

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：30108

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K00587

研究課題名(和文)福島第一原発事故後のアカネズミの継世代影響評価と評価系の開発

研究課題名(英文) Trial to analysis of transgenerational effect for the large Japanese field mice after the Fukushima Daiichi nuclear power plant accident.

研究代表者

中田 章史(Nakata, Akifumi)

北海道科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：70415420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：放射線における生殖巣の影響を解析するために、放射性物質汚染地域に生息するアカネズミ(2n=48型)と染色体異常を考慮した染色体数の異なるアカネズミ(2n=48型、2n=46型、交雑型(2n=47型))の生殖巣の評価を行った。アカネズミの精巣・卵巣の組織学的・形態学的変化の動態から繁殖周期を明らかにしたが、放射線によって繁殖周期が変化するかは不明である。一方、急性照射または慢性被ばくを想定した低線量率照射したマウスの生殖腺における遺伝子発現の変化を網羅的に調べた。その結果、発現量が変化した遺伝子の中には受精に関わる遺伝子の発現の変化が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射性物質汚染地域に生息するアカネズミは慢性的な被ばくを受けているため、継世代の影響を考える上で有用なモデルである。しかしながら、アカネズミの生殖機能に関する知見はほぼ蓄積されていないため、放射線影響評価が困難となっている。実験動物における生殖技術を基盤とした手法をアカネズミに適用し、ラボマウスと比較することで、ラボとフィールドの違いを検証が可能となると考えている。野生動物における放射線の影響評価系の構築が可能となった場合、生態系に対する影響、環境保全の手助けとなり、被災住民の帰還の判断材料となることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：To analyze the effects of radiation on the gonads, we assessed the gonads of the large Japanese field mice with different chromosome numbers considering chromosomal abnormalities (2n=48 type, 2n=46 type, and hybrid (2n=47 type)) and 2n=48 type mice inhabiting radiation in contaminated areas. The reproductive cycle was clarified from the analysis of histological and morphological changes in the testis and ovary of the large Japanese field mice, but it is unclear whether the reproductive cycle is affected by radiation. On the other hand, we applied gene expression analysis using microarrays to the evaluation of the gonads of laboratory mice exposed to acute and chronic low-dose γ -irradiation. Gene expression profiling showed that genes associated with fertilization are changed.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 生殖腺 生物影響 減数分裂 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

福島県の放射性物質汚染地域では除染及び復興活動により空間線量が低下しているものの除染が困難とされる森林地帯については対象外となっていることから、森林地帯に生息する野生動物は依然として低線量放射線の長期被ばくを受けている。そのため、放射性物質汚染地域の野生動物における遺伝的影響、特に継世代的影響が懸念される。しかしながら、空間線量が低下した現在の状況下では捕獲したアカネズミのみを解析しただけでは放射線の影響で自然淘汰される個体の影響は明らかにできない。したがって、実験系による科学的根拠による評価も必要不可欠である。現在、アカネズミの後代を作出する技術は未だ確立されていないことが、リファレンス動物としてのアカネズミを用いた放射線影響評価や継世代影響評価が制限されている要因である。

2. 研究の目的

本研究は、放射線汚染地域、非汚染地域、染色体異常モデルのアカネズミの生殖細胞形成過程を明らかにし、アカネズミを用いた放射線影響評価や継世代影響評価法の開発を試みる。加えて、放射線照射したラボマウスの生殖腺における網羅的遺伝子発現解析を施行し、生殖細胞における放射線影響の基盤データを構築する。

3. 研究の方法

・試料調整

福島県内の空間線量の異なる複数の地点、対照地域として青森県および新潟県、染色体異常モデル個体を長野県でアカネズミを捕獲し、生殖腺を採取した。繁殖期に捕獲した雄アカネズミは、精巣上体尾部から精子を採取し、液体窒素中にて保存した。さらに、放射線の生殖細胞に対する遺伝的影響を解析するためにラボマウスに対して急性照射または慢性被ばくを想定した低線量率照射を行なった。急性照射群は、7日齢のマウスに対して4 Gyを照射したのち、通常の飼育環境で飼育を継続し、35日齢に精巣を摘出した。慢性照射群は、1週齢時から母マウスと共に、4週間で総線量4 Gyになるよう照射を行い、35日齢に精巣を摘出した。

・精母細胞における減数分裂の染色体観察

アカネズミおよびマウスから摘出した精巣は精細管を裸出し PBS 中に放置する。細胞懸濁液から遠心分離によって細胞を回収する。回収した細胞に0.075M KClを加えて低調処理を行う。低張処理終了後、細胞懸濁液にメタノール：酢酸=3：1固定液を加えて固定を行う。固定した細胞懸濁液はメタノール：酢酸=3：1固定液を用いて洗浄し、細胞浮遊液とした。細胞浮遊液から染色体標本を作成し、光学顕微鏡にて観察を行い、減数分裂を評価した。

・アカネズミの生殖腺の組織学的観察

ブアン液で固定された繁殖期の生殖腺は、固定後、エタノール系列で脱水、透徹した。パラフィン包埋した標本は、ミクロトームを用いて切片化した。パラフィン切片は、脱パラフィン後、エタノール系列で親水化した。その後、Hematoxylin Eosin (HE) 染色し、生殖腺における生殖細胞を観察した。また、免疫組織学的に精巣における減数分裂を評価するために、REC8およびSCP3の精母細胞中の分布を観察した。OCTコンパウンドにて凍結保存したサンプルを、-20℃まで上げた後、ミクロトームを用いて切片を作成した。切片に対して抗REC8抗体、抗SCP3抗体を反応させ、対比染色としてDAPIを用いて共焦点顕微鏡にて観察した。

・アカネズミの卵子の採取と体外受精(IVF)、体外発生(IVC)方法の検討

卵子の採取のための過排卵誘起処理は、抗インヒピン血清とeCG(ウマ絨毛性ゴナドトロピン)の混合物であるIASeを用いた。IASeを雌アカネズミの腹腔内投与した48時間後にhCG(ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン)を腹腔内投与し、卵管膨大部より採卵を行った。採取した卵と精子を37℃インキュベーター内で媒精した。

・マウスの精巣における遺伝子発現の網羅的解析

ラボにおける評価系を確立するためにマウスに放射線を照射し、被ばく後の生殖細胞形成機構を明らかにする。生殖器官について病理解析、減数分裂の正常性、生殖腺における遺伝子の網羅的解析に関しては外部委託した。

4. 研究成果

・精母細胞における減数分裂の染色体観察

生殖細胞の染色体観察には、細胞分裂のステージや標本作成時の条件により染色体の形態の識別が困難である。ラボマウスの精巣を用いて染色体標本作成のための条件検討および減数分裂におけるステージ分類を行った。ラボマウスの分類を基準にして、アカネズミの減数分裂時のステージ分類を行うことができた。しかしながら、染色体異常モデルでは3価染色体の識別が困難であった。また、減数分裂の染色体像から放射線の影響を評価することが困難であるため、アカネズミのセントロメアに特異的な配列を利用することで生物線量評価が容易になることが予想される。今後はアカネズミのセントロメアに特異的な配列の探索を行う予定である。

・アカネズミの生殖腺の組織学的観察

アカネズミにおいて、生殖工学技術は確立されていないため、実験動物で確立している方法論が適用できない。そのため、アカネズミから効率よく生殖細胞を得ることを目的として、精巣・卵巣の組織学的・形態学的変化の動態を把握するために組織標本の解析を行った。その結果、雄アカネズミの精子形成周期、雌アカネズミにおいては卵胞の形態から非繁殖期および繁殖期の区別を明らかにし、さらに繁殖期の各期を細別した。加えて、アカネズミの精巣における HE 染色の結果、対象地域および染色体異常モデルにおいて精原細胞、精母細胞、円形精子細胞、精子が認められたことから、染色体異常モデルにおいて精子形成が正常であることが判明した。また、減数分裂時に発現する SCP3、REC8 の分布を解析したところ、一次精母細胞に SCP3、一次精母細胞から二次精母細胞にかけて REC8 の局在が確認された。このことから、染色体異常モデルでも正常に減数分裂が生じていることが示された。今後、放射線汚染地域のアカネズミに対しても同様の解析を行うことで、放射線による影響評価が可能となると考えている。

・アカネズミの卵子の採取と体外受精（IVF）体外発生（IVC）方法の検討

アカネズミから効率的に卵細胞を採取法の検討を行い、繁殖期における過排卵誘起剤の投与条件を決定し、効率的に卵を得ることが確認できた。採卵した卵子に IVF を施した結果、繁殖期および非繁殖期に採卵した卵子は、新鮮精子および凍結精子を用いた IVF においても 2-4 細胞期胚まで発生することが示された。しかしながら、初期発生の進行にはさらなる IVC 培地の検討が必要である。

・マウスの精巣における遺伝子発現の網羅的解析

35 日齢マウスの精巣から抽出した total RNA を株式会社 DNA チップ研究所へ送り、マイクロアレイ解析による遺伝子発現の変化を網羅的に調べた。2 倍以上発現量が変化した遺伝子を放射線により変化する遺伝子の候補とした。その結果、急性照射によって約 25,000 個の遺伝子発現が変化した（発現が増加する遺伝子 約 14,000 個、減少する遺伝子 約 11,000 個）。一方、低線量率照射では約 5,000 個の遺伝子発現が変化した（発現が増加する遺伝子 約 3,000 個、減少する遺伝子 約 2,000 個）。これら候補遺伝子の中には受精に関わる遺伝子における発現の変化が示唆された。そこで、マウスの受精に関わる遺伝子の 1 つである *Izumo1* 遺伝子を増幅するためのプライマーを数種類作成し、アカネズミに対して適用可能かどうか検討したところ、いくつかのプライマーで増幅が確認された。今後、アカネズミでも遺伝子発現解析が可能となれば、生殖細胞における新たな評価指標にもなりうると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Meguro Kanna, Komatsu Kazuki, Ohdaira Takuya, Nakagata Naomi, Nakata Akifumi, Fukumoto Manabu, Miura Tomisato, Yamashiro Hideaki	4. 巻 54
2. 論文標題 Induction of superovulation using inhibin antiserum and competence of embryo development in wild large Japanese field mice (<i>Apodemus speciosus</i>)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reproduction in Domestic Animals	6. 最初と最後の頁 1637 ~ 1642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/rda.13573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ito Jun, Meguro Kanna, Komatsu Kazuki, Ohdaira Takuya, Shoji Rina, Yamada Takahisa, Sugimura Satoshi, Fujishima Yohei, Nakata Akifumi, Fukumoto Manabu, Miura Tomisato, Yamashiro Hideaki	4. 巻 214
2. 論文標題 Seasonal changes in the spermatogenesis of the large Japanese field mice (<i>Apodemus speciosus</i>) controlled by proliferation and apoptosis of germ cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Reproduction Science	6. 最初と最後の頁 106288 ~ 106288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anireprosci.2020.106288	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohdaira Takuya, Meguro Kanna, Komatsu Kazuki, Syoji Rina, Fujishima Yohei, Swee Ting Goh Valerie, Kasai Kosuke, Ariyoshi Kentaro, Nakata Akifumi, Urushihara Yusuke, Koarai Kazuma, Kino Yasushi, Sekine Tsutomu, Suzuki Masatoshi, Takahashi Atsushi, Shimizu Yoshinaka, Shinoda H, Yoshida MA, Fukumoto M, Yamashiro H, Miura T	4. 巻 1
2. 論文標題 Analysis of Radioactive Elements in Testes of Large Japanese Field Mice Using an Electron Probe Micro-Analyser after the Fukushima Accident	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ionizing and Non-ionizing Radiation	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5772/intechopen.84634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ariyoshi Kentaro, Miura Tomisato, Kasai Kosuke, Akifumi Nakata, Fujishima Yohei, Yoshida Mitsuaki A.	4. 巻 57
2. 論文標題 Radiation-induced bystander effect in large Japanese field mouse (<i>Apodemus speciosus</i>) embryonic cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Radiation and Environmental Biophysics	6. 最初と最後の頁 223 ~ 231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00411-018-0743-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 4. Kitaya T, Maeda T, Yasui H, Mizukawa H, Inanami O, Nakata A, Miura T, Hosokawa Y, Kuwabara M	4. 巻 6
2. 論文標題 Attempts of radiation dose measurement in the teeth of mice living around the nuclear power plant in Fukushima using electron spin resonance spectroscopy.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Radiation Environment and Medicine	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 目黒菜奈、小松一樹、近能真優、坂美幸、藤嶋洋平、中潟直己、中田章史、三浦富智、山城秀昭
2. 発表標題 野生アカネズミのIVFC技術を用いた染色体数の異なる生殖能の評価
3. 学会等名 第60回日本卵子学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有吉健太郎、三浦富智、葛西宏介、中田章史、藤嶋洋平、Goh VST、吉田光明
2. 発表標題 Radiation-induced bystander effect in large Japanese field mouse (<i>Apodemus speciosus</i>) embryonic cells.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小松一樹、目黒菜奈、近能真優、坂美幸、中田章史、三浦富智、山城秀昭
2. 発表標題 野生雌アカネズミの繁殖周期に伴うカレンダー遺伝子の発現動態
3. 学会等名 第67回北信越畜産学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujishima Y, Miura T, Ariyoshi K, Nakata A, Tazoe H, Kasai K, Valerie GST, Toyoda T, Yamada M, Yoshida MA
2. 発表標題 Distribution of radioactive-caesium and cytogetic analysis of raccoon (Procyon lotor) in Namie town, Fukushima
3. 学会等名 4th. Educational Symposium on Radiation and Health by young scientists. (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 有吉健太郎、三浦富智、中田章史、葛西宏介、藤嶋洋平、鈴木享純、吉田光明
2. 発表標題 放射性物質汚染地域に生息するアカネズミ骨髄前駆細胞への放射線影響解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第60回大会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 藤嶋洋平、三浦富智、有吉健太郎、中田章史、田副博文、葛西宏介、Valerie Goh Swee Ting、豊田正、山田正俊、吉田光明
2. 発表標題 放射線汚染地域に生息するアライグマにおける放射性セシウムの臓器分布と細胞遺伝学的解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第60回大会
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	三浦 富智 (Miura Tomisato) (20261456)	弘前大学・被ばく医療総合研究所・教授 (11101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	葛西 宏介 (Kasai Kousuke) (50400148)	弘前大学・保健学研究科・講師 (11101)	
連携研究者	有吉 健太郎 (Arisyohi Kentaro) (50462750)	福島県立医科大学・総合科学教育研究センター・准教授 (21601)	
連携研究者	山城 秀昭 (Yamashiro Hideaki) (60612710)	新潟大学・農学部・准教授 (13101)	
連携研究者	篠田 壽 (Shinoda Hisashi) (80014025)	東北大学・歯学研究科・名誉教授 (11301)	