

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12251

研究課題名(和文)メダカ胸腺を指標にした放射線複合影響の可視化と定量化

研究課題名(英文)Quantification of combined effects of radiation under continuous gamma-ray irradiation using medaka thymus.

研究代表者

丸山 耕一 (Maruyama, Kouichi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学研究所 計測・線量評価部・主幹研究員

研究者番号：70349033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、メダカ胸腺をターゲットにして、放射線+ の異なる複数のストレスをメダカに与え、胸腺萎縮の程度から、ストレス影響が現れる閾値を検証する事である。A) 概日リズム障害では、明暗サイクルを早める事で、胸腺萎縮を確認できた。また、明暗サイクル変化19日目に1-10GyのX線照射することで、通常よりも低い線量での放射線影響が確認された。B) 化学物質では、亜ヒ酸による胸腺萎縮を試みたが、亜致死濃度でのみ胸腺萎縮が観察された。C) 心因的要因では、メダカ(大)とメダカ(小)を同鉢に飼う事でメダカ(小)に胸腺萎縮のストレスを与える事が示され、X線の影響も低い線量で出る事が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにマウスの拘束モデル下での放射線影響との複合影響の仕事はあり、より低い線量で放射線影響が出る事が示されている。しかしながら魚類においては同様の研究は行われていない。今回、申請者が構築している胸腺可視化モデルを使い、放射線以外のストレスでもストレスを定量することが示され、また、ストレス下での放射線の影響を調べ、日照リズム障害下や心因的ストレス下では、より低い線量で放射線影響を与えることが示された。

研究成果の概要(英文)：We have established a novel biosystem for quantifying radiation effects in real-time using thymus-visualizing living medaka. By observing the thymus after a single X-ray exposure, we can observe and analyze the radiation effects and recovery in a dose-dependent manner (Maruyama et al., IJRB 2019).

Using this system, three different types of stress were confirmed to cause thymic atrophy in medaka. The thymic atrophy in medaka was significantly observed under circadian rhythm disorder and psychological stress. The chemical (NaAsO₂) did not atrophy the thymus compared with the other stresses. The threshold of the thymic atrophy was revealed at lower doses under the stress of the circadian rhythm disorders and psychogenic stress.

研究分野：放射線生物学

キーワード：メダカ 胸腺 放射線 複合影響

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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であり、放射線の照射後すぐに萎縮が観察される。また、胸腺は環境からの影響を受けやすい臓器でもあり、化学物質では、無機ヒ素(NaAsO_2)、ダイオキシン、PFOS、有機スズなどにより胸腺の萎縮が報告されている。また、化学物質による胸腺萎縮は化学物質の特異性がある事も知られている。さらに胸腺は心因的要因により萎縮が引き起こされることが知られ、人間社会では胸腺の萎縮が児童の虐待における指標の一つになっており、実験動物マウスの拘束実験からその再現モデルも確立されている。メダカ胸腺に対する放射線影響は、これまで 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た。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(Ghoneum M. et al., J Fac. Sci. Univ. Tokyo, 1979)。そこで、申請者は胸腺のみで GFP を発現するメダカ系統 cab-Tg(rag1-egfp)を用いて、X 線単発照射後の胸腺の萎縮、経時的な回復のデータを得た。放射線障害を定量するのに適したメダカは孵化後 1.5-2 カ月、X 線照射により影響の出るしきい値は 2-5Gy の間、照射後 7 日目には回復が見られるなどの基礎的なデータを収集し、リアルタイムに放射線影響を可視化、定量化出来るシステムの開発の内容で論文発表している(図 1)(Maruyama et al., IJRB 2019)。

