

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11952

研究課題名(和文)被災雄牛における経世代影響評価系の構築と解析

研究課題名(英文) Transgenerational effects associated with radiation exposure in bulls after Fukushima accident

研究代表者

山城 秀昭 (Hideaki, Yamashiro)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：60612710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、旧警戒区域内で6ヶ月および2年間被ばくした雄ウシと8頭の産子において全ゲノムエクソン領域の網羅的な変異を抽出した。その結果、NLRP9など9遺伝子への変異が認められたが、生命の維持に重要な役割を果たす遺伝子への変異は認められなかった。さらに、被災雄牛の精子を用いて人工受精を実施し、10ヶ月飼育した後に全代謝産物のメタボローム解析を行った。その結果、対照の子牛のそれらの値と比較して差は認められなかった。本研究の成果は、福島県産の優良種雄牛の精子を用いて子牛を生産した場合においても、その子牛への放射線の影響が認められる可能性は極めて低いという一つの科学的な根拠を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to investigate the effect of exporting radiation for 6 months and 2 years in the ex-evacuation zone, a 20-km radius region surrounding the FNPP, on whole genome exome mutation of offspring associated with radiated bulls. As a result, there were no hereditary phenotypic alterations in the whole genome exome regions of calves associated with paternal exposure to ionizing radiation. Furthermore, we analysed transgenerational effects on calf on the blood plasma metabolome in order to detect alterations associated with paternal exposure to radiation. There were no significant transgenerational effects on the blood plasma metabolome in calf obtained by AI using sperm from LDR-radiated bull in the FNPP ex-evacuation zone. In calves produced by using sperm of Fukushima bulls, the radiation effects were extremely low. Thus, the results of our study would contribute to the reconstruction of the Fukushima livestock industry and facilitate devising food safety and security measures.

研究分野：動物生殖学

キーワード：福島原発事故 被災雄牛 経世代 エクソン解析 メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

2011年3月、福島第一原発の事故で、大量の放射性物質が環境中に放出された。日本だけでなく世界中の人々が「直ちに健康に影響のないレベル」の放射線の被ばくが将来に亘っても影響がないのか、次世代への影響はなど回答を求めている。

唯一、子孫を生産可能にする生殖器官あるいは生殖細胞は、放射線に対する感受性が高く、閾値以上の放射性物質に内外部被ばくされた場合、それら染色体の異常や遺伝子に突然変異が生じ、遺伝的影響として子孫に引き継がれ、親とは違った形質が現れ、身体的または生理的な形質や機能に何等かの影響(継世代影響、遺伝的影響)を及ぼす可能性が高くなることが知られている。

2011年8月から福島第一原発の旧警戒区域内で殺処分されたウシから生殖器官を含めた生殖細胞と各臓器を採材し放射能濃度測定を行ってきた。その結果、臓器中放射性セシウム濃度は血中に比例し、横紋筋に最も高く甲状腺では極めて低いこと、胎子や子牛に親牛よりも高濃度で集積していることを明らかにした。特に、これまで実施してきた精子・卵子の体外操作に関する生殖工学技術を用いて、遺伝子を次世代へ引き継ぐオス牛生殖器官の組織学的解析と元素分布、生殖細胞および次世代への遺伝的影響を解析する研究を実施し、事故後300日程度では精原細胞、精母細胞および精子に著変がないことを明らかにした。

福島第一原発事故による放射性物質に長期間内外部被ばくしたウシにおいて、ただ安楽死処分するのではなく、その命を福島畜産の復興、食の安全性評価や人類の知見のために活用し、次世代にも渡りその影響を解析することは極めて重要な一つの課題である。しかし、大型畜産動物は、成長速度が遅いこと、飼育コストが高いこと、大規模な飼育スペースが必要なこと、また、必要な多くの個体数を確保するために非常に長い期間がかかることなどの問題点がある。

2. 研究の目的

(1) 福島第一原発の旧警戒区域内で6ヶ月から2年間、内外部被ばくした雄ウシにおける線量評価と継世代影響を明らかにし、未知の放射線被ばくに特異的なバイオマーカーを同定することを目的とする。

(2) 旧警戒区域内で2年間内外部被ばくした被災雄牛の精子を用いて、子牛を人工受精により産ませ、産まれた子牛の健康を評価するために血液の全代謝産物を網羅的に解析するメタボローム解析を実施した。

3. 研究の方法

(1) 被災牛の経世代影響評価

6ヶ月間被ばくした被災牛1、血統情報か

ら得られた父牛、2頭の子牛の3世代(グループ1)血統情報から得られた被災牛1の父方半兄弟牛・父牛・子牛および母牛(グループ2)、2年間内外部被ばくした被災牛2とその子牛および母牛(グループ3)の精子、筋肉あるいは血液からDNAを抽出した(図1)。DNAは、Sure Select Bovine All Exon Capture Sequence (Agilent Technologies)でタンパク質をコーディングする1-29番とX染色体の全エクソン領域を濃縮し、スニップとインデル(挿入・欠損部位)の頻度と位置を次世代シーケンサーを用いて解析した。



図1 継世代影響解析に用いた牛群とDNAの概要

(2) 被災雄牛由来の1頭の雄子牛は、農学部村松牧場で平成27年8月に生まれ、平成28年9月に血液を採取した。対照に用いた同年齢の1頭の子牛の血液は、新潟県内の和牛農家から採血した。採血した血液は、抗凝固剤であるEDTAにて凝固反応を抑制し、速やかに遠心分離し、血球成分を沈殿させた上清を用いた。メタボローム解析は、Human Metabolome Technologies (HMT)社のキャピラリー電気泳動装置(capillary electrophoresis: CE)を飛行時間型質量分析装置(time-of-flight mass spectrometry: TOFMS)に接続した分析装置を用いて、糖・アミノ酸・核酸・脂質などの代謝を構成するエネルギー代謝を解析した。

4. 研究成果

(1) 放射性物質の核種別に見た生殖器官および臓器沈着の解析:

表1は、6ヶ月間被ばくした被災牛1、2年間内外部被ばくした被災牛2および子牛の生殖器官あるいは臓器における放射性Csの濃度を示している。その結果、放射性セシウムは生殖器官を含む全臓器で検出されたこと、検出された放射性物質の中で、Cs137はCs137と放射能濃度はほぼ等しいことが認められた。さらに、産子の筋肉中の放射性物質の線量は検出限界以下であった。

表 1. 生殖器官あるいは臓器における放射性 Cs の濃度

Cattle	Organ	¹³⁷ Cs	¹³⁴ Cs	
No.1 (6 M)	Longissimus thoracis muscle	288±7	284±8	
	Tensor fasciae late muscle	370±6	356±7	
	Thoracic diaphragm	205±4	195±5	
	Liver	181±5	171±6	
	Kidney	259±7	251±8	
	Lung	173±6	164±7	
	Spleen	210±6	218±7	
	Blood	16±1	12±1	
	Testis	213±6	195±8	
	No.2 (2 Y)	Longissimus thoracis muscle	524±5	518±6
Tensor fasciae late muscle		567±5	573±8	
Masseter muscle		698±4	684±6	
Thoracic diaphragm		533±6	542±8	
Liver		276±2	283±3	
Kidney		575±5	561±6	
Lung		295±4	283±6	
Spleen		396±4	381±6	
Heart		473±4	491±5	
Tongue		689±6	684±5	
Glandula submandibularis	Glandula submandibularis	557±6	559±8	
	Eye	115±1	111±1	
	Skin	114±1	114±1	
	Urinary bladder	380±4	365±5	
	Testis	450±5	448±4	
	Calif 1	Tensor fasciae late muscle	Limit of Detection (LOD)	LOD
	Calif 2	Tensor fasciae late muscle	LOD	LOD
	Calif 3	Tensor fasciae late muscle	LOD	LOD
	Calif 4	Tensor fasciae late muscle	LOD	LOD

ターゲットエクソン領域のリード数とデプス数:

表 2. 次世代シーケンサーによるリード数とデプス数

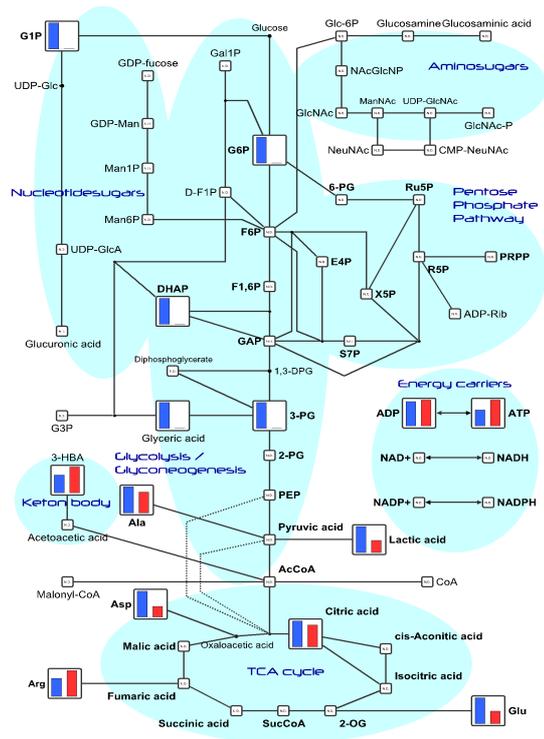
Chromosome	UMD3.1 (bp)	Target regions No. of exons	Sequences (bp)	Fold coverages (X)														
				Father (Sperm)	Father (Muscle)	Bull 1 (Sperm)	Bull 1 (Muscle)	Calif 1 (M)	Calif 2 (F)	Brother (Muscle)	Mother 1 (Blood)	Calif 4 (F)	Bull 2 (Muscle)	Mother 2 (Blood)	Calif 3 (F)			
1	158,337,067	10,818	2,417,418	58.1	68.3	54.0	62.0	39.2	49.0	61.9	43.9	75.9	54.9	52.9	69.3			
2	137,060,424	11,382	2,697,722	55.3	65.5	51.6	61.5	41.0	53.2	59.0	41.8	69.2	52.3	49.7	65.0			
3	121,420,405	12,035	2,847,194	52.7	62.9	48.8	59.7	43.6	58.7	55.6	39.9	66.5	49.6	46.6	59.8			
4	120,829,699	8,668	1,984,615	55.1	65.6	51.1	59.5	39.1	49.6	58.6	41.6	72.2	52.0	49.8	66.3			
5	121,191,424	11,791	2,738,898	50.4	61.1	46.8	58.0	42.7	56.6	53.4	38.0	63.5	47.5	44.7	57.5			
6	119,458,738	7,678	1,696,536	61.6	71.0	56.4	63.1	37.6	44.6	64.9	45.8	80.2	57.4	55.7	71.9			
7	112,638,659	11,078	2,761,262	49.9	54.4	40.7	53.1	43.7	59.7	45.8	39.1	52.9	41.3	37.7	47.0			
8	113,384,836	8,088	1,884,205	53.5	63.6	49.4	59.3	42.3	56.2	56.4	40.4	67.8	50.4	47.3	61.1			
9	105,708,250	6,593	1,484,878	58.2	68.6	54.0	61.9	38.3	47.3	62.0	44.1	76.6	55.2	53.0	70.4			
10	104,305,016	10,088	2,377,412	54.1	64.7	50.3	60.9	42.1	55.6	57.3	41.2	71.1	51.2	48.5	65.3			
11	107,310,763	10,732	2,510,731	46.3	56.4	43.2	54.1	41.1	55.0	48.8	35.0	57.7	43.8	40.9	52.3			
12	91,163,125	5,152	1,154,362	58.5	68.4	54.7	62.5	39.9	49.7	61.9	44.0	75.6	55.4	52.8	69.5			
13	84,240,350	7,870	1,840,703	44.6	55.2	41.3	53.6	44.1	61.0	46.8	33.7	53.8	42.0	38.4	48.0			
14	84,648,390	5,464	1,291,609	52.6	63.0	48.9	58.2	39.8	50.7	55.8	39.9	67.2	49.8	47.3	61.4			
15	85,296,676	7,363	1,745,700	52.0	62.3	48.1	58.5	44.1	59.4	54.6	39.4	63.9	49.4	46.0	57.6			
16	81,724,887	7,538	1,757,252	46.4	56.5	43.0	54.1	41.7	55.9	48.7	35.0	57.1	43.8	40.6	51.5			
17	75,158,596	6,687	1,557,432	46.0	55.7	41.8	53.4	42.0	55.4	47.4	33.3	54.6	42.3	38.5	48.8			
18	66,004,023	9,421	2,429,283	37.4	48.2	34.6	49.0	44.6	63.3	38.7	28.1	42.5	35.1	31.2	37.0			
19	64,057,467	11,054	2,744,472	38.7	49.2	36.0	51.3	46.2	65.5	40.1	28.9	44.4	36.2	32.2	39.4			
20	72,042,655	4,648	1,012,035	57.5	67.8	53.9	61.4	38.7	48.0	61.3	43.6	74.9	54.6	52.6	68.8			
21	71,599,096	5,678	1,380,383	46.5	57.2	43.1	54.5	42.6	57.4	48.9	35.2	57.2	44.0	40.4	51.2			
22	61,435,874	6,387	1,568,712	41.5	52.0	38.5	51.8	43.9	61.9	43.4	31.3	50.7	39.0	35.5	45.7			
23	52,530,062	5,367	1,331,855	44.5	54.8	41.3	54.8	46.1	65.1	46.4	33.3	52.3	41.9	37.7	45.9			
24	62,714,930	4,013	900,548	52.7	62.7	49.1	58.5	41.9	54.9	55.8	39.8	65.8	49.9	46.7	59.6			
25	42,904,170	6,553	1,686,507	34.7	44.9	32.3	46.5	43.2	61.3	35.8	25.9	38.1	32.6	28.5	33.4			
26	51,681,464	4,722	1,065,018	50.4	61.1	46.8	57.7	42.2	56.7	53.2	37.9	63.7	47.6	44.5	57.7			
27	45,407,902	2,757	624,208	54.4	64.8	50.8	60.3	41.3	53.3	57.9	41.2	70.0	51.8	49.1	63.5			
28	46,312,546	3,732	867,065	51.8	61.8	47.9	59.3	43.3	59.1	54.7	39.2	65.4	48.7	45.5	59.7			
29	51,505,224	5,168	1,284,693	38.9	49.5	36.0	49.3	43.1	59.6	40.4	29.1	44.4	36.6	32.9	39.8			
X	148,832,899	6,898	1,755,701	31.0	36.7	28.8	34.0	34.9	60.6	32.3	44.6	39.6	28.9	52.1	66.1			
Total	2,660,906,405	225,414	93,329,376	48.5	58.7	45.1	55.9	41.7	56.6	51.1	37.3	60.6	45.8	43.6	56.8			

53M base の塩基をリシーケンスし、約 22.5 万箇所のエクソン領域に対し、カバレッジの各個体の平均デプスは 37-60×リードでき、質・量ともに解析する十分なデータを習得できた (表 2)。

DNA濃縮技術によるエクソン領域解析により、放射線影響関連候補遺伝子を抽出した結果、NLRP9, RPGR, SRPX, REPS2, TLR8, SETD8, BMX やOR2AK2, PLA2G2D3遺伝子への変異が、異なるグループの子牛に共通して認められた。それら遺伝子の機能は、卵成熟、微小管、細胞接着、前立腺癌抑制、免疫、リシンメチルトランスフェラーゼ、チロシキナーゼ、臭レセプター、加水分解酵素に関連する遺伝子であり、生命の維持に重要な役割を果たす遺伝子への変異は認められなかった。

(2) 被災牛精子由来産子の血漿メタボローム解析

ウシ血漿2検体についてCE-TOFMSによるメタボローム解析を行った。HMT代謝物質ライブラリおよびknown-unknownライブラリに登録された物質のm/zおよびMTの値から104ピークに差が認められた。検出されたピークの代謝物質にもとづいて解糖系/糖新生、ペントースリン酸経路、クエン酸回路、尿素回路、プリン・ピリミジン代謝、補酵素代謝および各種アミノ酸代謝経路に分類した。その結果、対照の子牛と比較して被災牛由来子牛のATPが1.6倍の割合で高い値が検出された。一方、被災牛由来子牛の解糖系におけるG1P、G6P、3-PG、乳酸の生成割合は、対照の子牛と比較して低い値を示した。TCAサイクルにおけるクエン酸、アスパラギン酸、グルタミン酸の比は、両者間で差が認められなかった。



以上、旧警戒区域内で6ヶ月および2年間の内外部被ばくした被災雄牛の子牛において、放射線に関連した継世代影響は認められなかった。本研究を遂行したことによる成果は、第一次産業である畜産業、特に福島県産優良種雄牛を用いた産子の食の安全性評価に貢献することとどまらず、7年が経過しても畜産業が再開されていない地域の復興に活用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Takino S, Yamashiro H, Sugano Y, Fujishima Y, Nakata A, Kasai K, Urushihara Y, Suzuki M, Shinoda S, Miura T, Fukumoto M. Analysis of the effect of chronic and low-dose radiation exposure on spermatogenic cells of male large Japanese field mice (*Apodemus speciosus*) after the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident. *Radiation Research*, 査読有, 187, 2017, 161-168.
DOI: 10.1667/RR14234.1.

山城秀昭, 高橋秀和, 藤 晋一, 漆原佑介, 桑原義和, 鈴木正敏, 阿部靖之, 杉村智史, 福田智一, 木野康志, 磯貝恵美子, 福本 学. 被災雄牛における継世代影響評価. 無菌生物誌, 査読無, 46, 2016, 22-23.

Yamashiro H, Abe Y, Hayashi G, Urushihara Y, Kuwahara Y, Suzuki M, Kobayashi J, Kino Y, Fukuda T, Tong B, Takino S, Sugano Y, Sugimura S, Yamada T, Isogai E, Fukumoto M. Electron probe X-ray microanalysis of boar and inobuta testes after the Fukushima accident. 査読有, *Journal of Radiation Research*, 56, , 2015, S1, i42-47.
DOI: 10.1093/jrr/trv070.

〔学会発表〕(計6件)

Yamashiro H, Fukumoto M. Transgenerational effects on calf spermatogenesis and metabolome associated with paternal exposure to radiation after the Fukushima Nuclear Power Plant accident. Special Symposium, 2017 International Symposium on Morphological Sciences. Oral, The Fourth Military Medical University, Xi'an, China, 26-30 July, 2017.

大平拓也, 伊藤 洵, 菅原淳史, 山城秀昭, 中田章史, 鈴木正敏, 有吉健太郎, 葛西宏介, 篠田 壽, 三浦富智, 福本 学. 電子線マイクロアナライザによる被災アカネズミ精巢の元素分析. 日本放射線影響学会第59回大会. JMS アステールプラザ広島. 2016年10月26日~28日.

大平拓也, 伊藤 洵, 藤嶋洋平, 山城秀昭,

中田章史, 鈴木正敏, 有吉健太郎, 葛西宏介, 篠田 壽, 三浦富智, 福本 学. 被災アカネズミにおける精巢のEPMA分析. 第3回福島原発事故による周辺生物への影響に関する専門研究会. 京都大学原子炉実験所. 2016年8月3日~4日.

山城秀昭, 高橋秀和, 藤 晋一, 漆原佑介, 桑原義和, 鈴木正敏, 阿部靖之, 杉村智史, 福田智一, 木野康志, 磯貝恵美子, 福本 学. 被災雄牛における継世代影響評価. 第49回無菌生物ノートバイオロジー学会「福島原発事故のその後 再生を目指して」仙台ガーデンパレス. 2016年1月29日~30日.

山城秀昭. 被災雄牛における継世代影響評価の試み. 第2回福島原発事故による周辺生物への影響に関する専門研究会. 京都大学原子炉実験所. 2015年8月10日~11日.

Yamashiro H, Tong B, Takino S, Sugano Y, Tanaka S, Nishikawa T, Yoshida C, Abe Y, Hayashi G, Urushihara Y, Kuwahara Y, Suzuki M, Takahashi H, Fuji S, Isogai E, Fukumoto M. Effects of radiation exposure on transgenerational inheritance in bulls after the Fukushima Nuclear Power Plant accident. 15th International Congress of Radiation Research (ICRR). Kyoto International conference Centre, Kyoto, Japan, 25-29 May, 2015.

〔図書〕(計1件)

山城秀昭, 瀧野祥生, 菅野有晃, 漆原佑介, 鈴木正敏, 桑原義和, 阿部靖之, 小林 仁, 福田智一, 木野康志, 篠田 壽, 磯貝 恵美子, 福本 学. 被災家畜における生殖器官と機能影響の評価. 京都大学原子炉実験所レポート (KURRI Report), 2015, pp78-81.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山城 秀昭 (YAMASHIRO Hideaki)
新潟大学・自然科学系・助教
研究者番号: 60612710

(2) 研究分担者

杉村 智史 (SUGIMURA Satoshi)
東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・
特任准教授
研究者番号: 00728454