

**環境放射線の生物・生態系影響に関する調査
(平成 24 年度)**

目次

1 福島県の土壌からの放射線による植物へのDNA影響モニタリング植物の開発.....	1
1-1 はじめに.....	1
1-2 DNA損傷頻度を検出することができる植物の開発.....	1
1-2-1 DNA損傷修復機構.....	1
1-2-2 GU-USを導入した植物の作製.....	3
1-3 ガンマ線検出感度の検証.....	5
1-3-1 放射性物質非存在下での相同組換え頻度の検証.....	5
1-3-2 ガンマ線照射によるモニタリング植物の相同組換え検出感度の検証.....	7
1-4 福島県の土壌より放出されるガンマ線による相同組換え頻度の検出.....	9
1-4-1 放射性物質に汚染された土壌の採取.....	9
1-4-2 汚染土壌におけるGU-US導入シロイヌナズナの栽培.....	9
1-4-3 汚染土壌で栽培した植物の発芽率の測定.....	9
1-4-4 汚染土壌で栽培した植物における活性酸素の検出.....	10
1-4-5 汚染土壌で栽培した植物における相同組換え頻度.....	11
1-5 おわりに.....	13
引用文献.....	14
2 植物の生殖器官に対する低線量環境放射線影響の実態調査.....	14
2-1 はじめに.....	14
2-2 サクラの花粉熟成に対する影響.....	14
2-2-1 材料と方法.....	14
2-2-2 結果.....	16
2-2-3 考察.....	16
引用文献.....	18
2-4 アサガオの生殖器官と遺伝子発現に対する影響調査.....	19
2-4-1 材料と方法.....	19
2-4-2 結果.....	20
2-4-3 考察.....	23
引用文献.....	24
3 野生齧歯類を指標とした放射線生物影響の長期モニタリング.....	24
3-1 はじめに.....	24
3-2 材料と方法.....	25
3-2-1 アカネズミの捕獲.....	25
3-2-2 繁殖状態の把握.....	26
3-2-3 細胞培養の条件検討.....	26
3-2-4 アカネズミの放射性物質蓄積量計測.....	26

3-2-5	精巢における 8-OHdG 蓄積状況の把握 (抗 8-OHdG 抗体による免疫染色および HPLC による 8-OHdG 定量)	26
3-2-6	遺伝的変異検出用マーカーの開発	27
3-3	結果	28
3-3-1	アカネズミの捕獲	28
3-3-2	アカネズミ繁殖期の把握	28
3-3-3	培養条件の検討	29
3-3-4	アカネズミの放射性物質蓄積量計測	30
3-3-5	精巢における 8-OHdG 蓄積状況の把握 (抗 8-OHdG 抗体による免疫染色及び HPLC による定量)	30
3-3-6	遺伝的変異検出用マーカーの開発	31
3-4	考察	35
	参考文献	36
4	野生菌類 (キノコ類・地衣類) への放射線の蓄積	36
4-1	はじめに	36
4-2	材料と方法	38
4-3	結果と考察	40
4-3-1	地衣類の放射線量について	40
4-3-2	きのこ類の放射線量について	43
	引用文献	49

1 福島から放射線による植物へのDNA影響モニタリング植物の開発

1-1 はじめに

東日本大震災に伴う東京電力福島第一原子力発電所（以後、「福島第一原発」と呼ぶ）の事故により放射性物質が放出され、これらの一部は東北地方を中心に陸上に降り注いだ。この事故により原子力発電所より放出された放射性物質としては、I-131、Cs-134、Cs-137 など多岐にわたるが、これらのうち放射性セシウム Cs-134 は半減期が約3年、Cs-137 は半減期が約30年と比較的長期間にわたって放射線を放出し続ける。セシウムは粘土質の土壌と強固に結合する事が知られており、いったん土壌に降下すると容易に溶出しにくい事から、今後陸域では平常時に比べて放射線量が高い状況が長期間に渡って続く事が予想される。これら放射性セシウムからはガンマ線が放出されるが、これはX線などと同様に波長の短い電磁波に属し、生物の遺伝情報を担う高分子生態物質DNAに損傷を与える事が知られている。このようなDNA損傷はガンマ線とは関係なく日常的に引き起こされている為、生物はこのDNA損傷を修復するメカニズムを持っている。しかしながら、DNA修復速度が細胞の加齢に伴って低下、または環境要因によってDNA分子の損傷量が増大することによりDNA修復がDNA損傷の発生に追いつかなくなると、DNA塩基の置換やDNA鎖の一部欠損などが生じ、これが蓄積すると細胞レベルでは老化が促進され、さらに蓄積が起こればプログラム細胞死と呼ばれる細胞の自殺、または細胞のガン化が生じる。また、DNA塩基の置換がわずかであっても、これが生物の成長・発達に必要な遺伝子領域上に生じれば、胚発生致死を始めとするさまざまな突然変異を生じる。

このように放射性セシウムより放出されるガンマ線はDNA損傷を引き起こす事が知られている為、放射線量の高い地域ではヒトへの影響のみならず、野生生物への影響が懸念される。放射線による生物影響は、生態系、個体群、個体、細胞など様々なレベルで起こる事が想定される。福島第一原発の事故による空間放射線量の増加に伴う生物影響の研究としては、Møllerら（2012）による鳥類の個体数への影響調査、及びHiyamaら（2012）による福島で採取したヤマトシジミにおける奇形率の増加などがある。しかしながら、これらの研究による影響は放射線量の増加による直接的な影響を示しているのかについて疑問視されている。また、これまでに当該事故による植物への放射線影響を調べた事例はない。

本研究では植物への個体、細胞レベルでの放射線影響を調べる為、高感度にDNA損傷の頻度を調べる植物を開発し、現在の陸域における放射線レベルにより植物でどの程度DNA損傷が引き起こされているかについて検証を行った。

1-2 DNA損傷頻度を検出することができる植物の開発

1-2-1 DNA損傷修復機構

放射線によるDNAの損傷はDNA分子が直接電離しDNA分子の化学結合が切断される作用（直接作用）と、DNA分子の周囲にある水分子などから放射線による電離作用により反応性の高い活性酸素種を生じ、これらがDNAと化学反応を起こし損傷を引き起こす間接作用がある。このようにして生じるDNA損傷は（1）塩基の変化（酸化、メチル化など）、（2）DNA鎖の切断、及び（3）塩基の架橋、に分類することができる。これらの損傷が修復されなければいずれも塩基の置換や塩基の欠失を生じる。一方で、DNA情報の保存と後代への正しい伝搬は生物にとって最重要課題である為、生物はDNA損傷を自律的に修復する機構を複数持っている。その一つに相同組換えによる修復がある（図1-1）。ガンマ線などによりDNAでは直接、あるいは活性酸素を通じて塩基の置換または二本差の切断が生じる、塩基置換が起これば生物はいったん塩基除去を行うために二本差切断と同じ状態になる。この状態から相同組換え修復が始まる。二本差の切断面はヌクレアーゼおよびヘリカーゼにより5'から3'方向に向かって消化され、片側が一本鎖の状態になる。このむき出しになった一本鎖は対とな

る損傷を受けていない相同な染色体DNAとの交叉(相同組換え)が起こって正常染色体の遺伝情報を用いてDNA合成がなされ、最後に相同組換えした部分が切断・再結合されて修復を終える。つまりこの修復過程では必ず「相同組換え」のイベントが起こる。

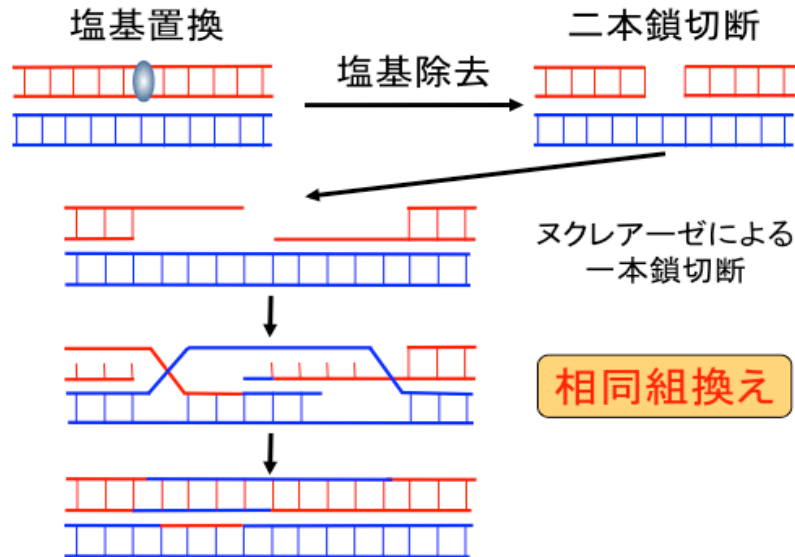


図1-1 モニタリング植物によるDNA損傷検出の概念

DNA損傷頻度をモニタリングするため、この「相同組換え」の頻度を検出する事により、間接的に体細胞におけるDNA損傷を定量化することができるような遺伝子改変植物を作製した(図1-2)。相同組換えを視覚的に見る為に使用した遺伝子として、大腸菌由来のβ-グルクロニダーゼ(GUS)タンパク質をコードしているものを用いた。このタンパク質に基質である5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide(X-Gluc)を加えると、脱エステル化され、さらに酸化重合することにより5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo(indigo blue)を生じる。この物質は難溶性で青色を呈することが知られている。本研究ではこのタンパク質をコードしているGUS遺伝子を600塩基にわたって重複した領域ができるように半分に切断し、間にhygromycin phosphotransferase遺伝子(*hpt*遺伝子:ハイグロマイシン耐性遺伝子)を挟み込んだコンストラクト(以下GU-USとする)を作製し、植物に導入した。またこれらのコンストラクトの上流にはmRNAを作らせる為に、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター(CaMV35S)を組み込み、またコンストラクトの下流にはmRNAの転写を止める為のアグロバクテリア由来のノパリン合成酵素のターミネーター(TNOS)を接合させた。このGU-USが導入された植物では、正常なGUSタンパク質が作られないため、GUS染色を行ってもindigo blueは生じない為、染色像は得られない。しかし、ガンマ線照射によりDNA損傷が生じ、この修復のために細胞内で相同組換えが起きると、GU-USの600塩基にわたって重複した領域でも相同組換えが生じ、正常な機能を持ったGUS遺伝子がゲノム上で再生し、同時に重複領域と*hpt*遺伝子が載った短い領域が切り出される。GUS染色を行うと、このイベントによりGUS遺伝子の機能が回復した細胞では正常なGUSタンパク質が作られ、青色のスポットが検出される(図中の赤矢印)。このスポットの数は植物の体細胞においてどれくらいの頻度で相同組換え修復が起きたのかを示しており、これは間接的にDNA損傷がどの程度起きたのかを示していると考えられる。

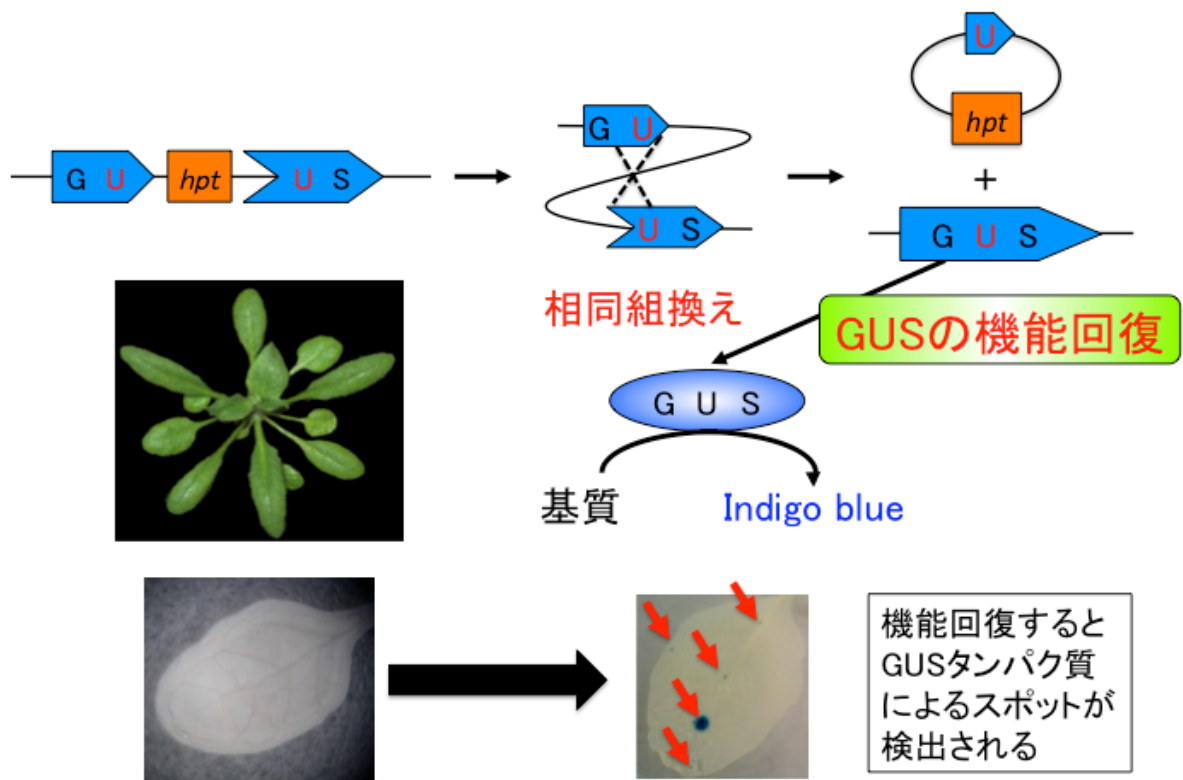


図1-2 DNA 損傷の頻度モニタリング植物開発の概念

相同組換えの検出にはGUS 遺伝子を使用。GU-US を導入した植物では *hpt* 遺伝子が邪魔をしているためにまともな GUS タンパク質が作られないため、染色を行っても葉に何も現れない (写真左下)。一方相同組換えが起こった細胞では GUS が機能を取り戻し、染色により葉にスポット上の像が生じる (写真右下)。

1-2-2 GU-US を導入した植物の作製

本研究ではGU-US の導入をシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の生態型 Col-0 を用いて floral dip 法により行った (図 1-3)。遺伝子導入用の植物は、表面をメッシュで覆った鉢にシロイヌナズナ Col-0 の種子を播種し、花茎の生長が見られるまで栽培を行った。その後、主花茎を摘心し、摘心後、植物をさらに1週間生育させることによって複数の花茎を伸張させた。こうして栽培した植物をアグロバクテリア

(*Rhizobium radiobacter* C58 Rif 株) への感染に用いた。植物は、感染当日に開花した花と、結実した鞘を切り落とし水道水で十分に給水させた。GU-US コンストラクトを電ポレーション法によってアグロバクテリアに導入し、25 mg/mL ハイグロマイシン B、25 mg/ml ゲンタマイシン入りの LB プレート上でコロニー形成させ、25 mg/mL ハイグロマイシン B、25 mg/mL ゲンタマイシン入りの LB 培地 1L で 30 度、120 rpm で振盪させながら OD600 が 0.8 になるまで液体培養した。その後、培



図 1-3 GU-US コンストラクトの導入に用いたシロイヌナズナ

養液を遠心分離し、アグロバクテリアを集菌し、2 mg/mL の BAP を 5 μ L、シリコンオイルを 200 μ L、20 mg/mL アセトシリルンゴンを 1 mL 加えた 1 L のムラング・スクーグ (MS) 培地を作り、この MS 培地 500 mL を用いて集菌したアグロバクテリアを懸濁した。500 mL ビーカーに 250 mL の懸濁液を分取し、鉢を逆さにして植物を懸濁液に浸けた。デシケーターの中にビーカーを移し、400 mmHg で 10 分間減圧を行った。減圧を解除し、植物を懸濁液から取り出し、少量の水を入れたトレイに鉢を横倒しにして置き、ラップを掛けて一晩置いた。翌日、鉢を起し、20 日間水をやらずに植物培養室に置いた。その後、種子を収穫した。収穫した種子は 25 mg/mL のハイグロマイシン B の入った 1/2MS 培地に播種し、遺伝子組換え植物 (T1 : 遺伝子組換え 1 世代目) の選抜を行った。得られた T1 植物の種子をロックウールに播種し、12 本の植物体を栽培した。播種後 2 週間目の実生の葉を一枚 (約 5 mm \times 5 mm) 取り、DNA 抽出溶液 (100 mM Tris-HCl, pH9.5、1 M KCl、10 mM EDTA) 中にてすりつぶした。この溶液を 2 μ L 使い、以下の組成で PCR を行い GUS 遺伝子が導入されている個体の選抜を行った。

PCR 反応液組成

抽出した DNA 溶液 2 μ L、2x PCR buffer 12.5 μ L、100 mM GUS-F primer 0.3 μ L、100 mM GUS-R primer 0.3 μ L、KOD Fx neo 0.5 μ L、H₂O 9.4 μ L

PCR はサーマルサイクラー PCR9700 (Life Technologies 社製) を使用し、95 度で 3 分の条件で 2 本鎖 DNA を解離させた後に、95 度 30 秒・55 度 15 秒・68 度 30 秒のサイクルを 30 サイクル繰り返すことにより行った。その際に使用したプライマーとして GUS-F : 5'-TTCGCGTCGGCATCCGGTCAGTGGCA-3'及び GUS-R :

5'-GCGGACGGGTATCCGGTT CGTTGGCA-3'を用いた。この PCR 産物を、2%アガロースゲルを用いて電気泳動する事により GUS 遺伝子由来の約 450 bp のバンドが得られた個体を同定した。同定された植物を栽培し、T2

(遺伝子組換え 2 世代目) の種子を得た。得られた T2 種子をロックウールに播種し、12 本の植物体を栽培した。T1 植物と同様に DNA 抽出、PCR を行い、12 本の植物体すべてから GUS 遺伝子由来の約 450 bp のバンドが得ら

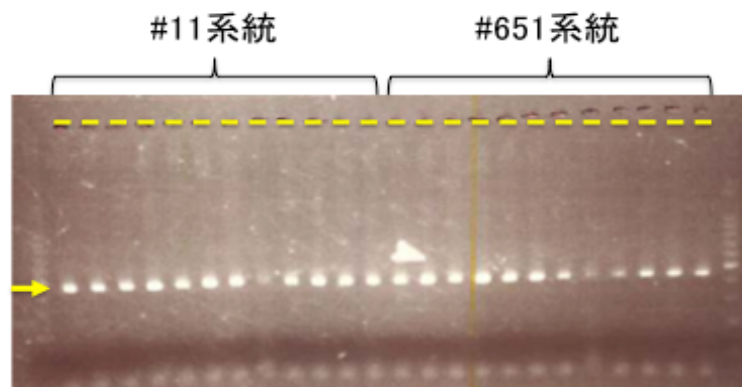


図 1-4 GU-US がホモに導入された系統の選抜

#11 系統 (左 12 レーン) 及び #651 系統 (右 12 レーン) の T3 世代における PCR 解析の結果を示す。矢印が挿入遺伝子 GU-US に由来する電気泳動によるバンドの位置を示す。

れた個体を導入遺伝子がホモに導入されている系統とし以後の実験に使用した (図 1-4)。以上の様に GU-US 遺伝子が導入された遺伝子組換えシロイヌナズナを選抜した結果、#11 系統の植物体を得ることができた。なお T2 世代においてこの #11 系統における遺伝様式を検証した。100 粒の T1 種子を 25 mg/mL のハイグロマイシン B の入った 1/2MS 培地に播種し、遺伝子組換え植物のハイグロマイシン耐性による遺伝的分離を測定した (表 1-1)。

表 1-1 #11 系統のハイグロマイシン耐性による分離比

表現型	観測値	分離比	理論値
ハイグロマイシン耐性	77	3	75
ハイグロマイシン感受性	23	1	25
合計	100	4	100

その結果、播種した種子のうち 77 粒がハイグロマイシン耐性を示し、23 粒がハイグロマイシン感受性を示した。もし GU-US 遺伝子が染色体上に 1 コピー存在するのであれば、ハイグロマイシン耐性とハイグロマイシン感受性の分離比は 3:1 のメンデル遺伝をするはずである。そこで、メンデル遺伝を想定したカイ 2 乗検定を行ったところ $p=0.644$ となり、帰無仮説である「分離比が 3:1」になることは棄却できないため、GU-US 遺伝子はメンデル遺伝しているといえる。つまり #11 系統では導入した遺伝子がメンデル遺伝するためにゲノム中に 1 コピー存在することが明らかになった。これに加えて、独立行政法人農業生物資源研究所農業生物先端ゲノム研究センターゲノム改変研究ユニットの土岐精一ユニット長よりシロイヌナズナ #1406 系統及び #1415 系統の種子を分与していただいた。さらに、レスブリック大学の Igor Kovalchuk 博士よりシロイヌナズナ #651 系統の種子を分与していただいた。これらの 4 系統の GU-US が導入されたシロイヌナズナを用いて以後の実験を行った。

1-3 ガンマ線検出感度の検証

1-3-1 放射性物質非存在下での相同組換え頻度の検証

上述したように本研究による遺伝子導入及び他機関の研究者からの分与により 4 系統の GU-US コンストラクトを導入した遺伝子組換えシロイヌナズナを得ることができた。次にこれらの遺伝子組換え植物が通常の栽培条件下でどの程度の相同組み換えを起こすのかについて検証を行った。GU-US を導入した遺伝子組換えシロイヌナズナの生育は国立環境研究所生物環境調節実験棟にある育成チャンバーにて 30 日間行った。シロイヌナズナの種子をロックウール（グロダン社製）に 100 粒程度播種し、水分を与えた状態で 3 日間、4 度に静置した。その後、気温 24 度、相対湿度 70%、光合成光量子束密度（photosynthetic photon flux density, PPF） $100\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ に設定した育成チャンバーにて栽培を行った。また、栽培にあたっては 1/2,000 倍希釈したハイポネックス原液（6-10-5、ハイポネックスジャパン社製）を水とともに適宜投与した。30 日後植物の地上部を回収し、300 ml の GUS 染色液（50 mM Na リン酸緩衝液 pH7.0、0.1% Triton-X、10 mM EDTA、0.5 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、0.5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、1 mM X-Gluc）の入った 500 ml ビーカーに入れた。植物が染色液によく浸るように上からネットをかぶせて植物を沈め、真空デシケーターにて 400 mmHg で 5 分間減圧を 3 セット行った。その後、ビーカーにラップをかぶせ、37 度に 48 時間静置した。静置後、GUS タンパク質による反応生成物 5, 5'-dibromo-4, 4'-dichloro-indigo による染色をはっきりさせるため、染色液を捨てた後に脱色液（70%エタノール、20%グリセリン）にて葉緑素を抜いた。脱色液は適宜交換し、48 時間程度脱色させた植物体を試料とした。得られた染色像を実体顕微鏡（Vixen 社製、SL-60ZT）にて観察し、個体あたりのスポット数（相同組み換え数）を計測した。なお、栽培室における空間ガンマ線量は $0.088\mu\text{Gy/hr}$ であったため、30 日間の栽培による植物の積算被ばく線量は約 $2.64\mu\text{Gy}$ と推定された。図 1-5 に本研究で用いた 4 系統の GU-US 導入系統を指標とした植物における組換え頻度を示す。#11 系統と #1406 系統の個体あたりの組換え頻度はそれぞれ 1.12 ± 0.2 及び 1.5 ± 0.17 であった。これらの系統では多くの個体で組換え由来のスポットが見当たらず、見つかったとしても 1~2 個/個体程度の頻度であった。一方で、#651 系統及び #1415 系統ではこれらよりも個体あたりの組換え頻度が高く検出され、それぞれ 19.06 ± 2.65 及び 10.0 ± 0.44 であった。これらの系統については調べた全ての個体において相同組換え由来のスポットが見つかり、その数も #651 系統で