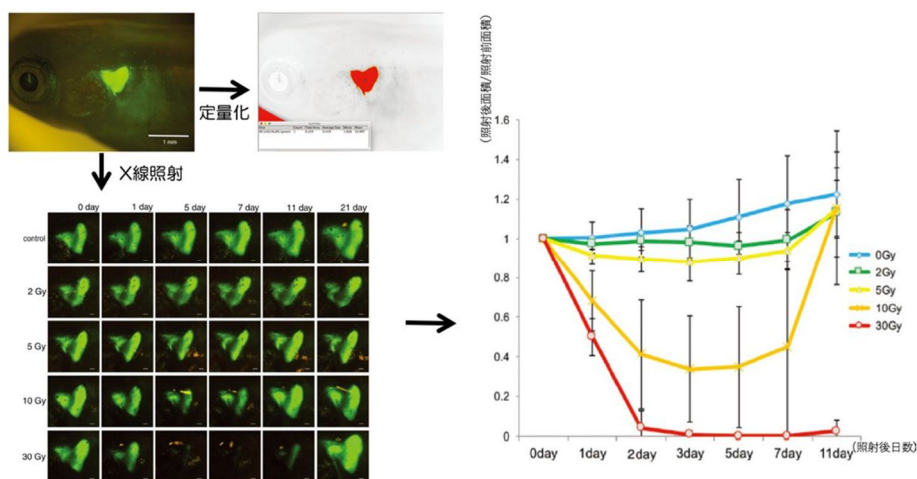


図1 胸腺可視化メダカを利用した放射線影響可視化、定量化システム

2. 研究の目的

胸腺は放射線をはじめ様々なストレスにより萎縮が引き起こされる臓器である。本研究課題は、胸腺が可視化された遺伝子改変メダカを用いて、胸腺の萎縮の程度を指標として、個体 1 匹が受けている放射線+ の複数のストレスによる影響を定量化し、評価するものである。これまで放射線(X 線)に関してはすでにしきい値などを解析済みである。それ以外のストレスとしては、(A)概日リズム障害、(B)化学物質(無機ヒ素 NaAsO_2)曝露、(C)心因的要因を想定している(図 2)。

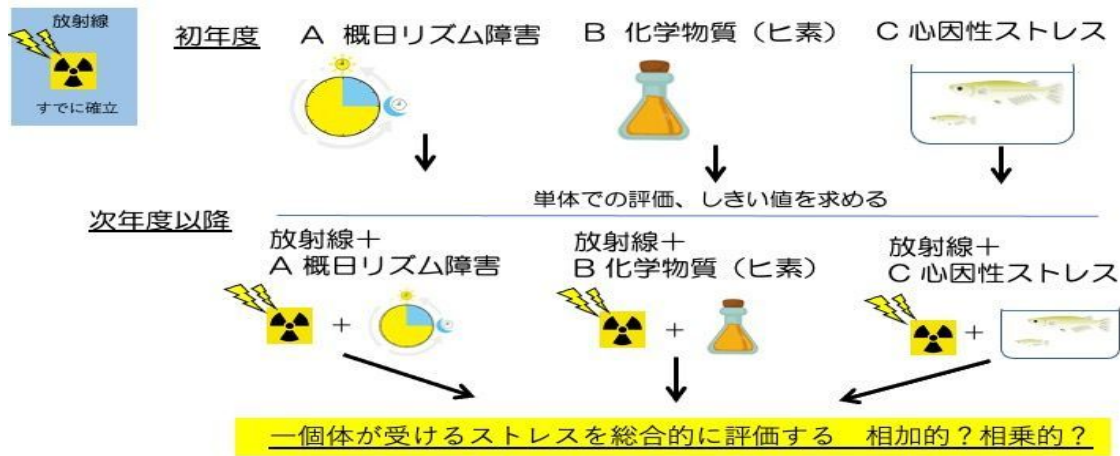


図2 研究計画模式図

3. 研究の方法

A) 概日リズム障害+放射線

地球上のほぼすべての生物に備わる体内時計は、「昼と夜」という地球の自転に伴う環境周期を予測し、これに先んじて身体の機能を適応させることで生体機能を維持する役割を担っている。マウスでは概日リズムを4日毎に日周サイクルを8時間前倒しにしていくことで、寿命の短縮が見られ、特に免疫機能の恒常性破綻による炎症の亢進を主要な病態として惹起することが示唆されている(Yagita et al 2017 Sleep and Biological Rhythms)。魚類でもこの概日リズムは存在しており、昼行性のメダカは日の出とともに活動し、暗くなると睡眠する事が知られている。そこで、マウスと同様に4日毎に日周サイクルを8時間前倒しにしていくことで概日リズム障害実験を行い、どの程度胸腺に影響が出るのかを調べる。さらにそこにX線を照射した時に、X線のみと比べ、どの程度影響が増大するかを定量、評価する。具体的には、1) 通常飼育群と、4日毎に8時間ずつ明暗時間を早める群とで胸腺の萎縮の度合いを比べる。2) その結果から、放射線を照射する時期を決定し、照射後、通常飼育の結果との比較を行う。

