

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：11601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H02229

研究課題名(和文) 長期的な低線量被曝が野生生物に及ぼす遺伝的影響の評価

研究課題名(英文) Biological effects of long-term radiation exposure on wild animals and plants

研究代表者

水澤 玲子 (Mizusawa, Leiko)

福島大学・人間発達文化学類・准教授

研究者番号：30722946

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：2011年3月に発生した福島第一原子力発電所の事故に伴う低線量被曝が、野生生物に遺伝的影響を及ぼしているかどうかを明らかにするために、放射線防護の観点から基準植物の適用が可能なアカマツを対象に生殖細胞系列の突然変異率及び葉のDNA酸化損傷レベルを調べた。また、基準動物の適用が可能なアカネズミを対象に放射線感受性関連遺伝子の対立遺伝子頻度を調べた。いずれの項目についても、高線量地域と対照区との間に統計的な差は検出されなかった。より多くのサンプルを解析すれば何らかの影響が検出される可能性を否定するものではないが、先の事故に起因する被曝によって野生生物に劇的な遺伝的影響が生じているとは考えにくい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

2011年から翌年にかけて設定された避難指示区域は除染の状況や自然減衰の程度に基づき定期的に見直されてきた。かつて避難指示準備区域や帰還困難区域に設定されていた地域の多くが2023年5月1日現在居住可能となっている。被曝によって何らかの影響が見られたとする結果、すなわちポジティブデータは、ネガティブデータと比べて公表される頻度が高く、また話題にも上りやすい傾向にある。しかし当該地域の今後の復興計画の策定に当たっては本研究の結果のようなネガティブデータもまた、ポジティブデータと同等の重要な意義を持つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To clarify whether low-dose radiation exposure caused by the accident at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant (FDNPP) in March 2011 has had genetic effects on wild plants and animals, we examined the mutation rate of germ line and the DNA oxidative damage in needles of *Pinus densiflora*, to which reference plants of ICRP can be applied. Allele frequencies of radiosensitivity-related genes were also examined in *Apodemus speciosus*, to which reference animals of ICRP can be applied. No statistical difference was detected between the high-dose area and the control area for any of the measurements. Although our results do not eliminate the possibility that some effects could be detected by analyzing a larger number of samples, at least it is suggested that dramatic genetic effects caused by the FDNPP accident have not happened on wild plants and animals.

研究分野：生態学

キーワード：福島第一原子力発電所 生物学的影響 突然変異率 DNA酸化損傷 放射線感受性 アカマツ アカネズミ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2011年3月11日に発生した東日本大震災に伴う原子力発電所施設の電源喪失により、同月12日から15日にかけて福島第一原子力発電所において放射性物質の漏洩事故が発生し、発電所の敷地外の広い範囲に放射性物質が降下した。国は発電所から20km圏内のエリア及び、年間被ばく量が20mSv/hを超える恐れがあるエリアに避難指示を出し、その中でも年間被ばく量が50mSv/hを超えるエリアは長期的に居住が制限される帰還困難区域に指定されるなど、住民の生活は多大な影響を受けた。人々の間には事故による被ばくで突然変異が増えるのではないかといった不安が広がった。一方で事故の社会的インパクトの高さとは対照的に、この事故に起因する放射能汚染の程度はこれまでに放射線生物学が対象としてきた線量率と比べて極めて低く、非除染区域の野生生物についてさえ、事故による長期的な被ばくが生物影響としてどの程度顕在化するのか、特に、突然変異が増えるかどうかについてはほとんど情報がなかった。