は1~46個/個体、#1415系統では2~23個/個体となっていた。このように作製した4系統は大きく分けて、比較的相同組換え頻度が低い#11系統及び#1406系統と、相同組換え頻度が高い#651系統及び#1415系統とに分類する事ができた。言い換えれば前者のグループに比べて後者のグループの系統は相同組換えイベントが起こり易い、感度の高いモニタリング植物であるといえる。これら通常栽培条件下における相同組換え頻度の違いは同じ条件で育てているにもかかわらず現れる事から少なくともDNA損傷の程度の違いを現しているのではないと考えられる。本研究で使用したアグロバクテリアによる植物への遺伝子導入法では、ゲノム上の狙った位置に遺伝子を導入する事ができない。したがって、導入した遺伝子はゲノム上にランダムな位置に挿入される。この挿入された位置によって導入遺伝子は様々な影響を受ける。これはポジションエフェクトと呼ばれている。本研究により導入されたGU-USコンストラクトがたまたまゲノム上の非常に高い活動を持つ領域に挿入された場合には、相同組換えタンパク質群の影響を受けやすく、細胞内で同じような程度で相同組換え系が働いたとしても結果的に高い相同組換え頻度が起きていると判断される。このように植物の遺伝子導入については不安定な要素を抱えているものの、これが逆に様々な感度の相同組換えモニタリング植物の作出に貢献しているともいえる。本研究でも結果的に相同組換えを高い感度で検出する事ができる遺伝子組み換え植物を2系統(#651系統及び#1415系統)、また相対的に相同組換えを低い感度で検出する事ができる遺伝子組換え植物を2系統(#11系統及び#1406系統)得る事ができた。

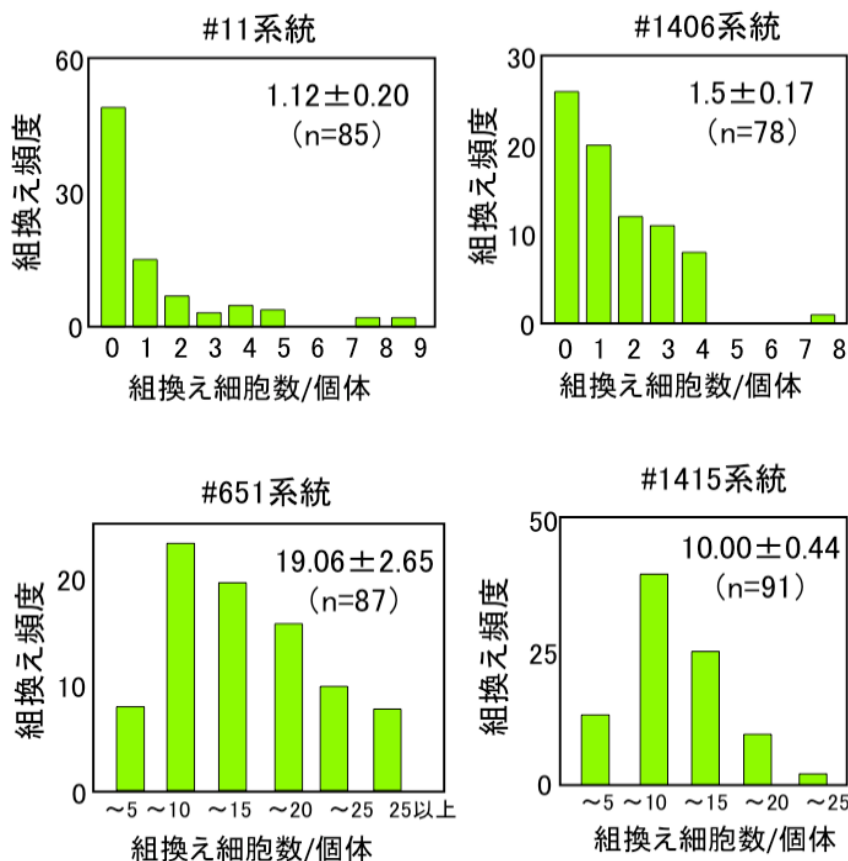


図1-5 GU-US 系統における通常栽培条件下での組換え頻度

4系統の遺伝子組み換え植物を30日間栽培し、個体あたりの組換え頻度を観察し、ヒストグラムにした。各系統のグラフ右上の値は平均値±標準誤差を示す。

1-3-2 ガンマ線照射によるモニタリング植物の相同組換え検出感度の検証

次に本研究で得る事ができた相同組換え検出用植物がガンマ線により生じる細胞での相同組換え活性の増加を植物に生じる GUS タンパク質由来のスポットの数により定量的にモニタリングできるかについて検証を行った。遺伝子組み換えシロイヌナズナへのガンマ線照射は独立行政法人原子力研究開発機構高崎量子応用研究所にある食品照射棟第 1 照射室において行った (図 1-6、施設の詳細については以下のリンク先を参照 <http://www.taka.jaea.go.jp/tiara/665/japanese/Food/Foodtitle1.htm>)。また照射実験は独立行政法人原子力研究開発機構高崎量子応用研究所医療・バイオ応用量子ビーム技術研究ユニットイオンビーム変異誘発研究グループの坂本綾子研究主幹に依頼して行った。

ガンマ線照射実験は、本研究で得る事ができたモニタリング植物のうち 3 系統 (#651 系統、#1406 系統、及び#1415 系統) について行った。これらの種子 150 粒を土壌 (プラグメイト:パーミキュライト:パーライト=8:1:1) に播種し、発芽をそろえる為に水分を与えた状態で 5 日間、4 度に静置した。その後、気温 25 度、相対湿度 70%、PPFD $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に設定した育成チャンバーにて栽培を行った。また、栽培にあたっては水を適宜投与した。この条件で植物を 2 週間栽培した後にガンマ線照射を行った。ガンマ線照射は 9.44 TBq の Co-60 線源から植物を 122cm 離して置く事により行った。このときの植物へのガンマ線照射量は 5 Gy/hr になり、こ



図 1-6 ガンマ線照射施設 (第 1 照射室)
線源の Co-60 が赤矢印の位置にて昇降する

の照射を 10 時間行ったため、植物に照射された積算ガンマ線量は 50 Gy になる。また、#651 系統については、線量依存的な相同組換えスポット数の変化を見る為に時間を変えた照射を行った。この時の照射線量は 5 Gy/hr とし、照射時間を 5 時間、10 時間、15 時間と変えた。これにより植物に照射された積算ガンマ線量は 25 Gy、50 Gy、75 Gy となる。またガンマ線照射しなかった植物の積算照射線量は 0 Gy とした。ガンマ線照射後の相同組換え頻度の検出は照射後 7 日間目に行った。その理由としては、(1) 相同組換えによる DNA 修復が起こるのに一定の時間が必要な事、(2) たとえ細胞 1 個で相同組換えが起こったとしても微小なため GUS タンパク質由来のスポットによる検出が難しいことから、ある程度植物を生長させる必要がある事、が挙げられる。GUS タンパク質による染色は 1-2-1 と同様に行った。ガンマ線照射による相同組換え頻度変化の結果を図 1-7 に示す。ガンマ線を照射していない植物における相同組換え由来スポット数は、#1406 系統で 0.51 個/個体、#1415 系統で 0.16 個/個体、#651 系統で 0.17 個/個体であった。同じ植物で 50 Gy のガンマ線を照射すると相同組換え由来スポット数は、#1406 系統で 2.25 個/個体、#1415 系統で 2.58 個/個体、#651 系統で 0.58 個/個体とすべて増加した。この値を 0 Gy を 1 としたときの相対値にすると、50 Gy のガンマ線照射により相同組換え由来スポット数は、#1406 系統で 4.4 倍、#1415 系統で 15.91 倍、#651 系統で 3.33 倍になった (図 1-7a)。以上のことから今回検証を行った 3 系統の GU-US 導入シロイヌナズナはすべてガンマ線照射に対して相同組み換えを検出することができることが明らかになった。また、50 Gy のガンマ線照射に体する感度は#1415 系統で最も高く、#1406 系統及び#651 系統では#1415 系統ほど高くはなかった。この結果を図 1-6 で得られた結果と比較すると、#1415 系統に関しては

どちらの実験でも高い感度で相同組換えを検出することができることが明らかになった。一方で、#651 系統については図 1-5 では高い感度が得られたが、本実験ではそこまで高い感度は得られなかった。この原因は不明であるが、両実験におけるシロイヌナズナの生育日数の違いによる可能性が考えられる。

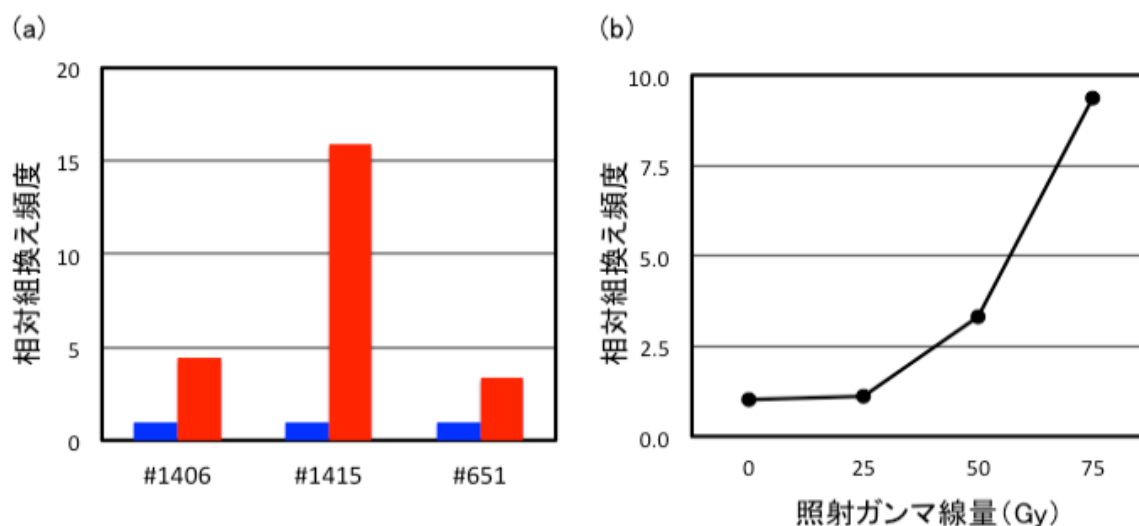


図 1-7 ガンマ線照射による相同組換え頻度の変化

(a) ガンマ線照射による 3 系統の GU-US 導入シロイヌナズナにおける相同組換え頻度の変化。青棒は 0 Gy 照射時の、赤棒は 50 Gy のガンマ線照射時の相同組換え頻度を表す。値は 0 Gy 照射時の頻度を 1 とした時の相対組換え頻度で示す。(b) #651 系統における相同組換え頻度のガンマ線量依存性。グラフは 0 Gy 照射時の相同組換え頻度を 1 とした時の 25、50、75 Gy のガンマ線照射時における相対組換え頻度を示す。

図 1-7 の実験 (14 日間栽培) においてガンマ線を照射していない植物では、図 1-5 の実験 (30 日間) で検出された相同組換えに由来するスポット数の 1/10 程度になっている。このことは植物の老化がある程度進むとガンマ線に依存しない相同組換えが検出されやすくなることを示している。したがって、今後は植物の加齢に伴う相同組換え頻度の推移をきちんと調査した上でガンマ線による組換え頻度を算出する必要があると考えられる。

次に照射するガンマ線量と組換え頻度との間に相関があるのかについて検証を行った。その結果、#651 系統では照射するガンマ線量が 25 Gy の時には組換え頻度がほとんど増加しなかったが、50 Gy で 3.3 倍に、75 Gy で 9.4 倍にスポット数が増加した (図 1-7b)。このことから本研究で作製した GU-US 遺伝子導入シロイヌナズナにより少なくとも 50 Gy 以上のガンマ線照射により相同組換えを検出することができることが明らかになった。一方で、このような高いレベルの放射線量は福島被災地において植物が浴びることは考えにくい。実際の放射線量が高い土壌においてこれらの植物によりモニタリングできるかどうかについては更に検証する必要がある。

1-4 福島県の土壌より放出されるガンマ線による相同組換え頻度の検出

1-4-1 放射性物質に汚染された土壌の採取

1-2 で検証したように本研究により作製された相同組換えモニタリング植物は比較的高線量のガンマ線に対して応答することが明らかになった。そこで、実際の放射性物質汚染土壌から放出されるガンマ線に対してこれらの植物によるモニタリングができるかどうかについて検証を行った。汚染土壌の採取は 2012 年 8 月に行った。土壌の採取は空間線量率の異なる 2 地点で行い、空間線量率の低い地点のサンプルを S1 (空間線量率 $1.307\mu\text{Sv/hr}$)、空間線量率の高い地点のサンプルを S2 (空間線量率 $9.99\mu\text{Sv/hr}$ 以上) とした。これらの各地点から表層約 5 cm までの土壌を約 15 kg ずつ採取し、現地にて 2 日間風乾させた後、独立行政法人国立環境研究所の風洞棟に持ち込んだ。採取した土壌をよく攪拌し、80~100g 程度を U-8 容器に詰めゲルマニウム半導体検出器にてガンマ線の測定を行った。各サンプルから 3 つの測定試料を作製し、ガンマ線量測定に供した (表 1-2)。その結果、各サンプルの放射線量は、S1 の Cs-134 及び Cs-137 はそれぞれ $2,028 \pm 34 \text{ Bq/kgDW}$ 及び $3,562 \pm 49 \text{ Bq/kgDW}$ であった。また S2 の Cs-134 及び Cs-137 はそれぞれ $26,729 \pm 446 \text{ Bq/kgDW}$ 及び $46,166 \pm 875 \text{ Bq/kgDW}$ であった。

表 1-2 採取地の緯度・経度、空間線量率 (地表面)

採取地	空間線量率	放射能 (Cs-137)
S1	$1.307 \mu\text{Sv/hr}$	$3,562 \pm 49 \text{ Bq/kg DW}$
S2	$9.99 \mu\text{Sv/hr}$ 以上	$46,166 \pm 875 \text{ Bq/kg DW}$

1-4-2 汚染土壌における GU-US 導入シロイヌナズナの栽培

採取した汚染土壌を用いた GU-US 導入シロイヌナズナの栽培は、独立行政法人国立環境研究所内にある震災放射線研究実験棟に設置した育成チャンバーにて行った。200 粒程度の種子を 1.5 ml チューブに入れ、1ml の 70%エタノールで表面殺菌後、エタノールを取り除き、1 ml 滅菌水で 5 回洗浄した。5 回目の滅菌水が入った状態でチューブを 5 日間、4 度に静置した。5 日後種子を汚染土壌に播種した。汚染土壌は使用前に 121 度で 20 分間処理することにより殺菌し、プラスチックバット (ハイパック角形 365 mm × 270 mm × 55 mm) に 5 cm の深さに敷き詰めた。この汚染土壌の表面に各系統の種子を 100 粒ずつ播種した。その後、気温 24 度、相対湿度 70%、PPFD $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ に設定した育成チャンバーにて栽培を行った。また、栽培にあたっては 1/2,000 倍希釈したハイポネックス原液 (ハイポネックスジャパン社製) を水とともに適宜投与した。

1-4-3 汚染土壌で栽培した植物の発芽率の測定

播種後 10 日目の汚染土壌で栽培した植物の発芽率の検証を行った (図 1-8)。その結果、空間線量の低い S1 土壌における発芽率は、#1406 系統、#1415 系統、#11 系統及び#651 系統でそれぞれ 95% (95/100)、78% (78/100)、54% (54/100) 及び 36% (36/100) であった。一方で、空間線量の高い S2 土壌における発芽率は、#1406 系統、#1415 系統、#11 系統及び#651 系統でそれぞれ 94% (94/100)、88% (88/100)、52% (52/100) 及び 30% (30/100) だった。このように各系統間で発芽率の違いは見られたものの、放射線放出量の違う土壌間での発芽率については明確な違いは見られなかった。Kovalchuk ら (1998) はチェルノブイリにおける原発事故で汚染された土壌においてシロイヌナズナの発芽率が放射線量に応じて低下していくことを報告している。本研究と Kovalchuk ら (1998) による結果の違いについては現在のところ不明であるが、試験栽培に使用した土壌の化学的・物理学的性質がウクライナと福島とでは異なる可能性があり、これが植物の発芽率に放射線感受性を変化させている可能性がある。この点については福島県の土壌物性・化学的組成を調べて比較検討する必要がある。

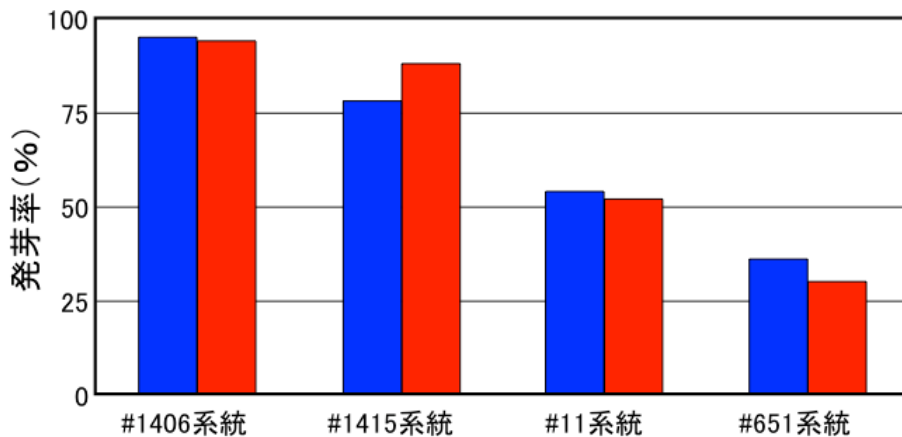


図1-8 放射性物質汚染土壌で栽培したシロイヌナズナの発芽率

異なる放射能を持つ土壌S1 (3,562 ± 49 Bq/kg DW) 及びS2 (46,166 ± 875 Bq/kg DW) にて栽培した植物を用いて播種後10日目に発芽率を調査した。青棒はS1土壌の、赤棒はS2土壌での発芽率を示す。

1-4-4 汚染土壌で栽培した植物における活性酸素の検出

過去の研究からガンマ線によるDNA損傷の75%程度がガンマ線により細胞内で生成された活性酸素により生じ、ガンマ線による直接的なDNA損傷は25%程度であることが知られている (Becker and Sevilla, 1993)。従って、汚染土壌において栽培した植物の活性酸素生成量を調べることで放射性物質に由来するガンマ線によりどの程度影響を受けているのかを推測することができる。そこで、放射能の異なる2種類の汚染土壌で栽培したシロイヌナズナにおいて活性酸素種の発生状況について解析を行った。一般に植物がストレスを受けると活性酸素種のうちヒドロキシルラジカル、スーパーオキシド (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、一重項酸素が発生する。本研究ではこれらのうち O_2^- と H_2O_2 の検出を行った。これらの活性酸素種は酸化力が弱い比較的安定しており、検出が容易である。 O_2^- の検出はNitro Blue Tetrazolium (NBT) 染色法にて行った (Jabs *et al.*, 1996)。NBT 染色液の組成は、10 mM リン酸バッファー pH 7.5、10 mM $NaNO_3$ 、0.1% NBT-塩酸塩である。3週間育てた植物の地上部を切り取り、30 mL のNBT 染色液が入った50 mL ビーカーに入れ、植物が染色液によく浸るように上からネットをかぶせて植物を沈め、真空デシケータにて400 mmHg で10分間減圧を2セット行った。その後、ビーカーにラップをかぶせ、室温に1時間静置した。静置後、 O_2^- による酸化生成物NBT-diformazan による染色をはっきりさせるため、染色液を捨てた後に脱色液 (70%エタノール、20%グリセリン) にて葉緑素を抜いた。脱色液は適宜交換し、48時間程度脱色させた植物体を試料とした。 H_2O_2 の検出はDiaminobenzidine (DAB) 染色法にて行った (Torres *et al.*, 2002)。DAB 染色液の組成は1% 3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride である。NBT 染色と同様に植物をDAB 染色液に入れ、減圧浸透後、室温にて24時間染色を行いoxidized-DAB による染色をはっきりさせるため、脱色を行った。NBT 染色により放射線量の高い土壌で栽培した植物では線量の低い土壌で育てた植物に比べて、顕著な染色像が見られた (図1-9)。一方で、DAB 染色では放射線量の違いによる染色像に大きな違いは見いだされなかった。以上の結果、高い放射線量を持つ土壌で栽培した植物では活性酸素種のうち O_2^- の蓄積が起きやすいことが明らかになった。通常の栽培条件であれば植物体内で生成した O_2^- はSuperoxide dismutase (SOD) により酸素と H_2O_2 代謝される。本研究では H_2O_2 の明確な蓄積が放射線量の高い土壌で育てた植物で見られなかったことから、おそらく土壌由来のガンマ線によりSODによる代謝能を超えた O_2^- が生成されていることが推察される。 O_2^- 自身は比較的酸化力の弱い活性酸素種であるが、これが蓄積すると H_2O_2 の蓄積が恒常的に起こり、さらにこの

H₂O₂がフェントン反応 (Fenton, 1894) により酸化力の強いヒドロキシルラジカル (•OH) に変換されるためこれが DNA 損傷量を高める可能性がある。今後は、より酸化力の強い•OH が本研究で用いた汚染土壌によってどの程度生成しているのか、また活性酸素の除去に關与する抗酸化物質、抗酸化酵素などについても調べる必要がある。