B) 化学物質(無機ヒ素)+放射線

胸腺は環境からの影響を受けやすく、多くの環境中に存在する化学物質が胸腺萎縮作用を持つことが知られている。胸腺萎縮作用をもつ化学物質の多くは免疫機能抑制作用を示すことが報告されている。無機ヒ素も胸腺萎縮の作用があり、マウスに垂ヒ酸 10mg/kg で投与後、1日目に約20%減、3日目に30%減のデータが国立環境研より報告されている。メダカへのヒ素の影響は1970年に笠井らにより調べられ、20ppmが限界致死濃度であるという報告がある(笠井, 1970)。これらのデータを元にして、メダカ胸腺に影響が現れるしきい値を調べる。その後、さらにX線を照射後、ヒ素のみと比較し、どの程度影響が増大するかを定量、評価する。

C) 心因性ストレス+放射線

胸腺萎縮は、様々な心因性ストレスでも引き起こされ、人間社会では児童虐待の指標の一つとしても使われている。和歌山県立医科大学近藤教授は児童虐待モデルとして、マウスを拘束ストレスにさらすことで、胸腺萎縮モデルを確立しているが、魚類のメダカを長時間拘束するのは技術的に難しい。一方、大きいメダカと小さいメダカを同鉢で飼育すると、小さいメダカの

成長が著しく遅延することは小型魚類研究者ではよく知られた現象であり、申請者はこの時にメダカは虐待と同等の心因性ストレスを感じていると推測している。放射線による胸腺萎縮システムのメダカは体長 10-15mm の若魚を使用するが、ここに 30mm 以上の成魚メダカを同じ鉢で同居させ、経時的に胸腺の変化を解析する。ストレス性の胸腺萎縮が観察された場合、ストレス下のメダカに X 線を照射し、どの程度影響が増大するかを定量、評価する。

4. 研究成果

A) 概日リズム障害+放射線

集団飼育をしている胸腺可視化メダカ(孵化後約 1.5 ヶ月齢)を 4 匹を個別に小タッパに入れ、一週間程度慣らした後、1)通常の明暗サイクルで飼育群、2)4 日毎に 8 時間ずつ明暗サイクルの 2 種の群で飼育し、経時ごとに胸腺を撮影し胸腺の大きさの比較した(図 3)。

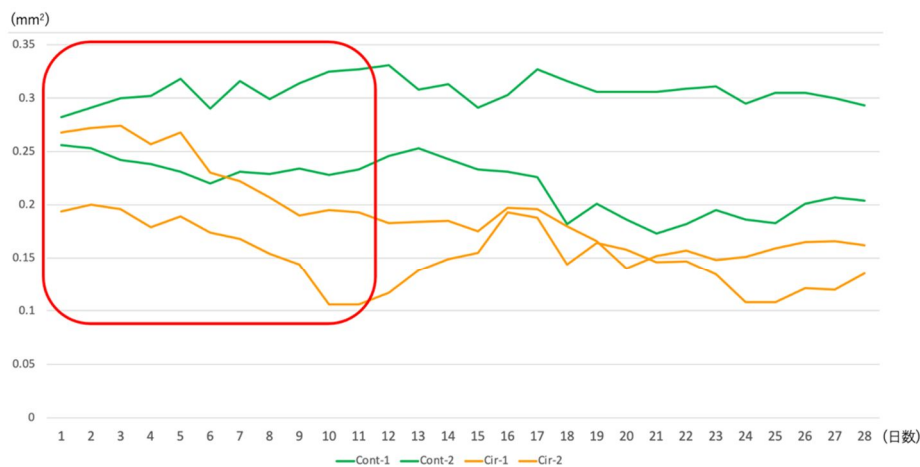


図3 日照時間を変化させた際の胸腺の変化

結果、コントロール群に比べ明暗サイクル変化群の方が胸腺の萎縮が大きいことが示された。また、実験開始後 2 週間後で穏やかな胸腺の回復も見られた。これは環境の変化に慣れてきたのではないかと推測された。次に同様に明暗サイクル 2 周後に、0-10Gy でメダカを照射し、その後の胸腺の変化を見た。結果、2 Gy や 1 Gy からでも胸腺の一時的な萎縮が観察された(図 4)。通常の明暗サイクル変化をしてない群では、この線量では胸腺の萎縮は検出されていないので、このことは明暗サイクルストレス下ではより低い線量で放射線影響が出ることを示しており、大変興味深い結果であった。今後、統計解析を加えることで詳しい結果を論文として発表したい。

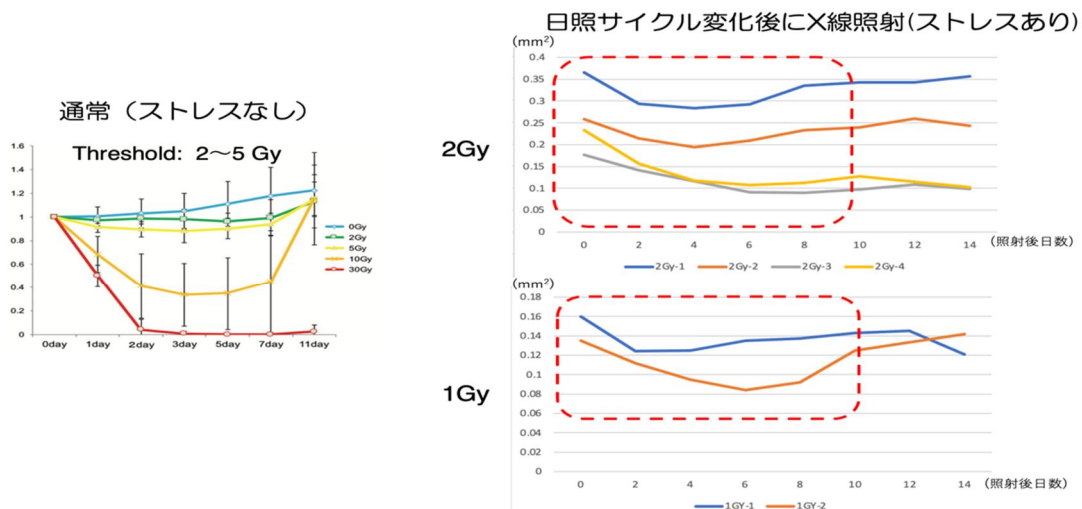


図4 日照時間変化後にX線照射の胸腺変化

B) 化学物質(無機ヒ素)+放射線

亜ヒ酸ナトリウム(富士フィルム・和光純薬)を購入し、飼育水に希釈したものにメダカを2時間暴露した後に、経時的に胸腺の萎縮を観察した。文献では20ppmが限界致死濃度と記載があったので、0,1,5,10ppmの濃度で暴露し、0,1,2,3,5,7,11日目に胸腺を撮影し解析した。しかし、有意な胸腺萎縮は確認されなかった。そこで、亜ヒ酸の濃度を上げ、50, 100, 500ppmの濃度で同様に実験を行った。すると、500ppmにのみに翌日から胸腺の萎縮が検出された(図5)。しかし、濃度500ppmでは明らかにメダカの運動量が減り、また暴露した2匹の内の1匹は翌日に死亡が確認された。ヒ素の毒性によるものと思われる。このことから、亜ヒ酸ナトリウムは胸腺萎縮を誘発するのは100~500ppmの間、ただ500ppmでは致死に至ることがあり、この実験系には再考、改良が必要であると結論づけ、他の2つの実験系を先行する事にした。