### 2. 研究の目的

事故の直後には、線量率の高い地域の野生生物で形態異常が見られたとする報告もあったが、そのような形態異常の頻度は事故から年数が経過するのに伴い減少していった。このことについては、事故直後の形態異常が突然変異に起因するものではなく放射線の直接的影響に起因するものと解釈することもできるが、被ばくによって突然変異を生じるような放射線感受性の高い個体が時間の経過に伴い自然選択によって除去されたと解釈することもできる。本研究では、放射線防護の観点から標準植物及び動物の適用が可能なアカマツおよびアカネズミを対象に、生殖細胞系列の突然変異率、DNA酸化損傷レベル、及び放射線感受性関連遺伝子に対する自然選択の影響を調べ、高線量地域において継続している低線量被ばくが野生生物に遺伝的影響を及ぼしているかどうかを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) アカマツの生殖細胞に生じる突然変異率の評価

裸子植物では、発芽直後の種子を解剖することで実生組織と雌性配偶体組織を容易に分離できる(図1)。この点に着目し、雌性配偶体と母樹の遺伝子型を比較することでアカマツの生殖細胞に生じる突然変異率を検出する手法を開発した。続いて、高線量地域(空間線量率3.81~8.96µGy/h)及び対照地域(空間線量率0.1~0.24µGy/h)のアカマツから採取した種子中の雌性配偶体組織及び母樹組織を対象に、マイクロサテライトマーカー9座を用いて遺伝子型を決定した。また、RAD-seq法による裸子植物雌性配偶体の新規突然変異解析の可能性についても検討を行った。これについては、シロイヌナズナの突然変異解析のパイプラインを参考としてスギの雌性配偶体のRAD-seq解析データで検証を行った。

#### (2) アカマツの葉に生じるDNA酸化損傷の評価

まず、アカマツの葉のDNA酸化損傷レベルに紫外線が及ぼす影響をどの程度考慮する必要があるのかを検討するために、太陽光及びクリーンベンチの殺菌灯による照射実験を行い、紫外線曝露による8-OHdG濃度の上昇が見られないことを確認した。8-OHdG濃度の測定には市販のELISAキットを用いた。続いて、高線量地域(空間線量率3.81~8.96µGy/h)と対照地域(空間線量率0.1~0.24µGy/h)から採取したアカマツ成熟葉及び新芽の8-OHdG濃度を比較した。さらに、対照地域で野外採取したアカマツ実生に対して実験室においてCs線源による48時間の照射実験を行い、照射直後の葉の8-OHdG濃度を非照射群と比較した。照射終了後の実生は9カ月間にわたり実験室にて栽培し、生存率に対する照射線量率及び葉の8-OHdG濃度の影響を解析した。

#### (3) 野生アカネズミ集団の放射線感受性関連遺伝子の自然選択の評価

高線量地域(ネズミ類が活動する地表面の線量率13µGy/h)及び対照地域(同線量率0.05µGy/h)から、震災発生以降に誕生した各10個体ずつのアカネズミを捕獲し供試した。まずミトコンドリアD-loop領域およびCytb領域のDNA塩基配列に基づき個体間に系統的な偏りがないことを確認したうえで、DNA損傷のセンサータンパク質をコードするAtaxia telangiectasia mutated 遺伝子(ATM)、及びハウスキーピング遺伝子であるBeta actin (ACTB)とGLUCOSE transporter (GLUT)のエクソンの塩基配列を調べ、つくば市で採取されたレファレンス個体と比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) アカマツの生殖細胞に生じる突然変異率の評価

高線量地域については580粒の種子の雌性配偶体の5071ヶ所の遺伝子型を決定し、1個の突

突然変異が検出された。突然変異率の値としては  $1.97 \times 10^{-4}$  である。一方で対照地域については 556 粒の種子の雌性配偶体の 4573 ヶ所の遺伝子型が決定されたが突然変異は検出されなかった。突然変異率の値としては少なくとも  $2.19 \times 10^{-4}$  より低い値と推測できる。高線量地域と対照地域の突然変異率に統計的な有意差は見られなかった (フィッシャーの正確確率検定  $p$ -value = 1)。

RAD-seq 法による新規突然変異率解析については、シロイヌナズナゲノムを対象にする場合と比較すると新規突然変異を正しく特定する確率が低いものの、裸子植物にも応用可能であることが確認された。