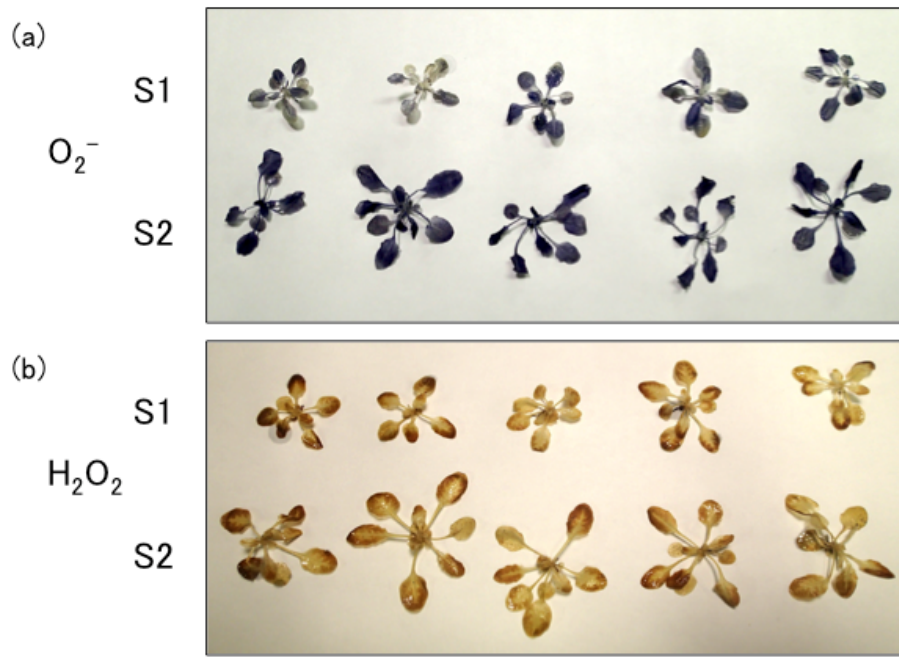


図 1-9 放射性物質汚染土壌で栽培したシロイヌナズナにおける活性酸素種の発生
異なる放射能を持つ土壌 S1 及び S2 にて 3 週間栽培した植物を用いて活性酸素生成を調べた。
(a) NBT 染色による O₂⁻ の検出、及び (b) DAB 染色による H₂O₂ の検出。

1-4-5 汚染土壌で栽培した植物における相同組換え頻度

汚染土壌において栽培した植物における相同組換え頻度は S1 及び S2 土壌において 30 日間栽培した GU-US 導入シロイヌナズナを用いて観察した。植物における GUS スポットの検出は 1-2-1 と同じ手順で行った。清浄な土壌で栽培した比較的相同組換え検出感度の低い系統である #11 系統及び #1406 系統に見られる典型的な GUS 染色像を図 1-10 (a) 及び図 1-10 (b) に示す。これらの系統では多くの植物においてほとんど相同組換えに由来する GUS スポットは検出されなかった。一方で、これらの系統を放射性物質で汚染された土壌 S2 で栽培すると、図 1-10 (c) 及び図 1-10 (d) に見られるように葉を中心に相同組換えに由来する GUS スポットが検出されるようになった。このことから本研究で用いた GU-US 導入シロイヌナズナにより、放射性物質で汚染された福島県土壌において引き起こされる相同組換え活性の増加を検出することができることが示された。次に GU-US 導入植物に生じる GUS スポットの数に對してどの程度定量性があるのかについて検証を行った。この検証に用いた土壌は、清浄土壌、S1 土壌及び S2 土壌で、30 日間の栽培において植物がこれらの土壌から受けた積算ガンマ線量はそれぞれ、2.64µGy、261µGy 及び 2,840µGy であった。このような土壌において栽培した 4 系統の GU-US 導入シロイヌナズナにおける相同組換え頻度を図 1-11 に示す。清浄土壌における個体あたりの組換え頻度は #1406 系統、#1415 系統、#11 系統及び #651 系統でそれぞれ 1.5 ± 0.17 、 10 ± 0.44 、 1.12 ± 0.2 、

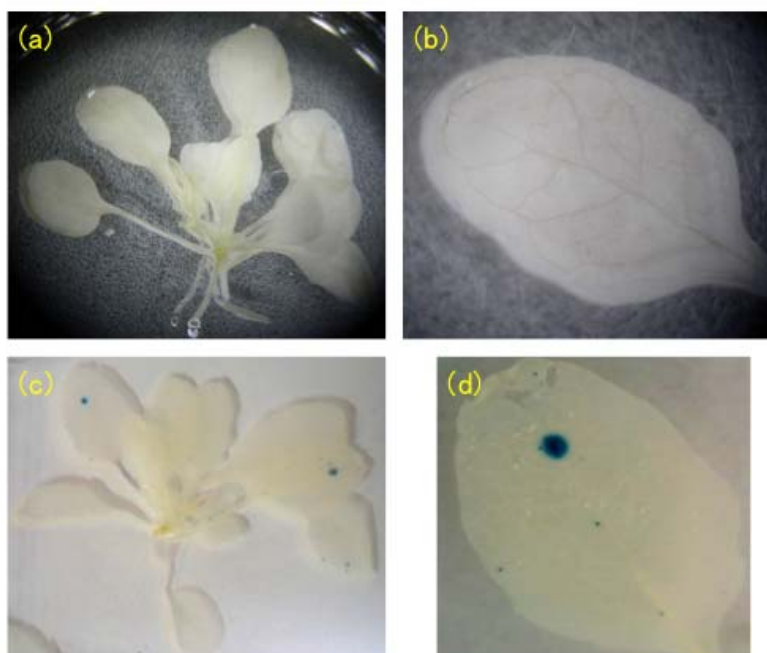


図1-10 放射性物質汚染土壌で栽培した植物における相同組換え由来のGUSスポット

清浄な土壌及び汚染された土壌 (S2) にて30日間栽培した植物における相同組換えに由来するGUSスポットの例。清浄土壌で栽培したシロイヌナズナのGUS染色像 (a) と第一葉 (b)。汚染土壌で栽培したシロイヌナズナのGUS染色像 (c) と第一葉 (d)。青紫色の斑点が相同組換え由来のGUSのスポット。

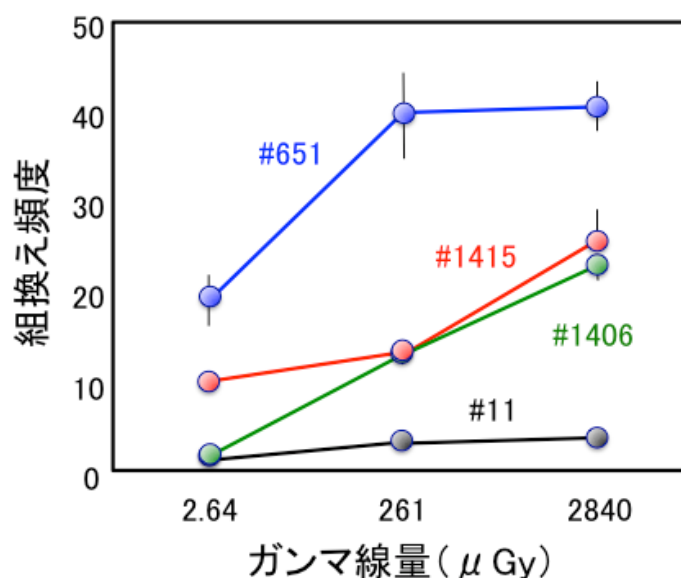


図1-11 異なる線量の汚染土壌で栽培した植物における相同組換え由来のGUSスポット数の変化

清浄な土壌 (積算線量 2.64μ Gy)、S1 土壌 (積算線量 261μ Gy) 及び S2 土壌 (積算線量 2840μ Gy) にて30日間栽培した植物における相同組換えに由来する個体あたりの組換え頻度。バーは標準誤差を示す。

及び 19.06 ± 2.65 であった。S1 土壌で育てた植物における組換え頻度は#1415を除くすべての系統で増加し、その個体あたりの頻度は#1406 系統、#11 系統及び#651 系統でそれぞれ 12.99 ± 0.58 (清浄土壌の 8.7 倍)、 3.03 ± 0.61 (清浄土壌の 2.7 倍)、及び 39.54 ± 4.8 (清浄土壌の 2.0 倍) であった。一方、S1 土壌で育てた#1415 系統における組換え頻度は 13.07 ± 1.09 と清浄土壌に比べて 1.3 倍程度しか増加しなかった。放射線量の一番高い土壌 S2 で育てた植物における組換え頻度を S1 と比較すると、#1406 系統及び#1415 系統において相同組換え頻度の増加が認められ、その頻度は 22.74 ± 1.28 (S1 土壌の 1.8 倍)、及び 25.56 ± 3.26 (清浄土壌の 2.0 倍) であった。一方で、#11 系統及び#651 系統では S2 土壌における相同組換え頻度が S1 土壌における相同組換え頻度とほとんど変化が見られなかった(#11 系統で 3.61 ± 0.98 、#651 系統で 40.49 ± 2.76)。以上の結果から本研究で用いた 4 系統の GU-US 導入シロイヌナズナのうち実際の福島の土壌放射線量に対して相同組換え頻度を定量的に示すことができるのは#1406 系統であることが明らかになった。また、#1415 系統は低線量域では定量性が低い、高線量域では#1415 系統と同程度の定量性を持つこと、また、#651 系統は低線量域における相同組換えの検出には使用できるが、感度が高いため、高線量域になると組換え頻度の検出が頭打ちになり定量性が失われることが明らかになった。さらに#11 系統は本研究で調べた放射線量の土壌では感度が低い、ため定量性が見られないことが明らかになった。

1-5 おわりに

本研究では GU-US を導入したシロイヌナズナを用いて、福島の汚染土壌におけるガンマ線に由来する DNA 損傷を相同組換え活性を介して定量的に検出することができることを示した。したがって、GU-US を導入した植物を用いて福島の土壌から放出される放射線による植物への DNA 損傷が起きる頻度を定量的に知ることができることが期待される。しかしながら、本研究で使用した植物は遺伝子組換え操作を用いて作製されているため、このまま実際の野外において土壌放射線量のモニタリングに使用することはできない。野外での使用の可能性としては、この植物を「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律 (カルタヘナ法)」に基づいて拡散防止措置を取らないで環境中にて使用する「第一種使用等」に申請する方法がある。しかし、この方法は申請手続きが煩雑であるため認可まで時間が必要なこと、また、シロイヌナズナ自体が研究室での栽培を前提としたモデル植物であり、強光などのストレスにさらされる野外においてストレスを受けることなく栽培することは難しい。したがって、本研究で使用した植物は 1-3-5 で行ったように汚染された土壌を栽培室内に持ち込んで、管理された環境下において放射線量の影響を調査するのに向いているであろう。一方で、GU-US を導入した植物において相同組換えに由来する GUS のスポットが観察された部位では、相同組換え活性が高まっていることから、元々シロイヌナズナのゲノム中に内在する相同組換えが起こりやすい領域において GU-US と同様に組換えが起こっている可能性が高い。したがって、この植物で観察される GUS スポット周辺を切り出すことにより相同組換えイベントの起こった組織を濃縮して取り出すことができる。こうして得られた組織を用いてゲノム配列を解読し、GUS スポットを呈していない組織におけるゲノム配列と比較する事により、導入した GU-US コンストラクトに依存しない新たな相同組換えマーカ領域を見つけることができるかもしれない。こうして見つかった領域は遺伝子組換え操作を行っていない植物体においても相同組み換えを起こしている可能性があるため、遺伝子組換えに依存することなく DNA 損傷をモニタリングするマーカーになる可能性を秘めている。

引用文献

1. Møller, A. P. et al. (2012) *Environmental Pollution*, 164: 36-39.
2. Hiyama, A. et al. (2012) *Scientific Reports*, 2: Article number: 570. Kovalchuk, I. et al. (1998) *Nature Biotechnology*, 16: 1054-1059.
3. Becker, D. and Sevilla, M.D. (1993) *Advanced Radiation Biology*, 17: 121-180.
4. Jabs, T. et al. (1996) *Science*, 273: 1853-1856.
5. Torres, M. A. et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99: 517-522.
6. Fenton, H. J. H. (1894) *J. Chem. Soc., Trans.* 65: 899-911.

2 植物の生殖器官に対する低線量環境放射線影響の実態調査

2-1 はじめに

福島第一原発の事故により環境中に大量の放射性セシウムが放出された。その結果、福島県浪江町や飯舘村では広い面積にわたり空間線量率が $1\mu\text{Sv/h}$ を超える放射線が検出されている。これらの地域では、今後長期間にわたり空間線量率が高い状態が続くと予想され、植物にも何らかの影響がおよぶことが懸念されている。過去の研究を調べると植物に放射線を暴露した研究は非常に多いが、そのほとんどはガンマフィールドでコバルト60由来の非常に高い線量（福島県内の最も線量の高い地域の100倍以上）を照射した研究である（IRB 1962, 1973）。チェルノブイリ原発事故後の植物への影響を調べた研究を見ると、「原発近傍のマツの葉が赤化して枯れた。」という結果が公表されているが、これも我々が研究対象としている地域と比較して、その放射線量は桁違いに高く、その結果を福島県に外挿することはできない（Arkhipov et al. 1994）。よって、福島第一原発事故による放射線の植物への影響を調べるには、実際に福島県内の空間線量率がことなる地域を選定して、植物への影響を長期間にわたってモニタリングする必要がある。

モニタリング対照の植物種としては、遺伝的背景の違いや放射線量以外の環境の違いを排除する必要があることから、長期間同じ場所にとどまっている木本類でかつ、遺伝的な背景が均一な種を選ぶか、遺伝的な背景が均一な種子を播種して長期的に栽培できる種が望ましい。以上の様な観点でモニタリング対照植物種を選定した結果、サクラとアサガオを選定した。サクラは国内各地に植樹されており、それらのほとんどはソメイヨシノの由来で、遺伝的に均一であることが知られている（Tsuda et al. 2009, Kato et al. 2012）。しかも文部科学省が福島県内に設置したモニタリングポストの近傍にはサクラが植樹されているため、正確な暴露量を算出することが可能である。次に、アサガオは園芸植物として古くから親しまれており、種子の色・花色・花卉の形態といった形質の変化を観察することで、放射線の影響評価を行うことが可能な材料である。また、ESTが公開されているため、ストレスを受けたときに機能する遺伝子群の発現状態を調べることが容易である。本研究ではサクラとアサガオを用いて、放射線の植物への影響について、花粉の未熟率や種子の形態変異、あるいはストレス遺伝子の発現量を指標として調査をおこなった。

2-2 サクラの花粉熟成に対する影響

2-2-1 材料と方法

サクラの花序の採取と固定

表2-2に示した地点で開花していたサクラより、花序を1個体あたり50個採取した。採取した花序は、湿った濾紙を入れた密閉容器に入れて持ち帰り、放射線量が十分低いことを確認後、花卉を取り除き、残った部分をカル

ノイ液（エタノール：クロロホルム：酢酸6:3:1）に浸漬して固定をおこなった。固定した試料はカルノイ液に浸漬した状態で、分析に供するまで4°Cで保管した。

花粉の染色と成熟率の算出

花粉の染色はRoss et al. (2010) の方法に従った。葯が開裂していない雄しべをスライドグラスにのせ、染色液を1滴垂らしカバーグラスをかけて雄しべを押しつぶした。染色液の組成は以下の通りである。染色液：9.5%エタノール、25%グリセロール、0.05%酸性フクシン、0.01%マラカイトグリーン、0.005%オレンジG、4%酢酸。プレパラートを65°Cで3分間熱処理して花粉を染色した。染色された花粉を光学顕微鏡で観察し、4,000~40,000万個の花粉をデジタルカメラで撮影した。

正四面体状の赤く染色されている花粉を成熟した花粉とし、青く染色されている楕円形の花粉を未熟花粉とした。撮影した写真をImage Jによって画像処理をおこない、赤く染色されている花粉の数を計測した。青く染色されている未熟花粉の数は、目視によって数えた。

サクラ花序からのDNAの抽出

カルノイ液で固定された花序から雄しべ、雌しべ及び胚珠を除去した。残った組織の重量を測定し、5mLのプラスチックチューブに入れた。20mgの組織に対し、3mLの水を加えてゆっくりと10分間攪拌した。チューブ内の水を捨て、もう一度3mLの水を加えて、再度10分間攪拌し、水を捨てることにより、組織に含まれる酢酸を除去した。この様に洗浄した組織を用いてキアゲン社のDNA精製キットを用いてDNAを抽出した。

SSRマーカーによる品種検定

採取したサクラの品種を調べるために、Tsuda et al. 2009およびKato et al. 2012の論文に記載されている、13対のマイクロサテライトマーカー（SSR）増幅用のPCRプライマーを作成した。プライマーの一方は5'末端を蛍光物質で標識した。マーカーの名称、標識した蛍光色素の名称と色を表2-1に示した。これらのプライマーを用いて、サクラのDNAをテンプレートにしてPCRを2720Thermal Cycler（アプライドバイオシステムズ）を用いて行い、増幅されたSSRの長さをDNAアナライザーで分析した。塩基配列の長さの基準として、市販のGeneScan LIZ Size Standardを用いた。DNAアナライザーで得られたデータからSSRの長さを解析するためにPeak Scanner 2を用いた。

反応液組成: 全量20 μ Lに以下のものを含む。DNA 1-10 ng, EX-Taq polymerase (Takara) 0.5U, プライマー各0.2 μ M、業者提供の反応バッファー。

反応条件: 最初の熱変性94°Cで3分。引き続き 94°C で30秒, 55°C 30秒, 72°C 45秒を30サイクル。最後に72°Cで7分の伸長反応をおこなった。

・空間線量率の算出

採取地点の空間線量率は文部科学省放射線モニタリング情報よりデータをダウンロードして用いた。

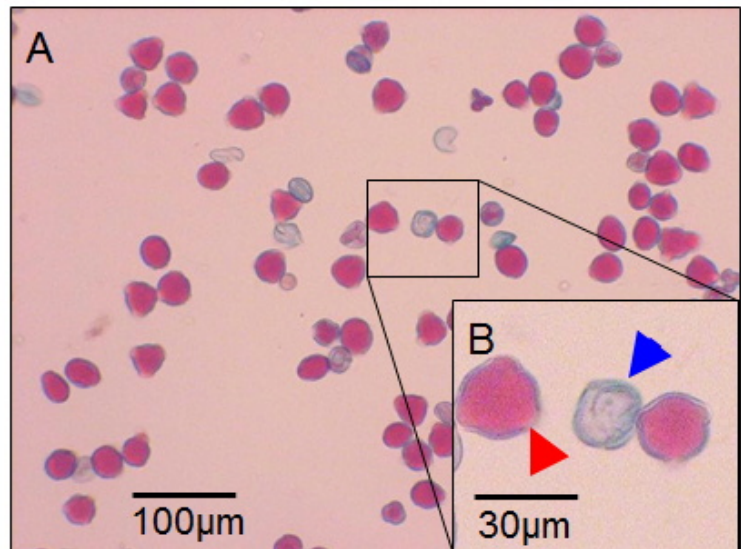


図2-1 サクラの花粉の染色写真

赤く染色されているのが、成熟花粉（赤矢印）。青く染色されているのが未熟花粉（青矢印）

2-2-2 結果

平成12年4月6日に、国立環境研究所内で咲いていたサクラの花序を採取した。平成12年4月11日に三重県保健環境研究所、5月2日に飯館村、浪江町を訪れ、サクラの花序を採取した。採取した場所の空間線量率を表2-2に示した。各個体からDNAを抽出し、品種同定用のSSRマーカーを用いて採取したサクラの品種を検定した。13対のプライマーを用いてPCRをおこなったところ、すべてのDNAについて、すべてのプライマーの組み合わせで、ほぼ同じ塩基配列長のDNAが増幅された。これらの結果を表2-1に示した。また、それぞれのプライマーで増幅されたDNAの長さをKato et al.

