

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25252035

研究課題名(和文) 長期間の低線量放射線被曝が魚類に及ぼす遺伝的影響に関する研究

研究課題名(英文) The genetic effect of long period expose of radioactive materials on fishes

研究代表者

中嶋 正道 (Nakajima, Masamichi)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：20192221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 27,400,000円

研究成果の概要(和文)：福島県内の阿武隈山地に生息するヤマメにおける放射線被曝の影響を調べた結果以下のことが明らかとなった。

1)ヤマメ筋肉中の<sup>137</sup>Cs濃度が高い個体ほど脾臓で範囲のメラノマクロファージが観察された。同様に鰓における形態異常も観察された。2)血液性状ではヘモグロビン濃度が低下する傾向が見られた。この現象は給餌実験でも観察された。3)真野川で採捕された雌親魚から得られた仔魚におけるmtDNAを調べたところ親魚とは異なる配列が観察された。福島内水試で継代飼育されている系統では観察されなかった。4)アポトーシスに関連する遺伝子の発現低下が観察された。

これらの現象には放射線被曝が影響していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The radioactive Cesium released by the accident of Fukushima Daiichi Nuclear Power Station distribute to Abukuma Mountains in Fukushima. The effects of expose of radiocesium on masu salmon were examined. Following results were obtained.

1) Positive correlation was observed between the concentration of <sup>137</sup>Cs in muscle and melanomacrophage in spleen. The histological deformities were also observed in gill. 2) the hemoglobin concentration decreased according to the increase of <sup>137</sup>Cs concentration in muscle. This phenomenon also observed in rearing experiment. 3) Point mutations were observed in mitochondria DNA in the offspring obtained from the females which were collected from Mano River. These were not observed in the offspring obtained from the female which was rearing in Fukushima Prefectural Inland Water experimental Station. 4) Decrease of expression level in the gene which affecting to the apoptosis was observed. These results are probably caused by exposition to radioactive materials.

研究分野：水産遺伝育種学

キーワード：放射性セシウム 血液性状 突然変異 ミトコンドリアDNA メラノマクロファージ クローン 雌性発生 福島第一原発事故

## 1. 研究開始当初の背景

平成 23 年(2011 年)3 月 11 日に発生した東北太平洋沖地震に伴う東京電力福島第一原子力発電所事故により多くの放射性物質が海洋をはじめ山林などの自然環境中に放出された。河川は山林に降下した放射性物質が濃縮されるところであり、このような環境に生息する淡水魚は放射性物質の影響を受けやすい環境に生息していると言える。これまでに魚類における放射性物質汚染の状況は食品としての安全性の観点から調べられてきたが魚類そのものに対する影響、特に遺伝的影響に関する研究は行われていなかった。そのため、低線量の放射線を長期間被曝させたとき遺伝子や臓器組織、血液性状、環境適応能力にどのような影響を及ぼすかを明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

低線量放射線の長期間被曝が与える影響を明らかにすることを目的とし、以下の事項について明らかにした。

血液性状における影響

DNA 塩基配列における影響

環境適応能力に対する影響

臓器組織に及ぼす影響

遺伝子発現に対する影響

## 3. 研究の方法

### (1) 血液性状における影響

福島県内の阿武隈川、真野川、請戸川の三河川よりヤマメを採集し血液性状を調べ、筋肉中の<sup>137</sup>Cs濃度の関連を調べた。コントロールとして宮城県仙台市の広瀬川のヤマメを用いた。調べた血液性状は赤血球数(RBC)、ヘモグロビン濃度(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC)の6形質である。分析方法として重回帰分析と主成分分析を用いた。また、飼育実験として福島内水試で作成された1+のクローンヤマメ30尾を用いた。コントロールと処理区に各15尾ずつ分け、餌として<sup>137</sup>Csを50,000Bq/kgに調整したマス育成用餌料を3g/kg/day与え、150L水槽、水温15で2015年10月から130日間飼育を行った。血液性状は

野生集団と同様の項目を調べた。

### (2) DNA 塩基配列における影響

本研究では2014年真野川で採集された親魚2尾(M5、M6)より得られた仔魚と福島内水試で継代飼育されている親魚2尾(FP9、FP23)より得られた仔魚を用いた。真野川で採集された親魚で筋肉中の総Cs量は632Bq/kgと211Bq/kgであった。福島内水試で継代飼育されていた親魚では検出限界以下であった。塩基配列の比較は母系遺伝するミトコンドリア(Mt)DNAのCytbとD-Loopの2領域において行った。