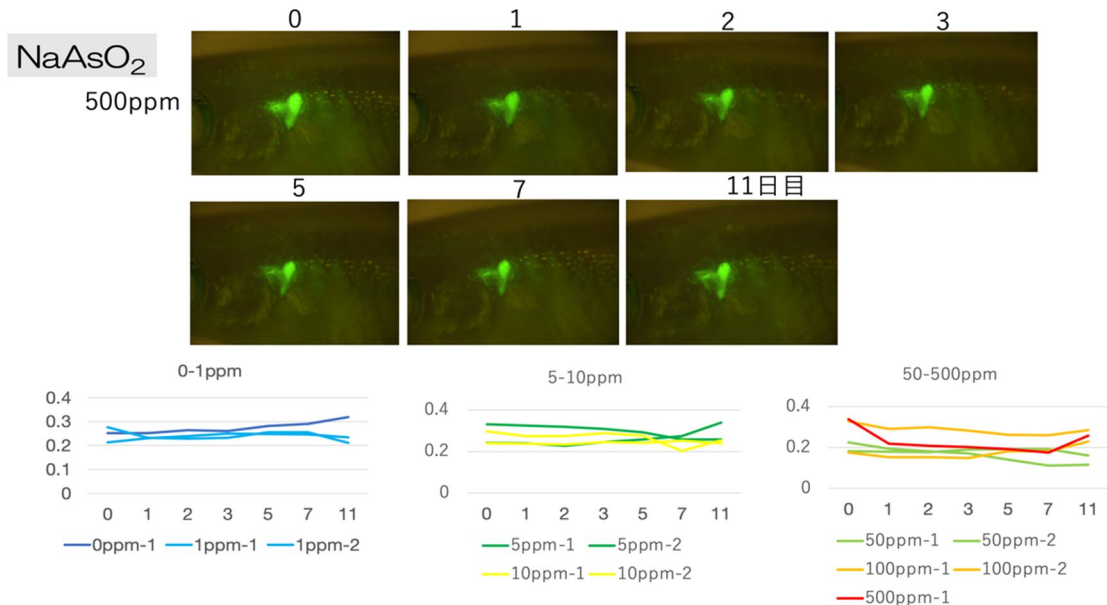


図5 亜ヒ酸暴露による胸腺の萎縮

C) 心因性ストレス+放射線

大きいメダカ(25-30mm)と小さいメダカ(15-20mm)を同じタッパで飼育し、小さいメダカがストレスを感じているのかを検証した(図6A)。結果、いずれのメダカ(小)でも胸腺が萎縮しているのが確認され、大変強いストレスを受けていることが推測された(図6B)。そこで、2週間同鉢で飼育後にX線を照射し、胸腺の萎縮を観察した。その結果、心因性ストレス下にあるメダカは1, 2Gyでも胸腺の萎縮が検出された。

今回、放射線以外の3種のストレスをメダカに与え、その影響を見た。いずれも胸腺萎縮は引き起こされたが、亜ヒ酸に関しては今後条件等の改良が必要であった。残りの2種に関しては十分な胸腺萎縮が検出されたので、X線照射を与えると通常検出されるよりも低い線量(1, 2Gy)で胸腺の萎縮を検出することができた。このことはストレスにより、放射線の感受性がより低くなることを意味しており大変興味深い。今後、サンプル数を増やして統計学的な解析を行った後、論文として発表したい。