2012の論文と照合したところ、ソメイヨシノ系のサクラが最も類似していた。

次に、開花直前の花序より雄しべを採取して、染色液で染色後、顕微鏡で観察した。サクラの花粉は正四面体構造をとっており、成熟した花粉は細胞内のタンパク質が塩酸フクシンと反応するため、赤色に染色された。一方、未熟花粉の形状は卵形であり、マラカイトグリーンにより青色に染色された(図2-1)。各個体の花粉

を染色して、計測した花粉の総数と未成熟花粉の数および未熟花粉の割合を測定地点ごとに表2-2示した。未熟花粉の割合と空間線量率との関係をグラフにしたところ、有意な相関は認められなかった(図2-2)。

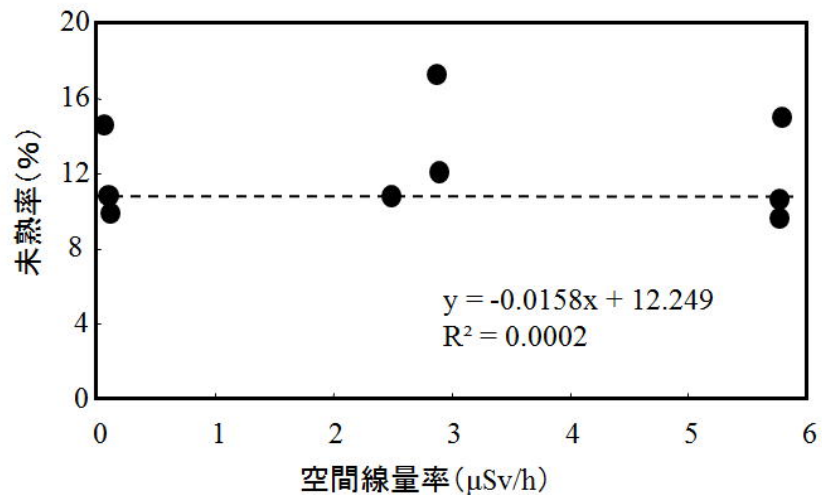


図2-2 空間線量率と花粉の未熟率との関係

詳細な値は表2-2を参照。

2-2-3 考察

採取したサクラからDNAを抽出して、サクラの品種を検定するSSRマーカーで検定したところ、すべてのマーカーでDNAの由来によらず、ほぼ同じ大きさのSSRが増幅された。このことから、採取した個体の遺伝子型がほぼ同一であると言える。一部のマーカーでは1塩基のずれが生じていたが、同時に2つ出現する他のマイナーピークもすべて1塩基ずれていたことから、電気泳動の際のわずかな分析条件の差で見かけ上1塩基の違いが出たものと考えられる。

各マーカーの遺伝子型をKato et al. 2012の論文で確認したところ、遺伝子型が最もよく似ている品種はソメイヨシノであった。以上のことから採取したサクラは遺伝的に均一であることは確実で、おそらくすべてソメイヨシノであると推定された。今後は、ソメイヨシノであることが確実にわかっている樹木から採取したDNAを入手して、同様の分析をおこない、本研究の結果と比較することで、採取した試料がソメイヨシノであることを確定する予定である。

図2-2に示した様に、花粉の未熟率と空間線量率を比較したところ、両者に有意な相関は見られなかった。三重で採取した試料では、未熟率が高かった。花粉の未熟率は、花粉の登熟時期の気温や降水量に大きく依存する。三重の試料で未熟率が高かったのは、開花時期の気温変化が影響したのかもしれない。実際に平成24年4月上旬の三重県北部では最低気温が2~5℃とこの時期として異常な低温を記録していた。開花直前の低温の影響で未熟

率が上がってしまった可能性がある。一方、空間線量率の高い飯館中や津島小の試料でも未熟率が高かったことから、これが放射線の影響によるものであることを否定できない。

平成24年度の調査は採取許可取得が開花期に間に合わず、許可が出た時点で満開を過ぎていた場所もあったため、空間線量率の異なる地点として5地点しか採取できなかった。また、本研究では0.1%程度の精度で未熟率を算出しようとしたので、検査する花粉の数を10,000個以上とした。しかし、サクラの花粉の未熟率は10%以上であることが明らかとなった。この程度の未熟率なら、計測する花粉数を半分程度に減らすことが可能であるので、来年度以降は計測する花粉数を減らして、採取する個体数を増やしてデータを蓄積する予定である。なお、長泥コミュニティセンターは昨年8月以降立ち入り禁止になったので、代替地点を探す必要がある。

表2-1 サクラのSSR マーカーの解析結果

マーカーの名称	AM287648	AM287842	AM288205	AM290339	DW358868
蛍光色素の名称と色	青 6-FAM	緑-VIC	黄-NED	赤-PET	緑-VIC
長泥CC A	289	143, 162	178, 181	190	265, 267
長泥CC B	289	143, 162	178, 181	190	265, 267
津島中学校	288	143, 162	177, 180	189	265, 267
三重県保健環境研究所	288	143, 162	178, 181	190	265, 267
津島小学校	288	143, 162	178, 181	190	265, 267
飯館中学校A	288	143, 162	177, 180	190	265, 267
飯館中学校B	288	143, 162	177, 180	190	265, 267
国立環境研究所 A	288	143, 162	177, 180	190	265, 267
国立環境研究所 B	288	143, 162	177, 180	190	265, 267

マーカーの名称	DN553427	DN554499	DY640364	DY640849
蛍光色素の名称と色	青 6-FAM	緑-VIC	黄-NED	赤-PET
長泥CC A	200	217, 219	236	300, 319
長泥CC B	200	217, 219	236	300, 319
津島中学校	200	217, 219	236	300, 319
三重県保健環境研究所	200	217, 219	236	300, 319
津島小学校	200	217, 219	236	300, 319
飯館中学校A	200	217, 219	236	300, 319
飯館中学校B	200	217, 219	236	300, 319
国立環境研究所 A	200	217, 219	236	300, 319
国立環境研究所 B	200	217, 219	236	300, 319

マーカーの名称	DY646168	DY647422	DY652293	DN556408
蛍光色素の名称と色	青 6-FAM	緑-VIC	黄-NED	赤-PET
長泥CC A	265	159	297, 299	187, 190
長泥CC B	265	159	297, 299	187, 190
津島中学校	265	159	297, 299	187, 190
三重県保健環境研究所	265	159	297, 299	187, 190
津島小学校	265	159	297, 299	187, 190
飯館中学校A	265	159	297, 299	187, 190
飯館中学校B	265	159	297, 299	187, 190
国立環境研究所 A	265	159	297, 299	187, 190
国立環境研究所 B	265	159	297, 299	187, 190

マーカーの名称はKato et al. 2012およびTsuda et al. 2009による。表中の数字は増幅されたSSRの塩基配列長を表す。2つの数字が記入されているものは、2つのSSRが増幅されることを示す。

「長泥CC」は長泥コミュニティーセンターを表す。

表2-2 サクラの採取地点および空間線量率と花粉の未熟率

県名	市町村名	採取場所	空間線量率 ($\mu\text{Sv/h}$)	総花粉数	未熟花粉数	未熟率 (%)
三重県	四日市市	三重県保健環境研究所	0.045	5016	727	14.5
茨城県	つくば市	国立環境研究所A	0.17	48566	4837	10.0
茨城県	つくば市	国立環境研究所B	0.17	39248	4198	10.7
福島県	浪江町	津島小学校	5.8	25175	3764	15.0
福島県	浪江町	津島中学校	2.5	12635	1351	10.7
福島県	飯館村	飯館中学校A	2.9	15869	2744	17.3
福島県	飯館村	飯館中学校B	2.9	34251	4052	11.8
福島県	飯館村	長泥CC A	5.8	18385	1899	10.3
福島県	飯館村	長泥CC B	5.8	23954	2295	9.6

「長泥CC」は長泥コミュニティーセンターを表す。

引用文献 (なお、webは2014年11月10日にチェックした。)

1. Arkhjpov, NP. et al. (1994) Science of the Total Environment 157, 383-386.
2. IRB (The Institute of Radiation Breeding). (1962) Proceeding of Gamma Field Symposia.
3. IRB (The Institute of Radiation Breeding). (1973) Proceeding of Gamma Field Symposia.
4. Kato, S. et al. (2012) Breeding Science 62, 248-255.
5. Ross, P., Slovin, J.P., Chen, C. (2010) Int. J. Plant Bio. 1, e13.
6. Tsuda, Y. et al. (2009) Conserv. Genet., 10, 685-688
7. 放射線モニタリング情報 <http://radioactivity.nsr.go.jp/map/ja/download.html>

2-4 アサガオの生殖器官と遺伝子発現に対する影響調査

2-4-1 材料と方法

アサガオの栽培と試料採取

低線量環境放射線のアサガオの生殖器官に対する影響があるかどうかを調べるため、アサガオ品種スカーレットオハラ（国立環境研究所で保持、以後「SO」と記載）、並びに東京古形標準型（九州大学大学院理学研究院生物科学部門仁田坂英二博士より提供、以後「TKS」と記載）を用いて、生殖器官の形態形成等への影響を空間放射線量の異なる各地で調べた。福島県郡山市、茨城県つくば市、埼玉県加須市、東京都江東区、神奈川県平塚市、千葉県市原市、愛知県名古屋市、福岡県太宰府市の各地の研究機関の敷地内において、地植え、もしくは各地の土壌を入れたプランターを用いて野外で栽培したアサガオを用い、花器・花色・種子の色や形態変化と空間放射線量との関係を調査した。各地の空間放射線量については、文部科学省（現・原子力規制委員会）放射線モニタリング情報（文部科学省、2012）より、各研究機関敷地内または最寄りの測定地点のデータをダウンロードした。各地における栽培開始日、試料の採取日、葉試料の検体数、試料採集までの栽培日数と積算放射線量を表2-3に示す。

表2-3 アサガオの栽培、試料採集状況と放射線量

場所	栽培開始日	葉試料採集日	検体数	栽培日数	積算放射線量 (μSv)	種子試料採集 終了日	栽培日数	積算放射線量 (μSv)
郡山	2012/6/18	2012/7/17	4	29	419.8	2012/12/5	170	3764.8
		2012/9/24	4	98	1768.3			
つくば	2012/6/8	—	—	—	—	2012/11/5	150	383
加須	2012/5/18	2012/6/18	3	31	43.3	2012/10/11	146	347.6
		2012/7/26	2	69	95.1			
		2012/9/21	1	126	250			
東京	2012/6/11	2012/7/24	5	43	60.3	2012/11/16	158	329.7
平塚	2012/6/4	2012/6/28	3	24	25.8	2012/11/5	154	243.8
市原	2012/5/18	2012/6/21	1	34	51.3	2012/10/11	146	318.6
名古屋	2012/5/17	2012/6/18	3	32	49.4	2012/10/22	158	398.1
大宰府	2012/5/14	2012/7/6	3	53	77.1	2012/11/12	182	413.9

葉の遺伝子発現解析

葉は採取後、ただちに適当量のRNAlater（Life Technologies Co., Carlsbad, CA, USA）に浸漬して4°Cで一晩静置後、-20°Cで保存し、RNA調整時に解凍した。Total RNA調整にはRNeasy Plant mini kit（QIAGEN, Hilden, Germany）を用いた。各試料から調整したtotal RNAを用いてOmniscript RT kit（QIAGEN）により逆転写反応を行い、cDNAを合成した。放射線影響のマーカーとなる可能性の示唆されている酸化的ストレス反応またはDNA修復に関わる4つのシロイヌナズナ遺伝子（Kovalchuk et al., 2004）と最も高い相同性を持つアサガオESTクローンからなるcontig配列（基礎生物学研究所星野敦博士データベースNIBB Japanese morning glory cDNA Databaseによる。以後、便宜的に「遺伝子」と呼ぶ）、及び対象となるアサガオのアクチン（*Actin4*）の各々の塩基配列の特異プライマーを設計した。これらを用いて、合成したcDNAを鋳型にPCR（94°C3分、94°C1分、55°C2分、72°C3分）25サイクル、72°C10分）を行い、それぞれの発現量を調べた。PCR産物を電気泳動し、臭化エチジウムにより染色した後、

画像解析ソフトImage J (Rasband, 1997-2012) による発現量の数値化を行い、アクチンに対する他の遺伝子の相対発現量の値を得た。

種子の形態調査

各地で採取した種子試料について、形態が正常な種子と異常な種子に分け、それぞれ計数した。大きさが小さい、形がいびつ、種皮の一部の色が薄い、種皮が割れている種子について、形態が異常な種子とした。種子の形態の例を図2-3に示す。

種子試料の放射能濃度測定

種子試料中の放射能濃度測定のため、ゲルマニウム (Ge) 半導体検出器を用い、I-131、Cs-134、Cs-137の放射核種分析を行った。形態の正常、異常に関わらず、乾燥させた各試料を約10gずつ計量し、ミルサーで粉状にした後、50ml容量のU-8容器に入れて測定時間14,400秒で分析した。放射核種分析はいであ株式会社 (東京、日本) によって行われた。

2-4-2 結果

遺伝子発現と放射線量

葉における各遺伝子の相対発現量と積算放射線量との相関を図2-4に示す。

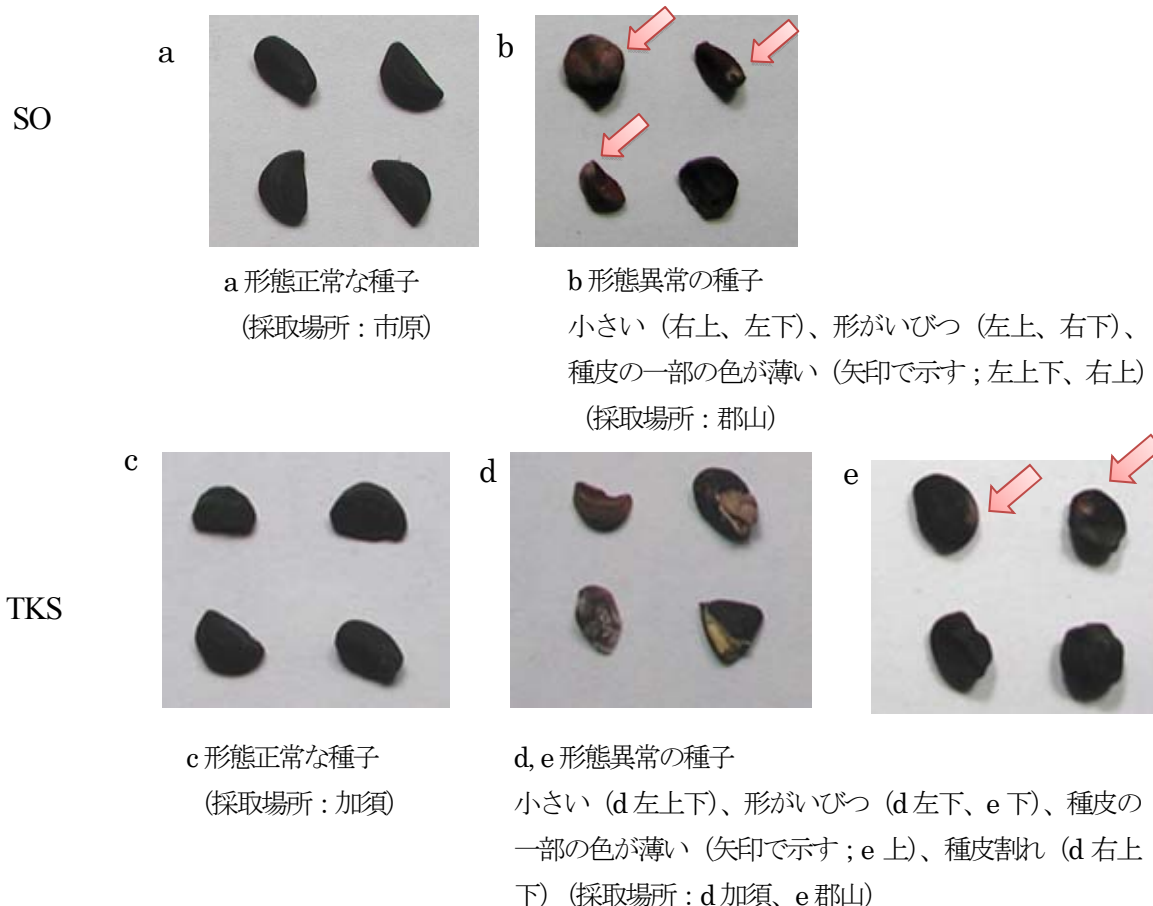


図2-3 アサガオ種子の形態

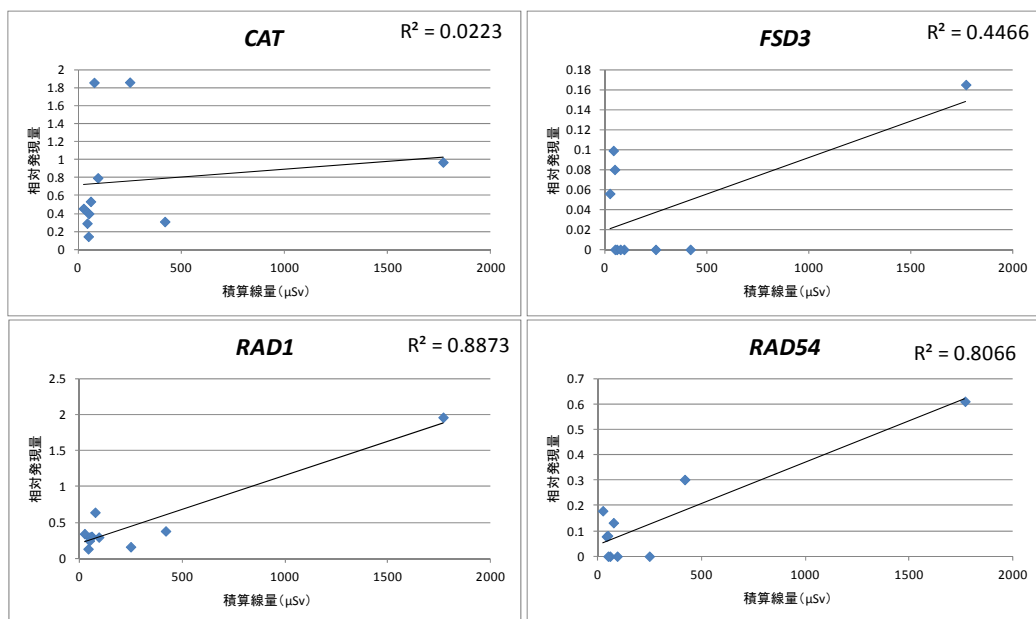


図2-4 葉における各遺伝子の相対発現量と積算放射線量の相関

相対発現量は、*Actin4* の発現に対する相対値で、同日に同一場所で採取した各試料から得られた値の平均値。検体数については表 2-3 参照。R は相関係数。

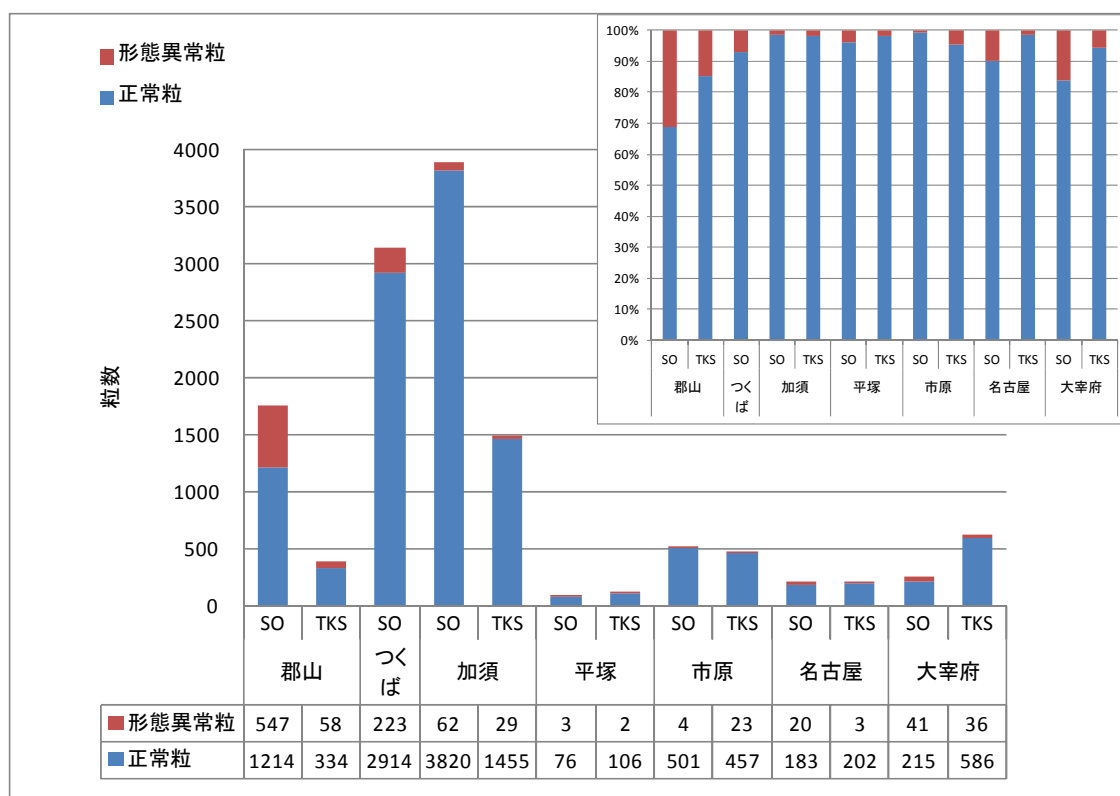


図2-5 各地における正常および形態異常のアサガオ種子数と形態異常率

チェルノブイリの原発事故において、高線量の環境放射線に暴露されたシロイヌナズナで発現が調べられた4つの遺伝子 (Kovalchuk et al., 2004) に注目した。そのうち、2つの遺伝子の相対発現量については積算線量との有意な相関は認められなかったが、残りの2つの遺伝子については有意な相関が認められた。一方、これらの遺伝子の相対発現量と栽培日数の相関を調べたところ、 R^2 は各々0.5509、0.0079、0.1529、0.0308であり、積算線量と相関が認められなかった1つの遺伝子の発現量と栽培日数の間に弱い相関が認められたが、他は相関は認められなかった。

種子の形態異常率と放射線量

正常および形態異常のアサガオ種子数と形態異常率を図2-5に示す。また、種子の形態異常率と積算放射線量との相関を図2-6に示す。なお、東京において得られた種子 (SO、8粒) は数が少なかったため図には載せていないが、全て正常な形態であった。なお、各地で栽培したアサガオ花器の形態や花色に異常は観察されなかった。

各地の種子試料に於いて、ある程度の形態異常が認められた。SOでは各地の平均形態異常率が10.03%、TKSでは5.1%で、SOの方が高い異常率であった。郡山ではSO (31.06%)、TKS (14.8%) 共に最も高い異常率を示した。形態異常とした「大きさが小さい、形がいびつ、種皮の一部の色が薄い、種皮が割れている」のうち、種皮割れは加須の試料のみで観察されたが、他の3つの形態は各地の試料で観察された。

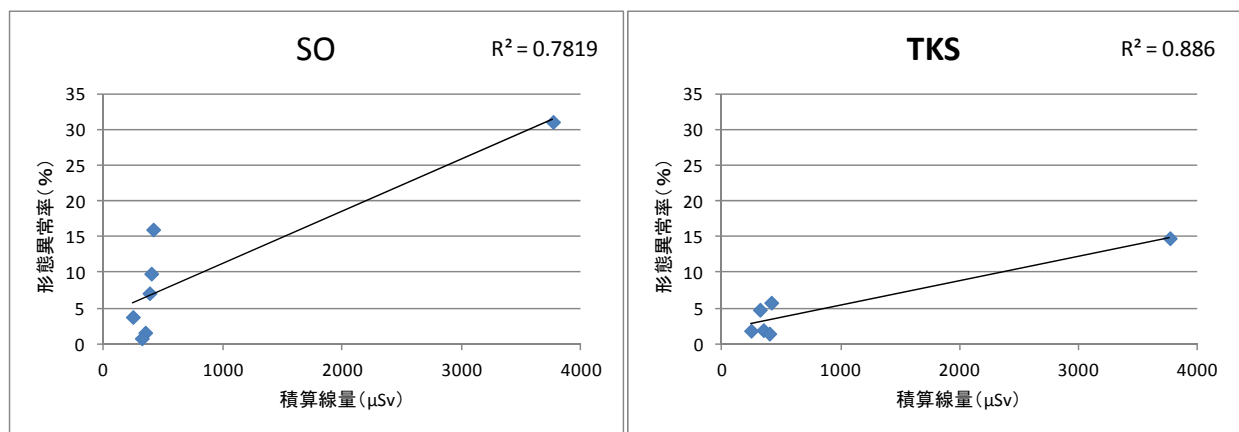


図2-6 種子の形態異常率と積算放射線量との相関 (Rは相関係数)

SO、TKSの2品種とも種子の形態異常率と積算線量に相関が認められた。形態異常率と栽培日数の相関を調べたところ、SOとTKSにおける R^2 は各々0.5806、0.2698であり、SOにおいては弱い相関が認められたものの、積算線量との相関に比べると低かった。種子試料の放射能濃度：種子試料中の放射核種分析結果を表2-4に示す。

表2-4 種子試料中の放射核種分析

—は不検出を示す。各分析値の減衰補正は行っていない。

地域	品種	試料重量 (g)	I-131 分析値 (Bq/kg)	I-131 検出下限値 (Bq/kg)	Cs-134 分析値 (Bq/kg)	Cs-134 検出下限値 (Bq/kg)	Cs-137 分析値 (Bq/kg)	Cs-137 検出下限値 (Bq/kg)
郡山	SO	9.723	—	9.9	46	9.4	93	10
	TKS	9.666	—	10	82	11	140	12
加須	SO	10.034	—	8.6	—	8.8	—	10
市原	SO	9.665	—	8.3	—	9.8	—	9.4
名古屋	TKS	9.628	—	8.9	—	10	—	9.7
大宰府	SO	9.619	—	9.1	—	11	—	12

