi Mitani, Shoji Oda

第 19 回小型魚類研究会 2013 年 9 月 20 日  
仙台 AER(アエル)ビル 5 階 仙台市情報・産業プラザ(宮城県、仙台市)

6. NMR イメージングによる小動物(マウス脳、メダカ、ヤツデヒトデ腕)の内部構造の観察

尾田正二、阿部欣史、近藤真理、三谷啓志、久恒辰博

日本動物学会第 84 回大会  
2013 年 9 月 25 日 岡山大学(岡山県、岡山市)

7. メダカの心臓自律神経の研究

浅香智美、尾田正二、岩崎賢一、馬場昭次、三谷啓志

日本動物学会第 84 回大会  
2013 年 9 月 27 日 岡山大学(岡山県、岡山市)

8. メダカの泳ぎ方の研究

新堀真希、大平宇志、浅香 智美、寺田昌弘、馬場昭次、三谷啓志、尾田正二

日本動物学会第 83 回大会  
2012 年 9 月 15 日 大阪大学(大阪府、大阪市)

9. メダカにおけるストレス行動の解析

矢野裕紀、高橋英也、坂本竜哉、三谷啓志、尾田正二

日本動物学会第 83 回大会  
2012 年 9 月 15 日 大阪大学(大阪府、大阪市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

研究室ホームページ

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/K-medaka/TOP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾田正二(Oda Shoji)

東京大学大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号: 50266714

(2) 研究分担者

久恒辰博(HISATSUNE Tatsuhiko)

東京大学大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号: 10238298

(3) 連携研究者

三谷啓志(MITANI Hiroshi)

東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号: 70181922