### (2) アカマツの葉に生じる DNA 酸化損傷の評価

高線量地域と対照地域にそれぞれ自生する野生株の分析では、成熟葉と新芽のどちらについても組織中の 8-OHdG 濃度に空間線量率の影響は検出されなかった。特に、新芽については 8-OHdG 濃度そのものが低く、高線量地域と対照地域のどちらにもコントロールアッセイと同程度のシグナルレベルのものが含まれた。実験室における照射実験では、個体が枯死するほどの線量率を照射した場合でさえ 8-OHdG 濃度の上昇は検出されなかったが (表 1)、一方で、8-OHdG 濃度の高い株は 9 カ月経過後の生存率が低かった (図 2)。これらの結果から、DNA 酸化損傷は個体の健康状態を反映するものの、福島第一原子力発電所の事故に起因する対照被ばくではアカマツの DNA 酸化損傷の明瞭な増加は生じないことを示唆している。アカマツは明るい環境を好むパイオニア種であるため、強光に起因する酸化ストレスに対して高い抵抗性を有しており、被ばくによって活性酸素が生じたとしても DNA 酸化損傷に至る前に消去されている可能性が考えられた。

### (3) 野生アカネズミ集団の放射線感受性関連遺伝子の自然選択の評価

*ATM* 遺伝子の 30 エクソン 11830bp、*ACTB* 遺伝子の 4 エクソン 1558bp、及び *GLUT* 遺伝子の 13 エクソン 3130bp が決定され、それぞれ 315、36、及び 46 ヶ所にレファレンス個体との変異が検出された。そのうち、各エクソンの最も 5' 端に近い位置に出現した SNP 多型のみを抽出し、各 SNP を 1 アレルとみなしてヘテロ接合度、固定指数、及び HWE からの逸脱度を算出した結果 (表 2、表 3)、高線量地域の *ATM* 遺伝子に特異的な傾向は認められず、放射線被ばくによる集団構造の劇的な変化は無かったと考えられた。今後は、サンプル数を増やしたさらなる解析が望まれる。

以上、本研究では福島第一原子力発電所事故に起因する低線量被ばくが野生生物の DNA に遺伝的影響を及ぼしている証拠は得られなかった。シロイヌナズナを用いた全ゲノム解析やスギを対象とした RAD-seq 解析によれば、新規突然変異の発生率は極めて低く、また、個体や分類群によってばらつきが大きいことが明らかになりつつある (Hirao *et al.* 2022, Ueno *et al.* 2023)。従って、変異率のばらつきも含めた全体像の理解にはより大きなサンプル数を対象とした包括的な解析が必要である。今回得られた結果の解釈は、低頻度の変異を検出するのに十分なサンプル数を解析できれば変わってくる可能性もあるが、もし明確な生物学的影響が生じているのであれば今回の実験条件であっても何らかの影響が検出されたはずであり、少なくとも、事故直後に報告された帰還困難区域内の野生生物の形態異常が突然変異に起因していると解釈することについては慎重になる必要があるだろう。



図 1 発芽直後のアカマツの実生 (A) と、種子を解剖して雌性配偶体を取り出した様子 (B)。雌性配偶体は矢印で示す。

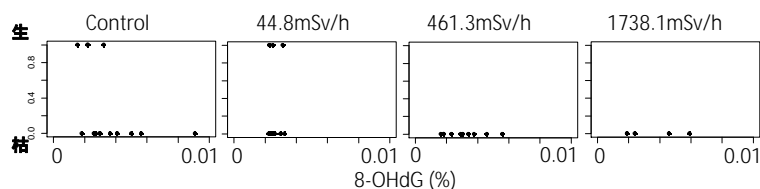


図 2 実生の生存率に及ぼす照射線量率と酸化ストレスの関係。

表1 解析に使用した応答変数及び説明変数の一覧。一般化線形モデルのフルモデルに組み込んだ説明変数は丸印で、組み込んでいない説明変数はハイフンで示した。アスタリスクはAICに基づくモデル選択でベストモデルに含まれたことを示す。

実験内容	応答変数	説明変数					
		実験室での					
		線量率	採取地点	個体サイズ	栽培日数	8-OHdG濃度	交互作用項
Cs線源による照射実験	8-OHdG濃度	○	-	-	○*	-	○
	9カ月後生存率	○*	-	○	-	○*	○*
野生株の被ばくの影響	8-OHdG濃度	○	○	-	-	-	○

表2 アカネズミの放射線感受性関連遺伝子とハウスキーピング遺伝子の多型性。

集団 (個体数)	遺伝子 (Mean/SE)		
	ATM	ACTB	GLUT
ヘテロ接合度 対照1 (4)	0.386 / 0.063	0.467 / 0.176	0.219 / 0.100
実測値 対照2 (5)	0.264 / 0.065	0.333 / 0.333	0.100 / 0.038
高線量1 (10)	0.309 / 0.057	0.333 / 0.285	0.175 / 0.053
ヘテロ接合度 対照1 (5)	0.293 / 0.035	0.327 / 0.087	0.160 / 0.067
期待値 対照2 (5)	0.217 / 0.044	0.167 / 0.167	0.240 / 0.065
高線量1 (10)	0.274 / 0.037	0.197 / 0.152	0.223 / 0.076
固定指数 対照1 (4)	-0.271 / 0.082	-0.343 / 0.167	-0.305 / 0.076
対照2 (5)	-0.168 / 0.105	-1.000 / 0.185	0.484 / 0.177
高線量1 (10)	-0.070 / 0.085	-0.435 / 0.313	0.103 / 0.082

表3 HWEからの逸脱が見られた遺伝子座

集団	遺伝子 (エクソン番号)					
	ATM (27)	ATM (35)	ATM (32)	ACTB (2)	GLUT (01)	GLUT (06)
対照1	+	+				
対照2			+	+	+	+
高線量1	+	+		+		

## 引用文献

- Hirao, A. S., Watanabe, Y., Hasegawa, Y., Takagi, T., Ueno, S., & Kaneko, S. (2022). Mutational effects of chronic gamma radiation throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*: Insight into radiosensitivity in the reproductive stage. *Science of The Total Environment*, 838, 156224. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156224>
- Ueno, S., Hasegawa, Y., Kato, S., Mori, H., Tsukada, H., Ohira, H., & Kaneko, S. (2023). Rapid survey of de novo mutations in naturally growing tree species following the March 2011 disaster in Fukushima: The effect of low-dose-rate radiation. *Environment International*, 174, 107893. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107893>

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Saneyoshi Ueno, Yoichi Hasegawa, Shuri Kato, Hideki Mori, Hirofumi Tsukada, Hajime Ohira, Shingo Kaneko	4. 巻 174
2. 論文標題 Rapid survey of de novo mutations in naturally growing tree species following the March 2011 disaster in Fukushima: The effect of low-dose-rate radiation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Environment International	6. 最初と最後の頁 107993
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.envint.2023.107893	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 Ishiniwa H, Davis M	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of the small rodent fauna inhabiting the forests of Tadami, Fukushima Prefecture, Japan, and the cesium accumulations in their bodies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bulletin of the Tadami Beech Center	6. 最初と最後の頁 2-7
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 該当する
1. 著者名 Donovan Anderson, Nicholas A.Beresford, Hiroko Ishiniwa, Manabu Onuma, Kenji Nanba, Thomas G.Hinton	4. 巻 226
2. 論文標題 Radiocesium concentration ratios and radiation dose to wild rodents in Fukushima Prefecture	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Environmental Radioactivity	6. 最初と最後の頁 106457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jenvrad.2020.106457	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
1. 著者名 Hiroko Ishiniwa, Tsukasa Okano, Akira Yoshioka, Masanori Tamaoki, Yasushi Yokohata, Junji Shindo, Noriko Azuma, Nobuyoshi Nakajima, Manabu Onuma.	4. 巻 34
2. 論文標題 Data paper: Concentration of radioactive materials in small mammals collected from a restricted area in Fukushima, Japan since 2012	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ecological Research	6. 最初と最後の頁 7-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1440-1703.1016	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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Leiko MIZUSAWA, Yoshito WATANABE, Shingo KANEKO
2. 発表標題 Effects of Radioactive Contamination Associated with the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident on DNA Oxidative Damage in Leaves of Pinus densiflora
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 石庭寛子
2. 発表標題 放射線による野生齧歯類 "アカネズミ" の影響解明を目指して
3. 学会等名 日本放射線影響学会第2回SITワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石庭寛子, 玉置雅紀, 大沼学
2. 発表標題 アカネズミの精子形成過程における放射線が引き起こす酸化ストレス応答の違い
3. 学会等名 日本哺乳類学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ishiniwa H, Tamaoki M, Endoh D, Onuma M
2. 発表標題 Radiocesium contamination in wild mouse in Fukushima, Japan
3. 学会等名 EGU General Assembly 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 兼子伸吾
2. 発表標題 近年の遺伝解析の成果を福島での研究と理解にどう活かす？
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水澤玲子, 渡辺嘉人, 兼子伸吾
2. 発表標題 福島第一原子力発電所事故後の帰還困難区域内外におけるアカマツ針葉の8-0HdGレベルの比較
3. 学会等名 日本放射線影響学会64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中美沙希, 石庭寛子, 大沼学, 中嶋信美, 遠藤大二
2. 発表標題 福島原発事故立ち入り制限区域における野生アカネズミのゲノム変化推定方法の開発
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大沼学, 石庭寛子, 玉置雅紀
2. 発表標題 期間困難地域に分布するアカネズミ ( <i>Apodemus speciosus</i> ) の被ばく量推定とその雄性生殖器への影響
3. 学会等名 環境創造センター成果報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石庭寛子, 玉置雅紀, 遠藤大二, 大沼学
2. 発表標題 帰還困難区域に生息する野生アカネズミの放射線影響~DNA損傷および次世代への遺伝的影響評価の展望~
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 五十嵐美咲・水澤玲子
2. 発表標題 低線量被曝および紫外線によるアカマツの葉のDNA酸化損傷測定手法の確立に関する研究
3. 学会等名 福島いきもの調査発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 五十嵐美咲・水澤玲子
2. 発表標題 福島県の避難指示区域の中と外におけるアカマツの葉のDNA酸化損傷レベルの比較
3. 学会等名 日本生態学会東北地区会岩手大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 兼子伸吾、上野真義、村山悠太、水澤玲子、長谷川陽一、平尾章
2. 発表標題 野外に生育する針葉樹を対象とした突然変異率実測の試み
3. 学会等名 日本DNA多型学会第28回学術集会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 石庭寛子、玉置雅紀、中嶋信美、Samantha L. Pederson、Margaret C. Rollert、Joshua M. Hayes、兼子伸吾、奥田圭、Thomas G. Hinton
2. 発表標題 アカネズミのセシウム蓄積量に寄与する餌生物の探索
3. 学会等名 日本DNA多型学会第28回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 兼子伸吾
2. 発表標題 Clonal plants as experimental organisms
3. 学会等名 International Conference of The Plant Resources Society of Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 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
研究 分担者	石庭 寛子  (ISHINIWA Hiroko)  (00624967)	福島大学・環境放射能研究所・特任講師   (11601)	
研究 分担者	兼子 伸吾  (KANEKO Shingo)  (30635983)	福島大学・共生システム理工学類・准教授   (11601)	

#### 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
---------	---------