I-131はどの試料からも検出されなかった。Cs-134、Cs-137は郡山の試料からある程度検出されたが、他の地域の試料からは検出されなかった。

なお、郡山においてアサガオ栽培に使用した土壌は福島県環境センター内の花壇の土壌を用いたが、2012年6月8日現在、その放射能濃度はI-131が不検出(検出下限値10.8 Bq/kg)、Cs-134が3303.9 Bq/kg(検出下限値14.4 Bq/kg)、Cs-137が5090.1 Bq/kg(検出下限値16.1 Bq/kg)であった(サンプル重量1.542kg、1Lマリネリビーカー使用、測定時間3600秒)。また、2012年9月19日現在、郡山で採取したアサガオ葉の放射能濃度はI-131が不検出(検出下限値60.8 Bq/kg)、Cs-134が不検出(検出下限値99.9 Bq/kg)、Cs-137が97.4 Bq/kg(検出下限値88.6 Bq/kg)であった(サンプル重量60 g、100ml U-8容器使用、測定時間1800秒)。

2-4-3 考察

原子力発電所の事故により放出された放射性物質による生体への放射線の長期的影響では、主としてCs-134やCs-137からのβ線(内部被曝)やγ線(外部被曝)により引き起こされる酸化的ストレスとDNA損傷が問題となる。植物では、実験植物のシロイヌナズナで放射線影響のマーカーとなる可能性のある遺伝子が報告されている(Kovalchuk et al., 2004)。今回、各地で栽培したアサガオで、これらの遺伝子に対応する配列の発現を調べたところ、DNA修復に関わる遺伝子の発現と積算放射線量に正の相関がある(環境放射線の高い郡山の試料において発現量も高い)という結果が得られ、DNA損傷とその修復機能の働きに環境放射線の影響があることが示唆された。ただし、発現を調べた遺伝子に関し、アサガオにおける実際の塩基配列の詳細な情報や発現調節に関する情報は未確認であり、今後の精査や再現性の確認が必要である。

環境放射線の生殖器官への影響としては、種子の形態の異常率と積算放射線量に正の相関があることが示され、種子形成に環境放射線の影響がある可能性が示唆された。しかし、アサガオ種子の形態異常と周囲の環境等との関連はこれまで調べられていない。形態形成に対する気温など他の要因の影響も排除できないことから、郡山と同様の気温で放射線量の低い栽培地を検討する等、今後の再現性の確認が必要である。

今回はアサガオの栽培に各地の栽培場所の土壌を用い、アサガオ種子等の形態や葉における遺伝子発現に対する各地の環境放射線の影響の有無の確認を試みた。今回、郡山における土壌からアサガオの葉と種子への放射能の移行係数は各々 1.16×10^{-2} (SO葉)、 1.66×10^{-2} (SO種子)、 2.64×10^{-2} (TKS種子)であった。今後は、空間放射線量の影響、すなわち外部被曝の影響を定量的に示すため、園芸培土などの土壌を用いることを検討したい。また、各地の空間放射線量は、郡山市で他の各地よりも高い他は、それほど差がなかった。今後、植物の生殖器官・組織に対する空間放射線量の影響を定量的に示すには、各地と郡山の中間程度の線量の場所や、郡山よりも高い線量の場所でアサガオを栽培することを検討する必要がある。

材料のアサガオについては、栽培が容易で古くから親しまれている園芸植物であり、特にSO、TKSはこれまでに環境ストレス評価に用いてきたことから選定した。今後、放射線影響のマーカー遺伝子を利用していく可能性をふまえ、遺伝的に均一で、遺伝子情報のデータベースに用いられている品種ムラサキについても導入を検討したい。

引用文献 (なお、webは2014年11月10日にチェックした。)

1. Kovalchuk, I. et al. (2004) Plant Physiology 135: 357-363.
2. Rasband, W.S. (1997-2012), ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>
3. 放射線モニタリング情報 <http://radioactivity.nsr.go.jp/map/ja/download.html>

3 野生齧歯類を指標とした放射線生物影響の長期モニタリング

3-1 はじめに

福島第一原発の事故で放出された放射性物質によって野生生物に何らかの影響が生じる可能性がある。特にセシウム134および137からのガンマ線による影響が懸念される。ガンマ線を含む放射線による被ばくで現れる影響は身体的影響と遺伝的影響に分類できる。身体的影響とは放射線に被ばくした身体に現れる影響で、子孫に影響が現れる場合を遺伝的影響という。身体的影響の具体例には急性死、皮膚の紅斑、脱毛、不妊、白内障等がある。臓器では特に骨髄、精巣、卵巣、腸上皮、水晶体に影響が現れやすい。遺伝的影響とは生殖細胞に生じた突然変異が原因で発生するもので、具体例として遺伝病をあげることができる。

ガンマ線の影響は、主に被ばくで細胞内に発生する活性酸素がDNA損傷することで引き起こされる。活性酸素によるDNA損傷の主な様式はDNA塩基の化学的変異である。したがってDNA塩基の化学的変異を定量することによって、細胞内の活性酸素量を知ることが可能となり、ひいてはガンマ線がどの程度DNA損傷を引き起こしているのか間接的に評価できる。8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) は活性酸素によってグアニン塩基が酸化されて形成されるもので、活性酸素によるDNA塩基の化学的変異の一種である(図3-1)。8-OHdGは生体内で安定性が高いため、DNA以外にも血液や尿で定量することが可能である。そのため、8-OHdGは活性酸素が原因のDNA損傷を検出するマーカーとして利用されている。

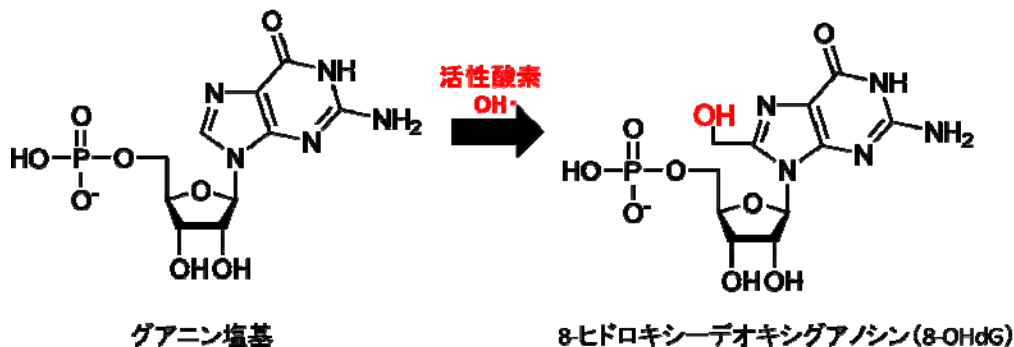


図3-1 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) の形成過程

グアニン塩基の酸化が原因

国際放射線防護委員会は放射性物質による生態系への影響を調べる際、ネズミ科の生物を「推奨動植物」に指定している。そこで、アカネズミ (*Apodemus speciosus*) をモデル動物として、以下の4項目について調査、研究を今年度実施した。

- 福島県におけるアカネズミの繁殖期の把握 (精巣の細胞分裂が盛んな時期に合わせて捕獲を行い、放射線影響の検出感度を上げるため)

- 活性酸素が原因のDNA損傷を検出するマーカーである8-OHdGの蓄積状況を、細胞分裂が盛んで放射線の影響が出やすいと考えられる繁殖期の精巢で調査し、現在の放射線量によってアカネズミに身体的影響が発生する可能性があるのか検討する。
- 放射線影響を培養細胞における染色体異常などで評価できるようにするため、皮膚組織を利用して細胞培養を試み、培養条件の検討を行う。
- 遺伝的影響を評価するために利用できるマーカーを開発する。

3-2 材料と方法

3-2-1 アカネズミの捕獲

福島第一原発から30km圏内（以下、「30km圏内」とする）で、空間線量率が17.45-20.63 μ Sv/hの地点（以下、「30km圏内（高）」とする）および空間線量率が6.84 μ Sv/hの地点（以下、「30km圏内（低）」とする）、合計2カ所において捕獲を実施した。また、対照地を富山県立山町および青森県十和田市に設定し捕獲を行った。シャーマントラップ（折りたたみ式生け捕り罠）を林内山道の脇または林縁部に、概ね10m毎に1基設置した。誘因餌には加熱して発芽阻害処理をしたヒマワリの種を用いた。捕獲地ごとの毎回（月）の罠の設置数は80～150基であった。罠の設置は午後14～18時に、罠の回収（捕獲個体の回収）は設置翌日の午前8～11時に行った。捕獲は毎月1回（1～2晩）、30km圏内は8～11月、富山県は5～11月、青森県は9～11月に行った（表3-1）。

表3-1 罠の設置期間

	5月	6月	7月	8月	9月	10月
福島県	—	—	—	9～10日	10～11日	18～19日
富山県	29～30日	29～30日	24～25日	30～31日	27～28日	24～25日
青森県	—	—	—	—	4～6日	15～16日

表3-2 各部位の処理法

部位	処理
肝臓・精巢	ブアン液またはホルマリン浸漬
	ISOGENまたはQIAZOL浸漬 - 30℃凍結保存
腹腔内消化管	エタノール浸漬
精巢上体	ブアン液またはホルマリン浸漬
子宮	ホルマリン浸漬
頭部	エタノール浸漬
残りの体	- 30℃凍結保存

30km圏内で採集した個体は、ワナ回収後1時間以内に野外で頸椎脱臼による安楽殺を行い、氷で保冷をし、国連規格容器内に入れ、国立環境研究所（つくば市）まで持ち帰った。研究所内（風洞棟）で空間線量計を用いて簡易的に放射性物質による汚染が軽度であることを確認後、解剖・採材を行う野生動物検疫施設に搬入した。富

山県および青森県で採集した個体は、生きたまま解剖・採材場所まで持ち帰り、頸椎脱臼あるいはジエチルエーテルで安楽殺を行った。富山県では富山大学理学部（富山市）、青森県では北里大学獣医学部（十和田市）にて、解剖・採材を行った。ワナ回収から安楽殺までの時間は富山県および青森県で2時間であった。

安楽殺後、全長、尾長、および体重を計測後、精巣の位置（雄）、乳頭の発達および膣の開口（雌）を確認した。開腹し、肝臓、腹腔内消化管、精巣および精巣上体（雄）、卵巣および子宮（雌）を採取した。精巣重量（雄）および卵巣・子宮重量（雌）を計測した。この他、富山県で捕獲したアカネズミ7個体からは皮膚組織を採取し、それを染色体異常検出用細胞の培養条件検討に利用した。その後、臼歯の摩耗による齢査定（1）と頭骨標本作成のため頭部を切断し、残りの胴体部分は放射性物質の定量のため -30°C にて冷凍保存した（詳細は後述）。各部位の処理法を表3-2に示す。

3-2-2 繁殖状態の把握

雄において、固定した精巣および精巣上体を、アルコール系列で脱水し、パラフィンで包埋、マイクロトームで $4\mu\text{m}$ の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を施して鏡検した。雌において、子宮の胎盤痕と妊娠胎子数を計数した。

3-2-3 細胞培養の条件検討

アカネズミに由来する細胞の培養条件検討は富山県で捕獲したアカネズミ7個体を対象に実施した。安楽殺後にアカネズミの耳介先端部分を切除し細切した。その細切した皮膚をダルベッコ・フォークト変法イーグル最小必須培地（DMEM）と混合し、T25培養用フラスコに播種した。フラスコを湿潤、 37°C 、5% CO_2 インキュベーターに静置した。

3-2-4 アカネズミの放射性物質蓄積量計測

アカネズミのうち22個体（30km圏内14個体、富山県4個体、青森県4個体）の成獣オス（体重 30g 以上、繁殖期）について体内の放射性物質蓄積量を計測した。頭部切除及び臓器摘出後、胴体部分を食品用粉碎装置で細切した。その後、細切した胴体部分をU-8容器に封入し、ゲルマニウム半導体検出器（測定時間 $14,400$ 秒）でセシウム $134(\text{Cs-134})$ およびセシウム $137(\text{Cs-137})$ の定量を行った。

3-2-5 精巣における8-OHdG蓄積状況の把握（抗8-OHdG抗体による免疫染色およびHPLCによる8-OHdG定量）

放射性物質の蓄積量を測定したアカネズミ22個体（30km圏内14個体、富山県4個体、青森県4個体）の成獣オス（体重 30g 以上、繁殖期）を対象に抗8-OHdG抗体による免疫染色およびHPLCによる8-OHdG定量を実施した。ブアン固定した精巣および精巣上体をパラフィンブロックにて包埋し、マイクロトームで $4\mu\text{m}$ に薄切した。その後、8-OHdG免疫染色を実施した。免疫染色の一次抗体には8-OHdGモノクローナル抗体（日研ザイル株式会社）を使用した。二次抗体にはシンプルステインラットMAX-PO（ニチレイバイオサイエンス）を使用した。免疫染色終了後、精巣断面全域および精巣上体断面全域を顕微鏡で観察し、茶褐色を呈する細胞（図3-2）を含む精細管あるいは精巣上体管の数を数え、8-OHdGの蓄積状況を下記の5段階に分類した。

蓄積状況：無し（8-OHdG陽性細胞が全く見られない）、ごく軽度（1~5精細管に8-OHdG陽性細胞が散見）、軽度（5~10精細管）、中等度（10~20精細管）、高度（20精細管以上）

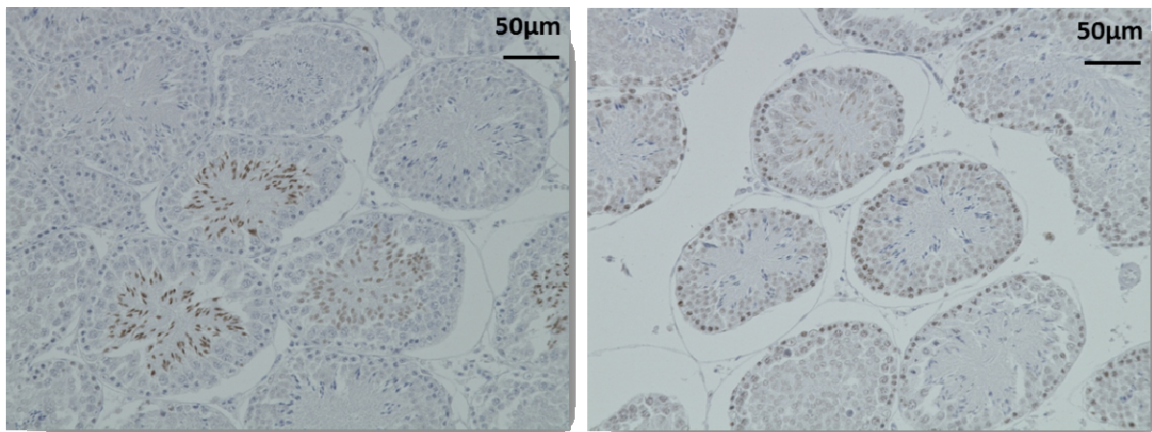


図3-2 8-OHdG陽性となったアカネズミの精細管

HPLCによる8-OHdG定量を実施するため、ヨウ化ナトリウム法 (DNAエキストラクター@TISキット、和光純薬) で精巣よりDNAを抽出した。DNA中の8-OHdGを測定する場合、DNAの加水分解処理が必要であるため、8-OHdG測定前処理試薬セット (和光純薬) で精巣から抽出したDNAを加水分解した。次にHPLCによって加水分解したDNA中に含まれる8-OHdGとグアニン塩基(dG)の定量を行った。指標には8-OHdG量をdG量で標準化した値 (8-OHdG/dG)を使用した。

3-2-6 遺伝的変異検出用マーカーの開発

各捕獲個体から肝臓または脾臓の組織小片 (約1mm³) を切り取り、Genra Puregene Tissue Kit (QIAGEN)を用いてゲノムDNAを抽出した。手順は添付の説明書に従い、最終的に200µLの緩衝液に溶解し、50-200ng/µLの濃度に調製した。

最初にデータベースからマウスのゲノム上 (X染色体および第1、第2染色体上) のマイクロサテライトマーカー (4) を35組、アカネズミ属のゲノムから単離されたマイクロサテライトマーカーについて報告した論文 (4, 5, 6など) から、解析に使えるようなマイクロサテライトマーカーを30組選択し、富山のアカネズミ4個体のゲノムをテンプレートとしてPCRの可否を調べた。DNAポリメラーゼとしてTaKaRaのEXTaqを使用し、以下の条件でPCRを行い、2.5%アガロースTBEゲル上で電気泳動を行い、増幅を確認した。

反応液組成

(10xbuffer MgCl₂入りとdNTPは、TaKaRa EX Taq hot start versionに添付のもの)

10x buffer	1.5uL
dNTP	1.2 uL
Taq	0.1 uL
Primer	0.3 uL (50 pmol/uL のFとRを等量混合したもの)
Genomic DNA	1 uL(ca. 30 ng/uL)

温度プロファイル

95°C 1 min (95°C 30sec, TA 30sec, 70°C 30sec) x 30cycles 70°C 30 min

さらに、安定して増幅が確認されたプライマーセットについて、フォワードプライマーを蛍光修飾し、それを用いて富山のアカネズミ4個体から抽出したDNAをテンプレートに、上記条件でPCR増幅後、産物をABI3730シーケンサー上で電気泳動して断片長を観察した。ここで適切な多型が確認されて遺伝子型の特特定が可能であると思われたプライマーセットを選択した。この選択したプライマーセットによって富山県で捕獲したアカネズミ49個体と30km圏内48個体についてタイピングを試みた。さらに利用可能なプライマーセットを増やすため、アカネズミのゲノムを次世代シーケンサーによって網羅的に解析し、そのうちマイクロサテライト領域を含む配列を抽出した。これらの配列から、適切な多型と断片長(概ね400bp以下)が期待できる配列を選択し、PCR増幅を試み、成功したプライマーペアは蛍光修飾し、青森の8個体のゲノムを用いて多型を確認した。

次に、ミトコンドリアDNAの部分塩基配列が放射線の遺伝学的影響を評価するマーカーとして有用か評価するため、アカネズミで系統解析に用いられたミトコンドリアDNAの部分配列、シトクロームb遺伝子領域(Cytb)および調節領域についてPCRと塩基配列解析を行った。プライマー配列は、Cytb増幅にはL14724: CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G (2)とCB1007R: CTA CTG GTT GGC CTC CGA TTC AG(本研究において新規に設計)、調節領域に対しては M15997: TCC CCA CCA TCA GCA CCC AAA GC および H16401: TGG GCG GGT TGT TGG TTT CAC GG(ともに3)を用いた。試薬・組成はマイクロサテライトPCRに準じたが、全体の液量は2倍とし、ゲノムDNA量は半量とした。温度プロファイルは以下のとおりである。

95°C 1 min (95°C 30sec, 60°C 30sec, 70°C 30sec) x 30cycles 70°C 7 min

PCR産物は精製ののちBigDyeTerminatorV3.1(アプライドバイオシステムズ)でシーケンス反応を行い、ABI 3730xlシーケンサーで塩基配列を解読した。

3-3 結果

3-3-1 アカネズミの捕獲

各地のアカネズミ捕獲結果を表3-3に示す。今年度、30km圏内では70個体(オス30個体、メス40個体)、富山県では74個体(オス42個体、メス32個体)、青森県では74個体(オス34個体、メス40個体)、合計で218個体(オス106個体、メス112個体)の捕獲に成功した。

表3-3 捕獲数

		5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	合計	合計
福島	雄	—	—	—	7	9	9	5	30	70
	雌	—	—	—	10	9	8	13	40	
富山	雄	6	13	3	9	6	3	2	42	74
	雌	5	7	1	7	4	5	3	32	
青森	雄	—	—	—	—	18	15	1	34	74
	雌	—	—	—	—	24	16	0	40	

3-3-2 アカネズミ繁殖期の把握

アカネズミの精巣重量は、30km圏内および富山県で8月、青森で9月に最も高値(平均0.84g)を示し(図3-3)、これらの時期には多くの個体で組織観察により精細管および精巣上体管内に精子が認められた(図3-4)。アカネズミの妊娠個体は、30km圏内では9月11日(3/9個体)、富山県では8月31日(1/7個体)、青森県では9月5日(5/24個体)に認められた(図3-5,6)

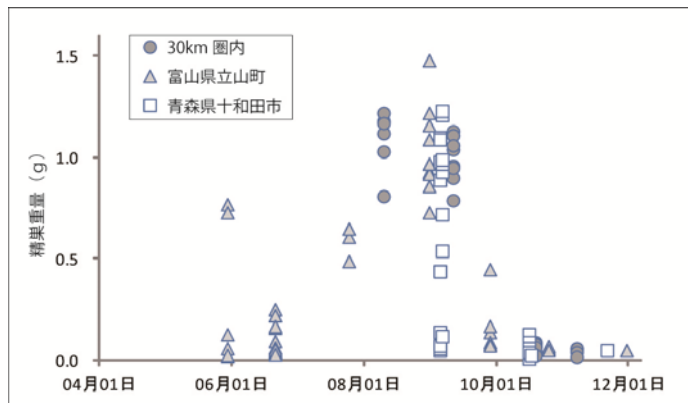


図3-3 アカネズミの精巣重量の季節変化

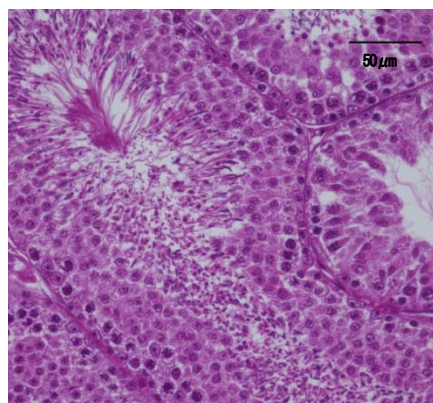


図3-4 アカネズミの精細管断面
青森県9月捕獲個体 (HE 染色)



図3-5 アカネズミの妊娠胎子
30km 圏内9月捕獲個体

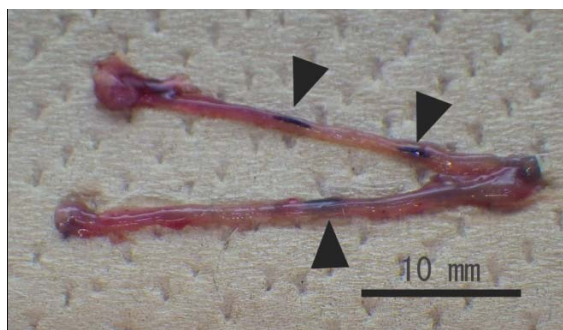


図3-6 アカネズミの胎盤痕 (矢頭)
30km 圏内8月捕獲個

3-3-3 培養条件の検討

7個体中5個体の皮膚組織から細胞の増殖が観察された (図3-7)。

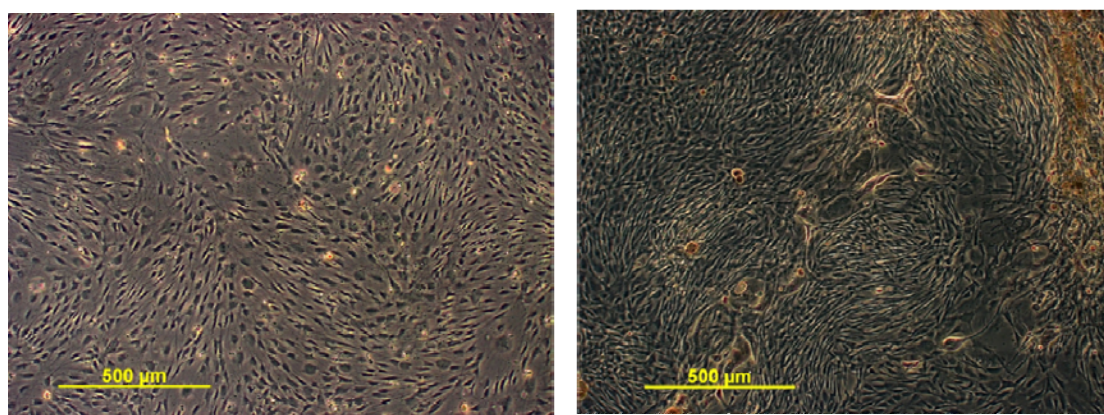


図3-7 培養に成功したアカネズミの細胞 (皮膚組織由来)

3-3-4 アカネズミの放射性物質蓄積量計測

アカネズミの胴体部分における放射性物質の計測結果を図3-8に示した。富山県における測定値は0.0~17.0 Bq/kg、青森県29.5~151.0 Bq/kg、30km圏内（低）14,700.0~21,400.0 Bq/kg、30km圏内（高）8,400.0~185,000.0 Bq/kgであった。

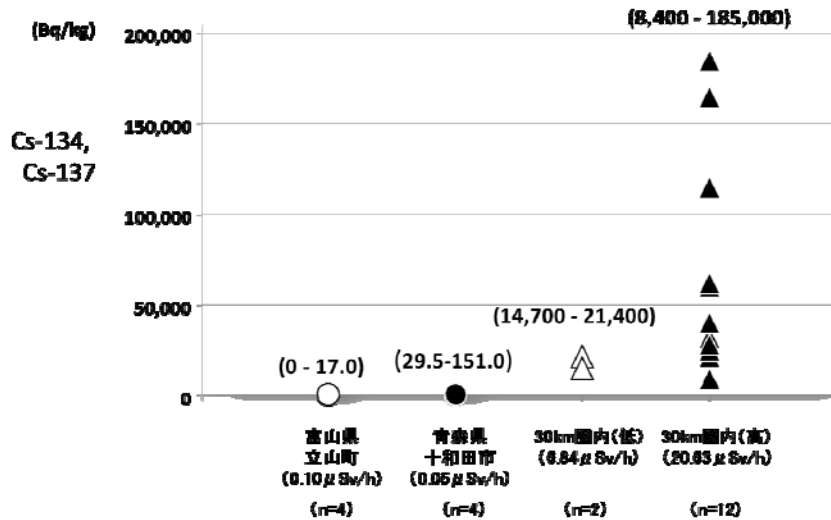


図3-8 アカネズミの放射性物質蓄積量計測結果（セシウム134とセシウム137の合計）

3-3-5 精巢における8-OHdG蓄積状況の把握（抗8-OHdG抗体による免疫染色及びHPLCによる定量）

8-OHdG蓄積状況の評価結果を図3-9に示した。対象地域である富山県と青森県では全ての個体が“ごく軽度”以下に分類されたのに対して、30km圏内で捕獲した個体は全て“軽度”以上の蓄積状況であった。空間線量率20.63μSv/hの地域で捕獲されたアカネズミ12個体のうち6個体は8-OHdGの蓄積が“重度”であった。一方、精巢上皮では8-OHdG陽性となる細胞は認められなかった（図3-10）。

8-OHdG/dG値を図3-11に示した。富山県における値は3.84~6.81、青森県4.53~9.97、30km圏内（低）2.33~3.25、30km圏内（高）1.56~19.67であった。

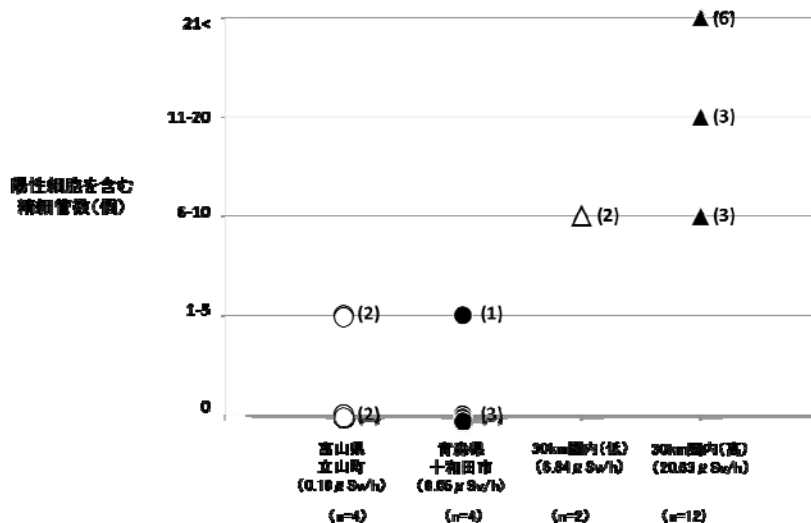


図3-9 アカネズミ精巢の8-OHdG免疫染色結果

括弧内は個体数

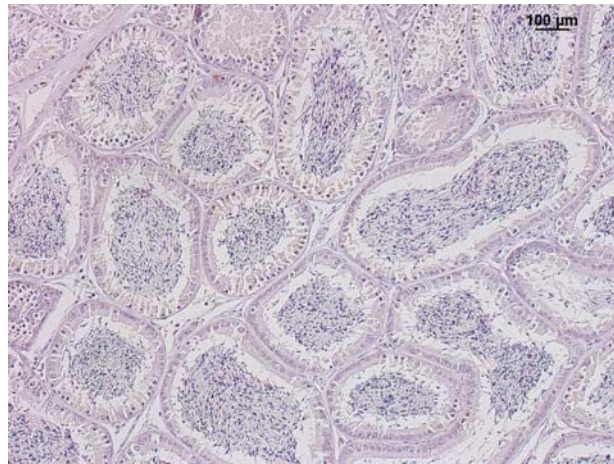


図3-10 アカネズミ精巣上体の8-OHdG免疫染色結果

8-OHdG陽性細胞は観察されなかった。

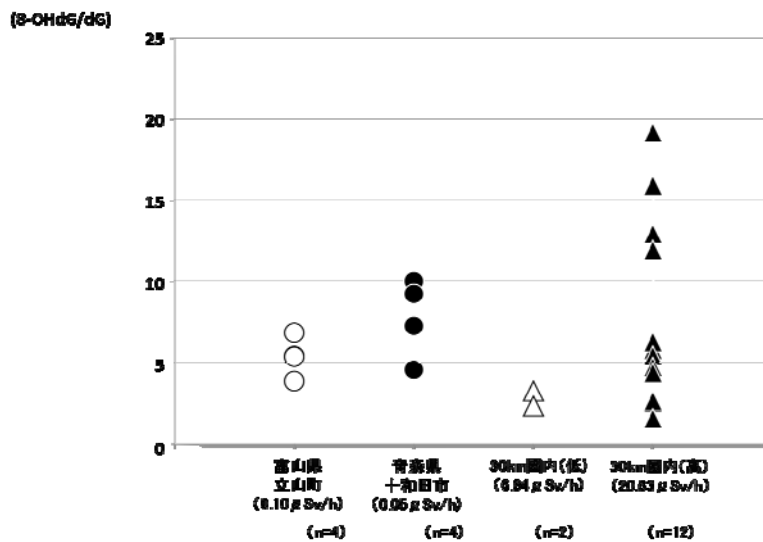


図3-11 HPLCによるアカネズミ精巣の8-OHdG定量結果

3-3-6 遺伝的変異検出用マーカーの開発

今年度、富山と30km圏内で捕獲したアカネズミ全個体からPCRに適する純度のDNAが得られた。マイクロサテライトとミトコンドリアDNAの分析に、これらのDNAを利用した。

既報のマイクロサテライトマーカーの有用性を評価したところ、アカネズミ属のゲノムから開発された既報のマイクロサテライトマーカーのうち、10セットのプライマーペアが、今年度捕獲され30km圏内のサンプルで増幅可能かつ多型であった(表3-4)。また、新規に開発したマイクロサテライトマーカー・65組のプライマーペアを設計し、そのうち増幅が安定して多型があり、タイピングできるものを25組選定した(表3-5)。

表3-4 既報のマイクロサテライトマーカーのうち、アカネズミの遺伝解析に使用可能と思われるマーカー

マーカー名 (出典)	プライマーの塩基配列	アニーリング 温度 (°C)	対立 遺伝子数	期待ヘテロ 接合度
D1Mit24 (4.)	F: CCAATCCATCTTGGGCAG R: ATTGGTTTTGCTGAACCAGG	56	18	0.907
MSAA-6 (5.)	F: AGTCAAAGCTTGCTGGGCCTAAC R: ATACTCTGGCCTCACCTCATA	56	20	0.885
KFM1 (6.)	F: TTTGGTTGTTTCAGTTTTAG R: ATGGAAGACCCATCAGTG	53	18	0.927
KFM3 (6.)	F: ATTCAGCGGTACTGTGGT R: GCTACTAAGGCGACGATT	53	33	0.964
KFM8 (6.)	F: TTGAACCATGTCTCCAGAC R: AGCCTCAAGTTTCAGTGTTT	53	20	0.948
KFM9 (6.)	F: AAGCAACACCCAAAACATA R: CCCAACTTCACCCTCAGAAT	53	26	0.946
SFM2 (7.)	F: GCTTCGGATCTACCTACCTTT R: GCCTGCCTTTGACTCTGTTT	53	18	0.918
SFM4 (7.)	F: CGAGCAGGTCAATCAAGT R: TTTATCCATCAAGCCATC	53	18	0.921
CFM2 (8.)	F: ATCAGCTTCTGGCATCTACAC R: TCCTGGTCTCCTTAACATTAC	56	25	0.869
CFM7 (8.)	F: CCCTCAATCCCTGCTAAG R: TCCAATTCCTGCAACGAC	53	20	0.937

表3-5 次世代シーケンサーによるゲノム解析データから新たに作成したマイクロサテライトマーカー アニール温度はいずれも58℃である。

マーカー名	プライマー塩基配列	対立 遺伝子数	期待ヘテロ 接合度
AMS03	F TGTGGGATAGAGAACCATCCA R GCAGGTCACCAACTCCACAA	9	0.911
AMS07	F CAATGGCTTTGGGTAGAGGA R AGCAAAGGAATTTGGAAAGAA	8	0.911
AMS08	F CATTTGCACACATTTTCAGTCA R ATCATCCATTGGCAAGCTCT	9	0.920
AMS12	F GACAACAGCTTGGAGGGAGT R ACCCAGCACCTCATAATGG	13	0.973
AMS14	F AAACAGCACCTGGAGCCTTA R AGCCCGAACCTTTAAGCAGT	9	0.911
AMS15	F CCTGCTTCTGGCTGTTCTCT R TGTTTGTTCAGGGGTTTCTGC	11	0.911
AMS20	F ACGTGAACAAGGCATGTGAA R ACAACGGATGCCTCAACTCT	10	0.911
AMS25	F CAGTGTTTCAGAAGGCTGCAA R GCCAGCAGAGGGAACTTAT	9	0.893
AMS31	F CCCTAAGTGAACCAATTTTCATCTC R CGTTCCTAGCTCAGCTCTCA	9	0.929
AMS34	F TAGGCCTGAGATGGATCCTG R TGGCTTCCATATTCACATGC	5	0.795
AMS35	F CCCCATCTCCTTAGATTACAATG R CATCAACCATATTGTCTTCCTTC	9	0.857
AMS37	F GATCCACTTTACAATTGCTCTGA R AGGTGCTGGGACCTAAACTCT	10	0.893
AMS38	F TTCTGGGCAGAAACAAGTGTA R TCTCCTTGGCTTAGTGTTTTCC	11	0.955
AMS41	F AAATGCTGCTTTTATGCTGATTA R TCCTTTTGCAGCAAGACAAT	6	0.830
AMS44	F CCTCCACATCTGCTCACTCA R TCACTGGAAGGCACAGAACA	6	0.804
AMS46	F CAAATTGAATATAAGTCTGAGTGTC R CTGAAGATGACCTTTGGCTTC	9	0.929
AMS49	F GCAGGTTAAGTTACTCCCTTGG R TTGACTCAAGCTATACCACACA	13	0.964
AMS50	F CGATGTGTTCTTAGTCTCAAAGA R CTTGGTGCTTCAGAGTTTTGG	9	0.893
AMS51	F TCAAGTTCTAACCGTCTATCCTGA R TCACAGCAATCAGAGCGAGT	11	0.946
AMS52	F ATTCCCAGCATCAACCTCTG R CTACCCTGGGTTGCCAAAGT	13	0.991

表3-5 続き

マーカー名	プライマー塩基配列	対立 遺伝子数	期待ヘテロ 接合度
AMS58	F TGACATGGTGACAAACTGCTT R TCTCCCATTCTTACTTCATAGCA	9	0.920
AMS59	F CGAGAGACTAAAGTAATGCCAACA R CTTTACAATGAACTGAATCTGAGAAC	10	0.902
AMS60	F GCAATGTCGTATGAGACAGTGAAT R GACCTTTGGCAGCTATGTGG	10	0.911
AMS66	F GGAGAACTAAGACATTCCATGA R GAGCAGTTTTTGTGATTCTTGTT	7	0.821
AMS69	F ACCTAGGGCTATATAATGAAATCA R GGAAGATGCAGACAGGATCG	10	0.946

ミトコンドリアDNAのCytb領域の解析では、941bpの配列を得て108個体（本年度捕獲した富山の63個体と30km圏内の45個体）を解析したところ、50のハプロタイプが見つかった。調節領域の解析では、258bpの配列を得て96個体（本年度捕獲した富山の63個体と30km圏内の33個体）を解析したところ、45のハプロタイプが見つかった。Cytb領域と調節領域で見つかった配列をもとに近隣結合法によって系統樹をそれぞれ作成した（図3-12, 13）。



図3-12 アカネズミのミトコンドリアDNA・Cytb領域の系統樹（近隣結合法）

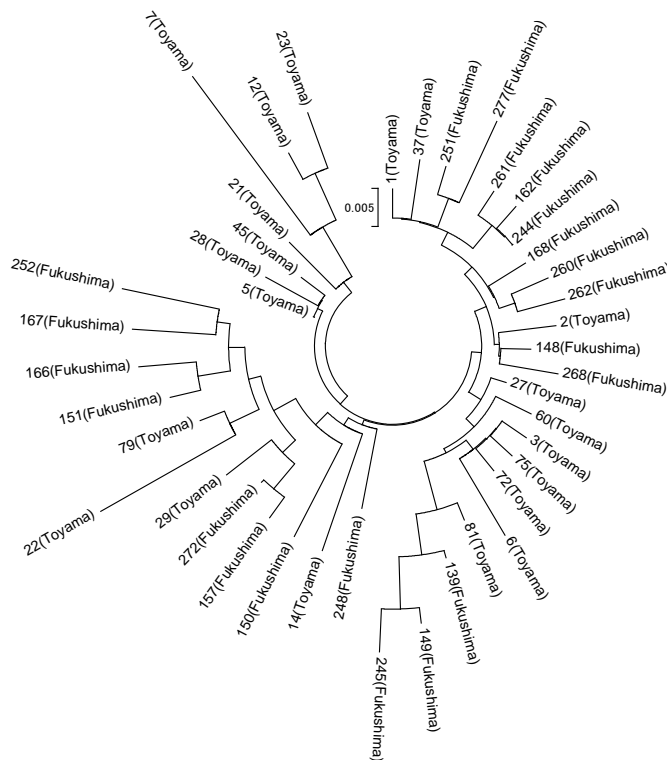


図3-13 アカネズミのミトコンドリアDNA・調節領域の系統樹（近隣結合法）

3-4 考察

精巣重量の増減パターンと妊娠個体が観察できる時期から、調査期間内の各地におけるアカネズミの交尾期は、8月であると考えられた。したがって、30km圏内においてアカネズミの精巣を指標に放射線の身体的影響を評価する場合、細胞分裂が盛んになる8月に捕獲した個体を使用する必要がある。

今回評価した30km圏内のアカネズミ14個体中6個体が“高度”に8-OHdG陽性となる細胞が観察された。富山県と青森県では“高度”に分類された個体は無かった。一方、DNAレベルの8-OHdG蓄積状況は細胞レベルでの蓄積状況とは異なっている。すなわち、30km圏内で捕獲したアカネズミの中で対象地域（富山県と青森県）よりも8-OHdGが精巣内に蓄積していた個体は4個体のみであった。30km圏内の捕獲地域の最大の空間放射線量率は20.63 μ Sv/hであり、年間の外部被ばく量は180.7mSvとなる。また、30km圏内で捕獲されたアカネズミのCs-134およびCs-137の体内蓄積量は全個体10,000Bq/kgを超えている。このような状況を考慮すると、30km圏内の個体ではガンマ線によって細胞内で発生する活性酸素の量が富山県や青森県と比較して多く、8-OHdGの形成量も富山県や青森県と比較して増加していると予想される。これに伴いDNAから8-OHdGを取り除く酵素であるOGG1が作用し、DNAから取り除かれた8-OHdGは細胞質内に蓄積していると考えられる。このため、30km圏内で捕獲したアカネズミの精巣を免疫染色するとOGG1の作用でDNAから除去され細胞内に残っている8-OHdGが反応し8-OHdG陽性となる細胞が観察され、DNAを抽出して定量すると8-OHdGが通常量であるという現象が起こると考えられる。精巣上で8-OHdGが陽性となる精子は観察されなかったのは、精子が精巣上で移動していく過程で8-OHdGが修復され、移動後は精巣上体管内の抗酸化物質が精子を保護しているためかもしれない。対象地域（富山県と青森県）よりも8-OHdGが精巣内に蓄積していた4個体についてはOGG1発現量が他の個体と比較して低く、8-OHdGの修復速度が他の個体と比較して遅い可能性が考えられる。

今年度開発あるいは有用性を確認したマイクロサテライト35座は放射線の遺伝学的影響を評価する際のマーカーとして利用できるものである。ミトコンドリアDNAのCytb領域については富山と30km圏内に共通する遺伝子型はなかったが、系統樹ではそれぞれの地域の遺伝子型が単系統にはならなかった。調節領域の解析では、1遺伝子型が富山と30km圏内で共有されていたが、やはり地域に相当した系統関係はなかった。しかし、8-OHdGは塩基配列の変異を起こすことが知られているため、30km圏内に分布するアカネズミにおいて特徴的な配列が生じる可能性がある。そのため、今後も継続して両地域でミトコンドリアDNAの配列データを比較・検討していく必要がある。また、震災以前に捕獲した野生齧歯類標本を木村吉幸教授（福島大学）より提供いただいたため、この標本を活用することで、震災前後でマイクロサテライトの遺伝子頻度やミトコンドリアDNAの塩基配列を比較できると考えられる。

一般的な哺乳類細胞培養方法でアカネズミの皮膚組織から細胞が増殖することを確認した。今後この細胞を放射線照射実験等に利用できる可能性があり、今回の成果は実験室で野生動物の放射線影響を研究する体制整備に資するものである。

参考文献（なお、webは2014年11月10日にチェックした。）

1. 疋田努ら (1980) 日本生態学会誌30: 109-116.
2. Suzuki H et al. (1997) Zoological Science 14: 167-173.
3. Stacy JE et al. (1997) Molecular Ecology 6: 751-759.
4. Microsatellites Data Base of Japan, <http://www.shigen.nig.ac.jp/mouse/mmdbj/top.jsp>
5. Ohnishi N et al. (1998) Molecular Ecology 7: 1431-1432.
6. Wu H, Zhang S-N (2009) Conservation Genetic Resources 1:1-3
7. Wu H et al. (2008) Conservation Genetic Resources 9:1691-1693
8. Wu H et al. (2009) Molecular Ecology Resources 9:848-50

4 野生菌類（キノコ類・地衣類）への放射線の蓄積

4-1 はじめに

菌類、特にキノコ類と地衣類は、他の生物に比べて桁違いに高濃度の放射性物質を蓄積することが知られている。この特性は、1986年に起こったチェルノブイリ原発事故後のモニタリング調査で次々に明らかになった。このような特性から、キノコ類と地衣類をバイオレメディエーションのために利用する可能性も示唆されているが、基礎調査が不足しており、実用には至っていないのが現状である。本研究では、2011年3月に起こった福島第一原発事故とその後の放射線物質の拡散をうけ、キノコ類と地衣類の多様な種を調査し、放射能物質の蓄積特性を明らかにすることを目的とする。具体的な研究目的は以下の通りである：

- (1) キノコ類・地衣類の多様なグループから放射能濃度を測定し、グループごとの放射能濃度を明らかにする。
- (2) 該当する全サンプルよりDNAを抽出し、分子系統解析により、進化的位置と放射性物質蓄積濃度の関連を解析する。
- (3) キノコ類の発生状況と環境中の放射能濃度の関連を解析する。
- (4) チェルノブイリ事故以後の標本から放射能濃度測定を行い、福島第一原発事故前後の濃度変遷を明らかにする。

地衣類は、その生育形から、葉状地衣類、樹枝状地衣類、固着地衣類に分けることができる。放射性物質の蓄積特性は、種ごとの生理的特性の他に、形態的な違いによっても影響を受けると予想される。そこで、代表的な地衣類について、東北から関東の都市部および海岸沿い、山間部において生試料を収集し、それらの放射線量の測定を行い、地衣類の種ごとの特性を明らかにすることを目的とした。

きのこ類は、生態的な特性から、外生菌根菌（以下EM菌）、木材腐朽菌（以下LIG菌）、地上性腐生菌（以下SAP菌）に分けることができる。EM菌は、生きた植物（主にブナ科やマツ科の樹木）の根から有機物を得ている。LIG菌は枯れた木を、SAP菌は落ち葉を分解して栄養を吸収している。このように、きのこ類では栄養摂取様式が多様であるために、放射性物質の蓄積も大きく異なることが予想される。そこで、これらの3グループについて地衣類調査と同じ地域から生試料を収集し、生態的特性と放射能濃度との関連を明らかにしていく。

上記の通り、菌類、特にキノコ類や地衣類は植物や動物と比べ、より高濃度の放射性物質を蓄積することが知られており、チェルノブイリ事故以後も、生態系の放射能汚染状況や放射性物質の挙動が世界でモニタリングされている。本研究では福島第一原発事故を受けて、キノコ類と地衣類、およびそれらと相互関係にある生物（菌食性動物、昆虫、樹木）を対象とし、日本国内の放射性物質の動向を把握するとともに、世界でモニタリングされている種の測定値と比較を行い、人間および森林生態系に対するリスク予測に繋げるための検討を関連研究チームと共同で行うための基礎データを蓄積することを目的とする。

事前の研究により、EM菌および地衣類が高い放射性物質蓄積性を有することはすでに知られている。たとえば、チェルノブイリ事故以後にウクライナで測定されたEM菌の一種、*Paxillus involutus*からは80万Bq/kgという、非常に高濃度の数値が記録されている。その後もEM菌から高濃度の放射性物質が検出されてきた一方で、SAP菌およびLIG菌からは低濃度であるという報告が多い。しかし、両者とも生態系においては菌糸を土壌や木材内部に広げて成長し、周囲の栄養分やミネラルを吸収する、という生き方に変わりはなく、EM菌が他に比べて高い吸収能力を持つということに対する明確な理由はわかっていない。さらに、これまでの我々による研究により、LIG菌およびSAP菌も高い放射能濃度を示す可能性も示唆されている。そのため本研究プロジェクトでは、LIG菌・SAP菌という、生態的に全く異なる菌類についても放射能濃度を継続的にモニタリングし、その中から特に高い値を示す菌類を、長期的なモニタリング対象種としてピックアップする予定である。

生態系における放射性物質の影響調査において、地衣類が着目されるようになったのは、放射性降下物（フォールアウト）が、食物連鎖を通して地衣類→トナカイ→ヒトへと高濃度に濃縮されて移行することが明らかにされたことによる(Palmer et al. 1963)。地衣類は高緯度地方のツンドラ地帯においては地表を優占して被っており、トナカイの冬場の主要な食糧となっている。さらに、トナカイの肉は現地のエスキモーによって食べられる。これらのことから、北半球において1950～1960年代前半に競って行われていた大気中核実験や1986年に起こったチェルノブイリ原発事故の後には、地衣類→トナカイ→ヒトの関係が調査され、さらに地衣類そのものの放射性物質に対する特性も盛んに調べられてきた。

地衣類は、菌類と藻類から構成される共生体であり、永続性のある安定した地衣体を作るという特徴を持ち、一般に寿命が数十年と長い。維管束植物のような根系を持たずに、水分や栄養分は地衣体全体で吸収するために大気からの影響を直接受けると考えられている。地衣体中の放射性物質は、長期間に渡って保持されるが(Tuominen & Jaakkola 1973)、実効半減期は2.7-10.1年と見積もられている(Puhakainen et al. 2007; Iurian et al. 2011)。地衣体中にトラップされると洗浄による逸脱は一割程度であり(Feige et al. 1990)、このことも長期間保持に関連していると考えられる。放射性セシウムの濃度は維管束植物に比べて数倍～数十倍になることから、地衣類は高濃度の放射性物質を蓄積すると言われてきた(Salo & Miettinen 1964; Bretten et al. 1992)。以上のことから、地衣類は放射

性降下物の積算量のモニタリングに有用であるとされ、現在でもヨーロッパや北米を中心に調査が続けられている(Nimis 1996)。

2011年3月に発生した福島第一原発事故を受けて、国立科学博物館および筑波大学による菌類調査チームは、事故から1ヶ月半後からきのこ類および地衣類の放射性物質濃度のモニタリングを開始した。我々は筑波大学構内に生育している葉状地衣類について調査を行ってきた(表4-1)。Cs137濃度で最も値が高かったのは2011年6月30日にケヤキ樹幹上で採集されたシロムカデゴケ(*Physcia orientalis*)の20,553±339Bq/kgであった。クロムカデゴケの一種(*Phaeophyscia spinellosa*)やコフキメダルチイ(*Dirinaria appplanata*)においても高濃度のCs137が検出されたが、一年間に最大で約50%にまで減少していた。しかしながら、2012年3月現在、未だに筑波大学構内の地衣類からは10,000Bq/kgを超える値が検出されている。

表4-1 地衣類から検出されたCs137濃度 (Bq/kg, 乾燥重量)

凡例：PS=*Phaeophyscia spinellosa*クロムカデゴケ属の一種(コンクリートの水平面および垂直面に着生), HC=*Hyperphyscia crocata*コカゲチイ(シラカシ着生2本: HC1, HC2), PO=*Physcia orientalis*シロムカデゴケ(ケヤキ着生), DA=*Dirinaria appplanata*コフキメダルチイ(ケヤキ着生)

サンプル	採集日				
	2010/2/19 (事故前)	2011/4/26	2011/6/30	2011/10/26	2012/3/8
PS水平	不検出	13296±293	15541±328	12243±135	11184±112
PS垂直	(水平・垂直混合)	(水平・垂直混合)	11342±260	7989±108	5925±102
HC1	—	—	—	1096±35	1928±45
HC2	—	—	—	—	4545±81
PO	—	—	22596±373	19491±169	—
DA	—	3836±139	—	17949±134	9394±125

4-2 材料と方法

本年度に実施した調査地は以下の通りである。

平成24年4月～12月にかけて 筑波実験植物園、平成24年4月～12月にかけて 福島県郡山市周辺地域

平成24年6月21日 茨城県石岡市 筑波山、平成24年6月27-29日 長野県伊那市

平成24年6月28, 29日 山梨県南アルプス市、平成24年7月3, 4日 山梨県甲府市

平成24年7月4日 長野県南佐久郡川上村、平成24年7月4日 山梨県北杜市

平成24年7月5日 山梨県山梨市、平成24年9月11, 12日 栃木県日光市

平成24年10月10-12日 山梨県富士山、平成24年12月2日 茨城県取手市

平成24年12月3日 茨城県稲敷市、平成24年12月3日 茨城県稲敷郡美浦村

平成24年12月3日 茨城県稲敷郡阿見町、平成24年12月3日 茨城県行方市

平成24年12月11日 茨城県那珂郡東海村*、平成24年12月12日 福島県いわき市

平成24年12月13日 福島県双葉郡浪江町、平成24年12月13日 福島県相馬郡飯舘村

平成24年12月13日 福島県田村市*、平成24年12月17, 18日 福島県福島市*

平成24年12月26, 27日 群馬県高崎市*、平成25年1月28, 29日 福島県田村市*

一部の調査(*)については、日本原子力研究開発機構の協力を得て実施した。国立公園特別保護地域からの試料については許可を得て採集された保管標本を測定に用いた。

きのこ類の採集は、基質（土壌、落葉、木材など）からナイフを用いて分離し、子実体のみを採集した。発生環境を記録し、生態写真撮影をした後、個々に袋詰めをして研究室に持ち帰り、標本を作製した。また、いくつ



図4-1 きのこの乾燥標本作成

かの採集地においては基質および周辺の土壌や落葉サンプルを同時に採集し、後の測定に用いた。採集した子実体は、その日のうちに標本の写真撮影を行い、子実体の一部をカミソリで切り取り、DMSOバッファーに保管し、これをのちのDNA実験に使用した。残りの子実体は乾燥機（Nesco）を用いて48°Cで24時間風乾して、乾燥標本とした（図4-1）。乾燥標本は採集地、発生環境を記録したデータとともに国立科学博物館菌類標本庫に保管した。DNA情報については、バッファーに保管された

小片を液体窒素ですりつぶし、改変CTAB法によりDNAを抽出した後、PCR法により核ITS領域および核LSU領域を増幅し、オートシーケンサーにて塩基配列を決定した。分類群により上記2領域では種の特定に不十分な場合があることから、他の領域についても必要に応じて増幅・シーケンスを行い、種同定に用いた。

地衣類試料の採集は、樹幹、コンクリート上、岩上などから手またはナイフで地衣体をはぎ取り、測定試料および証拠標本を作成した（図4-2）。採集した標本について、形態観察および地衣成分の検定結果ならびにDNA情報に基づいて標本の同定を行った。形態観察は実体顕微鏡による外部形態の観察と明視野顕微鏡による生殖器官や地衣体の内部構造の観察を行った。内部構造観察用の切片は実体顕微鏡下でカミソリによって作製し、これをGAW（グリセリン：エタノール：水＝1：1：1）で封入しプレパラートとした。地衣成分の検定は必要に応じて呈色反応法（黒川1964）、顕微化学的検出法（Asahina 1936-1940）、紫外線照射法（黒川1964）、薄層クロマトグラフ法（Culberson and Johnson 1982）を行った。なお、薄層クロマトグラフは展開溶媒B（Culberson and Johnson 1982）のみで行った。DNA情報については、地衣体約10mgをサンプルより切り出し、CTAB法にてDNAを抽出し、PCR法によりITS rDNAを増幅し、オートシーケンサーにて塩基配列を決定した。

きのこ子実体のセシウム濃度の測定については、生状態または乾燥状態のサンプルから行った。生標本を使用する場合は、U-8容器に充満する程度の量を詰め、密閉したのちにゲルマニウム半導体検出器により2,000秒または5,000秒測定した。乾燥状態のサンプルの場合は、生状態に比べ体積が約1/10になることがこれまでの研究で示唆されており、種によっては容器を充満するだけの量を確保することが難しかったため、U-8容器の1/8以上を満たすことを条件としてサンプルを準備し、測定に用いた。測定機器および測定時間は上記と同様である。また、この測定は筑波大学アイソトープ総合センター、東京大学アイソトープ総合センター、郡山女子大学および国立環境研究所の各施設で行った。



図4-2 クロマツ樹幹に生育する
地衣類*Parmotrema
tinctorum*ウメノキゴケ

地衣類試料の放射性セシウム濃度について、試料をU-8容器に入れ、低バックグラウンド γ 線測定装置（測定：いであ株式会社）を用いて放射性ヨウ素(I181)および放射性セシウム(Cs134, Cs137)の測定を行った。さらに、福島第一原発事故発生前との比較や過去の放射能汚染との関係を調べるために、国立科学博物館に保

管されている標本についてもCs137の測定を行った。証拠標本は全て国立科学博物館(TNS)に保管されている。学名および和名はKurokawa & Kashiwadani (2006)に従った。

4-3 結果と考察

4-3-1 地衣類の放射線量について

平成24年度に得られた地衣類の採集品のうち、試料容量が50 ml以上となる試料から30点を選定し、放射性物質濃度の測定を行った。結果を表4-2に示す。なお、容量が十分ではない試料については、微量試料からの測定法が確立された後、逐次測定を試みていく予定である。

これらのうち、山梨県南アルプス市や長野県南佐久郡川上村など福島第一原発事故の影響をほとんど受けていないとされる地域から採集された*Cladonia rangiferina*（ハナゴケ）は微量なCs137（ $<70\text{Bq/kg}$ ）およびCs134（ $<55\text{Bq/kg}$ ）が検出された。長野県南佐久郡川上村のサンプルについてはCs134:Cs137の比率がほぼ1:1であったことから、これまで放射性物質が未検出だった地域に新たに微量ながら福島第一原発事故由来の放射性セシウムが飛来した可能性が考えられた。山梨県南アルプス市のサンプルについてはCs134:Cs137=0.8:1であったことから、福島第一原発事故由来の放射性物質に加えて、それ以前に放射性物質もすでに存在していたことが可能性として考えられた。

茨城県取手市のケヤキ樹幹上から採取された*Dirinaria applanata*コフキメダルチイ（ $16,000\text{Bq/kg}$ Cs137）や*Parmotrema austrosinense*ナミガタウメノキゴケ（ $57,000\text{Bq/kg}$ Cs137）のように同じ環境に生育している場合でも種によって大きく値が異なる場合が稀にあったが、ほとんどの地点では種による放射性物質の蓄積特性に顕著な差は見られなかった。今回対象とした地衣類はすべて大型の葉状地衣類であったが、これらの生育形の地衣類においては、放射性物質濃度は概ね空間線量との関係があると考えられた。地衣類は放射性降下物の積算量を反映することで知られているが、今回の結果から、日本産の種においても、低線量地域の地衣類の放射性物質濃度は低く、高線量地域の地衣類の放射性物質の濃度は高いという結果が得られた。空間線量と地衣類の放射性物質濃度との間の詳細な解析については、今後行っていく予定である。

一般に地衣類は他の植物などに比べて、高濃度の放射性物質を蓄積すると言われているが、低濃度汚染地域である茨城県稲敷市のクロマツ上において採取された*P. tinctorum*ウメノキゴケ（ $5,600\text{Bq/kg}$ Cs 137）や*D. applanata*

(2,600 Bq/kg Cs137) は地衣類が付着していないクロマツ樹皮 (2,100 Bq/kg Cs137) と大きな差が見られなかった。一方、宮城県宇多川の国立環境研究所モニタリングサイトにおいて採取したクロマツ樹皮 (9,500 Bq/kg Cs137) (サイト2) は近隣のサイト2で採取された*Myelochroa irrugans* ウチキウメノキゴケ (150,000 Bq/kg Cs137) と大きく値に差が見られた。地衣類の蓄積特性については、低線量地域では顕著な差が出にくいと思われるので、今後は高濃度汚染地域での調査を実施し、さらに比較可能な試料を採取して実態を明らかにしていく予定である。

今回測定できた試料の中では、福島県双葉郡浪江町の岩上に生育していた*Myelochroa sp.*が1,100,000Bq/kg Cs137と非常に高い値を示した。国内で報告されている生物試料の放射線物質濃度としては最高値がそれに類する値であると思われる。なお、同地点の蘚類も760,000Bq/kg Cs137や990,000Bq/kg Cs137と高い値を示していた。単位重量あたりの濃度は地衣類と蘚類の間で類似していたが、サーベイメーターを直に試料に置いた場合の線量は2倍ほど蘚類の方が高かった(図4-3)。このように単純に放射線物質濃度だけで汚染状況を反映するわけではないと思われるので、表面汚染計による測定なども合わせて現地調査を実施し、地衣類をはじめ様々な生物試料の放射線物質濃度と現場の汚染状況が推定できるようなモニタリングのガイドラインについて検討していくことが望まれるであろう。



図4-3 本調査で最高値 (1,100,000Bq/kg Cs137) を示した地衣類*Myelochroa sp.* (左 : 4.21 μ Sv/h) と同地点に生育していた蘚類 (右 : 8.08 μ Sv/h; 760,000Bq/kg Cs137)

放射線物質濃度の違いが現場での線量の違いを表しているわけではない。

表4-2 地衣類等の試料の採集情報および放射線物質濃度

Species	採集日	標高	基物	分析供試量	計測回数	測定日	測定時間	測定回数	測定精度	検出下限	検出率	検出回数	検出率	検出精度	検出回数	検出率	検出精度	検出回数	検出率
<i>Cladonia rangiferina</i>	2012.6.28	2180 m	土上	10.33	2011/3/15	2013/2/4	23:44	1400	1400	不検出	19	不検出	55	69 ± 0.6	21				
<i>Cladonia rangiferina</i>	2012.7.4	2450 m	露葉土上	8.4	2011/3/15	2013/2/4	23:49	1400	1400	不検出	22	不検出	42	41 ± 0.1	25				
<i>Dicranaria appplanata</i>	2012.12.03	15 m	ケヤキ	13.62	2011/3/15	2013/2/5	21:47	1400	1400	不検出	66	16,000 ± 120	100	16,000 ± 95	53				
<i>Parmotrema austrosiense</i>	2012.12.03	15 m	ケヤキ	4.12	2011/3/15	2013/2/5	22:21	1400	1400	不検出	180	58,000 ± 410	350	57,000 ± 320	170				
<i>Dicranaria appplanata</i>	2012.12.03	20 m	クヌギ樹幹	2.97	2011/3/15	2013/2/13	23:27	1402	1402	不検出	110	20,000 ± 220	210	20,000 ± 170	96				
<i>Dicranaria appplanata</i>	2012.12.03	23 m	クヌギ樹幹	8.1	2011/3/15	2013/2/13	23:28	1403	1403	不検出	92	35,000 ± 200	170	36,000 ± 160	85				
<i>Parmotrema tinctorum</i>	2012.12.03	23 m	クヌギ樹幹	2.87	2011/3/15	2013/2/5	13:38	1400	1400	不検出	160	25,000 ± 290	270	25,000 ± 220	120				
<i>Dicranaria appplanata (樹皮付)</i>	2012.12.03	23 m	クヌギ樹幹	9.88	2011/3/15	2013/2/15	22:43	1404	1404	不検出	120	41,000 ± 220	200	41,000 ± 170	93				
<i>Parmotrema tinctorum</i>	2012.12.03	23 m	クヌギ樹幹	3.17	2011/3/15	2013/2/10	19:00	1400	1400	不検出	210	52,000 ± 410	390	51,000 ± 310	170				
<i>Parmotrema tinctorum</i>	2012.12.03	23 m	クヌギ樹幹	6.14	2011/3/15	2013/2/15	22:46	1405	1405	不検出	180	56,000 ± 430	360	57,000 ± 330	170				
<i>Parmotrema tinctorum</i>	2012.12.03	23 m	クヌギ樹幹	5.09	2011/3/15	2013/2/5	9:33	1400	1400	不検出	77	5,300 ± 120	140	5,600 ± 99	65				
<i>Parmotrema tinctorum</i>	2012.12.03	0 m	クヌギ樹幹	12.87	2011/3/15	2013/2/12	23:30	1400	1400	不検出	33	2,700 ± 54	55	2,600 ± 41	26				
<i>Dicranaria appplanata (樹皮付)</i>	2012.12.03	0 m	クヌギ樹幹	8.86	2011/3/15	2013/2/12	23:30	1401	1401	不検出	29	2,100 ± 53	61	2,100 ± 40	36				
<i>Parmotrema tinctorum</i>	2012.12.03	16 m	クヌギ樹幹	5.01	2011/3/15	2013/2/5	17:45	1400	1400	不検出	140	21,000 ± 290	250	22,000 ± 190	110				
<i>Parmotrema tinctorum</i>	2012.12.03	16 m	クヌギ樹幹	7.87	2011/3/15	2013/2/5	18:09	1400	1400	不検出	79	18,000 ± 160	150	18,000 ± 130	76				
<i>Parmotrema tinctorum (樹皮付)</i>	2012.12.11	7 m	クヌギ樹幹	9.63	2011/3/15	2013/2/9	22:28	1400	1400	不検出	91	32,000 ± 200	170	33,000 ± 160	87				
<i>Parmotrema clavuliferum (樹皮付)</i>	2012.12.11	7 m	クヌギ樹幹	7.03	2011/3/15	2013/2/10	19:01	1400	1400	不検出	100	30,000 ± 220	190	31,000 ± 170	96				
<i>Parmotrema clavuliferum (樹皮付)</i>	2012.12.13	1 m	クヌギ樹幹	9.88	2011/3/15	2013/2/6	23:44	1400	1400	不検出	130	39,000 ± 240	210	38,000 ± 180	95				
<i>Parmotrema tinctorum (樹皮付)</i>	2012.12.13	1 m	クヌギ樹幹	8.57	2011/3/15	2013/2/7	14:06	1400	1400	不検出	110	25,000 ± 200	190	25,000 ± 160	91				
<i>Flavoparmelia caperata</i>	2012.12.13	1 m	クヌギ樹幹	10.81	2011/3/15	2013/2/8	22:42	1400	1400	不検出	100	24,000 ± 180	160	23,000 ± 140	76				
<i>Myelochroa irurgans</i>	2012.12.13	488 m	クヌギ樹幹	5.84	2011/3/15	2013/2/8	22:42	1400	1400	不検出	230	150,000 ± 530	430	150,000 ± 410	170				
<i>クヌギ樹皮</i>	2012.12.13	450 m	クヌギ樹幹	16.04	2011/3/15	2013/2/9	22:48	1400	1400	不検出	52.0	9,200 ± 93	88	9,500 ± 73	38				
<i>Flavoparmelia caperata</i>	2012.12.13	485 m	クヌギ樹幹	9.12	2011/3/15	2013/2/6	22:26	1400	1400	不検出	250	250,000 ± 570	460	260,000 ± 450	230				
<i>Brigophyllum 1</i>	2012.12.13	529 m	道路土	4.99	2011/3/15	2013/2/6	2:32	1400	1400	不検出	900	970,000 ± 1,090	1500	990,000 ± 1,300	780				
<i>Brigophyllum 2</i>	2012.12.13	529 m	道路土	12.64	2011/3/15	2013/2/6	2:37	1400	1400	不検出	370	740,000 ± 850	690	760,000 ± 970	280				
<i>Myelochroa irurgans</i>	2012.12.13	488 m	クヌギ樹幹	4.31	2011/3/15	2013/2/6	6:41	1400	1400	不検出	720	650,000 ± 1,300	1200	650,000 ± 1,000	580				
<i>Myelochroa irurgans</i>	2012.12.13	488 m	クヌギ樹幹	6.2	2011/3/15	2013/2/6	6:48	1400	1400	不検出	280	270,000 ± 660	540	280,000 ± 510	220				
<i>Myelochroa sp.</i>	2012.12.13	529 m	岩上	6.9	2011/3/15	2013/2/6	14:09	1400	1400	不検出	810	1,100,000 ± 1,500	1400	1,100,000 ± 1,200	760				
<i>Myelochroa irurgans</i>	2012.12.13	714 m	クヌギ樹幹	10.76	2011/3/15	2013/2/6	16:09	1400	1400	不検出	220	230,000 ± 500	410	230,000 ± 400	200				
<i>Melanelia hui</i>	2012.12.13	714 m	クヌギ樹幹	5.97	2011/3/15	2013/2/6	18:40	1400	1400	不検出	380	260,000 ± 720	640	270,000 ± 560	290				

4-3-2 きのご類の放射線量について

今回の調査では約500点のきのご類を採集した。最終的にはその全てを測定に用いる予定であるが、全ての測定機関（筑波大学、東京大学、郡山女子大学、国立環境研究所）において測定機器の使用が混雑しており、迅速な測定は不可能な状況であった。そのためサンプルの準備は整っているものの、今年度中に測定できなかったサンプルが200点以上に上る。今後は大量のサンプルをいかに効率よく測定していくかが大きな課題である。

実際に測定できたきのご類のうち、福島県郡山市周辺地域で採集・測定されたもののデータを表4-3に示す。

表4-3 福島県で採集されたきのご類の放射性セシウム濃度

ID	名称	重さ (g)	採取日付	採取場所	Cs-134 (Bq/Kg)	Cs-137 (Bq/Kg)
211	アンズタケ	23.0	2012/7/27	郡山市島公園	55.9	90.7
212	ヒロタケ	8.9	2012/7/27	郡山市開成山公園	2584.0	3760.0
213	チチタケ カサ	24.2	2012/7/29	郡山市逢瀬公園 (モミの木)	<74.86	175.0
213	チチタケ 柄	24.1	2012/7/29	郡山市逢瀬公園 (モミの木)	<13.27	<14.01
214	チチタケ	20.0	2012/7/29	郡山市逢瀬公園 (コナラ)	62.8	125.0
215	チチタケ (赤色タイプ)	20.0	2012/7/29	郡山市逢瀬公園 (サクラの広場)	<16.47	<16.04
216	チチタケ	15.2	2012/7/29	郡山市大槻公園	68.5	110.9
217	シロハツ	16.5	2012/7/29	郡山市大槻公園	<22.18	38.3
218	サマツモドキ	16.0	2012/7/29	郡山市逢瀬公園	170.9	259.5
219	カバイロツルタケ	15.0	2012/7/29	郡山市逢瀬公園	<20.16	<21.48
220	ニガイグチモドキ	20.5	2012/7/29	郡山市逢瀬公園	70.9	148.8
221	クサハツ	20.0	2012/7/29	郡山市逢瀬公園	29.5	45.0
222	チリメンチチタケ カサ	25.0	2012/7/29	栃木県鹿沼市	8607.0	13250.0
222	チリメンチチタケ 柄	18.1	2012/7/29	栃木県鹿沼市	3259.0	4887.0
223	ナラタケモドキ2 カサ	27.1	2012/8/11	郡山市逢瀬公園	36.3	59.9
223	ナラタケモドキ2 柄	26.0	2012/8/11	郡山市逢瀬公園	28.1	36.5
224	ナラタケモドキ4 カサ	21.2	2012/8/11	郡山市逢瀬公園	44.1	80.2
224	ナラタケモドキ4 柄	22.6	2012/8/11	郡山市逢瀬公園	25.8	36.3
225	チチタケ	21.0	2012/8/14	会津田島	<16.62	19.1
226	チチタケ	23.1	2012/8/14	会津南郷村	18.2	49.9

227	チチタケ	28.1	2012/8/14	栃木県鹿沼市	1143.0	1869.0
228	チリメンチチタケ	32.5	2012/8/14	栃木県鹿沼市	6814.0	10750.0
229	ビロードタイプチチ タケ	21.8	2012/8/14	栃木県鹿沼市	456.2	749.3
230	クラヤミイグチ	32.8	2012/8/19	相馬市一本木池	29.7	55.1
231	ハナビラタケ	25.1	2012/8/16	福島市土湯温泉	72.6	121.4
232	オキナクサハツ	22.6	2012/8/26	郡山市大槻公園	103.4	166.2
233	クロハツ	20.0	2012/8/26	郡山市大槻公園	74.5	129.7
234	シロハツ	21.0	2012/8/26	郡山市大槻公園	245.0	430.0
235	ボタンイボタケ	16.5	2012/8/26	郡山市大槻公園	72.4	87.4
236	タマネギモドキ	16.0	2012/8/31	福島県郡山市富田	66.2	112.9
237	ベニイグチ カサ	20.3	2012/9/1	郡山市高篠山森林公園	40.7	73.9
237	ベニイグチ 柄	20.4	2012/9/1	郡山市高篠山森林公園	15.4	36.1
238	ムラサキヤマドリタ ケ カサ	25.8	2012/9/1	郡山市高篠山森林公園	37.5	62.1
238	ムラサキヤマドリタ ケ 柄	22.0	2012/9/1	郡山市高篠山森林公園	25.2	37.2
239	タマゴダケ カサ	20.7	2012/9/1	郡山市逢瀬公園	159.6	295.8
239	タマゴダケ 柄	25.3	2012/9/1	郡山市逢瀬公園	86.7	147.2
240	アイタケ	20.2	2012/9/1	郡山市逢瀬公園	18.2	27.9
241	カラハツモドキ	22.1	2012/9/1	郡山市逢瀬公園	198.0	301.8
242	シロオニタケ カサ	23.0	2012/9/8	郡山市逢瀬公園	17.7	26.6
242	シロオニタケ 柄	25.1	2012/9/8	郡山市逢瀬公園	<12.72	14.3
243	タマゴダケ カサ	16.7	2012/9/8	郡山市逢瀬公園	53.6	85.5
243	タマゴダケ 卵	24.7	2012/9/8	郡山市大槻公園	<15.21	22.4
244	クサハリタケ	21.1	2012/9/8	郡山市逢瀬公園	202.7	344.4
245	チャハリタケ	21.2	2012/9/8	郡山市逢瀬公園	243.5	394.0
246	シロハツ	21.2	2012/9/8	郡山市大槻公園	94.4	130.6
247	クロチチダマシ	20.3	2012/9/8	郡山市大槻公園	2688.0	4376.0
248	ハラタケ	23.4	2012/9/8	郡山市大槻公園	<13.30	<12.49
249	チチタケ	22.4	2012/9/16	郡山市逢瀬公園	<14.65	23.1
250	チチタケ	22.3	2012/9/16	郡山市逢瀬公園	<15.86	<14.43
251	ビロードタイプチチ タケ	18.8	2012/9/16	郡山市逢瀬公園	58.9	99.1
252	ヒロハチチタケ	23.0	2012/9/16	郡山市高篠山森林公園	<15.92	<13.14
253	ハイカグラテングタ ケ	23.4	2012/9/16	郡山市高篠山森林公園	<11.39	<17.04
254	ケシロハツモドキ	23.3	2012/9/16	郡山市逢瀬公園	21.9	34.1

	カサ					
254	ケシロハツモドキ 柄	21.3	2012/9/16	郡山市逢瀬公園	14.9	21.3
255	ツチカブリ	23.3	2012/9/16	郡山市逢瀬公園	361.4	627.4
256	ヤブレキチャハツ	23.1	2012/9/16	郡山市逢瀬公園	<16.68	<17.20
257	トンビマイタケ	23.0	2012/9/15	山形県酒田市	<13.65	<13.67
258	ニクウチワタケ	12.4	2012/9/15	福島市松川	665.7	1129.0
259	チチタケ	20.0	2012/9/22	郡山市逢瀬公園	<17.48	<14.50
260	チリメンチチタケ カサ	22.1	2012/9/26	栃木県那須塩原市	19340.0	31540.0
260	チリメンチチタケ 柄	22.3	2012/9/26	栃木県那須塩原市	5230.0	8537.0
261	チリメンチチタケ中 型カサ	20.0	2012/9/26	栃木県那須塩原市	22360.0	36480.0
262	赤色タイプチチタケ カサ	23.0	2012/9/26	栃木県那須塩原市	744.1	1256.0
262	赤色タイプチチタケ 柄	21.1	2012/9/26	栃木県那須塩原市	243.1	422.3
263	赤色チチタケ カサ	18.1	2012/9/26	栃木県那須塩原市	494.1	800.7
264	チリメン赤タイプ カサ	24.5	2012/9/26	栃木県那須塩原市	5389.0	8776.0
264	チチタケ赤タイプ 柄	25.7	2012/9/26	栃木県那須塩原市	563.2	932.8
265	チチタケ	18.1	2012/9/26	栃木県那須塩原市	862.9	1370.0
266	赤色タイプチチタケ	20.6	2012/9/26	栃木県那須	1623.0	270.1
267	チチタケ (チリメン 赤色タイプ)	18.7	2012/9/26	栃木県那須	4695.0	7658.0
268	スギヒラタケ	24.3	2012/9/30	福島県南会津町	25.5	33.4
269	ホテイシメジ	24.6	2012/9/30	福島県南会津町	511.2	869.7
270	ツキヨタケ	33.0	2012/10/5	青森市	<9.249	19.5
271	アカハツ	25.1	2012/10/5	福島県南相馬市	710.4	1191.0
272	ハナホウキタケ	24.6	2012/10/5	福島県葛尾村	224.1	324.4
273	チチタケ	22.8	2012/10/5	福島県葛尾村	109.2	181.0
274	シャカシメジ	31.6	2012/10/5	福島県葛尾村	24.0	45.4
275	ハツタケ	25.1	2012/10/5	郡山市緑ヶ丘	14.0	19.9
276	ハツタケ	31.5	2012/10/7	福島県郡山市郡山女子大	1186.0	1866.0
277	アカハツ	28.0	2012/10/6	福島県郡山市郡山女子大	137.1	243.7
278	チチアワタケ	25.0	2012/10/8	福島県郡山市郡山女子大	161.6	271.9

279	ムジナタケ	27.5	2012/10/8	福島県郡山市郡山女子大	40.1	55.8
280	アカハツ	30.0	2012/10/8	福島県郡山市郡山女子大	204.8	344.2
281	ハナイグチ	26.3	2012/10/8	青森県七戸町	<14.16	14.2
282	シャカシメジ	25.5	2012/10/10	郡山市高篠山森林公園	<14.89	<16.59
283	クサウラベニタケ	22.0	2012/10/10	郡山市高篠山森林公園	585.5	1002.0
284	クサウラベニタケ	30.0	2012/10/10	郡山市高篠山森林公園	1398.0	2396.0
285	ウラベニホテイシメジ	24.6	2012/10/10	郡山市高篠山森林公園	<15.75	27.3
286	アミタケ	20.7	2012/10/10	郡山市高篠山森林公園	152.8	256.6
287	オオイチョウタケ	32.8	2012/10/10	郡山市逢瀬公園	1525.0	2528.0
288	スギヒラタケ	22.1	2012/10/10	郡山市逢瀬公園	298.1	515.5
289	ハツタケ	20.3	2012/10/10	須賀川市宇津峰山	<19.03	<18.87
290	ハツタケ	30.2	2012/10/12	二本松市笹森山	634.6	1050.0
291	タマゴタケ カサ	25.1	2012/10/14	いわき市石森山	<15.01	32.4
291	タマゴタケ 柄	25.5	2012/10/14	いわき市石森山	<10.39	<10.72
292	ハタケシメジ カサ	30.2	2012/10/14	いわき市石森山	<11.63	<12.38
292	ハタケシメジ 柄	25.2	2012/10/14	いわき市石森山	<12.94	<11.79
293	サクラシメジ カサ	22.2	2012/10/14	いわき市石森山	69.5	106.8
293	サクラシメジ 柄	23.5	2012/10/14	いわき市石森山	62.9	101.7
294	フウセンタケ属	23.0	2012/10/14	いわき市石森山	1482.0	2534.0
296	イボテングタケ	25.0	2012/10/14	郡山市逢瀬公園	61.9	92.4
297	ホンシメジ	25.3	2012/10/14	会津昭和村	23.6	32.5
298	コウタケ	20.1	2012/10/16	郡山市中田町	268.2	510.1
299	原木マイタケ	25.0	2012/10/18	福島県郡山市郡山女子大	145.3	221.9
300	マツタケ	23.5	2012/10/19	郡山市磐梯熱海町	<13.98	19.6
301	ナラタケ	22.3	2012/10/19	郡山市磐梯熱海町	21.2	31.1
302	コウタケ	23.5	2012/10/21	福島県葛尾村	736.6	1240.0
303	ホウキタケ	23.2	2012/10/21	福島県葛尾村	3173.0	5353.0
304	ミネシメジ	21.3	2012/10/21	福島県葛尾村	99.0	159.9
305	ハツタケ	23.7	2012/10/21	栃木県鹿沼市	423.2	705.1
306	クロカワ	27.5	2012/10/22	宮城県丸森町	685.4	1135.0
307	コウタケ	25.1	2012/10/22	宮城県丸森町	482.4	802.0
308	クロカワ	25.5	2012/10/24	福島県飯舘村	9261.0	15200.0
309	ハタケシメジ	30.2	2012/10/24	福島県飯舘村	263.2	464.2
310	シャカシメジ	28.9	2012/10/26	福島県川内村	59.1	100.6
311	コウタケ	25.4	2012/10/26	福島県川内村	241.1	444.7
312	コウタケ	22.0	2012/10/26	福島県川内村	288.6	535.6

313	クロカワ	30.4	2012/10/26	福島県川内村	133.9	226.5
314	ナラタケ	25.0	2012/10/27	会津昭和村	<14.43	<16.75
315	コガネタケ	25.4	2012/10/27	会津昭和村	<15.04	<15.29
316	アイシメジ	25.3	2012/10/27	会津昭和村	42.3	117.7
317	ムキタケ	26.2	2012/10/27	会津昭和村	26.4	49.7
318	コウタケ	26.5	2012/10/29	伊達市梁川町	317.3	615.2
319	ムキタケ	26.3	2012/10/31	郡山市磐梯熱海町	96.3	166.3
320	ツキヨタケ	25.0	2012/10/31	郡山市磐梯熱海町	47.0	97.8
321	ヒラタケ	26.6	2012/10/31	郡山市開成山大神宮	211.7	354.3
322	ヤワナラタケ	30.0	2012/11/1	福島県郡山市郡山女子大	44.0	81.5
323	ナラタケ	25.9	2012/11/3	福島県郡山市河内	126.5	213.6
324	コガネタケ	24.8	2012/11/3	福島県郡山市富田	<12.95	15.0
325	ルリハツタケ	23.6	2012/11/3	伊達市梁川町	699.6	1146.0
326	ナラタケ	25.6	2012/11/8	福島県天栄村羽鳥湖	<14.83	<17.13
327	ハタケシメジ	29.0	2012/11/8	福島県天栄村羽鳥湖	<9.716	15.8
328	クリタケ	31.1	2012/11/8	福島県天栄村羽鳥湖	16.5	28.9
329	ムキタケ	45.4	2012/11/8	福島県天栄村羽鳥湖	39.5	69.3
330	シモフリシメジ	22.0	2012/11/8	福島県天栄村羽鳥湖	29.3	58.8
331	ヒラタケ	27.0	2012/11/9	郡山女子大附属高校	<13.95	17.7
332	シロノハイイロシメジ	25.3	2012/11/9	伊達市梁川町	2444.0	4117.0
333	ツチスギタケモドキ	27.0	2012/11/10	郡山市亀田バイパス脇	76.9	154.1
334	ムラサキシメジ	30.0	2012/11/10	福島県郡山市河内	215.4	334.6
335	ヒラタケ	20.0	2012/12/2	福島県郡山市富田	<20.44	33.1
336	ハタケシメジ	25.4	2012/12/2	福島県郡山市小山田	<14.53	14.6
337	ヒラタケ	33.5	2012/12/5	福島県郡山市大島	17.4	38.8
338	カワラタケ	15.4	2012/12/16	福島県郡山市町東	438.0	780.8
339	エノキタケ	25.2	2012/12/16	福島県郡山市富田	104.8	172.3
340	ヒラタケ	20.8	2012/12/16	福島県郡山市富田	852.1	1419.0

2012年に分析したきので特に高い値を示したもの(1,000Bq以上)には、チリメンチチタケ、クロチチダマシ、ツチカブリ、ルリハツタケ、ハツタケ、アカハツ、シロノハイイロシメジ、オオイチョウタケ、センボンイチメガサ、ホテイシメジ、フウセンタケ属、コウタケ、クロカワ、キクラゲ、アラゲキクラゲ、カワラタケ、スエヒロタケ、ヒイロタケなどがあげられる。このうち、オオイチョウタケについては2011年に100Bq/kg以下と放射性セシウム濃度の低かったきのこと同一場所で採取したきのが、2012年では4,000Bq以上と非常に高い値を示していた。この場所の放射性セシウム濃度は腐葉層で最も高く、次いで表面落ち葉、表土の順であり、菌糸は腐葉層に多く見られたが、このように極端に値が高くなったきのは他には見られないので、原因を明らかにしたいと考えている。

福島県で分析したデータによれば食用きのこで500Bq以上の放射性セシウムが検出されているきのこはコウタケ、アマタケ、サクラシメジ、シャカシメジ、チチタケ、ハツタケであった。また100～499Bqを示しているきのこは、上記のきのこを除きウラベニホテイシメジ、オオモミタケ、ホウキタケ、ハナイグチ、マツタケ、ナラタケ、ハタケシメジ、ヒラタケがある。

反対に我々の分析で低い値(50Bq以下)を示していたきのこにはアイトケ、ヤブレキチャハツ、シロオニタケ、ツルタケ、カバイロツルタケ、ハイカグラテングタケ、タマゴタケ、ツキヨタケ、コガネタケ、ハラタケ、ツチグリなどがあり、福島県内採取のチチタケ、ハツタケ、シャカシメジ、ハタケシメジ、ウラベニホテイシメジ、マツタケ、ナラタケ、ヒラタケでも場所によっては50Bq以下のものも見られた。

これらのデータは明らかにきのこの種類により特徴があり菌根菌、腐生菌といったまとめができないことを示していると思われる。

放射性セシウムは現在落ち葉や腐葉土に多く蓄積しており、土壌では地下5cm付近にとどまっている。従って、きのこの菌糸がどの場所に生育するのかによりセシウムの吸収もかなり異なることが予想される。

富士山周辺地域では、標高ごとのきのこ実体内のセシウム濃度を測定した。その結果を以下図4-4に示す。

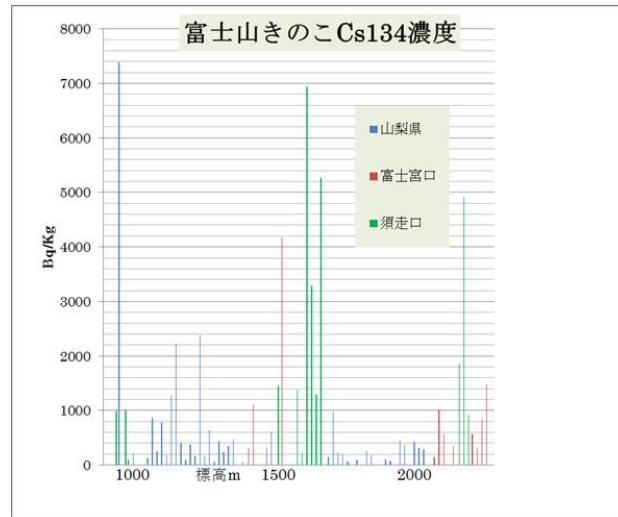


図4-4 富士山の各標高において採集されたきのこ類のセシウム濃度

2011年に富士山(山梨県)で採集した子実体中の放射性Cs-134の濃度は、標高が高い地域では低いことにはすでに報告されている。また、チェルノブイリ事故以降の1990年および1996年に富士山(山梨県)で測定された結果では、放射性Cs濃度は標高が高い地域に発生する子実体の方が高いと報告されている。2012年に富士山(静岡県須走口)で採集されたきのこからは山梨県より濃度が高いだけでなく標高の高い地域まで高濃度のCs-134が検出された。また、富士宮口は須走口よりもCs-134濃度が低かった。さらに、富士宮口では標高の高い地域からは山梨県の標高の高い地域より高濃度のCs-134が検出された。

富士山で放射性Cs濃度が高いきのこはヌメリガサ科のホテイシメジ、コガネヌメリガサ、ベニタケ科のドクベニタケ、クロハツモドキ(広義)、クサハツ、カラマツチチタケ、アカモミタケ、モエギタケ科のチャナメツムタケ、フウセンタケ科のショウゲンジ、イッポンシメジ科のクサウラベニタケ、ヌメリイグチ科のハナイグチ、ナヨタケ科のナヨタケ属の1種などである。腐生菌は菌根菌より放射性Cs濃度が低いとの報告がある。しかし、腐生菌と考えられるホテイシメジ、チャナメツムタケ、ナヨタケ属の1種は多くの菌根菌よりも放射性Cs濃度が

高かった。菌根菌が腐生菌より放射性Cs濃度が高いとは限らず、きのこの種類や発生環境などによる違いの方が大きいことが示唆された。

以上のデータは、これまで報告されてきたように、EM菌がSAP菌やLIG菌よりも高い放射能濃度を示す、というデータと明らかに矛盾する。チェルノブイリ事故においては、事故後2年以上経ってから報告された値が多く、今回の調査のように事故後1年未満から調査・測定をした例は無く、貴重なデータである。地上に発生するきのこの類のうち、特に木材上に発生するようなLIG菌の数種が高い値を示したことは、おそらく基質からではなく、フォールアウトによる影響を見ていることになると考えられるが、明らかに福島第一原発事故のフォールアウト後に発生したきのこの類においても高い値を示すSAP菌およびLIG菌が見受けられることから、基質からの吸収・濃縮が起こっていることは否定できない。今後、セシウムがより地中深くに浸透する可能性があり、そうなるとEM菌からの吸収が増え、依然の報告の通りEM菌による濃縮が検出されてくる可能性は高い。今回のデータをふまえて、中～長期的なきのこの類の放射能濃度モニタリングが必要である。

我が国は、2011年の福島第一原発事故の他に、チェルノブイリ原発事故（1986年）や大気核実験による大量の放射性降下物（1963年）などによる放射能汚染を経験している。地衣類は寿命が数十年と長く放射性物質を蓄積する能力が高いと言われていることから、過去に採集された標本においても、半減期が約30年であるCs137は現在でも検出可能であると予想された。国立科学博物館に保管されている1964年に福島県松川浦において採集された*P. tinctorum*の放射性物質濃度を測定したところ、506Bq/kgのCs137が検出された（Cs134やI181は未検出であった）。一方、2008年に茨城県大洗で採集された*P. tinctorum*ではCs137は未検出であった。これらのことから、放射能汚染後に何年か経過することによって、放射性物質そのものの自然崩壊や生態系外への流出などにより、環境中の放射性物質はいずれ未検出レベルに減少することが予想される。国立科学博物館に保管されている標本は採集場所および採集年月日が記されており、過去の放射能汚染を知ることができる貴重な資料となりうる。現段階では測定試料の量や均一化するために標本を破壊しなければならないことがネックとなっており、微量サンプルからの測定技術の確立が早急な課題となっている。

引用文献

1. Asahina, Y. (1936-1940) *Mitteilung. J. Jpn. Bot.* 12: 516-525, 859-872, 13: 529-536, 855-861, 14: 39-44, 244-250, 318-323, 650-659, 767-773, 15: 465-472, 16: 185-193.
2. Bretten, S. et al. (1992) *Analyst* 117: 501-503.
3. Culberson, C. F. and Johnson, A. (1982) *J. Chromatogr.* 238: 483-487.
4. Feige, G. B., Niemann, L. & Jahnke, S. (1990) In: H. M. Jahns (ed.): *Contributions to Lichenology in Honour of A. Henssen. Bibliotheca Lichenologica.* 38: 63-77.
5. Iurian, A. R. et al. (2011) *Romanian Journal of Physics* 56: 983-992.
6. 黒川道. (1964) 地衣. 国立科学博物館, 東京. 39pp.
7. Kurokawa, S. and Kashiwadani, H. (2006) - *National Science Museum Monographs No. 33, National Science Museum, Tokyo.* 157 pp.
8. Nimis, P. L. (1996) *Studia Geobotanica* 15: 3-49.
9. Palmer, H. E. et al. (1963) *Science* 142: 64-66.
10. Salo, A. et al. (1964) - *Nature* 201: 1177-1179.
11. Tuominen, Y. et al. (1973) In: V. Ahmadjian & M. E. Hale (eds.): *The Lichens.* Academic Press, New York and London, pp. 185-223.