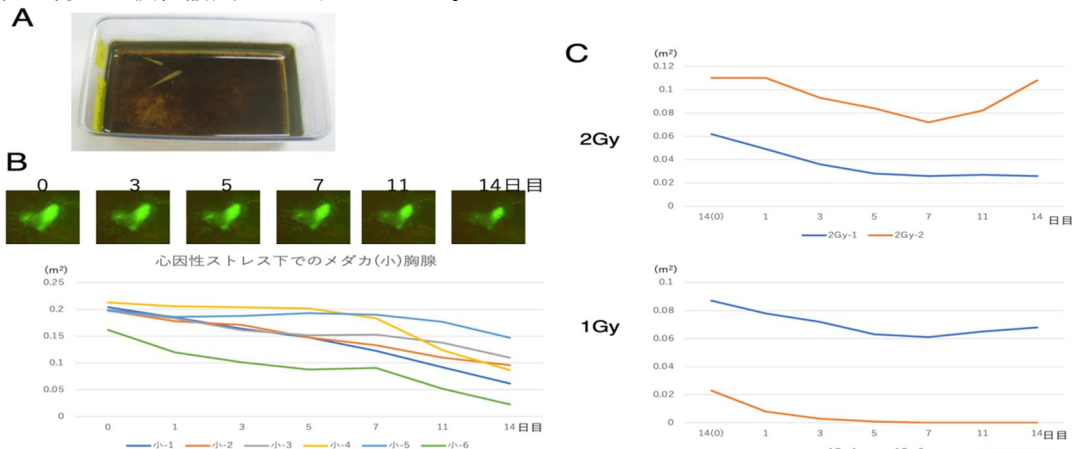


図6 心因性ストレス下での胸腺萎縮とX線照射後の胸腺変化

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kouichi Maruyama, Bing Wang, Yoshito Watanabe	4. 巻 -
2. 論文標題 Dose estimation to wild medaka around Fukushima Dai-ichi nuclear power plant.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Radiation Protection Dosimetry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/rpd/ncad140	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 Wang Bing, Katsube Takanori, Tanaka Kaoru, Ninomiya Yasuharu, Hirakawa Hirokazu, Cuihua Liu, Maruyama Kouichi, Guillaume Vares, Kito Seiji, Nakajima Tetsuo, Fujimori Akira, Neno Mitsuru	4. 巻 12(4)
2. 論文標題 Enhanced effects of chronic restraint-induced psychological stress on total body Fe-irradiation-induced hematopoietic toxicity in Trp53-heterozygous mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life12040565	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 該当する
1. 著者名 Wang Bing, Tanaka Kaoru, Maruyama Kouichi, Ninomiya Yasuharu, Katsube Takanori, Neno Mitsuru	4. 巻 46(10)
2. 論文標題 Induction of adaptive response in utero by ionizing radiation: A radiation quality dependent phenomenon.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BIOCELL	6. 最初と最後の頁 2315-2325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.32604/biocell.2022.021161	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 Wang Bing, Katsube Takanori, Tanaka Kaoru, Ninomiya Yasuharu, Hirakawa Hirokazu, Cuihua Liu, Maruyama Kouichi, Murakami Masahiro, Nakajima Tetsuo, Fujimori Akira, Neno Mitsuru	4. 巻 -
2. 論文標題 More efficient induction of genotoxicity by high-LET Fe-particle radiation than low-LET X-ray radiation at low doses.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Radiation Medicine and Protection	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.radmp.2022.12.001	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 Takanori Katsube , Bing Wang , Kaoru Tanaka , Yasuharu Ninomiya , Hirokazu Hirakawa , Cuihua Liu , Kouichi Maruyama , Guillaume Vares , Qiang Liu , Seiji Kito , Tetsuo Nakajima , Akira Fujimori , Mitsuru Nenoï	4. 巻 196(1)
2. 論文標題 Synergistic effects of chronic restraint-induced stress and low-dose 56Fe-particle irradiation on induction of chromosomal aberrations in Trp53-heterozygous mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 100-112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RADE-20-00218.1	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 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丸山耕一
2. 発表標題 Development of a biosystem for detecting the combined effects of radiation and other stress factors using medaka thymus.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸山耕一
2. 発表標題 メダカ胸腺を用いた放射線との複合影響定量システムの開発
3. 学会等名 日本放射線影響学会第 6 4 回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maruyama Kouichi
2. 発表標題 Establishment of a biosystem for quantification of the radiation effects and its combined effects of radiation with other factors.
3. 学会等名 The 29th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Maruyama Kouichi
2. 発表標題 Appearance of radiation-induced thymic atrophy at lower doses under the stress of changes in the circadian rhythm.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第66回大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究課題は、申請者の所属である量研の設備（小型魚類飼育システム、放射線照射システム）を利用したため設備費などに予算は使用していない。しかしながら、メダカの飼育、掛け合わせ、照射、撮影、データ解析などの人的な労働力が必要で、これについては令和3年度すぐに公募をしたが、令和4年2月まで全く候補者が現れず、これにより研究の遅滞があった。
最終年度の令和5年度に研究成果を海外の学会での発表を予定し、予算を確保しておいたが、昨今の想定外の円安により、大幅な予算超過が予想されたため、国内の研究会での発表(The 29th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2023)に切り替えた（口頭発表・英語）。

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関