### (3) 環境適応能力に対する影響

環境適応能力に対する影響を調べるためにギンブナを用いた。ギンブナは三倍体で雌性発生するために、得られる仔魚は全て同じ遺伝子型の雌親のクローンとなる。岡山県児島湖に生息していたギンブナ親魚から人工授精によって得られた一腹仔の飼育稚魚を供試魚とした。150L容量のガラス製水槽で、上面濾過による循環濾過飼育を行った。飼育水温を23とし、4つ設けた飼育水槽に75尾ずつ収容した。低線量放射線被曝実験は、3つの実験区(餌料中の<sup>137</sup>Cs:100,1000,10000Bq/kg)を設け、各線量に調製した配合飼料を給餌した。さらに、<sup>137</sup>Csを調製していない配合飼料を与えた対照区を設けた。高温耐性実験は、0.25、0.5、1、1.5および2.25年後に行った。

高温耐性実験には保温性の高い20L容量のプラスチック製容器を用い、この中に金属製の網籠を沈めた。この網籠に、実験区別に供試魚を5尾ずつ収容した。サーモスタットと石英ヒーターを用いて水温を上昇させ、36において供試魚が死亡するまでの生存時間を記録した。なお、鰓蓋開閉運動が無く、突くなどの刺激に対して無反応であった場合に死亡と判定した。

### (4) 臓器組織に及ぼす影響

請戸川、真野川、阿武隈川、対照区として宮城県広瀬川においてヤマメを採集し、現場において脾臓と鰓を摘出しブアン固定した。4 $\mu$ mの組織切片を作成しHE染色を行った。

メラノマクロファージ凝集(MMCs)の定量では50倍で画像(2.7 $\times$ 3.7mm<sup>2</sup>)を取得し、画像解析ソフトImageJを用いてMMCsの組織片に占

める面積の割合を測定した。鰓における組織傷害の定量では一次鰓弁 10 本を無作為に選択し、二次鰓弁および鰓弁間組織を 600 倍で観察した。鰓傷害として、二次鰓弁上皮細胞増加(LEP)、鰓弁間細胞増加(FEP)、鰓弁結合(LF)、鰓弁上皮剥離(Lif)、脈瘤(An)、鰓弁間浮腫(Ede)を計数し、その出現頻度を調べた。

#### (5) 遺伝子発現に対する影響

放射線被曝区のサンプルとして 2014 年 6、7 月福島県請戸川で採集されたヤマメを、コントロール区として宮城県広瀬川で採集したヤマメ各 3 尾を供試魚として用いた。脾臓から RNA を抽出し、個体毎に cDNA ライブラリを作製し HiSeq2000 で 100bp ペアエンド法によるシーケンス解析を行った。請戸川、広瀬川それぞれ 1 個体のリードデータをプールし *De novo* アセンブリによりリファレンスを構築した。TMM 正規化後、フィッシャーの正確確率検定により、放射線被曝区とコントロール区の比較で  $FDR < 0.05$  である遺伝子を発現変動遺伝子(DEGs)としてスクリーニングした。これらの中から 11 の遺伝子を選択し、RNA-seq と同一の個体を用いリアルタイム PCR により発現量を定量し、放射線被曝区とコントロール区とで比較を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 血液性状に及ぼす影響

#### 河川に生息するヤマメにおける影響

2014年より阿武隈川、真野川、請戸川の三河川よりヤマメを採集し血液性状を調べ、筋肉中の<sup>137</sup>Cs濃度の関連を調べた。コントロールとして宮城県広瀬川よりヤマメを採集した。重回帰分析を用い各血液性状と<sup>137</sup>Csとの回帰を調べた。MCVが正の、MCHとMCHCが負の有意な回帰を示した。このことは筋肉中の<sup>137</sup>Cs濃度の増加に伴い赤血球の容積が増加するものの、色素量が増加していないことを意味する。

#### 飼育実験での影響

血液性状のいずれの項目も飼育実験開始時と比べ130日目の値は低下していた。130日目の血液性状をコントロールと処理区で比較した結果、RBC、HCT、MCVがコントロールと比べ処理区で有

