

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340043

研究課題名(和文)メダカ胸腺を指標にした放射線障害の定量化システムの確立

研究課題名(英文) Establishment of a biosystem for quantification of the radiation effects with the medaka thymus.

研究代表者

丸山 耕一 (Maruyama, Kouichi)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・福島復興支援本部・主任研究員

研究者番号：70349033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、メダカの胸腺をターゲットにして、臓器、細胞レベルから包括的に放射線影響が現れるしきい値を検証する事である。

胸腺が可視化出来るメダカを用いて胸腺での小核試験法を確立させた。非照射メダカにおいて、小核出現率はエラや腎臓と比べて大きな違いはなかった。ガンマ線連続照射実験系を立ち上げ、胸腺萎縮と小核試験法から放射線影響の現れるしきい値を算定した。これまでの所、胸腺萎縮は10-50mGy/h、小核出現は1-10mGy/hにしきい値があると推定している。この線量率は原発事故後の空間線量率(<100uSv/h)と比べても10倍以上の高く、メダカに放射線の影響が出ているとは考えづらい。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to establish a biosystem for the quantification of the detrimental effects from radiation at organ and chromosomal levels in the thymus of medaka fish. In the present work, we have successfully established a biosystem. By using this system, the threshold dose from continuous gamma-irradiation was verified, at which significant atrophy of the thymus and marked increase in the frequency of the micronucleated cells were induced. So far, it was estimated that the threshold was at 10-50mGy/h for the thymus atrophy, and 1-10mGy/h for the increase of the micronucleated cells in medaka that had been exposed to gamma-irradiation for 2 weeks. These dose rates are much higher (more than 10 times) in comparison with the highest air dose rate (100uSv/h) in the 'difficult-to-return zones' near the crippled Fukushima nuclear plant designated by the government measured just after the accident.

研究分野：放射線生物学

キーワード：小核試験 メダカ 放射線

1. 研究開始当初の背景

放射線防護の分野では長い間、防護の対象はヒトに限られていたが、環境問題への関心が世界的に高まる中で放射線が環境へ与える影響にも目が向けられるようになり、国際原子力機関(IAEA)では1992年に、国連科学委員会(UNSCEAR)では1996年に、放射線の影響に関する環境生物への影響に関する報告が取りまとめられ、国際放射線防護委員会(ICRP)では環境の防護に関するタスクグループが設置され、Publication 91「ヒト以外の生物種に対する電離放射線のインパクト評価の枠組み」が2003年に発表され、2007年にはPublication 108「Environmental Protection: the Concept and Use of Reference Animals and Plants」が出版されている。

環境評価生物であるメダカは、古くから化学物質への影響だけでなく、放射線への影響が詳細に調べられた生物種である。これまで致死線量をはじめとして、放射線回復、晩発影響、年齢依存性、ホルミシス効果、継世代影響、放射線防護剤など、様々な放射線影響研究のデータが蓄積しており、理科年表をはじめICRPレポートなどの多くの文献にデータが記載されている(メダカの生物学 東京大学出版1990)。

リンパ球の供給臓器である胸腺は最も放射線の影響を受けやすい臓器の一つとして知られている。メダカでは、Ghoneumらにより胸腺の萎縮が複数の個体の胸腺切片の平均値を比較することで調べられている(Ghoneum M. et al., J Fac. Sci. Univ. Tokyo, 1979)。この実験系では複数個体の切片からデータを得ているため個体を殺さねばならず、また、元々胸腺の体積は個体差が大きいので正確な値を得るのが難しいなどの難点があった。

近年、徳島大学高浜研究室により、胸腺のみでGFPを発現するメダカ系統

cab-Tg(rag1-egfp)が開発された(Li J. et al., Journal of Immunology, 2007)。このメダカはrag1遺伝子のプロモーター領域をGFPレポーター遺伝子に組み込んだトランスジェニック系統で、生きたまま殺さずに蛍光顕微鏡下で胸腺の形、大きさを見る事が出来る。申請者はこれまでにナショナルバイオリソースを通じてこのメダカ系統を受入れ、X線単発照射による継時的な胸腺の萎縮、回復のデータを得ており、放射線障害を定量するのに適したメダカは孵化後1.5-3カ月、また2-5Gy照射から萎縮が観察され、7日目には回復が見られるなどの基礎的なデータを学会発表している(日本放射線影響学会2011年)。

一方、放射線障害を細胞レベルで定量する方法としては、小核試験法が挙げられる。メダカについては、大阪信愛大学・高井教授により、腎臓やエラの細胞を用いて放射線影響を異常小核の出現頻度で定量している

(Takai et al. Mutat. Res. 2004)。これら文献では、放射線影響はガンマ線急性照射24時間後に1-2Gyから検出されたという結論であった。この系は手法の簡便さ、他の化学物質や環境汚染物質などにも応用が出来大変優れた系ではあるが、放射線影響を精査するには適切でなく、より放射線感受性の高い胸腺の様な臓器を使うべきである。ただ、小型魚類の胸腺は小さく身体の内側にあり、解剖時に他の臓器と区別が難しく、生きたメダカから胸腺組織だけを取り出すのは至難の作業であった。前述のGFPトランスジェニックメダカ系統cab-Tg(rag1-egfp)は、蛍光顕微鏡下で胸腺のみを見ながら摘出することが可能である。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえて本研究では、個体臓器レベルと細胞レベルから放射線影響を定量するシステムを確立させる。そしてその応用として、福島第一原発事故による警戒区

域（帰宅困難区域）を想定した長期低線量被ばくによる環境生物への影響を算定する、までを目標とする。

・メダカ系統 cab-Tg(rag1-egfp)において、現在行っている胸腺萎縮モデルの確立を行う。

・胸腺が GFP により可視化された cab-Tg(rag1-egfp) メダカ系統から、胸腺のみを外科的手術で取り出し、胸腺からの小核試験法を確立させる。X線単発照射後の小核の出現率の継時変化と線量依存性の基礎データを出し、これまでに出ているメダカ腎臓、エラでのデータとの比較検討を行う。

・放医研ガンマ線照射システムから、福島第一原発事故-20 キロ圏内警戒区域と同程度、またそれ以上の低線量放射線照射場を作り、メダカ系統 cab-Tg(rag1-egfp)を長期間飼育しながら撮影、または胸腺からの小核試験を行い、個体-臓器レベル、細胞レベルで放射線影響を検証する。1)20 キロ圏内警戒区域(-100 μSv/h)で小核試験を指標に影響は出るのか？ 2)1)で出なかった場合、どの線量率で影響は出始めるか？ を明らかにする。

3. 研究の方法

上記目的を遂行するため、以下4つのセクションに分けて説明をする(図1)。

(1)メダカ胸腺からの小核試験法の開発



(2)X線単発照射後の胸腺-小核試験のデータ収集



(3)メダカガンマ線長期照射による基礎データの収集



(4)福島原発事故による警戒区域圏内を想定した環境放射線量下でのメダカへの影響評価

図1 本課題の流れ(方法)

(1)メダカ胸腺からの小核試験法の開発

(2)X線単発照射後の胸腺-小核試験でのデータ収集

(3)メダカガンマ線長期照射による基礎データの収集

(4)福島原発事故による警戒区域圏内を想定した環境放射線量下でのメダカへの影響評価

4. 研究成果

(1)メダカ胸腺からの小核試験法の開発

これまでに高井らがメダカ腎臓を用いて小核試験法を確立している(Takai et al., Genes and Environment 2008)。この手法を参考にして、メダカ胸腺での小核試験法を開発した。当初、計画では成魚1年目を使って胸腺の摘出を行う予定であったが、成魚1年の特に生殖を終えたメダカでは、個体自体は大きいのであるが、胸腺臓器はすでに老化により萎縮しており実験には適さない事がわかり、孵化後1.5~4ヶ月程度のメダカを使用することにした。

胸腺の摘出については、まずこれまで行っていた受精卵へのマイクロインジェクション法を改良して、蛍光顕微鏡下でGFPが発現している胸腺細胞をマニピュレーターで吸い上げる方法を試みた。鱗をピンセットで取り除き、ガラス針をGFP陽性胸腺細胞に刺して吸い上げる。何度か試行したが、メダカ成魚皮膚は柔らかく、針が突き刺さりにくかった。刺さった場合もガラス針が詰まってしまう事が多く、細胞を効率的に吸い上げる事は出来なかった。次に、30Gのインシュリン注射用針を用いて吸い上げる事も試みたが、これは針の径が大きすぎて失敗した。結局、微細なピンセットで鱗を剥いだ後、外科用メスで胸腺を沿う様に傷をつけ、ピンセットで取り出す方法が一番効率良かった。摘出した胸腺細胞から塗抹標本作製し観察を行った。何も染色しない状態で蛍光観察を行った場合、蛍光強度が足りず小核試験には難しい印象であった。アクリジンオレンジで染

色した場合は問題なく小核を検出する事が出来た。

(2) X線単発照射後の胸腺-小核試験でのデータ収集

今回確立した胸腺-小核試験法を用いて、X線単発照射後で何時間後に小核出現頻度が上昇するかの基礎データを収集した。X線10Gy単発照射したメダカを12, 24, 48, 72時間後に胸腺を取り出し小核試験を行った。これまで、メダカ腎臓では照射後24時間に小核出現頻度が上昇することが知られているが、メダカ胸腺でも同様の結果を得られた(図2左)。

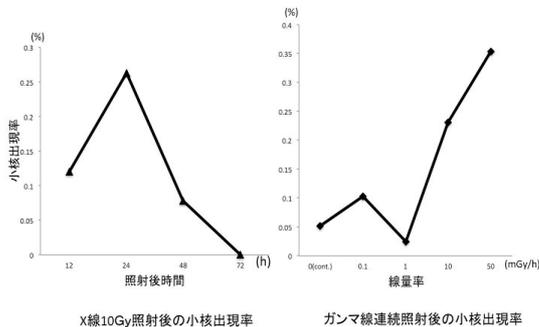


図2 胸腺細胞からの小核試験

(3) メダカーガンマ線長期照射による基礎データの収集

放医研・セシウム第1照射室(二方向二線源同時ガンマ線照射装置 ^{137}Cs 7.4TBq、296GBq)にて、メダカの連続照射実験系を立ち上げた。まず、飼育容器の選定は、数種類の細胞培養用のフラスコを試し、Nunc社の2リッターフラスコが一番良いと思われたことから以後これを使うこととした。照射線量率は、0(control), 0.1, 1, 10, 50mGy/hで行った。0.1mGy/h(=100uGy/h)は福島原発事故後の周辺環境での最も高い線量率を想定しており、また50mGy/hではメダカ精子に不稔があらわれるという報告がある(Egami N. and Hama A., J. Radiat. Res., 1979: 注) 正確には0.13kR/day)。容器内の

中心部にガラス線量計を配置し、水を入れた状態で線量を測定し、線源からの正確な位置定めを各線量率で行った。給餌は一日1回、水換えは週1回でおこなった。

(4) 福島原発事故による警戒区域圏内を想定した環境放射線量下でのメダカへの影響評価

ガンマ線の連続照射は2週間おこなった。当初考えていた期間よりも短い、これはガンマ線照射施設には、他に植物と両生類が連続照射をおこなっており、それとの兼合いで照射期間を短縮せざるを得なかった。照射期間中の胸腺の撮影は0, 1, 2, 3, 5, 7, 11, 14日目に行い、これはこれまでのX線照射実験との比較のためにこの日程でおこなった。撮影された画像はX線照射実験と同様にImage Jというソフトにより胸腺の面積を定量した。結果、0~10mGy/hの線量率でのメダカ胸腺は成長による増加を示したのに対して、50mSv/hでは5日目を境に減少が見られた(図3)。このことは放射線障害による胸腺萎縮のしきい値は10-50mGy/hの間にあると推定される。減少を始めた5日目の積算照射線量は6Gyであり、14日目照射終了時では16.8Gyと計算された。

14日目に撮影を終了したメダカはすぐに胸腺を摘出し、小核試験をおこなった。結果、0~1mGy/hの線量率では非照射メダカと同程度の0~0.1%の小核出現率であるのに対し、10mGy/h、50mGy/hでは飛躍的に増加しており、また50mGy/hの方が高かった(図2右図)。このことはメダカ胸腺における異常染色体の出現するガンマ線連続照射のしきい値は1-10mGy/hの間であることを示している。また、福島の帰宅困難区域を想定した0.1mGy/hでは胸腺萎縮、異常小核の上昇は見られなかったことから、事故当時から福島の野生メダカに放射線障害は出ていないものと思われる。では、どの位の線量率で影響が出はじめるかのしきい値は、現在までの所、染色体異

常で1~10mGy/h、臓器の萎縮が10~50mGy/hであったことから、10倍以上と推定された。

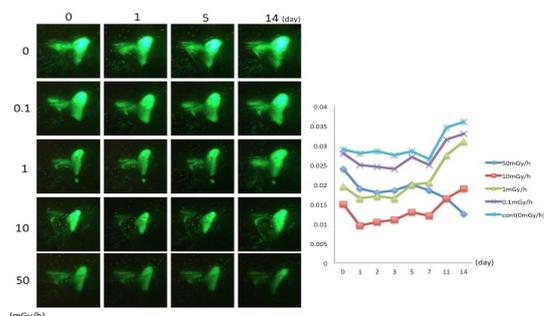


図3 ガンマ線連続照射下での胸腺の変化

今回、目的としていた、メダカ胸腺を指標にしての放射線影響検出系の確立、また放射線影響の起こるしきい値の算定を行い、福島原発事故による野生メダカへの放射線影響は出ていないであろうと結論づけた。残念ながら、専門誌等で論文発表までまとめ上げることまでは至らなかったが、すでに実験系は完成しており、今後さらなる実験を重ねてデータを増やすことで論文にまとめることは出来ると確信している。

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 9 件)

1) Maruyama K., Wang B., Ishikawa Y., Yasumasu S., Iuchi I. : Evolutionary pathway of pseudogenization of globin genes, $\alpha 5$ and $\beta 5$, in genus *Oryzias*. *Development Genes and Evolution* (2015) : 225: 305-311. 査読有

DOI:10.1007/s00427-015-0509-0

2) Watanabe Y., Ichikawa S., Kubota M., Hoshino J., Kubota Y., Maruyama K., Fuma S., Kawaguchi I., Yoschenko V.I., Yoshida S. : Morphological defects in native Japanese fir trees around the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant. *Scientific Reports* (2015); 5: 13232. 査読有

DOI:10.1038/srep13232.

3) Taimatsu K., Takubo K., Maruyama K., Suda T., Kudo A. : Proliferation following tetraploidization regulates the size and

number of erythrocytes in the blood flow during medaka development, as revealed by the abnormal karyotype of erythrocytes in the medaka TFDP1 mutant. *Developmental Dynamics* (2015) : 244: 651-668. 査読有
DOI: 10.1002/dvdy.24259.

4) Ishikawa Y., Inohaya K., Yamamoto N., Maruyama K., Yoshimoto M., Iigo M., Oishi T., Kudo A., Ito H. : The parapineal is incorporated into the habenula during ontogenesis in the medaka fish. *Brain, Behavior and Evolution* (2015); 85: 257-270. 査読有

DOI:DOI:10.1159/000431249

5) Wang B., Tanaka K., Ji B., Ono M., Fang Y., Ninomiya Y., Maruyama K., Izumi-Nakajima N., Begum N., Higuchi M., Fujimori A., Uehara Y., Nakajima T., Suhara T., Ono T., Neno M. : Total body 100mGy X-irradiation dose not induce Alzheimer's disease-like pathogenesis or memory impairment in mice. *J Radiat Res* (2014): 55(1): 84-96. 査読有

DOI: 10.1093/jrr/rrt096.

6) Wang B., Tanaka K., Ji B., Ono M., Fang Y., Ninomiya Y., Maruyama K., Izumi-Nakajima N., Begum N., Higuchi M., Fujimori A., Uehara Y., Nakajima T., Suhara T., Neno M. : Low-dose total body carbon-ion irradiations induce early transcriptional alteration without late Alzheimer's disease-like pathogenesis and memory impairment in mice. *Journal of Neuroscience Research* (2014) : 92(7): 915-926. 査読有

DOI: 10.1002/jnr.23363

7) Watanabe Y., Kubota Y., Fuma S., Maruyama K., Ichikawa S., Kubota M. Yoshida S.: Cytokinesis block micronucleus assay in field plants for monitoring radiation-induced genotoxicity of the environment. Mutation Research (2014) : 774: 41-46. 査読有 DOI:10.1016/j.mrgentox.2014.08.009

8) Wang B., Tanaka K., Morita A., Ninomiya Y., Maruyama K., Fujita K., Hosoi Y., Neno M. : Sodium orthovanadate (vanadate), a potent mitigator of radiation-induced damage to the hematopoietic system in mice. Journal of Radiation Research (2013) : 54(4): 620-629. 査読有 doi: 10.1093/jrr/rrs140.

9) Wang B., Tanaka K., Ninomiya Y., Maruyama K., Vares G., Kasai-Eguchi K., Neno M. : Relieved residual damage in the hematopoietic system of mice rescued by radiation-induced adaptive response (Yonezawa effect). Journal of Radiation Research (2013) : 54(1): 45-51. 査読有 doi: 10.1093/jrr/rrs077.

〔学会発表〕(計 4 件)

1) 丸山耕一
メダカ胸腺における放射線障害の可視化と定量化
日本動物学会関東支部大会 2016.3.12
神奈川大学(神奈川県)

2) Kouichi Maruyama, Akinori Takai, Bing Wang, Yoshito Watanabe, Yoshihisa Kubota, Satoshi Yoshida
Radiation effects on medaka around Fukushima Daiichi nuclear power plant.
小型魚類研究会 2015.9.19
大阪大学(大阪府)

3) Kouichi Maruyama, Akinori Takai, Bing Wang, Yoshito Watanabe, Yoshihisa Kubota,

Satoshi Yoshida
Radiation effects on medaka around Fukushima Daiichi nuclear power plant.
小型魚類研究会 2014.9.20
慶應大学(東京都)

4) Kouichi Maruyama, Bing Wang, Yuji Ishikawa, Shigeki Yasumasu, Ichiro Iuchi
Analysis of the 5() globin gene in medaka.
小型魚類研究会 2013.9.20
仙台市情報産業プラザ(宮城県)

〔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:
取得年月日:
国内外の別:
〔その他〕
ホームページ等
無し

6. 研究組織
(1) 研究代表者
丸山 耕一(MARUYAMA, Kouichi)
国立研究開発法人・放射線医学総合研究所・
福島復興支援本部・主任研究員
研究者番号: 70349033

(2) 研究分担者
無し ()

研究者番号:

(3) 連携研究者
無し ()

研究者番号: