

平成22年 6月15日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19510063
 研究課題名（和文） モデル実験生態系を用いた放射線と化学物質の環境影響の比較評価
 研究課題名（英文） Comparative evaluation of environmental effects between ionizing radiation and chemicals using an experimental ecosystem model
 研究代表者
 府馬 正一（FUMA SHOICHI）
 独立行政法人 放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・チームリーダー
 研究者番号：40260236

研究成果の概要（和文）：8種類の微生物から構成されるモデル実験生態系において、水圏微生物群集では従来知られていなかった各種間接影響を明らかにし、放射線による間接影響の多様性を示した。また、培養時期によって放射線感受性が異なることを示した。これらは、環境の放射線防護体系高度化に資する成果である。さらに、系全体に対する放射線と各種化学物質の影響用量を算出したが、これは化学物質を基準にして放射線の環境リスク認知を容易にすることに貢献する成果である。

研究成果の概要（英文）：Acute γ -irradiation experiment was carried out in an experimental ecosystem model consisting of eight taxa of aquatic microorganisms. Various indirect effects due to interspecies interactions, some of which had not been known in aquatic microbial community, were detected. It was also demonstrated that radiosensitivity was different with cultural stage. These results will contribute to improvement of current frameworks for radiation protection of the environments. Effect doses of γ -rays and various chemicals were evaluated for the entire system. This result will contribute to a better understanding of environmental risks of ionizing radiation compared with chemicals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：環境防護、放射線、化学物質、モデル実験生態系、間接影響、生物間相互作用

1. 研究開始当初の背景

従来、放射線の防護体系は人間を対象としたものであって、環境（人間以外の生物種お

よびその集合体である生態系）は対象とされていなかった。国際放射線防護委員会（ICRP）も1990年勧告までは「人間を防護していれ

「ば他の生物種を危険に陥れることはない。」という立場をとっていた。しかし、近年になって、環境問題全般に対する公衆の関心が高まるとともに、放射線防護や環境放射能の専門家の中で、従来の枠組みでは環境の放射線防護が不十分な場合があり得ることが指摘されるようになった。その結果、環境の放射線防護体系を構築することが国際原子力機関 (IAEA)、国連科学委員会 (UNSCEAR)、ICRP などの国際機関の重要な検討課題となった。このような国際的動向を受け、諸外国では放射線の環境影響に関する研究が行われるようになったが、日本での研究例は限られていた。

環境は放射線だけでなく、人間活動に伴う様々な有害因子に曝露されている。従って、放射線と他の有害因子の環境影響を比較評価することが重要である。例えば、火力発電に伴って放出される窒素酸化物や硫黄酸化物と放射線の環境影響を比較評価すれば、エネルギー源の選択に役立つと考えられた。また、放射線は公衆にとって必ずしも身近な存在ではないので、より身近な化学物質 (例: 水俣病の原因物質であるメチル水銀) と環境影響を比較することで、公衆による放射線の理解が深まると考えられた。

放射線の環境影響評価法としては、環境中の代表的な生物種 (レファレンス動植物) を選定し、その生物種の線量-影響関係を調べる手法 (単一生物種試験) が ICRP などによって提唱されていた。しかし、一方で、環境は多様な生物種から構成され、それらの中には複雑な相互作用が存在する。従って、環境影響を評価する際には、個々の生物種に対する直接影響を評価するだけでは不十分で、生物種間相互作用を介した間接影響も考慮して系全体に対する影響を評価する必要があるとの主張も根強く存在していた。放射線と比べて環境影響評価法の体系化が進んでいる化学物質でも同様の議論が存在していた。

そこで、我々はモデル実験生態系 (マイクロコズム) を用いて環境影響を研究することにした。マイクロコズムとは制御環境条件下で複数の生物種、すなわち生物群集を培養または飼育した系で、実際の環境における物理的、化学的、生物的要素と、それら間の相互作用を包含した実験系である。我々は、1996 年より、研究の第一段階として、総合地球環境学研究所の川端善一郎教授らが開発した水圏微生物マイクロコズム (川端マイクロコズム) を用いて研究を行った。この実験生態系は、生産者、消費者、分解者各 1 種類の微生物から構成される単純な系であるが、一定の成果を得ることができた。

しかし、川端マイクロコズムは、水圏微生物生態系の基本的な相互作用を有しているとはいえ、構成生物種が単細胞生物に限定さ

れ、その種数も最低限であり、評価できる間接影響も単純なものに限られていた。そこで、本研究では、これらの点を改善するため東北大学の故・栗原康名誉教授らにより開発された、より複雑なマイクロコズム (栗原マイクロコズム) を導入し、放射線の影響を調べ、化学物質の影響と比較評価することにした。

2. 研究の目的

本研究では、栗原マイクロコズムに様々な線量の γ 線を照射し、構成生物種の個体数に与える影響を調べ、以下の3点を明らかにする予定であった。

(1) 放射線による間接影響の多様性

川端マイクロコズムは、各栄養段階に 1 種類の生物しか存在しないため、捕食・被食関係など栄養段階間の相互作用による間接影響しか観察できなかった。これに対し、栗原マイクロコズムは、各栄養段階に複数の生物種 (互いに競争関係にある場合が多い) が存在するため、種間競争に伴う間接影響も観察できる可能性が高く、実際の環境における間接影響の多様性を示すことができると考えられた。

(2) 成長段階による環境影響の違い

日本を含む温帯地域では四季が明確で、季節によって環境の様相は大きく異なり、それにより放射線の影響も異なることが考えられた。そこで、成長期 (春に相当) と安定期 (夏に相当) の栗原マイクロコズムにそれぞれ γ 線を照射する実験を行うことにより、成長段階の違いによって環境影響がどのように異なるのかを明らかにすることにした。

(3) 系全体に対する放射線と化学物質の影響用量の定量的な比較

栗原マイクロコズムにおいて、適当な指数を用いて系全体に対する影響を数値化し、生物個体における LD_{50} と同様の考え方で、この指数を 50% に減少させる放射線と化学物質の用量 (マイクロコズム 50% 影響用量) を求めることにした。

3. 研究の方法

栗原マイクロコズムは、福島大学理工学群の稲森悠平教授より分譲いただいた。このマイクロコズムは、以下の微生物から構成されている。

・生産者 3 種

Chlorella sp. (緑藻)

Scenedesmus sp. (緑藻)

Tolypothrix sp. (藍藻)

・消費者 4 種

Aeolosoma hemprichi (貧毛類)

Lecane sp. (輪虫)

Philodina sp. (輪虫)

Cyclidium glaucoma (繊毛虫)

・分解者 4 種以上 (細菌)

Pseudomonas putida

Acinetobacter sp.

Bacillus cereus

Colyneform bacteria など

培地は、Taub の無機栄養塩培地にポリペプトンを加えたものである。培養方法などについては、稲森教授ならびに国立環境研究所の田中伸幸博士に指導いただいた。

成長期である培養開始1日目と定期である培養開始16日目の栗原マイクロコズムに、それぞれ⁶⁰Co γ 線を0(対照)、100、500、1000、5000 Gy 急照射し、各構成生物種の個体数を160日余にわたって測定した。細菌は、PY培地を用いた平板混釈法でコロニー数を測定した。糸状藻類である *Tolypothrix* sp. は、超音波処理で断片化させた後、顕微鏡下で長さを測定した。その他の生物種については、顕微鏡下で直接その数を数えた。このように得られた個体数データに、マイクロコズム毒性評価試験で一般的に用いられている PRC (Principal response curve) 法を適用し、群集全体についての影響指数 (C_{dt} : Canonical coefficient) を算出した。この計算は、放射線医学総合研究所の土居主尚研究員と川口勇生研究員に協力いただいた。

放射線と化学物質の影響の比較は、当初 C_{dt} を用いる予定であったが、検討の結果、不適当であることが判明した。そこで、研究代表者が以前に提案した、対照と有害因子を負荷したマイクロコズムの間で各構成生物種の個体数の差を求め、その総和をユークリッド距離で表し時間積分したマイクロコズム影響指数を用いて、放射線と化学物質のマイクロコズム 50% 影響用量を求めた。なお、化学物質に関しては、既存の実験データを用いて算出した。

また、栗原マイクロコズムには細菌が少なくとも4種類存在していることが培養法により確認されていたが、この他に培養不能な細菌種も存在していると考えられ、栗原マイクロコズムは知られている以上に多様な細菌種から構成されている可能性があった。従って、 γ 線によって細菌の総細胞数は影響を受けない場合でも、その種構成が影響を受ける可能性があったので、成長期に γ 線を照射後1日目と14日目に、細菌の種構成を調べた。その手法としては、培養不能な細菌も検出可能な分子生物学的手法である変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE 法) を用いた。ターゲットは16S rRNA 遺伝子をとし、各 DGGE バンドの塩基配列を決定することにより、細菌の系統的帰属分類を推定した。この実験に関しては、放射線医学総合研究所の石井伸昌主任研究員に協力いただいた。

さらに、染色体レベルの影響と群集レベルの影響を、将来結びつけるための試行実験として、マイクロコズム中の *A. hemprichi* の

染色体を解析し、放射線による染色体異常の誘発頻度を調べることを試みた。マイクロコズムより *A. hemprichi* を単離、固定後 (エタノール: 氷酢酸=3:1)、ウクライナ Institute of Biology of the Southern Seas に発送し、Dr. Victoria Tsytsugina と Prof. Gennady Polikarpov に染色体異常の解析を依頼した。

4. 研究成果

(1) 結果

① 成長期に γ 線を照射した場合の個体数変動 (図1)

対照マイクロコズムでは、培養開始後速やかに構成生物種の増加が見られたが、15日目までには、ほぼ増殖が停止し、定常状態となった。

100 Gy では、全ての消費者が対照よりも減少したが、*Tolypothrix* sp. は増加した。その他の構成生物種に影響は見られなかった。

500 Gy では、緑藻類の増殖が長期にわたって阻害されたが、やがて対照レベルまで増殖した。*Lecane* sp. は対照よりも減少した。細菌は、照射直後に一時的に大きく減少した後、増殖したが、対照より細胞数が少ない状態が続いた。その後、細菌数は対照レベルまで回復した。*Tolypothrix* sp. は対照よりも増加した。その他の生物には影響は見られなかった。

1000 Gy では、*Scenedesmus* sp. と *A. hemprichi* が死滅した。*Chlorella* sp. の増殖は長期にわたって阻害されたが、やがて対照レベルまで増殖した。*Lecane* sp. は、一時的に増殖が抑制されたが、その後は増殖し、対照よりも増加した。細菌は、照射直後に一時的に大きく減少した後は影響が見られなかった。*Tolypothrix* sp. と *C. glaucoma* は対照よりも増加した。

5000 Gy では、*Scenedesmus* sp. と全ての消費者が死滅し、*Chlorella* sp. の増殖が阻害された。細菌は、照射直後に一時的に大きく減少した後、増殖したが、その細胞数は対照よりも少ないままであった。*Tolypothrix* sp. は対照よりも増加した。

PRC 解析の結果、群集全体としては、100 Gy では無影響、500 Gy では一時的に個体数が対照より少ない状態となった後に完全回復、1000 Gy では一時的に個体数が対照より少ない状態となった後ある程度回復、5000 Gy では個体数が対照より少ない状態となったまま回復しない、という線量依存的な影響を受けたことが判明した。

② 定期に γ 線を照射した場合の個体数変動

実験期間中、対照マイクロコズムでは構成生物種の個体数は、ほぼ一定で安定していた。

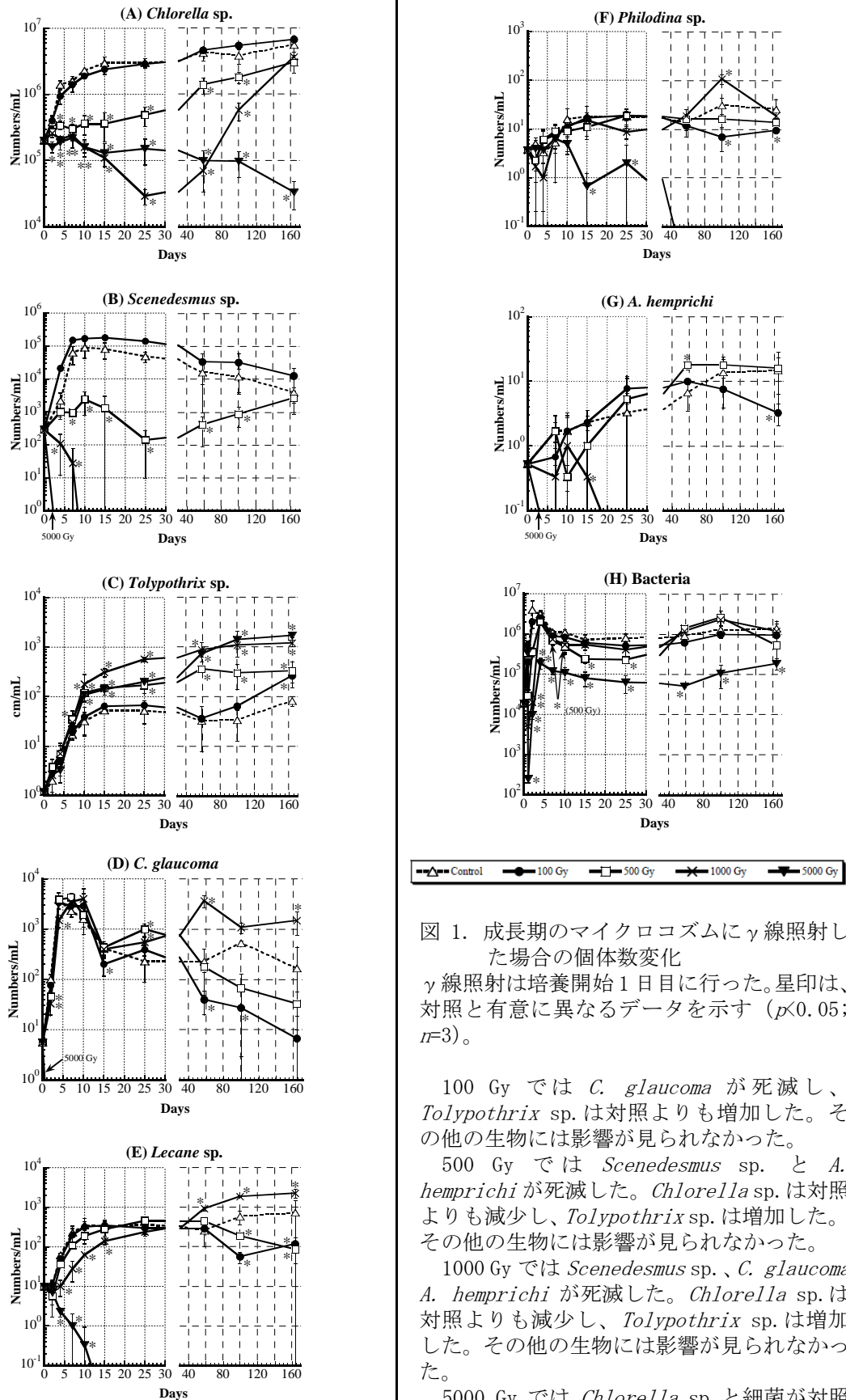


図 1. 成長期のマイクロコズムに γ 線照射した場合の個体数変化
 γ 線照射は培養開始1日目に行った。星印は、対照と有意に異なるデータを示す ($p < 0.05$; $n=3$)。

100 Gy では *C. glaucoma* が死滅し、*Tolypothrix sp.* は対照よりも増加した。その他の生物には影響が見られなかった。

500 Gy では *Scenedesmus sp.* と *A. hemprichi* が死滅した。*Chlorella sp.* は対照よりも減少し、*Tolypothrix sp.* は増加した。その他の生物には影響が見られなかった。

1000 Gy では *Scenedesmus sp.*、*C. glaucoma*、*A. hemprichi* が死滅した。*Chlorella sp.* は対照よりも減少し、*Tolypothrix sp.* は増加した。その他の生物には影響が見られなかった。

5000 Gy では *Chlorella sp.* と細菌が対照よりも減少し、*Tolypothrix sp.* は増加した。

それ以外の生物種は全て死滅した。

PRC 解析の結果、群集全体としては、100 Gy では無影響、500 Gy では一時的に個体数が対照より少ない状態となった後に完全回復、1000 Gy と 5000 Gy では個体数が対照より少ない状態となったまま回復しない、という線量依存的な影響を受けたことが判明した。

③ 放射線と化学物質の影響の比較

成長期のマイクロコズム 50%影響用量は、 γ 線が 2000 Gy、銅が 0.57 ppm、2,4,5-T (除草剤) が 49 ppm と算出された。

安定期のマイクロコズム 50%影響用量は、 γ 線が 5600 Gy、ベンチオカーブ (除草剤) が 6.7 ppm、LAS (直鎖アルキルベンゼンスルホン酸塩; 合成界面活性剤) が 6.1 ppm と算出された。

④ 細菌群集構造と γ 線の影響

DGGE 解析の結果、主要な DNA バンド 7 種類が検出された。原理的には、各バンドは 1 種類の原核生物 (細菌と藍藻) に由来するので、栗原マイクロコズムは、少なくとも 7 種類の原核生物から構成されていることが判明した。5 種類のバンドの塩基配列を決定したところ、*B. cereus*、*Pseudomonas saccharophila*、*Luteibacter rhizovicinus* または *Dyella yejuensis*、*Tolypothrix* sp.、*Leptothrix ginsengisoli* または *Rubrivivax gelatinosus* と系統的に最も近いことが判明した。従って、マイクロコズム構成原核生物として従来知られていた *B. cereus*、*P. putida*、*Tolypothrix* sp. については、その存在が DGGE 法でも確認できたと考えられる。

対照マイクロコズムの DGGE バンドパターンは、培養開始 2 日目と 15 日目とは違いがあった。例えば、*P. saccharophila* と *L. rhizovicinus* または *D. yejuensis* は 2 日目には存在していたが、15 日目には存在していなかった。逆に、*L. ginsengisoli* または *R. gelatinosus* は 15 日目には存在していたが、2 日目には存在していなかった。従って、マイクロコズムの細菌群集構造は、培養時期によって変化すると考えられる。

γ 線の影響については、以下が検出できた。15 日目の *B. cereus* の場合、500 Gy では存在が認められず、その他の全ての線量では対照よりも存在量が少なかった。2 日目の *P. saccharophila* の場合、100 Gy では対照よりも存在量が少なく、500 Gy 以上では存在が認められなかった。15 日目の *Tolypothrix* sp. の場合、全ての線量で対照よりも存在量が多く、顕微鏡による直接測定の結果と一致した。15 日目の *L. ginsengisoli* または *R. gelatinosus* については、500 Gy 以上で存在が認められなかった。

⑤ *A. hemprichi* の染色体異常

Dr. Tsytsugina より、送付した *A. hemprichi* の染色体が小さく、分裂している細胞も少ないので、染色体異常の検出は困難との回答があった。このため、解析を断念した。

(2) 考察

① 放射線による間接影響の多様性

本研究で観察された放射線影響は、概ね線量依存的であったが、一部の影響は線量依存的ではなく、個体数の増加も見られた。それらの影響は、水圏微生物群集では従来知られていなかった、各栄養段階における種間競争に起因する間接影響や、生産者・消費者間の捕食・被食関係に起因する間接影響と考えられた。以下に、その例を示す。

生産者については、成長期と安定期に γ 線照射した場合のいずれも 100-5000 Gy で *Tolypothrix* sp. が増加した。このうち、500-5000 Gy の増加については、以下の三つのメカニズムが考えられた。i) 同じ生産者である *Chlorella* sp. と *Scenedesmus* sp. が放射線によって死滅または減少した、あるいは、その増殖が抑制されたため、これらの緑藻類が利用するはずだった光、二酸化炭素、無機塩類などを *Tolypothrix* sp. が余分に利用できるようになった。ii) 共存する他の生物種が放射線によって死滅あるいは減少したため、その遺体から発生した二酸化炭素や無機塩類などを *Tolypothrix* sp. が余分に利用できるようになった。iii) *Tolypothrix* sp. を捕食する *A. hemprichi* が放射線によって死滅したため、捕食圧が低下した。

消費者については、成長期に 1000 Gy 照射した場合、*Lecane* sp. と *C. glaucoma* が対照よりも増加した。このメカニズムとしては、同じ消費者であり、エサである *Chlorella* sp. と細菌をめぐって競争関係にある *A. hemprichi* が放射線によって死滅したためと考えられる。

分解者に関しては、成長期に γ 線照射した場合、500 Gy では照射直後に細菌が一時的に大きく減少した後、培養開始 7 日目から 25 日目にかけて細菌数が対照よりも少ない状態が続いた。これに対し、1000 Gy では照射直後に細菌が一時的に大きく減少した以外、影響は見られなかった。このメカニズムとしては、培養開始 25 日目までの時点で、細菌を捕食している *Lecane* sp. と *A. hemprichi* が、1000 Gy では増殖が抑制または死滅したのに対し、500 Gy では影響を受けなかった結果として、1000 Gy の方が捕食圧が低かったことが考えられる。また、成長期に γ 線照射した場合、培養開始 15 日目において、500 Gy では *B. cereus* の存在が認められなかったのに対し、100 Gy および 1000 Gy 以上では存在

が認められた。線量に依存しない、この500 Gyでの影響も何らかの間接影響と考えられるが、そのメカニズムは不明である。

②培養時期による影響の違い

成長期のマイクロコズムに γ 線照射した場合、100 Gyと500 Gyでは死滅した生物種はなく、1000 Gyでも2種が死滅しただけだった。これに対し、安定期のマイクロコズムに γ 線を照射した場合には、100 Gyでは1種が、500 Gyでは2種が、1000 Gyでは3種が、それぞれ死滅した。従って、このマイクロコズムは、成長期（春を想定）と比べて安定期（夏を想定）では回復力が低く、放射線の影響を受けやすいと考えられる。従って、放射線の環境影響を評価する際には季節による違いも考慮すべきと考えられる。

(3) 結論

本研究では、水圏微生物群集では従来知られていなかった、各栄養段階における種間競争に起因する間接影響や、生産者・消費者間の捕食・被食関係に起因する間接影響を検出するなど、放射線による間接影響が多様であることを示した。従って、環境影響を評価する際には、生物間相互作用を介した間接影響を考慮すべきであることが示唆された。また、培養時期によりマイクロコズムの放射線感受性には違いが見られたので、放射線の環境影響を評価する際には季節による違いも考慮すべきことが示唆された。以上の点は、環境の放射線防護のための手段としてICRPが現在提唱しているレファレンス動植物アプローチでは抜け落ちており、今後防護体系を高度化する際には盛り込む必要があると考えられる。そのため、国際放射生態学連合(IUR)のタスクグループ「環境防護への生態系アプローチ(Ecosystem approach to environment protection)」などで本研究の成果を紹介することにより(研究代表者はタスクグループメンバー)、環境の放射線防護体系高度化に貢献できるものと考えられる。

本研究では、マイクロコズムに対する γ 線、金属、農薬、洗剤の影響用量を求めたが、放射線と他の有害因子の影響を、間接影響を含めて定量的に比較評価した例は他にないので、本研究の結果は、様々な化学物質を基準として放射線の環境リスク認知を容易にすることに貢献すると考えられる。

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3件)

- ① Shoichi Fuma, 他7名: Effects of acute γ -irradiation on community structure

of the aquatic microbial microcosm, *Journal of Environmental Radioactivity*, 査読有, in press

- ② Shoichi Fuma, 他9名: Effects of acute γ -irradiation on the aquatic microbial microcosm in comparison with chemicals, *Journal of Environmental Radioactivity*, 査読有, Vol. 100, 2009, 1027-1033
- ③ Shoichi Fuma, 他9名: Effects of acute gamma-irradiation on the aquatic microbial microcosm in comparison with chemicals, The International Conference on Radioecology & Environmental Radioactivity 15-20 June, 2008 in Bergen, Norway: Proceedings Oral and Oral Poster Presentations, Part 2, 査読無, 2008, 465-468

[学会発表] (計4件)

- ① Shoichi Fuma, 他9名: Effects of acute gamma-irradiation on the aquatic microbial microcosm in comparison with chemicals, International Conference on Radioecology and Environmental Radioactivity, 2008年6月20日, Bergen (Norway)
- ② Satoshi Yoshida, 他10名, Shoichi Fuma, 他5名: Researches in National Institute of Radiological Sciences (NIRS) for radiation protection of non-human biota and ecosystems in Japanese environment, International Conference on Radioecology and Environmental Radioactivity, 2008年6月20日, Bergen (Norway)
- ③ 府馬正一, 他7名: モデル実験生態系を用いた放射線の環境影響評価、第9回環境放射能研究会、2008年3月27日、つくば市
- ④ 府馬正一, 他8名: γ 線の急照射が成長期のマイクロコズムに与える影響、日本放射線影響学会第50回大会、2007年11月15日、千葉市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

府馬 正一 (FUMA SHOICHI)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・チームリーダー

研究者番号: 40260236