意に低下していた。MCHとMCHCでは低下する傾向はみられたものの有意差は観察されなかった。野生個体で観察されたMCVの増加は観察されなかった。

### (2) 塩基配列に及ぼす影響

塩基配列を調べた結果、野生個のCytb領域において3カ所で4種類の変異が観察され、D-loop領域では2カ所において変異が観察された。FP9とFP23で変異は観察されなかった。Cytb領域で観察された変異のなかでアミノ酸置換を生じる変異は一組だけであった。この変異も通常のヤマメ集団に観察されている変異(ハプロタイプ)であった。突然変異率はCytb領域で $4.9 \times 10^{-6} \sim 3.1 \times 10^{-5}$ 、D-loop領域で $1.8 \times 10^{-5}$ とD-loop領域の方がやや高い値であった。

野生個体でのみ変異が観察されたことは放射線被曝がDNAの塩基配列に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

### (3) 環境適応能力に対する影響

高温耐性実験の結果、被曝期間とともに高温耐性が変化し、0.5年後、1年後および1.5年後では低線量被曝区において対照区よりも有意に耐性が低下した。また、2.25年後では、10000Bq区において期間を通じて高温耐性が最も低下し、放射線被曝の影響が認められた。

### (4) 臓器組織に及ぼす影響

脾臓におけるMMCs定量的結果、広瀬川と比べ請戸川ではMMCsが増加していた。MMCsの組織に占める割合は筋肉中のCs-137濃度の対数値に対して正の相関を示した。鰓傷害において、LEP、FEP、LFおよびAnの出現頻度が請戸川では広瀬川に対して増加していた。一方でEdおよびLifにおいては明確な変化は見られなかった。真野川、阿武隈川ではいずれの傷害においても明確な変化は見られなかった。

### (5) 遺伝子発現に及ぼす影響

*de novo*アセンブリの結果136,705のコンティグが得られた。請戸川では524の遺伝子が発現上昇、1043遺伝子が発現低下していた。これら発現量が変動していると判断された遺伝子の中から放射線被曝との関連が報告されている11遺伝子を選択し、定量PCRに用いた。定量PCRの結果11遺伝子中8遺伝子がRNA-seqの結果と高い相関

を示し、2群間の差の比較では5遺伝子で有意差が見られた。これら5遺伝子のうちCaspase10、BMF2など2遺伝子がアポトーシスに関連する遺伝子であった。これら2遺伝子は請戸川で発現量の低下が観察され、アポトーシスが抑制されていることが示唆された。

#### 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12件)

Yamaguchi, K., Y. Otomo, J. Kaniwa, K. Umezawa, K. Dairiki and M. Nakajima, Genetic relationships and variability of Ayu (*Plecoglossus altivelis*) population

migrating upstream in the river Edo, Arakawa and Tamagawa, which flow into Tokyo Bay, Fish Genetics and Breeding Science, 査読有、46巻、2017年、41-48

Syukri, F., T. Nakajima and M. Nakajima, Can multilocus heterozygosity reveal inbreeding depression?, Journal of Environmental Biology, 査読有、37巻、2016年、1-9

Yamaguchi, K., M. Nakajima and N. Taniguchi, Population structure and conservation genetics of anadromous white-spotted char (*Salverinus loucomaenis*) on Hokkaido Island: Detection of isolation-by-distance, Environmental Biology of Fishes, 査読有、99巻、2016年、513-525

中嶋正道、放射能で汚染された河川・湖沼ヤマメの脾臓と鰹に変化を確認 被曝の影響? 要因は絞り切れず、グリーン・パワー、査読無、451巻、2016年、24-25

原将樹、川田暁、榎本昌宏、富谷敦、渡邊昌人、森下大悟、泉茂彦、中嶋正道、原発事故後の福島県内河川に生息するヤマメの筋肉中および生息河川底泥中における放射性セシウムの変化、水産育種、査読有、45巻、2016、33-39

安藤大成、神力義仁、佐々木義孝、安富亮

平、三坂尚行、水野伸也、宮腰靖之、中嶋正道、サケ稚魚の脊椎骨数における地域差、日本水産学会誌、査読有、81巻、2015年、843-845

原将樹、川田暁、榎本昌宏、富谷敦、渡邊昌人、中嶋正道、放射線被曝がヤマメ血液性状に与える影響、「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」報告書、査読無、209、2015年、98-104

安藤大成、佐々木義孝、宮腰靖之、安富亮平、飯嶋亜内、下田和孝、中嶋正道、サケ稚魚の家系間の成長様式の違い、水産増殖、査読有、63巻、2015年、89-98

Yamaguchi, K., M. Saito and M. Nakajima, Identification and characterization of 12 tetranucleotide microsatellite markers in the white-spotted char *Salverinus loucomaenis*, Conservation Genetics Resources, 査読有、6巻、2014年、DOI:10.1007/s12686-014-0405-3

安藤大成、神力義仁、下田和孝、安富亮平、佐々木義孝、宮腰靖之、中嶋正道、サケの産卵時期が脊椎骨数の変異に及ぼす影響、日本水産学会誌、査読有、80巻、2014年、191-200

安藤大成、佐藤俊平、神力義仁、安富亮平、有賀望、中嶋正道、琴似発寒川で自然産卵したサケの脊椎骨数と体サイズの関係、水産育種、査読有、43巻、2014年、29-33

安藤大成、安富亮平、神力義仁、宮腰靖之、ト部浩一、青山智哉、佐々木義孝、中嶋正道、自然産卵したサケ *Onchorhynchus keta* における幽門垂数の遡上時期による変異、水産増殖、査読有、61巻、2013年、311-314

[学会発表](計29件)

Yusof, M. F., 川田暁、泉茂彦、渡邊昌人、中嶋正道、福島県真野川のヤマメで観察された mtDNA の変異、日本水産学会春季大会、2017年3月29日、東京海洋大学(東京)

阪本憲司、小川智史、平井俊朗、中嶋正道、重油浸漬によるヒラメ稚魚の高温耐性ならびに鰹及び肝臓組織への影響、日本水産学会春季大会、2017年3月29日、東京海洋大学(東京)

山口光太郎、大友芳成、神庭仁、梅沢一弘、大力圭太郎、中嶋正道、東京湾流入河川を遡上するアユの遺伝的系統関係と多様性、

日本水産学会春季大会、2017年3月29日、東京海洋大学(東京)

酒井義文、田口将、川田暁、富谷敦、渡邊昌人、中嶋正道、ヤマメの遺伝子発現における影響、日本水産学会シンポジウム、日本水産学会春季大会、2017年3月26日、東京海洋大学(東京)

平井俊朗、小川智史、柴田安司、阪本憲司、原将樹、中嶋正道、ギンブナ造血器官に及ぼす放射線の影響 - 飼育実験による低線量放射性セシウム長期曝露影響の組織学的検証 - 、日本水産学会シンポジウム、日本水産学会春季大会、2017年3月26日、東京海洋大学(東京)

阪本憲司、フナ環境適応能力に与える影響、日本水産学会シンポジウム、日本水産学会春季大会、2017年3月26日、東京海洋大学(東京)

原将樹、川田暁、榎本昌宏、富谷敦、渡邊昌人、森下大悟、泉茂彦、中嶋正道、ヤマメの血液性状における影響、日本水産学会シンポジウム、日本水産学会春季大会、2017年3月26日、東京海洋大学(東京)

Yusof, M. F., 川田暁、榎本昌宏、富谷敦、渡邊昌人、森下大悟、泉茂彦、中嶋正道、ヤマメのmtDNA塩基配列に対する影響、日本水産学会シンポジウム、日本水産学会春季大会、2017年3月26日、東京海洋大学(東京)

Nakajima, M., S. Taguchi, M. Watanabe, A. Tomiya and G. Kawada, Histological deformities observed in masu salmon *Oncorhynchus masou* collected rivers in Fukushima, LAQUA2016, 2016年11月26日、Lima (Peru)

山口光太郎、中嶋正道、谷口順彦、アメマス移住率と集団の有効な大きさ、日本水産学会春季大会、2016年3月29日、東京海洋大学(東京)

工藤岳、中嶋正道、東北地方南部太平洋側の河川に遡上するサケにおける震災の遺伝的影響評価、日本水産学会春季大会、2016年3月29日、東京海洋大学(東京)

中嶋正道、放射線被曝がヤマメに与える影響、原発事故被災動物環境研究会、2016年2月11日、東京大学(東京)

Kudo, T. and M. Nakajima, Genetic evaluation of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) river population after tsunami disaster in Fukushima and Miyagi prefecture, Morioka Salmon Workshop、

2016年2月9日、メトロポリタン盛岡(日本)

Nakajima, M., T. Nakajima and S. Obinata, Estimation of breeding value in model fish, guppy (*Poecilia reticulata*) and its application for selective breeding in aquaculture, United States - Japan National Resources Panel on Aquaculture 43<sup>rd</sup> Scientific Symposium, 2015年11月10日、長崎大学(長崎)

工藤岳、中嶋正道、マイクロサテライトDNA マーカーを用いたサケにおける東日本大震災の遺伝的影響評価、日本動物遺伝育種学会大会、2015年11月7日、神戸大学(神戸)

佐藤龍星、中嶋正道、グッピーにおける系統間の遺伝的類縁関係、日本動物遺伝育種学会大会、2015年11月7日、神戸大学(神戸)

Yusof, M. F., G. Kawada, S. Izumi, M. Watanabe and M. Nakajima, Effect of radioisotope (<sup>137</sup>Cs) on Cyt B in Yamame (*Oncorhynchus masou*) in Mano River, 日本水産学会秋季大会、2015年9月23日、東北大学(仙台)

原将樹、川田暁、榎本昌宏、富谷敦、渡邊昌人、森下大悟、泉茂彦、中嶋正道、福島県産ヤマメにおける<sup>137</sup>Cs量と血液性状との関連、日本水産学会秋季大会、2015年9月24日、東北大学(仙台)

田口将、川田暁、渡邊昌人、榎本昌宏、富谷敦、中嶋正道、長期放射線被曝によりヤマメ脾臓で発現応答する遺伝子の探索、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、2015年8月11日、京都大学原子炉研究所(熊取)

原将樹、川田暁、榎本昌宏、富谷敦、渡邊昌人、森下大悟、泉茂彦、中嶋正道、放射線被曝がヤマメ血液性状に与える影響、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、2015年8月11日、京都大学原子炉研究所(熊取)

<sup>21</sup> Ismail, M. S., T. Nakajima and M. Nakajima, The effect of parental relatedness on the fitness in next generation of the guppy *Poecilia reticulata*,

International Symposium

on Genetics in Aquaculture、2015年6月25日、Santiago de Compostela (Spain)

<sup>22</sup> 山口光太郎、中嶋正道、谷口順彦、SSRマーカーによる北海道アメマスにおける集団構造と遺伝的変異性、日本水産学会春季大会、2015年3月30日、東京海洋大学(東京)

<sup>23</sup> 工藤岳、中嶋正道、次世代シーケンサーを用いたサケのマイクロサテライト DNA マーカーの開発、日本水産学会春季大会、2015年3月30日、東京海洋大学(東京)

<sup>24</sup> Muhammad Syukri Ismail、中嶋登代子、中嶋正道、グッピーの近親交配における親魚の遺伝的多様性と次世代の高温耐性との関係、日本水産学会春季大会、2015年3月30日、東京海洋大学(東京)

<sup>25</sup> 小川智史、原将樹、阪本憲司、井尻成保、足立伸次、中嶋正道、平井俊朗、3倍体クロロギンブナに対する低線量放射性セシウム長期被曝の組織学的影響、日本水産学会春季大会、2015年3月30日、東京海洋大学(東京)

<sup>26</sup> 原将樹、川田暁、渡邊昌人、富谷敦、中嶋正道、放射線被曝下のヤマメにおける遺伝子発現の特性、日本水産学会春季大会、2014年3月30日、北海道大学(函館)

<sup>27</sup> 原将樹、日尾彰宏、榎本昌宏、川田暁、富谷敦、渡邊昌人、中嶋正道、ヤマメにおける臓器別放射線量の比較、日本水産学会秋季大会、2013年9月20日、三重大学(津)

<sup>28</sup> 阪本憲司、中嶋正道、ヒラメ稚魚の高水温耐性に及ぼす重油の影響、日本水産学会秋季大会、2013年9月20日、三重大学(津)

<sup>29</sup> 田口将、川田暁、渡邊昌人、榎本昌宏、富谷敦、楠田聡、安藤大成、佐々木義孝、中嶋正道、サブトラクション法による福島県阿武隈川水系ヤマメにおける発現遺伝子の解析、日本水産学会、2013年9月20日、三重大学(津)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 正道 (NAKAJIMA, Masamichi)

東北大学・大学金農学研究科・准教授

研究者番号: 20192221

(2) 研究分担者

田中 憲司 (TANAKA, Kenji)

福山大学・生命工学部・准教授

研究者番号: 00309634

酒井 義文 (SAKAI, Yoshifumi)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号: 10277361

平井 俊朗 (HIRAI, Toshiaki)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号: 30238331

柴田 安司 (SHIBATA, Yasushi)

帝京科学大学・生命環境学部・准教授

研究者番号: 80446260

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )