

**環境放射線の生物・生態系影響に関する調査
(平成 25 年度)**

目次

1	相同組換え検出植物を用いた低線量放射線影響の調査.....	1
1-1	はじめに.....	1
1-2	DNA 修復頻度を検出することができる植物の開発.....	1
1-2-1	生物による DNA 損傷修復機構.....	1
1-2-2	遺伝子改変植物に導入したコンストラクト.....	3
1-2-3	遺伝子改変植物の栽培と DNA 修復頻度の検出方法.....	3
1-3	福島県の土壌より放出されるガンマ線による DNA 損傷修復頻度の検出.....	4
1-3-1	放射性物質に汚染された土壌の採取.....	4
1-3-2	汚染土壌で栽培した遺伝子改変植物における相同組換え頻度.....	4
1-3-3	遺伝子改変植物を用いた外部被曝による相同組換え頻度.....	6
1-4	遺伝子改変植物を用いた放射線以外の環境ストレスによる相同組換え頻度の検証.....	7
1-4-1	放射線以外の環境ストレスによる DNA 損傷.....	7
1-4-2	遺伝子改変植物の生育と大気汚染ガスの曝露及び DNA 損傷の検出.....	8
1-4-3	遺伝子改変植物を用いたオゾンとガンマ線による DNA 損傷リスクの比較.....	8
1-5	遺伝子改変植物の培養細胞化による現地に置ける線量評価手法の開発.....	9
1-5-1	培養細胞株を用いた DNA 損傷量の評価手法.....	9
1-5-2	培養細胞株の確立.....	10
1-5-3	培養細胞株を用いた GUS 活性の検出.....	10
1-6	おわりに.....	12
	引用文献.....	12
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.....	12
2-1	はじめに.....	12
2-2	サクラの花粉熟成に対する影響.....	13
2-2-1	材料と方法.....	13
2-2-2	結果.....	15
2-2-3	考察.....	15
	引用文献.....	16
	謝辞.....	16
2-3	アサガオの生殖器官と遺伝子発現に対する影響調査.....	16
2-3-1	材料と方法.....	16
2-3-2	結果.....	18
2-3-3	考察.....	20
	引用文献.....	21
	謝辞.....	21
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.....	22
3-1	はじめに.....	22

3-2	材料と方法	22
3-2-1	アカネズミの捕獲	22
3-2-2	放射性物質蓄積量の計測	23
3-2-3	30km 圏内に分布するアカネズミ遺伝的変異の評価	23
3-2-4	精巣および精巣上体における 8-OHdG 蓄積状況の把握	25
3-2-5	精巣上体精子奇形の観察	26
3-2-6	DNA バーコーディングによるアカネズミ糞分析による食性解析	26
3-3	結果	30
3-3-1	捕獲	30
3-3-2	放射性物質蓄積量	30
3-3-3	放射線による遺伝的変異の評価	32
3-3-4	精巣および精巣上体における 8-OHdG 蓄積状況	35
3-3-5	精巣上体精子奇形	35
3-3-6	食性	36
3-4	考察	37
3-4-1	精子細胞への放射線の影響について	37
3-4-2	遺伝的変異の評価	38
3-4-3	放射性物質の蓄積量と食性の関連について	38
	引用文献	38
4	野生菌類（キノコ類・地衣類）における放射性セシウムの動向把握	39
4-1	はじめに	39
4-2	地衣類を活用した放射性物質モニタリングにむけての基盤調査	40
4-3	つくば市における地衣類の放射性物質濃度分布	40
4-3-1	材料および方法	40
4-3-2	結果および考察	41
4-4	地衣類ナメラクロムカデゴケにおける生物学的半減期の推定	44
4-4-1	材料および方法	44
4-4-2	結果および考察	44
4-5	茨城県つくば市内を中心とする地域におけるキノコ類の放射性セシウム濃度の動向	45
4-5-1	はじめに	45
4-5-2	材料と方法	45
4-5-3	結果	46
4-5-4	考察	46
4-6	2011 年 3 月以前のキノコ類標本から探るセシウムの動向	47
4-6-1	はじめに	47
4-6-2	材料と方法	47
4-6-3	結果と考察	48
	引用文献	52

1 相同組換え検出植物を用いた低線量放射線影響の調査

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）の事故により原子炉から放射性物質が大気中に放出された。これらの多くは当時の風向きにより大半は太平洋側に放出されたが、2011年3月15日または21日の降雨により福島県を中心に陸上にも降り注いだ。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のうち放射性セシウム（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。陸上に降り注いだ放射性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ない事から、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体物質デオキシリボ核酸（DNA）に損傷を与える事が知られている。生物はこのDNA損傷を修復するメカニズムを持っているが、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る。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ると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。

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、福島県内の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ている。福島第一原発の事故に由来す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 et al. (2012) による鳥類の個体数への影響調査、及びHiyama et al. (2012) による福島で採取したヤマトシジミにおける形態異常の増加や発生の遅延の報告など限られたものしかない。後者については遺伝的な影響についても報告されている事から、DNAレベルでの影響が示唆されているが、現在のところこの点については明らかにされていない。

このように福島第一原発事故に由来する放射線による生物のDNA損傷及びそれに伴う遺伝子変異が懸念されているが、一方でDNA損傷はガンマ線とは関係なく様々な環境要因により日常的に引き起こされており、生物はこのDNA損傷を修復する為のメカニズムを持っている。H24年度の報告書では植物への個体、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た。これにより、現在の陸域における放射線レベルにより植物においてDNA損傷が線量依存的に起こっている事を明らかにした。今年度はこの植物を使用して、現在の福島県における土壌由来の放射線によるDNA損傷量が生物の持つDNA修復能を上回っているかどうかについて検証を行った。

1-2 DNA修復頻度を検出することができる植物の開発

1-2-1 生物による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により生じる。こうして生じたDNA損傷が修復されなければ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）。相同組換え修復では置換・欠失した塩基が除去され、二本鎖が切断された状態から始まる（図1-1の1段階目）。この二本鎖の切断面はヌクレアーゼにより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 (図 1-1 の 2 段階目)。次に、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 DNA (図中の青い DNA) と相同組換えを起こす (図 1-1 の 3 段階目)。この正常な DNA の遺伝情報を用いて新規 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 (図 1-1 の 4 段階目)。つまりこの修復過程では必ず「相同組換え」の過程を経る。

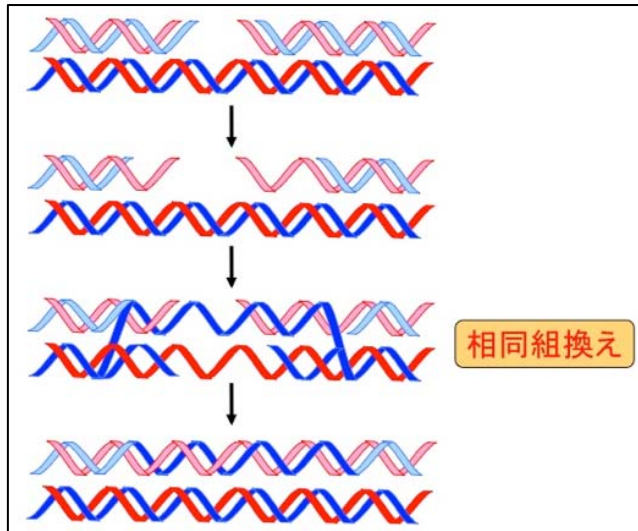


図 1-1 相同組換えによる DNA 損傷修復機構

前年度に我々は 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。詳細は H24 年度の報告書に示してあるが、その概要を図 1-2 に示す。この植物に放射線 (γ 線) が照射されると、ある一定の確率で細胞内の DNA に損傷 (二本鎖の切断) が生じる。DNA 損傷が起きた細胞ではこれを修復するために相同組換え修復に関わる一連のタンパク質群が増加する。これにより、DNA 損傷が起きた細胞では DNA 修復活性が高まる事になる。前年度開発した遺伝子改変植物ではこの細胞における修復活性の増加をとらえる事により DNA 修復の視覚化ができるような遺伝子 (以下 GU-US とする) を導入してある。前年度までに DNA 修復を定量的にモニタリングする事が出来る植物を 4 系統 (#11、#651、#1406、#1415) 作製したが (Kovalchuk et al., 1998)、これらのうち本研究では DNA 損傷の検出感度が高く、放射線量依存的に DNA 修復を検出する事が出来る #1406 系統を用いて研究を行った。

放射線 (γ 線) が照射されると、ある一定の確率で細胞内の DNA に損傷 (二本鎖の切断) が生じる。DNA 損傷が起きた細胞ではこれを修復するために相同組換え修復に関わる一連のタンパク質群が増加する。これにより、DNA 損傷が起きた細胞では DNA 修復活性が高まる事になる。前年度開発した遺伝子改変植物ではこの細胞における修復活性の増加をとらえる事により DNA 修復の視覚化ができるような遺伝子 (以下 GU-US とする) を導入してある。前年度までに DNA 修復を定量的にモニタリングする事が出来る植物を 4 系統 (#11、#651、#1406、#1415) 作製したが (Kovalchuk et al., 1998)、これらのうち本研究では DNA 損傷の検出感度が高く、放射線量依存的に DNA 修復を検出する事が出来る #1406 系統を用いて研究を行った。

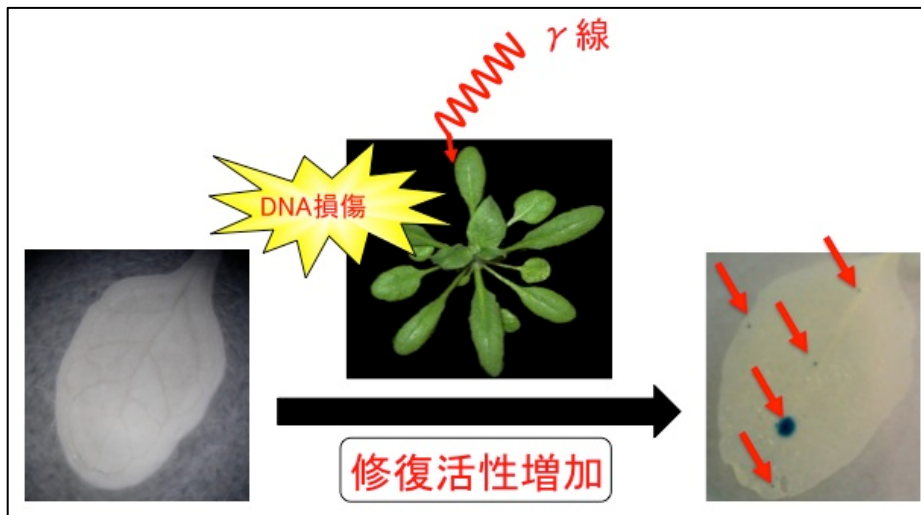


図 1-2 DNA 修復頻度を検出することができる植物

DNA 修復の検出には GU-US を導入した植物を用いた。この植物に γ 線があたり、DNA 損傷が起きるとその細胞で相同組換えに由来する修復活性の増加が起きる。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 (赤矢印)

1-2-2 遺伝子改変植物に導入したコンストラクト

遺伝子改変植物を用いた DNA 損傷の検出の詳細については H24 年度の報告書に示してある。ここではその内容を簡便に記述する。相同組換えを視覚的に見る為に、大腸菌由来の β -グルクロニダーゼタンパク質をコードしている遺伝子を用いた。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。本研究で用いた遺伝子改変植物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 GU-US コンストラクトを作製し、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 1-2 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。本研究ではこのような仕掛けを施した GU-US をモデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の生態型 Col-0 に導入した。

1-2-3 遺伝子改変植物の栽培と DNA 修復頻度の検出方法

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。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種子を 100 粒ずつ播種した。その後、気温 24 度、相対湿度 70%、光合成光子束密度 (photosynthetic photon flux density, 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 (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 染色溶液 (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 (DNA 修復数) を計測した。

1-3 福島県の土壌より放出されるガンマ線による DNA 損傷修復頻度の検出

1-3-1 放射性物質に汚染された土壌の採取

汚染土壌の採取は 2013 年 5 月に行った。採取地点を図 1-3 に示す。土壌の採取は空間線量率の異なる 3 地点で行い、空間線量率の最も低い地点のサンプルを S1（空間線量率 1.31 $\mu\text{Sv/hr}$ ）、空間線量率が中間地点のサンプルを S2（空間線量率 4.74 $\mu\text{Sv/hr}$ ）空間線量率の最も高い地点のサンプルを S3（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 10 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、65~80g 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

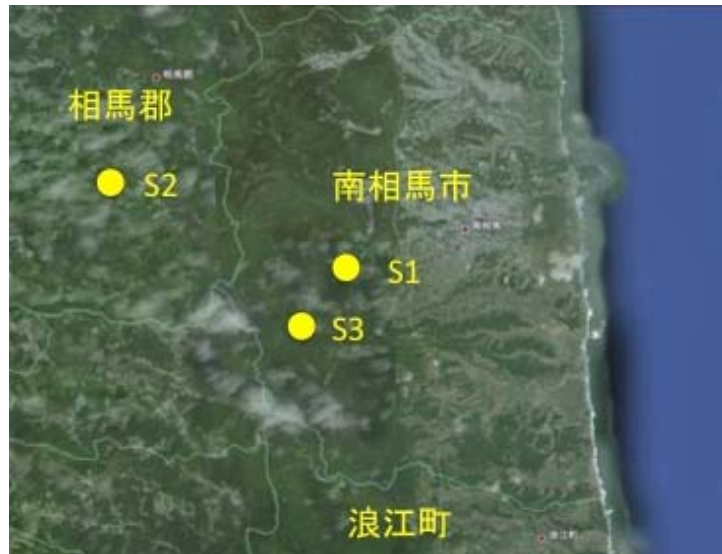


図 1-3 放射性物質汚染土壌の採取地

S1、S2 及び S3 の地点で土壌を採取

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 1-1）。その結果、各サンプルの放射能は、S1 土壌において Cs-134 及び Cs-137 はそれぞれ $2,028 \pm 34 \text{ Bq/kg DW}$ 及び $3,562 \pm 49 \text{ Bq/kg DW}$ 、S2 土壌

では $12,626 \pm 326 \text{ Bq/kg DW}$ 及び $21,593 \pm 593 \text{ Bq/kg DW}$ 、S3 土壌ではそれぞれ $26,729 \pm 446 \text{ Bq/kg DW}$ 及び $46,166 \pm 875 \text{ Bq/kg DW}$ であった。

表 1-1 採取地の空間線量率（地表面）、Cs-137 濃度

採取地	空間線量率	放射能(Cs-137)
S1	1.31 $\mu\text{Sv/hr}$	$3,562 \pm 49 \text{ Bq/kg DW}$
S2	4.74 $\mu\text{Sv/hr}$	$21,593 \pm 593 \text{ Bq/kg DW}$
S3	9.99 $\mu\text{Sv/hr}$ 以上	$46,166 \pm 875 \text{ Bq/kg DW}$

1-3-2 汚染土壌で栽培した遺伝子改変植物における相同組換え頻度

採取した 3 種類の汚染土壌及び清浄な土壌において遺伝子改変植物を 30 日間栽培し、相同組換え頻度を観察した。30 日間の栽培期間中に植物が浴びた積算ガンマ線量を積算線量計（Polimaster PM1621M）を用いて測定したところ、清浄土壌では 57.6 μSv 、S1 土壌では 261 μSv 、S2 土壌では 1,340 μSv 、S3 土壌では 2,840 μSv であった。このような条件において栽培した植物において GUS スポットの検出を 1-2-3 の手順にて行った。清浄な土壌で栽培した遺伝子改変植物に見られる典型的な GUS 染色像を図 1-4 (A) に示した。この条件で生育させた植物においては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、同じ植物を放射性物質で汚染された土壌 S3 で栽培すると、図 1-4 (B) 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る。

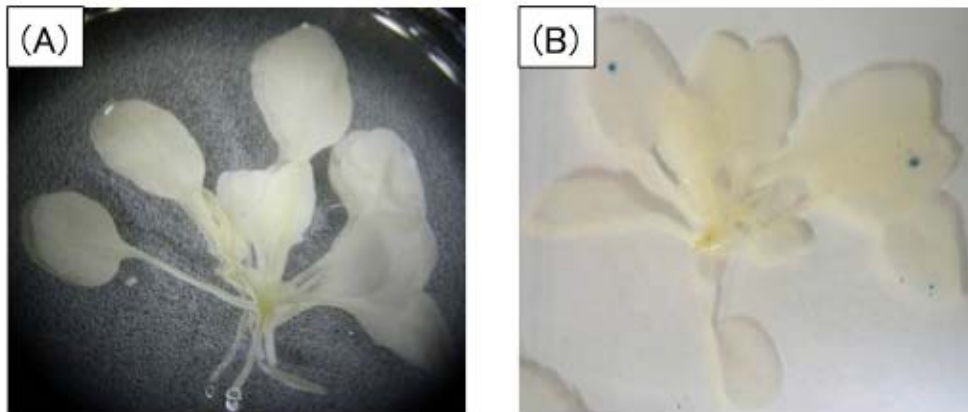


図1-4 放射性物質汚染土壌で栽培した植物における DNA 修復由来の GUS スポット

清浄な土壌及び汚染された土壌 (S3) にて 30 日間栽培した植物における DNA 修復に由来する GUS スポットの例。(A)清浄土壌で栽培したシロイヌナズナの GUS 染色像。(B)汚染土壌で栽培したシロイヌナズナの GUS 染色像。青紫色の斑点が DNA 修復由来の GUS のスポット。

そこで遺伝子改変植物に生じる GUS スポットの数が土壌放射線量に対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、S2 土壌及び S3 土壌であり、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、57.6 μSv (空間線量率 0.08 $\mu\text{Sv/h}$)、261 μSv (空間線量率 0.35 $\mu\text{Sv/h}$)、1,340 μSv (空間線量率 1.8 $\mu\text{Sv/h}$) 及び 2,840 μSv (空間線量率 3.8 $\mu\text{Sv/h}$) であった。このような土壌において栽培した GU-US 導入シロイヌナズナにおける相同組換え頻度を図 1-5 に示す。清浄土壌における個体あたりの DNA 修復頻度は 1.5 ± 0.17 ($n=78$) であった。この頻度は積算ガンマ線量の増加に伴って増加していき、S1 土壌で育てた植物における DNA 修復頻度は 12.99 ± 0.58 ($n=80$ 、清浄土壌の 8.7 倍)、S2 土壌では 17.62 ± 1.35 ($n=72$ 、清浄土壌の 11.8 倍)、S3 土壌では 22.74 ± 1.28 ($n=68$ 、清浄土壌

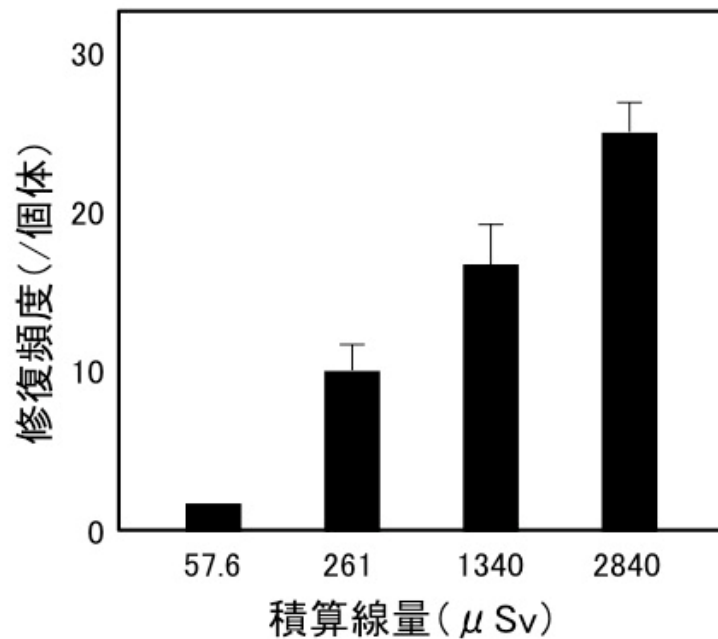


図1-5 異なる線量の汚染土壌で栽培した植物における DNA 修復由来の GUS スポット数の変化

清浄な土壌 (積算線量 57.6 μSv)、S1 土壌 (積算線量 261 μSv)、S2 土壌 (積算線量 1340 μSv) 及び S3 土壌 (積算線量 2840 μSv) 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 DNA 修復頻度。バーは標準誤差を示す。

の 15.2 倍) であった。以上の結果から、汚染土壌に由来するガンマ線により植物における DNA 損傷量は積算線量依存的に増加している事が明らかになった。実際に、S1 土壌、S2 土壌、及び S3 土壌にて栽培した植物におけ

る DNA 修復数と積算線量との一次相関を計算したところ、 $R=0.99$ となり高い相関を示した。

1-3-3 遺伝子改変植物を用いた外部被曝による相同組換え頻度

上述したように本研究で用いた遺伝子改変植物を放射性物質により汚染された土壌にて栽培を行うと、汚染土壌中の放射性セシウム濃度の増加とともに DNA 修復数の増加が見られた。使用した汚染土壌には主に Cs-137 が放射線源として含まれていると考えられるが、この物質はバリウム (Ba)-137 の基底状態に戻る事で安定になる。Cs-137 のうち約 6%程度が直接 Ba-137 となりこれがベータ線を放出するが、残りの 94%はベータ崩壊により Ba-137m となり、さらにこれがガンマ崩壊する事により Ba-137 となる。この過程で放出されるベータ線はガンマ線に比べて透過能力は低いが、高い電離作用を持つ。したがって、ベータ線による影響は一般に体内に取り込んだ場合の内部被曝により現れると考えられている。このことから、汚染土壌で栽培した植物には土壌中の Ba-137m が Ba-137 に崩壊する過程で放出されるガンマ線による外部被曝と、体内に取り込んだ Cs-137 が Ba-137 あるいは Ba-137m に崩壊される過程で放出されるベータ線による内部被曝の両者が影響している可能性がある。実際、1-3-2 で S3 土壌にて 30 日栽培した遺伝子改変植物における Cs-137 濃度は 687 Bq/kg DW (Cs-134 は 362 Bq/kg DW) であったことから本研究で用いた植物は一定量の内部被曝をしている事が推定される。したがって、図 1-5 で得られた DNA 修復数の結果は、放射性セシウムによる外部被曝と内部被曝の両者を同時に評価していると考えられる。そこで福島土壌における植物栽培による DNA 修復について外部被曝と内部被曝による影響を

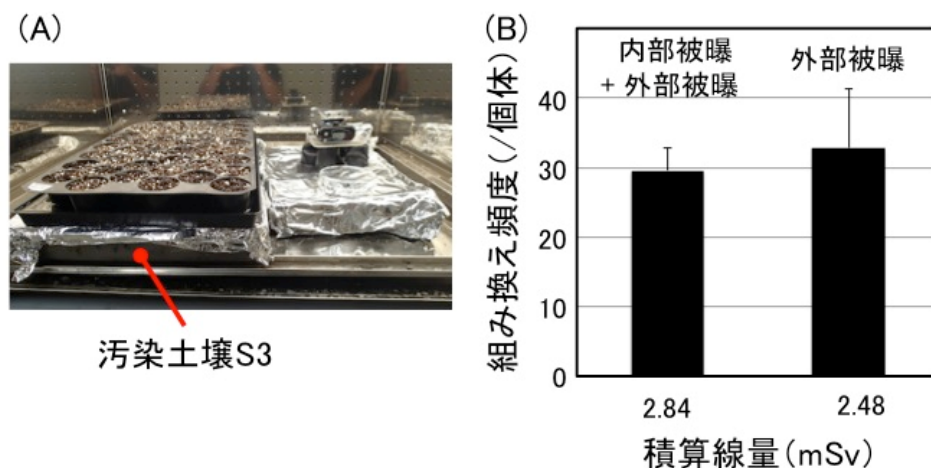


図 1-6 外部被曝させた植物における相同組換え頻度の検証

(A) 外部被曝中の植物の様子。植物への外部被曝は汚染土壌 S3 をガンマ線源として行った。写真右側には外部被曝量を計測するための積算線量計を設置してある。(B) 汚染土壌 S3 で栽培した植物 (内部被曝 + 外部被曝) と汚染土壌 S3 由来のガンマ線下で栽培した植物における組換え頻度。

分ける目的で汚染土壌に由来するガンマ線を用いて植物への外部被曝実験を行った。外部被曝実験の様子を図 1-6(A) に示す。汚染土壌 S3 を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、これをガンマ線源とした。この汚染土壌の上部に植物栽培用のトレイを置き、トレイに敷き詰めた清浄土壌 (バーミキュライト : パーライト = 1 : 1) に遺伝子改変植物の種子を播種した。このような条件下で植物を 30 日間栽培した。栽培期間中の積算ガンマ線量を積算線量計 (Polimaster PM1621M) にて測定したところ、 $2,480 \mu\text{Sv}$ であった。また対照区として 1-3-2 と同様に S3 土壌にて遺伝子改変植物の栽培を行った。この

際の積算ガンマ線量は 2,840 μSv であり外部被曝のみの処理を行った植物への積算ガンマ線量と同様な値であった。このような条件下で栽培した植物における組換え頻度 (DNA 修復頻度) を測定した。その結果、S3 土壌で栽培した植物個体あたりの DNA 修復頻度は 29.56 ± 3.26 ($n=63$) であり、S3 土壌由来のガンマ線による外部被曝を行った条件で栽培した植物個体あたりの DNA 修復頻度は 32.79 ± 8.52 ($n=56$) であった (図 1-6)。これらについて検定を行ったところ有意差は認められなかった事から S3 土壌における栽培で観察された DNA 修復の誘導は、外部被曝に由来することが示唆された。一般に内部被曝による DNA 損傷への影響は無視できない存在であるが、本研究で指標としている相同組換えにより修復される DNA 損傷についてはあまり影響が無いとの結果が得られた。このように内部被曝の影響が小さくなった原因としては、使用した植物への放射性セシウムの移行が小さく抑えられた事に由来すると考えられる。上述したように汚染土壌 S3 における Cs-137 濃度は $26,729 \text{ Bq/kg DW}$ であり、この土壌で 30 日間栽培した遺伝子改変植物の Cs-137 濃度は 687 Bq/kg DW であった事から、植物への Cs-137 移行係数は 0.025 と算出される。この値は本研究で用いたシロイヌナズナと同属であるキャベツの移行係数 0.026 とほぼ同様であるが (Tsukada and Hasegawa, 2002)、葉菜類で見られるような高い移行係数 (0.049) ではなかった (Kamei-Ishikawa et al., 2008)。したがって、本研究で用いた植物では DNA 損傷の誘発に対して外部被曝の寄与が大きくなったが、放射性セシウムの移行係数が比較的高い植物においては内部被曝由来による DNA 損傷も無視できないのではないかと推測される。

1-4 遺伝子改変植物を用いた放射線以外の環境ストレスによる相同組換え頻度の検証

1-4-1 放射線以外の環境ストレスによる DNA 損傷

本研究では GU-US コンストラクトを導入した遺伝子改変植物を用いて、福島第一原発事故に由来する放射性セシウムからのガンマ線等による DNA 損傷からの修復について検証を行ってきた。一般的に放射線量の増加は生物の DNA に損傷を与える事から、この事故による土壌放射線量の増加は特に突然変異率の増加を誘発する可能性から関係する一般の方々には不安を与えている。しかしながら、DNA 損傷に由来する突然変異の誘発は放射線に限り引き起こされる事象ではなく、変異源性化学物質や紫外線等を始めとする様々な環境ストレスによっても誘発される事が知られている。太陽光に含まれる紫外線のうち波長が $280 \sim 315 \text{ nm}$ のものは UV-B と呼ばれるが、生物の DNA は最大吸収スペクトルが 265 nm 付近に存在し、UV-B によるエネルギーを受け取りやすくなっている。したがって、UV-B 照射された生物では DNA を構成する分子が励起され不安定化し、二重らせん構造が破壊され、隣接する塩基同士が 2 量体を形成する。これにより塩基置換等が起こり、突然変異が誘発される。また、植物に対する多くの環境ストレスまたは病原菌感染は生体内に活性酸素種の生成を引き起こすが、発生した活性酸素種は DNA の酸化を促進し、この酸化物が適切に除去されないと DNA 変異の蓄積が起こる。つまり、DNA 損傷は放射線によってのみ起きるものではなく、様々な環境ストレスによっても起きている。福島第一原発事故に由来する放射線量の増加は確かに DNA 損傷量の増加リスクを伴う事象であるが、放射線量の増加に伴うリスクをことさら懸念するのはこのストレス源が他の環境ストレスに比べて視覚、嗅覚等我々の感覚によって認知しにくい事に由来するのではないかと推察される。そこで本研究では、遺伝子改変植物 GU-US を用いて、放射線以外の他の環境ストレス下における DNA 損傷量の定量化を行った。これにより生じた DNA 損傷量を指標として様々な環境ストレスからのリスクを GU-US 植物という同一の指標を用いた比較が可能であるかの検証を行った。

1-4-2 遺伝子改変植物の生育と大気汚染ガスの曝露及びDNA 損傷の検出

本研究では植物への環境ストレスとして大気汚染ガスの一種であるオゾンを選択した。オゾンは光化学オキシダントの主要成分であり、気孔を介して植物に取り込まれると速やかに活性酸素種を生成する事が知られている。オゾン曝露するための GU-US を導入した遺伝子組換えシロイヌナズナの生育を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行った。200 粒程度の種子を 1-2-3 と同様に表面殺菌し、殺菌した種子をロックウールに播種した。種子の発芽をそろえるため、4 度に 3 日間放置し、その後、気温 24 度、相対湿度 70%、PPFD 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に設定した育成チャンバーにて植物の栽培を行った。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。播種後 24 日目からこの植物を国立環境研究所生物環境調節実験棟にあるオゾン曝露チャンバーにてオゾン曝露を開始した。このチャンバーは、気温 24 度、相対湿度 60-70%、PPFD 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、オゾン濃度 100 ppb に設定した。このオゾン濃度は光化学オキシダント注意報が発令される 120 ppb を下回るものであり、埼玉県など光化学オキシダント濃度の比較的高い地域ではしばしば観察される濃度である。植物へのオゾン曝露は朝 10 時から午後 4 時まで 6 時間行い、これを 7 日間繰り返した。オゾン処理後速やかに地上部を回収し、1-2-3 と同様に GUS 染色を行い、個体あたりの DNA 修復頻度を計測した。

1-4-3 遺伝子改変植物を用いたオゾンとガンマ線による DNA 損傷リスクの比較

一般に高濃度のオゾンを急性曝露した植物では葉に可視的な障害が観察される事が知られているが、本研究によるオゾン曝露条件では可視障害の発現は見られなかった。このような状態の植物を用いて DNA 修復量を計測したところ、植物 1 個体当たりの GUS スポット数は 16.24 ± 0.91 ($n=81$) であった。この数値を 1-3-2 で計測した積算ガンマ線量に由来する DNA 修復量に換算するため、積算ガンマ線量 261 μSv 、1,340 μSv 、2,840 μSv における修復頻度との一次相関式を求めた。その結果、積算ガンマ線量と DNA 修復頻度との関係は $y = 265x - 3232$ ($R^2=0.99$) と高い一次相関を持つ事が明らかになった (図 1-7)。

そこでこの式にオゾン曝露で得られた GUS スポット数を x として代入したところ、 y は 1,071 と算出された。この事は 100 ppb のオゾン曝露を一日 6

時間、7 日間に渡って行う事のリスクは、30 日間の積算ガンマ線量が 1,071 μSv の場合と同じである事を示している。30 日間の積算ガンマ線量 1,071 μSv を空間線量率に換算すると 1.49 $\mu\text{Sv/h}$ であることから、本研究で用いたオゾン濃度 100 ppb によるリスクは空間線量率 1.49 $\mu\text{Sv/h}$ と同等であることが示された。しかしながら、これ

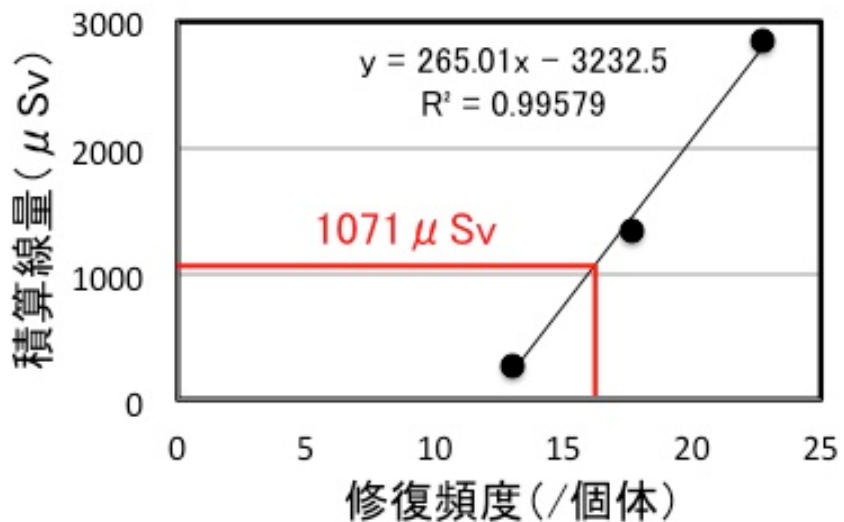


図 1-7 オゾン曝露による DNA 損傷量の積算ガンマ線による DNA 損傷リスクへの換算

1-3-2 で得られた積算ガンマ線による DNA 修復頻度と積算ガンマ線量との関係を一次相関で表した。

らの数値は単純に比較できない可能性がある。というのは100 ppbのオゾン曝露は30日間生育させた植物の生育後期の1週間行っただけであるのに対し、放射性物質によるガンマ線被曝は植物の生育期間全体を通して行われているからである。したがって、これらの異なるストレス間でDNA損傷頻度を比較するためには、汚染土壌による生育をオゾン曝露と同様に30日間の生育期間の内、最後の7日間だけ行う、または100 ppbのオゾン曝露を30日間の生育期間中に渡って行う必要がある。

1-5 遺伝子改変植物の培養細胞化による現地に置ける線量評価手法の開発

1-5-1 培養細胞株を用いたDNA損傷量の評価手法

上述したように本研究により開発した遺伝子改変植物 GU-US は福島第一原発事故により放出された放射性物質による植物のDNA損傷の評価を行う事が出来るだけでなく、様々な環境ストレスによるDNA損傷の評価を行う事が出来る可能性が示された。しかしながらこの植物は人工的な遺伝子改変により作製されたため、野外における使用は難しい。なぜならば本研究で作製した植物は「遺伝子組換え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（通称カルタヘナ法）」の規定では「第二種使用」の承認しか受けていないため、特定の研究施設での栽培・研究は認められているものの、野外における栽培は認められていない。したがって、現在のところこの植物を使って直ちに福島県内の異なる放射線量におけるDNA損傷を現地栽培で評価することは難しい。現地栽培における遺伝子改変植物の適用は、放射線以外の要素（日射量、気温、降水量）を含んだ総合的なDNA損傷量の評価を行う事が出来ると共に、室内実験では利用できる土地面積の制約で現地の空間線量率を過小評価する懸念があるため必要性が高い。実際に後者については、1-3-1及び1-3-2で示されたように空間線量率が9.99 $\mu\text{Sv/h}$ 以上の場所より採取した汚染土壌 S3 を用いても、本研究で行った栽培規模では3.8 $\mu\text{Sv/h}$ 程度の空間線量

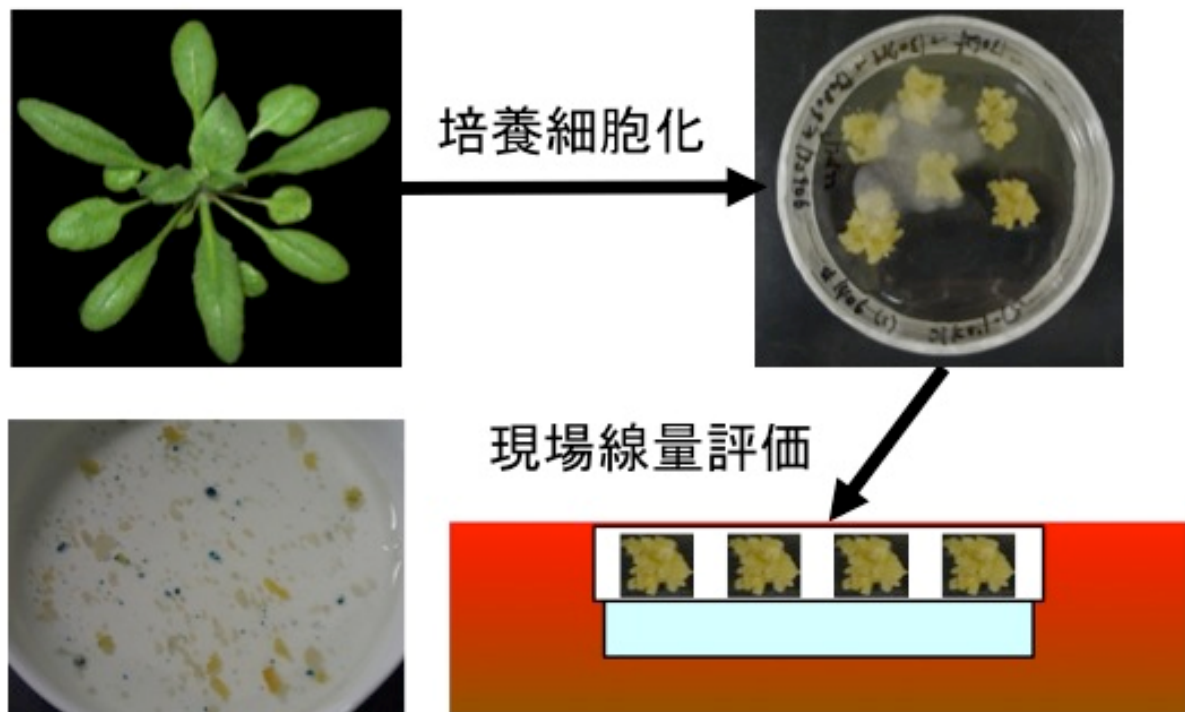


図 1-8 培養細胞化した遺伝子改変植物による汚染土壌からのオンサイト評価手法の概略

率しか再現できていない。この問題を打破するためには本研究で用いた遺伝子改変植物を正式な手続きに則り「第一種使用」の承認を受ける必要がある。しかしながら、「第一種使用」の承認を得るためには、遺伝子改変植物の生理学及び生態学的な特性を多岐にわたって明らかにする必要があり、また、承認には有識者による厳格な審査を受ける必要があり、多大な時間と労力が必要となる。

それではどのようにして現地土壌における DNA 損傷の評価をすれば良いのであろうか？その一つの解決策としては遺伝子改変植物の培養細胞化が挙げられる。カルタヘナ法施行規則第一条に、遺伝子組換え生物から除外されるものとして、「分化する能力を有する、又は分化した細胞等（個体及び配偶子を除く。）であって、自然条件において個体に成育しないもの」と定義されている。植物由来の培養細胞は適切な条件下におけば分化する能力を有するが、自然条件では増殖及び個体に生育する事は無い。そのため、遺伝子組み換え植物に由来する培養細胞は、カルタヘナ法による規制の対象外となる。したがって、本研究で用いた遺伝子改変植物を培養細胞化すれば福島県の現地汚染土壌において被曝ガンマ線量による DNA 損傷頻度の検出、ならびに DNA 修復頻度について評価できるのではないかと着想した。その概要を図 1-8 に示す。本研究で用いた遺伝子改変植物をカルス化し培養細胞を確立する。この培養細胞をシャーレに植え次ぎ、シャーレごと汚染土壌中に埋設する。一定期間静置後、シャーレを取り出し、培養細胞塊を GUS 染色する事により DNA 損傷の評価を行う事が出来るのではないかと考えた。培養細胞は植物体と異なり、シャーレに入った培地内に炭素源を入れておく事により成長する。培養細胞を使用する事は植物体を直接利用する事に比べて以下のようなメリットがある。植物体を DNA 損傷評価に利用する場合には、土壌に由来するガンマ線の他に日射量、気温、降水量等の要因によって結果が大きく左右される。一方で培養細胞を DNA 損傷評価に使用する場合には、シャーレごと培養細胞を埋設する事により、日射量及び降雨量の外的要因を無視する事ができ、植物体を使用する場合に比べて土壌に由来するガンマ線の評価をより正確に出来る可能性を秘めている。

1-5-2 培養細胞株の確立

遺伝子改変植物 (#1406 株) の種子 100 粒程度を 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、殺菌液 (1%次亜塩素酸ナトリウム) を 1ml 加え、10 分間静置した。10 分後、クリーンベンチ内にて 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種子を滅菌水ごと 1/2 MS 培地 (MS salt、2.5% gellan gum、pH5.7) 播種した。3 日間、4 度に静置後、気温 24 度、相対湿度 70%、PPFD 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に設定した育成チャンバーにて植物の栽培を行った。10 日後、植物の胚軸部分を 10 mm 程度メスにて無菌的に切り出し、プラスチックシャーレに入った CIM 培地 (1/2 MS salt、Bamborg B5、0.5 g/l MES、20 g/l Sucrose、2.5% gellan gum、0.5 mg/l 2,4-D、0.1 mg/l kinetin、pH5.7) に植え継いだ。植え継いだシャーレの周囲をサージカルテープでシールし、気温 24 度、相対湿度 70%、PPFD 30 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ に設定した育成チャンバーにて静置した。カルスが出現するまでの間、胚軸を一週間おきに新しい CIM 培地に植え継いだ。植え継ぎ後、およそ 1 週間でカルス形成が始まった (図 1-9A, B)。この後、1 週間おきにカルス化した部分 (直径約 3 mm) を新しい CIM 培地に植え継いでいき、カルスの大きさが直径 1 cm 程度になるまで培養を続けた。この大きさにカルスが成長するのに培養開始から 1 ヶ月を要した。その後、カルスの CIM 培地への植え継ぎ間隔を 2 週間置きに変更した。この過程をカルスが安定して成長するようになるまで約 2 ヶ月続けた (図 1-9C)。こうして安定して成長するようになったカルスを遺伝子改変植物由来の培養細胞とした。

1-5-3 培養細胞株を用いた GUS 活性の検出

以上のようにして確立した培養細胞を用いて、実際に GUS 活性を検出する事が出来るかどうかについて予備

的実験を行った。実験は1-3-3と同様に汚染土壌S3を用いた外部被曝を培養細胞に行う事により行った。2週間CIM培地で培養し、成長した培養細胞を直径3mmに切り出し、新しいCIM培地の入ったシャーレに植え継いだ。汚染土壌S3を5cmの深さに敷き詰めたプラスチックバット（ハイパック角形 365mm×270mm×55mm）を2枚重ねた上に静置する事により外部被曝処理区とした。対照区として同様にCIM培地の入ったシャーレに植え継いだ培養細胞を通常条件の育成チャンバーに静置する事により行った。このような条件下で21日間（501時間）培養を行った。培養期間中の積算ガンマ線量を積算線量計（Polimaster PM1621M）にて測定したところ、S3土壌による外部被曝処理区では2,280 μSv （空間線量率4.55 $\mu\text{Sv/h}$ ）であり、対照区では55.1 μSv （空間線量率0.11 $\mu\text{Sv/h}$ ）であった。このようにして培養を行った細胞塊を1-3-2と同様にGUS染色を行い、ペトリ皿上で染色細胞数を計測した（図1-9D）。その結果、対照区ではカルス1gあたりのGUSスポット数は 10 ± 3.21 （ $n=5$ ）であり、外部被曝処理区では 12 ± 2.33 （ $n=5$ ）であった。今回の実験では培養細胞により放射線の有無による違いは見られなかったが、その理由としては培養状態にあると推察された。すなわち、カルスの培養を1-5-2の条件で行うと、新しいCIM培地の入ったシャーレに移植後2週間までは問題ないが、3週間経過すると周囲からしばしばカビが混入する傾向にある。実際に、上記の実験は予備的であるため1度しか行っていないが、5枚のシャーレのうち3枚までがカビの混入が認められた。室内の比較的正常な実験状態においてもカビ易いため、

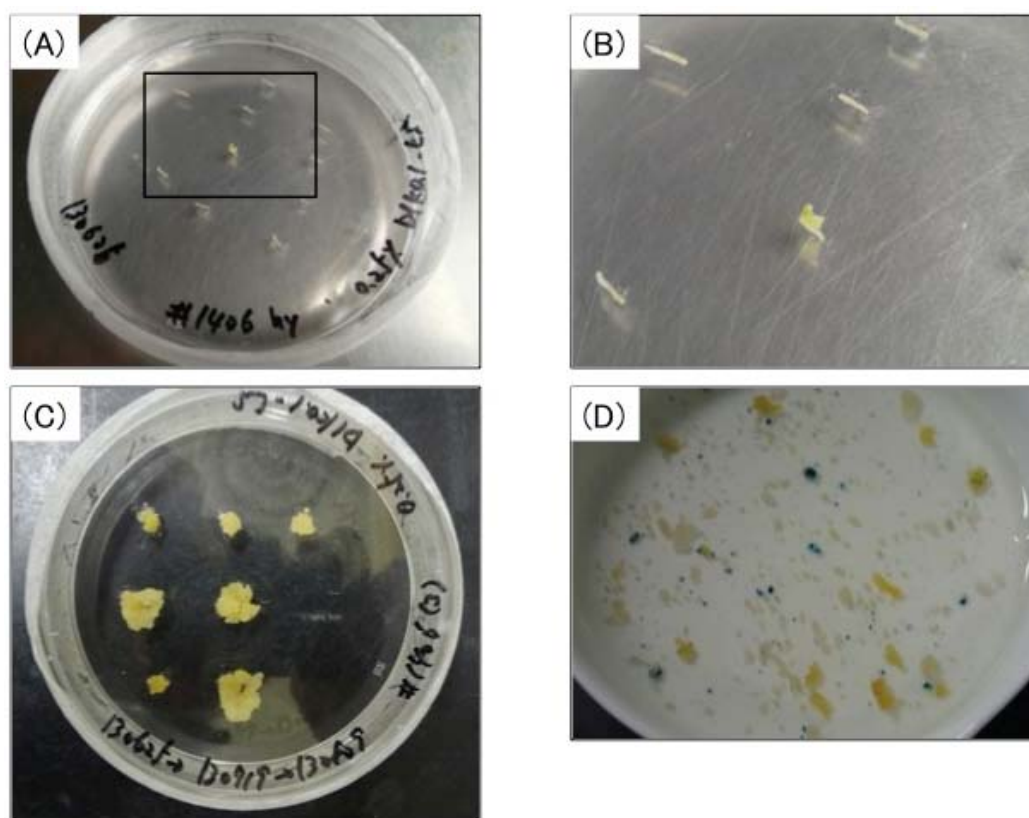


図1-9 遺伝子改変植物の培養細胞化の様子

(A) CIM培地に胚軸移植後9日目の様子。(B) Aの黒四角内を拡大した写真。真ん中にカルス化が進んだ胚軸が観察される。(C) CIM培地移植後46日目の写真。胚軸からのカルス誘導が終了し、培養細胞となっている。(D) 放射線を当てて21日間培養した細胞におけるGUS染色像。いくつかの細胞塊が染色されている。

実際の福島県の土壤中にて DNA 損傷を評価するためにはこのカビの発生を抑える必要が生じる。今後、このカビ対策としては、培地内に抗生物質を入れ、さらにシャーレのシールにより密閉性の高いパラフィルムを使用することを検討している。

1-6 おわりに

本研究では前年度作製した GU-US を導入したシロイヌナズナを用いて、福島汚染土壌におけるガンマ線に由来する DNA 損傷が相同組換え活性を介して土壌放射線量依存的に増加している事を示した。本研究で検出を行っている組換え活性は、言い換えると DNA 修復量を定量的に表しているとも言える。したがって、本研究で得られた結果から、図 1-3 の地域で採取した土壌に由来する放射線では DNA 修復も放射線量依存的に起きている事になる。このことは何を意味しているのだろうか？本研究で行った室内栽培条件では土壌に由来する放射線による外部被曝と土壌中から吸収した放射性物質による内部被曝の影響以外の外的環境は制御下にある。また、図 1-6 の結果から土壌栽培時における DNA 損傷は主に外部被曝に依存する事が示された。したがって、DNA 損傷を促す要因としては土壌汚染に由来する外部被曝のみが考えられる。生物は DNA 損傷を受けるとそれを速やかに修復するメカニズムを持っている。しかしながら、DNA 損傷が生物の持つ DNA 修復能を上回った場合には DNA 損傷が蓄積し、さらにこの損傷が重要な遺伝子において起きると変異となって現れてくる。これを放射線の場合に当てはめると、ある一定の積算放射線量までは DNA 修復が線量依存的に増加していくが、その閾値を超えると積算線量が増加しても DNA 修復量は増加しにくくなると考えられる。本研究で使った土壌による積算線量範囲では DNA 修復が線量依存的に起きている。この事から少なくとも本研究で使った土壌において DNA 損傷は、生物の持つ DNA 修復能力を超えていない事が推察される。しかしながら、実験施設の関係で汚染土壌を無限に展開して栽培する事が出来ないため、本研究における外部被曝量は土壌の採取地に比べて 1/3 程度になっている。そのため、今後は 1-5 で述べたような培養細胞を用いた方法により現地で直接線量を評価する手法を開発する必要がある。

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
3. Kovalchuk, I. et al. (1998) Nature Biotechnology, 16: 1054-1059.
4. Tsukada, H. and Hasegawa, H. (2002) Nucl. Chem. 252: 219-224.
5. Kamei-Ishikawa, N. et al. (2008) Nucl. Sci. Tech., Supplement 6: 146-151.

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、その結果をそのまま福島県の状況に外挿することはできない (Arkhipov et al. 1994)。従って、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異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。

モニタリング対象の植物種としては、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ものが望ましい。以上の様な観点でモニタリング対象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)。しかも原子力規制委員会が福島県内に設置したモニタリングポストの近傍には、たいていサクラが植樹されているため、正確な積算線量を算出することが可能である。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。本研究では昨年引き続いて、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

サクラ花序の採取と固定

表2-1に示した地点で植樹されていた5個体のサクラより、開花直前の花序を1個体あたり10個採取した。採取した花序は、その場でカルノイ液 (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。試料を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、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。開花直前の花序 (図2-1Aのステージ5) を選び、葯が開裂していない雄しべを採取した。採取した雄しべをスライドグラスにのせ、実体顕微鏡下で葯を壊し、内部の花粉をスライドグラスに展開した。染色液を1滴垂らしカバーグラスをかけ、65°Cで3分間熱処理して花粉を染色した。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。染色された花粉を光学顕微鏡で観察し、1個体につき6,000~11,000個の花粉をデジタルカメラで撮影した。細胞内部が完全に赤色で満たされている花粉を成熟花粉とし、赤色部分が不完全な花粉を未熟花粉とし、青く染色されている楕円形の花粉を死亡花粉とした (図2-1B)。撮影した写真をImage Jのセルカウンター機能をつかって解析し、花粉の総数、未熟花粉の数、死亡花粉の数を計測した。

積算線量の算出

採取地点の空間線量率は原子力規制委員会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。花序形成期にあたる採取日から2週間前までの積算線量を計算した。

2-2-2 結果

平成25年3月25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。つくばのサクラでは様々な大きさの花序を採取し、花序の大きさによって5つのステージに分けた(図2-1)。それぞれステージの花序から雄しべを採取し、スライドガラス上で葯を破壊し内部の花粉を染色液で染色後、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、赤色に染色される。花序の大きさごとに花粉の成熟度を比較すると、開花直前のステージ5およびステージ4の花序は成熟度が良かった。ステージ3になると花粉内部が染色されるが、形態が丸くなっていた。ステージ2及びステージ1では花粉内部が充実しておらず、多くが未熟な状態であった。以上の結果をもとに、2013年4月3日に三重県保健環境研究所、4月10日に二本松市、4月18日に飯館村と浪江町を訪れ、開花直前のサクラの花序を採取した。採取した場所での採取前2週間の積算線量を表2-1に示した。花粉の未熟率を採取地点ごとに示したのが図2-2である。高線量地域(津島小学校、津島中学校、飯館中学校、白石小学校)の未熟率が低線量地域(三重県保健環境研究所、国立環境研究所、二本松市内の中学校)に比べて有意に高い結果となった。各地点の花粉の未熟率と採取前2週間の積算線量との関係を示したのが図2-3である。二本松三中、国立環境研究所のデータがやや高めであるが積算線量と花粉の未熟率に正の相関が見られた。

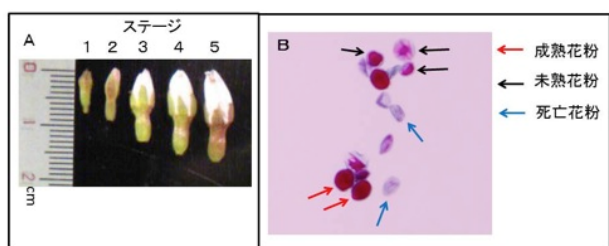


図2-1 サクラ花序の生育ステージと花粉の染色像

(A) 花序の大きさで生育ステージを5つにわけた。

(B) 花粉の成熟状態を示した写真

赤矢印：成熟花粉

黒矢印：未熟花粉

青矢印：死亡花粉

(C) 各ステージの花序から採取した花粉の染色画像

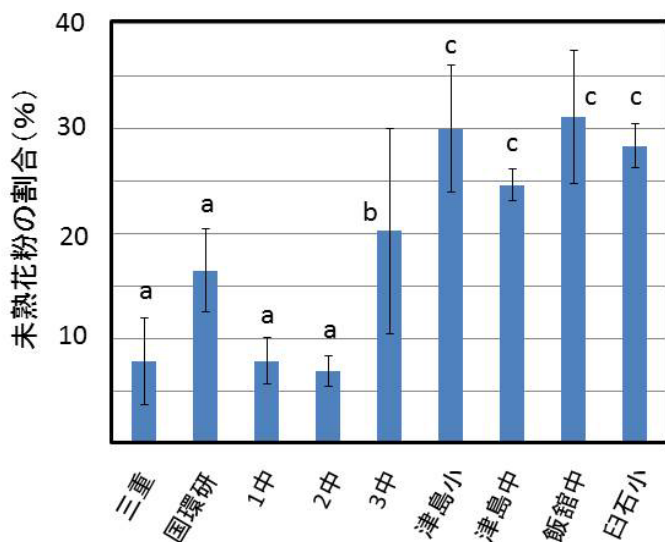
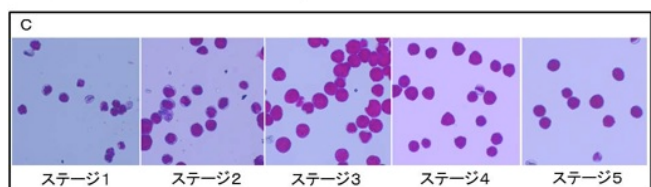


図2-2 調査地点の花粉の未熟率

三重：三重県保健環境研究所、国環研：国立環境研究所、1中：二本松第一中学校、2中：二本松第二中学校、3中：二本松第三中学校、津島小：津島小学校、津島中：津島中学校、飯館中：飯館中学校、白石小：白石小学校。 a: 両側 t 検定で c の値に対して $p \leq 0.05$ で有意差のあるデータを示す。 b: 両側 t 検定で c の値に対して $p \leq 0.1$ で有意差のあるデータを示す。エラーバーはSDを示す。

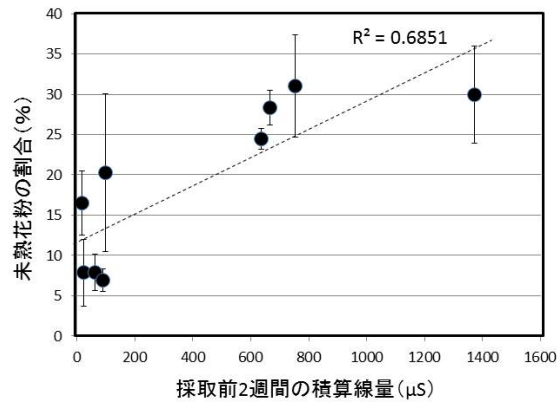


図2-3 未熟花粉の割合と採取前 2週間の積算線量との関係

エラーバーはSDを示す。

2-2-3 考察

本研究を開始した昨年度は、研究を開始した時点でサクラの開花が始まっていたため、花粉の染色に適したステージの確認ができなかった。本年度はあらかじめ花序の成長度合いを5つのステージに分類し、各ステージの花粉の熟成度を調べた。その結果、開花直前の花序（ステージ5）が適している事が判明した。また、開花して葯が開裂してしまうと、正常な花粉が葯から飛散してしまい、死亡花粉が多く葯に残ることになり、正しい未熟率を計測できないことが判明した。昨年度の結果と反省を踏まえ、各調査地から採取したサクラの花序から開花直前の花序を選んで花粉を染色し、未熟率を調べた。昨年度は青く染色された花粉（死亡花粉）のみを未熟花粉として計測していた。今年は花粉に放射線があたることにより成熟遅延が生じることも想定して、花粉内部が赤い染色物で充実していない花粉と青く染色される死亡花粉の合計を未熟花粉として計測した。その結果、高線量地域の未熟率と低線量地域の未熟率に有意差が見られ、未熟率は積算線量と相関がある結果となった。このような結果となった原因として、放射線の影響の他に、生育環境の影響（気温や土壌の質）が考えられる。この結果が放射線の影響であることを確認するには、同じ採取地点のサクラ個体において花粉未熟率と積算線量との相関関係を明らかにする必要がある。高線量地域の線量率は年々低下する傾向にある。この調査を継続し、毎年得られた結果を同じグラフにプロットすることで、同じ採取地点のそれぞれの個体における花粉の未熟率と積算線量との関係を明らかにすることができるであろう。なお、長泥コミュニティセンターは2012年8月以降立ち入り禁止となったので、新たな調査地を選定する予定である。

表2-1 調査地点における、採取日から2週間前までの推定積算線量

	積算線量 (μS)
三重県環境保健研究所	22.7
国立環境研究所	17.7
二本松市立第一中学校	61.3
二本松市立第二中学校	89.8
二本松市立第三中学校	97.4
浪江町立津島小学校	1373.8
浪江町立津島中学校	636.6
飯舘村率飯舘中学校	752.2
飯舘村立臼石小学校	667.1

引用文献

1. Arkhijov, 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. et al. (2010) Int. J. Plant Bio. 1, e13.
6. Tsuda, Y. et al. (2009) Conserv. Genet., 10, 685–688.
7. 原子力規制委員会(2013)放射線モニタリング情報 全国及び福島県の空間線量測定結果

謝辞

本研究の実施にあたり、二本松市、浪江町、飯館村の教育委員会事務局に大変お世話になった。改めてお礼を申し上げます。

2-3 アサガオの生殖器官と遺伝子発現に対する影響調査

2-3-1 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や遺伝子発現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）および、東京古形標準型とムラサキ（2品種とも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、前者は以後「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率の異なる各地で調べた。秋田県南秋田郡大潟村、秋田県秋田市（以上、秋田県立大学永澤信洋博士、佐藤奈美子博士により栽培）、福島県郡山市、茨城県つくば市、埼玉県加須市、千葉県市原市、静岡県静岡市、愛知県名古屋市、鳥取県東伯郡湯梨浜町、福岡県太宰府市の各地の研究機関等の敷地内において、地植え、もしくは各地の土壌等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積算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、各地栽培地点で測定、または原子力規制委員会放射線モニタリング情報（原子力規制委員会、2013）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。また、各地の平均気温は気象庁ホームページ（気象庁(2013)）より、最寄りの測定地点のデータをダウンロードした。各地における平均空間線量率、栽培開始日、各試料の採取日、葉試料の検体数、各試料採集までの栽培日数と積算放射線量を表 2-2 に示す。

表 2-2 アサガオの栽培、試料採集状況と放射線量

場所	平均空間線量率 ¹⁾ ($\mu\text{Sv/h}$)	栽培開始日	葉試料採集日	検体数	栽培日数	積算放射線量 ²⁾ (μSv)	種子試料採集終了日	栽培日数	積算放射線量 ³⁾ (μSv)
大潟	0.04	2013/6/1					2013/11/30	182	174.72
秋田	0.05	2013/6/1					2013/9/30	121	145.20
郡山	0.53	2013/5/27	2013/7/31	4	65	826.80	2013/11/12	169	2149.68
"	0.45	2013/5/27	2013/7/31	4	65	702.00	2013/11/12	169	1825.20
"	0.23	2013/5/27	2013/7/31	4	65	358.80	2013/11/12	169	932.88
つくば	0.10						2013/11/13	166	398.40
加須	0.11	2013/6/20	2013/7/12	3	22	58.08	2013/10/31	133	351.12
"	0.11	2013/6/25	2013/7/12	3	17	44.88			
"	0.11	2013/6/25	2013/8/9	3	45	118.80			
"	0.09	2013/6/20					2013/10/31	133	287.28
市原	0.07	2013/5/17	2013/6/24	3	38	63.84	2013/9/12	118	198.24
静岡	0.04	2013/5/13					2013/11/20	191	183.36
名古屋	0.07	2013/6/5	2013/8/7	4	63	105.84	2013/11/28	176	295.68
湯梨浜	0.06	2013/6/24					2013/10/11	109	156.96
太宰府	0.07	2013/5/21	2013/7/3	3	43	72.24	2013/11/13	176	295.68

¹⁾栽培場所の地上 1m 値 (秋田、大潟は最寄りのモニタリングポストの値)。栽培開始時、または栽培期間中に随時測定し、栽培期間中の平均値とした。²⁾葉試料採取までの期間の積算値。³⁾種子採取終了までの期間の積算値。

葉の遺伝子発現解析

遺伝子発現解析には SO の葉を用いた。葉は採取後、ただちに適当量の RNeasy Lysis Buffer (Life Technologies Co., Carlsbad, CA, USA) に浸漬して 4°C で一晩～数日間静置後、-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。数百個以上の場合は、20 粒の重量から推定した値を用いた。大きさが小さい、形がいてびつ、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 2-4 に示す。

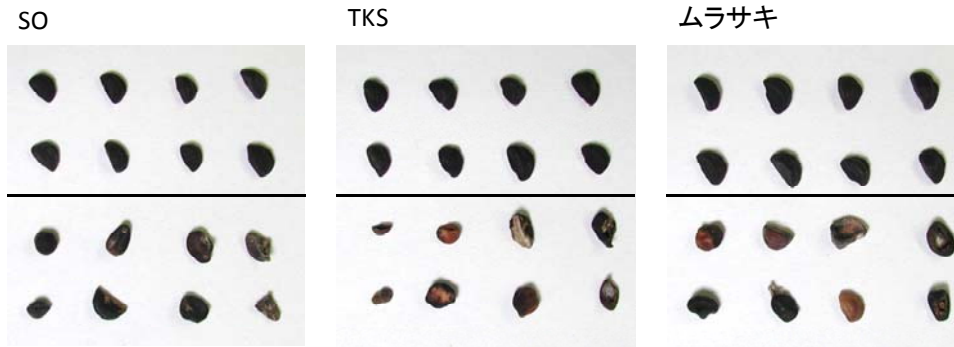


図2-4 各品種アサガオ種子の形態の例

各品種とも上段が形態の正常な種子、下段が大きさ、形、種皮（色、種皮割れ）に異常が認められた形態異常の種子。SO；スカーレットオハラ。TKS；東京古形標準型。埼玉県加須市にて採取。

2-3-2 結果

遺伝子発現と放射線量

昨年度と同様、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、発現量の調査を行った。昨年度は、2つの遺伝子の相対発現量については積算線量との相関は認められなかったが、残り2つの遺伝子については有意な相関が認められた。しかし、今年度は相対発現量と積算線量との相関は見られなかった。なお、1つの遺伝子については相対発現量が低く、結果が得られなかった。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2-5に示す。

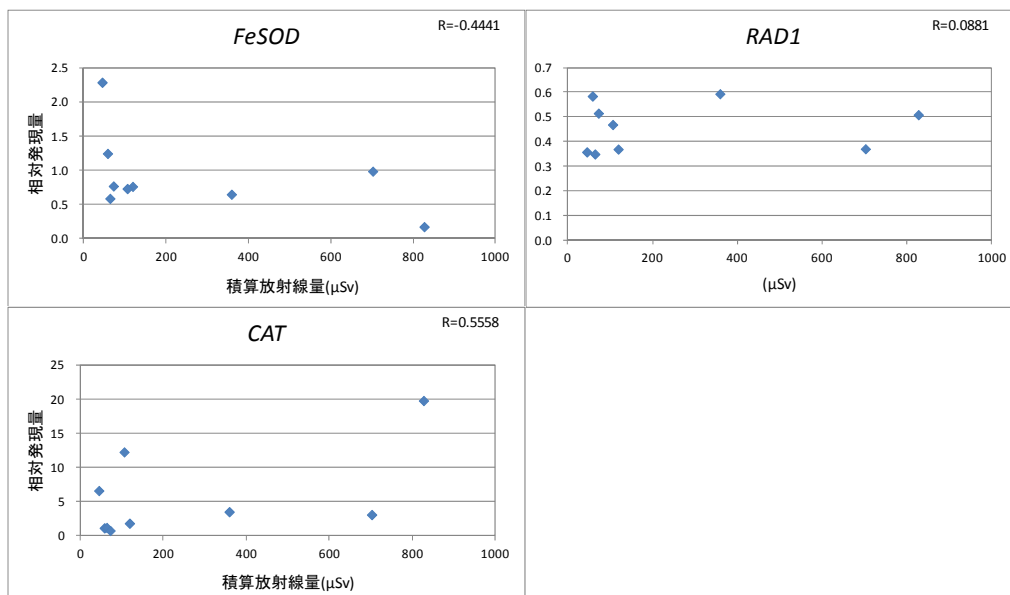


図2-5 葉における各遺伝子の相対発現量と積算放射線量の相関

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。採取場所、検体数、積算放射線量については表2-2 参照。Rは相関係数。

種子の形態異常率と放射線量

各地で採集したアサガオ種子数と栽培期間中の平均気温を表 2-3 に、種子の形態異常率を図 2-6 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 2-7 に示す。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。

表 2-3 各地において採取したアサガオ種子数と栽培期間の平均気温

SO（スカーレットオハラ）。TKS（東京古形標準型）。郡山、加須における H、M、L は、同一の場所で平均空間線量率の高低を表す。（高：H、中：M、低：L。表 2-2 参照）。

場所	SO	TKS	ムラサキ	栽培期間 平均気温 (°C)
大潟	531	403	185	18.6
秋田	500	559	202	22.9
郡山H	142	164	151	19.4
郡山M	232	77	95	19.4
郡山L	353	42	92	19.4
つくば	1,641	2,093		21.9
加須H	13,626			23.7
加須L		5,260	3,100	23.7
市原	646	503	201	25.0
静岡	2,497	869	384	23.3
名古屋	4	87	44	23.2
湯梨浜	440	81	142	24.8
太宰府	200	196	112	24.3

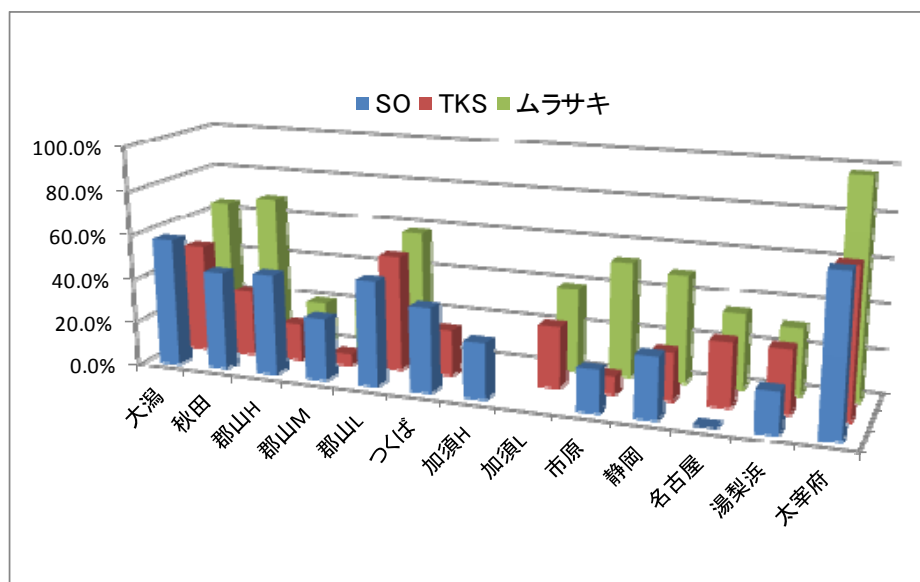


図 2-6 各地におけるアサガオ種子の形態異常率

SO（スカーレットオハラ）。TKS（東京古形標準型）。郡山、加須における H、M、L は、同一の場所で平均空間線量率の高低を表す。（高：H、中：M、低：L。表 2-2 参照）。

各地で採集した各品種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 35.0%、TKS では 29.5 %、ムラサキでは 48.6%で、ムラサキ、SO、TKS の順に高い異常率であった。なお、異常率が昨年度より高くなっているが、これは正常とする種子をより厳密に判定したためである。SO と TKS の異常率の違いについては昨年度の結果と同様であった。ムラサキではもともと種子の形態にばらつきが大きく、形がいびつで異常と判定されるものが多かった。また、昨年度同様、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、種皮が濡れている」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。

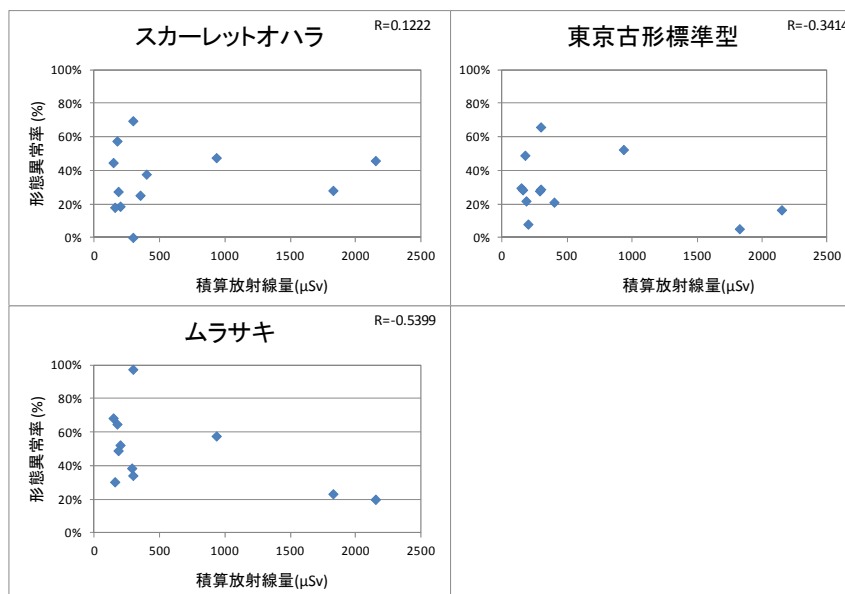


図 2-7 種子の形態異常率と積算放射線量との相関 (R は相関係数)

SO、TKS、ムラサキの 3 品種とも種子の形態異常率と積算線量には相関が認められなかった。形態異常率と栽培場所の平均気温、ならびに栽培日数との相関を各々調べたところ、どちらも相関は認められなかった。一方、同一栽培場所における各品種の種子の形態異常率には互いに有意な正の相関があった (表 2-4)。

表 2-4 同一栽培場所における各品種間の種子形態異常率の相関係数

	TKS	ムラサキ
SO	0.6490 *	0.6589 *
TKS	-	0.7586 **

相関係数 R の値を示した (*:P<5% **:P<1%)

2-3-3 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)。今年度も、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、昨年度は DNA 損傷に関わる遺伝子の発現量と積算放射線量に正の相関がみられたが、今年度はど

の遺伝子においても遺伝子発現量と積算放射線量との相関はみられなかった。これは、昨年度の積算放射線量が最大で郡山の約 1,350 μ Sv だったのに比べ、今年度は同じく郡山で約 830 μ Sv と低かったことが原因の一つと考えられる。すなわち、積算放射線量が遺伝子発現に影響を与える閾値が 830 μ Sv 以上である可能性が示唆された。なお、昨年度の積算放射線量は 1,350 μ Sv の次に高い値は約 420 μ Sv であったため、830 μ Sv 付近までで相関がみられたかどうかは不明である。

環境放射線の生殖器官への影響の調査のために用いた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。今回、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も導入した。これまで遺伝子発現解析には SO を用いているが、今後はムラサキも合わせて遺伝子発現解析に用いることも検討したい。

昨年度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たが、今年度は再現性が確認されなかった。一方、品種による形態異常率の差が認められた。また、同一栽培地点における各品種間のアサガオ種子の形態異常率には相関があったため、種子の形態異常と周囲の環境との関連が示唆された。しかし、種子の形態異常率と栽培期間の平均気温、栽培日数との相関は見られなかったため、形態異常を引き起こす具体的な環境要因については不明である。

今年度、郡山では除染が進み、空間放射線量は昨年度よりも低くなった。一方、郡山を除く各地の空間放射線量は、つくば市、加須市のように、栽培場所での実測値が最寄りのモニタリングポスト（原子力規制委員会(2013)）よりも 2 倍以上高い場所もあった（つくば市、加須市のモニタリングポストの値は 2014 年 3 月 6 日現在それぞれ約 0.04、0.05 (μ Sv/h)。栽培場所の実測値は表 2-2 参照）。そのため、実際の栽培場所での線量測定が望ましいと考えられる。

今年度は昨年度と異なり、植物の生殖器官・組織に対する空間放射線の影響は認められなかったが、空間放射線量率と積算放射線量の最大値が昨年度よりも大幅に低い条件での調査だったため、影響の有無については今後さらに調査する必要があると考えられる。そのために、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予定している。また、野外で得られたデータの検証のために、低線量放射線照射装置を導入する必要があると考えられる。

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. 気象庁(2013)各種データ・資料 過去の気象データ・ダウンロード、
<http://www.data.jma.go.jp/gmd/risk/obsdl/index.php>
4. 原子力規制委員会(2013)放射線モニタリング情報 全国及び福島県の空間線量測定結果、
<http://radioactivity.nsr.go.jp/map/ja/area.html>

謝辞

各地のアサガオの栽培と試料採取等に関しては、秋田県立大学永澤信洋氏、佐藤（永澤）奈美子氏、福島県環境センター古川誠氏、埼玉県環境科学国際センター三輪誠氏、千葉県環境研究センター岡崎淳氏、静岡県環境衛生科学研究所鈴木佐知子氏、名古屋市環境科学調査センター岡村祐里子氏、鳥取県生活環境部衛生環境研究所尾川成章氏、福岡県保健環境研究所須田隆一氏に担当いただいた。

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

昨年度の調査結果により、福島第一原発から30km圏内（以下、「30km圏内」とする）で捕獲したアカネズミにおいて以下の現象が明らかになった。

- 福島県で捕獲したアカネズミの精巣を組織学的に観察したところ、8-OHdG陽性となる細胞の出現頻度が富山県や青森県のアカネズミのものよりも増加していた。
- 一方、8-OHdG陽性となる精子は精巣上体で観察されない。
- 体内の放射性物質蓄積量（セシウム134とセシウム137の合計）が8,400～185,000 Bq/kgであった。

昨年度は8-OHdG陽性となる精子は精巣上体で観察されなかったものの、そのため、精巣上体に貯留している成熟した精子の詳細な形態観察を行うことで、現状の放射線量がアカネズミの不妊を引き起こす可能性があるのか評価できる。加えて、放射性物質の蓄積量が個体間での差が大きいことについて原因究明をすることにより、放射性物質の生物による移動について知見を得ることができると考えられる。

そこで今年度は、30km圏内におけるアカネズミの捕獲を昨年同様に行い、精巣における8-OHdGの蓄積状況および体内の放射性物質蓄積量の定量を継続しつつ、新規に以下について調査を行った。

- 福島県に分布するアカネズミ遺伝的変異の評価
- 精巣上体精子奇形の観察
- 放射性物質の体内蓄積量と食性の関係

3-2 材料と方法

3-2-1 アカネズミの捕獲

30km圏内で、空間線量率が13.1-18.2 μ Sv/hの地点（以下、「30km圏内（高）」とする）および空間線量率が4.6-5.7 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。各地の2013年8月時点での空間線量率（地表）を、表3-1に示す。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。捕獲地ごとの毎回の罠の設置数は40～100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。捕獲は各地で概ね2～3週間に1回（1～2晩）行い、30km圏内は7～10月、富山県は6～9月、青森県は7～10月に行った（表3-1）。

表3-1 捕獲地の緯度・経度、高度、および空間線量率（地表、2013年8月）

	6月	7月	8月	9月	10月
福島県	—	24, 25日	27, 28日	18, 19日	9日
富山県	6日	4, 24, 25日	7, 8, 21, 22日	18, 19日	—
青森県	—	17, 18, 31日	1, 21, 22日	11, 12, 25日	18日

30km圏内で採集した個体は、野外で二酸化炭素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、国立環境研究所南相馬実験室（福島県南相馬市）まで持ち帰り、解剖・採材を行った。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、二酸化炭素で安楽殺を行い、解剖・採材まで冷蔵保存した。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。安楽殺から解剖までの時間は、福島での作業工程と同程度になるように調整し、概ね2～4時間とした。

安楽殺後、体重を測定した。開腹後、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。その後、精巣・精巣上体重量（雄）および卵巣・子宮重量（雌）を計測した。右精巣上体尾部を切り離し、生理食塩水（生食）で洗浄後、生食（200μl）中で細切り、精子を遊出させた。精子遊出液（50μl）を等量の精子固定液（2%グルタルアルデヒド/0.165Mカコジール酸ナトリウム）と混合した。また、精子遊出液（50μl）を99.5%エタノール（500μl）と混合した。その後、臼歯の摩耗による齢査定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℃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。

表3-2 各部位の処理法

部位	処理
肝臓・精巣	ブアン液およびホルマリン浸漬
	QIAZOL浸漬
	-30℃凍結保存
腹腔内消化管	エタノール浸漬
精巣上体	ブアン液およびホルマリン浸漬
	QIAZOL浸漬
	精子の採取
精巣上体精子	精子固定液浸漬
	エタノール浸漬
子宮	ホルマリン浸漬
妊娠胎子	エタノール浸漬
残りの体	-30℃凍結保存

3-2-2 放射性物質蓄積量の計測

アカネズミのうち34個体（30km圏内26個体、富山県4個体、青森県4個体）の成獣（体重30g以上）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62～2557秒）でセシウム134（Cs-134）およびセシウム137（Cs-137）の定量を行った。また、30km圏内のアカネズミを捕獲地2地域において、各5地点より土壌サンプル（10～30g）を採取、U-8容器に封入し、ゲルマニウム半導体検出器（測定時間12～60秒）でCs-134およびCs-137の定量を行った。

3-2-3 30km 圏内に分布するアカネズミ遺伝的変異の評価

（1）野外集団における遺伝的変異の評価

各捕獲個体から肝臓の組織小片（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。遺伝学的影響を評価するマーカーとして、ミトコンドリアD-loop領域、シトクロムb遺伝子領域(Cytb)、および本プロジェクトにより新たに開発されたマイクロサテライトを用い、各マーカーの有用性を検討した。

ア. ミトコンドリア D-loop、Cytb領域

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(D-loop)についてPCRと塩基配列解読を行った。プライマー配列は、Cytb増幅にはL14724: CGA AGC TTG ATA TGA AAA ACC ATC GTT G (Suzuki *et al.*, 1997)とCB1007R: CTA CTG GTT GGC CTC CGA TTC AG (本研究において新規に設計)、D-loopには M15997: TCC CCA CCA TCA GCA CCC AAA GC および H16401: TGG GCG GGT TGT TGG TTT CAC GG (Stacy *et al.*, 1997) を用いた。DNAポリメラーゼとしてTaKaRaのEXTaqを使用し、以下の条件でPCRを行った。

【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 3.0uL

dNTP 2.4 uL

Taq 0.2 uL

Primer 3.0 uL (10 pmol/uL のForwardとReverse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】

94°C 2 min (98°C 10sec, 62°C 30sec, 72°C 30sec) x 32cycles 72°C 5 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 3130シーケンサーで塩基配列を解読した。得られた各サンプルの塩基配列から、地域集団内の遺伝子多様度を解析ソフトDnaSP v5 (www.ub.edu/dnasp/)を用いて求めた。

イ. マイクロサテライト

昨年度、本プロジェクトにおいて開発されたアカネズミのマイクロサテライトマーカー(Azuma *et al.*, 2013)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、8つのマーカー(AMS03, AMS07, AMS08, AMS12, AMS14, AMS15, AMS20, AMS41)を用いてマイクロサテライト解析を行った。プライマー配列はAzuma *et al.* (2013)を参照し、フォワードプライマーには蛍光色素を、リバープライマーの5'側にはA付加を効率良く行うために配列GTTTCTTを付加した(桑野ら, 2002)。DNAポリメラーゼとしてTaKaRaのTaqを使用し、以下の条件でPCRを行った。

【反応液組成】

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

10x buffer 2.0 uL

dNTP 1.6 uL

Taq 0.1 uL

Primer 1.0 uL (10 pmol/uL のForwardとReverse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 5 min (95°C 30sec, 58°C 30sec, 72°C 30sec) x 35cycles 72°C 40 min

PCR産物は、ABI 3130シーケンサーでフラグメント長を解読した。得られたフラグメント長から、各地域集団におけるマイクロサテライト座のアリル数、ヘテロ接合度、遺伝的多様度を解析ソフトArlequin v3 (cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/)を用いて求めた。

(2) 次世代への変異の遺伝評価

放射線によって形成される遺伝的変異が親から仔へ遺伝すると、親子間における遺伝子配列の相同性が低下することが仮定できる。そこで、次世代へ蓄積される変異を直接的に観察するために、メスとオスそれぞれについて評価法の確立を行った。

ア. 母親からの変異の遺伝評価

メスでは妊娠個体とその胎仔との遺伝子配列の相同性を明らかにすることで、次世代へ蓄積される変異について評価を行った。胎児は妊娠メスの子宮から摘出し、右足または臀部からDNA抽出を行った。評価を行う遺伝子領域はミトコンドリアD-loop領域とし、DNA抽出、PCRおよびシーケンスは(1)に準じて行った。

イ. 父親からの変異の遺伝評価 (キャピラリーシーケンサーを用いた1精子からの配列決定)

オスでは個体とその精巣上部尾部から採取された精子との遺伝子配列の相同性評価を行うことで、次世代への変異遺伝の指標とした。評価を行う遺伝子領域はミトコンドリアD-loop領域とした。

3-2-1において精巣上部尾部から抽出された精子を顕微鏡下でガラス針を用いて1つ採取し、ダイレクトPCRを行った(図3-1)。DNAポリメラーゼとしてTOYOBOのKOD Fx Neoを使用し、以下の条件でPCRを行った。プライマー配列およびPCR以降の方法は(1)に準じて行った。サンプルは非汚染地域である青森で捕獲された個体を用い、上記の手法を用いて、142個の精子を採取し、解析を行った。さらに、この手法を用いて放射線汚染地域で捕獲された個体の精子サンプルと非汚染地域である青森で捕獲された個体の精子サンプルの解析を行った。

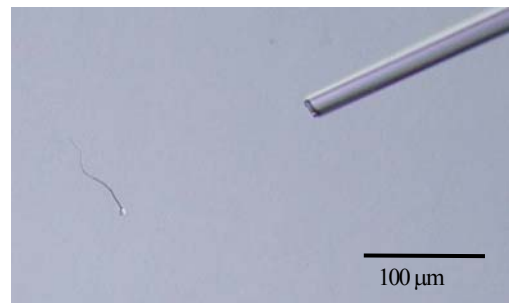


図3-1 精子採取の様子

【反応液組成】

2x buffer	15.0uL
dNTP	6.0 uL
Taq	0.6 uL
Primer	1.5 uL (10 pmol/uL のForwardとReverseを等量混合したもの)

【温度プロファイル】

94°C 2 min (94°C 15sec, 62°C 30sec, 68°C 30sec) x 45cycles 68°C 5 min

3-2-4 精巣および精巣上部における8-OHdG蓄積状況の把握

ブアン固定した精巣および精巣上部をパラフィンブロックにて包埋し、マイクロームで4 μm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、精巣断面全域を顕微鏡で観察し、茶褐色を呈する精子細胞を含む精細管があるのか観察した。

3-2-5 精巢上体精子奇形の観察

3-2-1で示した方法で固定後の精巢上体精子を、位相差顕微鏡下（100～400倍）で1個体あたり100精子観察し、頭部、中片部、および尾部の奇形を計数し、奇形率を算出した。

3-2-6 DNA バーコーディングによるアカネズミ糞分析による食性解析

(1) アカネズミの糞からのゲノムDNAの抽出

30km圏内で捕獲したアカネズミ（42個体）を対象にして、腸管（直腸）から採取した糞（～220 mg）から QIAamp DNA Stool Mini 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200 μl の Buffer AE でゲノムDNAを溶出させて濃度を測定した（表3-3）。また、溶出後の濃度の薄いサンプルについては、エタノール沈殿法による濃縮を行った。

表3-3 アカネズミの糞から抽出したゲノムDNAの濃度（括弧内は濃縮後の濃度を示す）

Sample	Sex	gDNA (ng μl ⁻¹)	Sample	Sex	gDNA (ng μl ⁻¹)	Sample	Sex	gDNA (ng μl ⁻¹)
FK13-001	M	72.0	FK13-015	M	71.0	FK13-034	M	26.5
FK13-002	M	51.0	FK13-016	M	41.0	FK13-035	F	18.0
FK13-003	M	44.0	FK13-017	M	25.5	FK13-036	M	8.9
FK13-004	F	70.5	FK13-018	M	95.5	FK13-037	M	38.5
FK13-005	F	86.5	FK13-020	M	23.5	FK13-038	F	81.5
FK13-006	F	14.2	FK13-021	M	63.0	FK13-039	M	24.0
FK13-007	M	28.5	FK13-023	M	20.0	FK13-040	F	70.0
FK13-008	M	10.6	FK13-024	M	8.6	FK13-041	M	94.0
FK13-009	M	7.9 (48.0)	FK13-025	M	15.0	FK13-042	M	103.5
FK13-010	M	109.5	FK13-026	M	34.5	FK13-043	M	54.5
FK13-011	M	3.5 (28.0)	FK13-028	M	12.2	FK13-044	M	6.1 (40.5)
FK13-012	M	12.4	FK13-030	M	31.5	FK13-046	M	71.0
FK13-013	F	2.4 (26.0)	FK13-032	M	12.2	FK13-047	M	75.0
FK13-014	F	52.5	FK13-033	M	31.0	FK13-048	F	49.5

(2) バーコーディング領域の増幅とサンプルの精製

ア. 植物のバーコーディング

植物のバーコーディングには、葉緑体のリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ (RubisCO) 遺伝子の大型サブユニット領域 (large chain of *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*、以下 *rbcL* 遺伝子と表記する) を用いた(CBOL Plant Working Group, 2009)。PCRの実験条件やプライマーの情報は日本バーコードオブライフ・イニシアチブ (JBOLI ; <http://www.jboli.org/>) に公開されているものを参考にして実験を行った。まず、このプロトコルで実際にバーコード領域が増幅されるかを確認するため、シロイヌナズナ (Col-0) とイネ (ササニシキ) から抽出したゲノムDNAをテンプレートとして、以下に示す組成およびプロトコルでサーマルサイクラーPCR9600を用いて実験を行った。

[反応液組成] ゲノムDNA (100 ng) 1.0 μl、2×PCR buffer 10 μl、2 mM dNTPs 4 μl、20 μM *rbcLa_F* primer 0.3 μl、20 μM *rbcLa_R* primer 0.3 μl、1 U/μl KOD FX Neo 0.4 μl、H₂O 4 μl (計20 μl)

[PCR 反応条件] 95°C 1分の熱変成の後、95°C 30秒、55°C 1分、68°C 1分のサイクルを35サイクル

[プライマー配列]

Forward primer : rbcLa_F (5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3')

Reverse primer : rbcLa_R (5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3') (R=A and G)

PCR産物を2%アガロースゲルで電気泳動を行った結果、増幅される産物のサイズが600 bp程度であることが確認できた。以降の次世代シーケンサーでの解析を考慮してPCR産物のサイズを400 bp未満にするため、新たにプライマーを設計した。アカネズミが食していると考えられる植物種のデータをTatsukawaら(1976)から調査し、記載されている植物種の*rbcL*遺伝子の配列をBOLD Systems v3 (<http://www.boldsystems.org/>)を用いて検索・取得した。これらの配列から共通性の高い領域を探索し、以下のようなプライマーを設計した。

[設計したプライマー]

rbcL_Fn1

(5'-TCCAATTGTGGGTAATGTATTTGG-3')

rbcL_Fn2

(5'-TGCTTATGTAGCTTACCCTTTAGACC-3')

Reverse primerはrbcLa_Rで固定し、設計したプライマーをそれぞれForward primerとしてPCRを行った。反応溶液組成は前述と同様にし、反応条件におけるアニーリングステップの時間を30秒に変更した。PCR産物を電気泳動で確認したところ、いずれも単一のバンドが確認され得られたPCR産物のサイズはそれぞれ約250 bp、約300 bpであった(図3-2)。次世代シーケンサーの解析でより多くの情報を得るためには、より長い産物を用いてシーケンスを行うことが望ましいと考えられたことから、以降の実験ではrbcL_Fn2とrbcLa_Rのプライマーペアを用いて行った。

アカネズミの糞から抽出したゲノムDNAをテンプレートとしてrbcL_Fn2とrbcLa_Rを用いたPCRを行い、得られたPCR産物に対して等量(v/v%)のフェノールを加えて懸濁させた後、最高速度(14,000 rpm)で5分間遠心した。水層を新しい1.5 mlチューブに回収し、さらにPCI溶液(フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール = 25:24:1)を加えて懸濁し、最高速度(14,000 rpm)で3分間遠心した。水層を新しい1.5 mlチューブに回収して、これを2%アガロースゲルの電気泳動に供した。各サンプルのバンドをゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kitを用いてPCR産物を回収・精製した。手順は添付の説明書に従い、最終的に50 µlのBuffer EBでPCR産物を溶出させて濃度を測定した。

イ. 昆虫・動物のバーコーディング

昆虫や動物のバーコーディングには、ミトコンドリアのチトクロムC酸化酵素サブユニットI遺伝子(*cytochrome c oxidase subunit I*、以下COI遺伝子と表記する)を用いた(JBOLIおよびHebertら(2003)を参照)。PCRの実験条件やプライマーの情報はJBOLIに公開されているものを参考にして実験を行った。まず、アカネズミのゲノムDNA(糞から抽出したものではなく、昨年福島で捕獲されたアカネズミの肝臓から抽出したもの)をテンプレートとして、以下に示す組成およびプロトコルでサーマルサイクラーPCR9600を用いて実験を行った。

[反応液組成] ゲノムDNA (100 ng) 1.0 µl, 2×PCR buffer 10 µl, 2 mM dNTPs 4 µl, 20 µM LCO1490 primer 0.3 µl, 20 µM HCO2198 primer 0.3 µl, 1 U/µl KOD FX Neo 0.4 µl, H₂O 4 µl (計 20 µl)

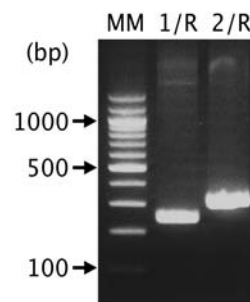


図3-2 設計したプライマーを用いたPCR産物の電気泳動像 MM、1/R、2/Rはそれぞれ100 bp DNA ladder、Fn1/R、Fn2/Rを示す。

[PCR 反応条件] 95°C 1 分の熱変成の後、95°C 30 秒、50°C 30 秒、68°C 1 分 のサイクルを 35 サイクル
[プライマー配列]

Forward primer : LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')

Reverse primer : HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3')

PCR 産物を 2%アガロースゲルで電気泳動を行った結果、増幅される産物のサイズが 700 bp 程度であることが確認できた。植物の場合と同様 PCR 産物のサイズを 400 bp 未満にするため、Tatsukawa ら (1976) を参考にして新規プライマーの設計を検討していたが、*COI* 領域を用いたバーコーディングに使用可能で、プロダクトサイズのより小さい新規プライマーが Leray ら (2013) によって報告された。彼らが設計したプライマーの配列を以下に示す。

[プライマー配列] mlCOIintF (5'-GGMACMGGMTGAACMGITMTAYCCYCC-3')

(M=A or C, Y=T or C)

このプライマーと前述の HCO2198 プライマーを使用することで、PCR 産物のサイズは 313 bp となる。このサイズは次世代シーケンサーでの解析が可能なサイズ (400 bp 未満) であるため、動物のバーコーディングはこのプライマーを使用して行うことにした。Tatsukawa ら (1976) を参考にして、これらのプライマーを用いて以下の条件でタッチダウン PCR を行った。

[反応液組成] ゲノム DNA (100 ng) 1.0 µl、2× PCR buffer
10 µl、2 mM dNTPs 4 µl、20 µM mlCOIintF primer 0.3 µl、
20 µM HCO2198 primer 0.3 µl、1 U/µl KOD FX Neo 0.4
µl、H₂O 4 µl (計 20 µl)

[PCR 反応条件] 95°C 1 分の熱変成の後、95°C 10 秒、
62-47°C*30 秒、68°C 30 秒 のサイクルを 16 サイクル
(*アニーリング温度は、サイクル毎に 1°C ずつ降温する
ようにプログラムをセットした) その後、95°C 10 秒、
46°C 30 秒、68°C 30 秒 のサイクルを 29 サイクル
(Hebert ら(2003))

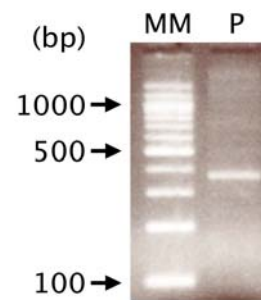


図3-3 mlCOIintF と HCO2198 を用いた PCR
産物の電気泳動像 MM、P はそ
れぞれ 100 bp DNA ladder、PCR
産物を示す。

PCR 産物を電気泳動に供した結果、単一のバンドが確認された (図 3-3)。以降の解析では、このプライマーペアで増幅した PCR 産物を使用した。アカネズミの糞から抽出したゲノム DNA をテンプレートとして mlCOIintF と HCO2198 を用いた PCR を行った。この PCR 産物をフェノール抽出および PCI 抽出した後、2%アガロースゲルで電気泳動に供した。各サンプルのバンドをゲルから切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit を用いて精製し、最終的に 50 µl の Buffer EB で PCR 産物を溶出させて濃度を測定した。

(3) フラグメントライブラリーの作製

(特に表記のない試薬・機器は Life Technologies 社製)

前節で回収・精製した *rbcl* の PCR 産物 100 ng から、Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit および Ion Xpress™ Barcode Adapters 17-32 Kit を用いて次世代シーケンサー (Ion PGM) 用のフラグメントライブラリーを作製した。解析サンプルが 42 個体分あるため、本実験では 14 サンプルを 1 セットとしてバーコードを使用した (FK13-001 ~ FK13-014、FK13-015 ~ FK13-033、FK13-034 ~ FK13-048 をそれぞれ 1 セットとして、17 ~ 30 のバーコードダ

グを使用した)。手順は Ion Community (<http://ioncommunity.lifetechnologies.com/>) から取得した説明書に従い、End repair ステップ、および Adaptor ligation and Nick repair ステップ終了後、それぞれのサンプルを AMPure XP Kit (Beckman Coulter) を用いて精製し、最終的に 20 µl の low TE に溶解した。精製サンプルの濃度は、2100 Bioanalyzer と Agilent High Sensitivity DNA Kit (いずれも Agilent Technologies) を用いて、マニュアルに従って測定した。それぞれのサンプルを Ambion® Nuclease Free Water を用いて 26 pM に希釈して 1.5 ml LoBind Tube (Eppendorf) に入れ (1× TDF テンプレート)、FK13-001~FK13-014 の希釈サンプルを新しい 1.5 ml LoBind Tube に各 1.78 µl 混合し (計 ~25 µl)、希釈ライブラリーとした。同じことを FK13-015~FK13-033、FK13-034~FK13-048 の各サンプルセットでも行い、3 つの希釈ライブラリーを調製した。この希釈ライブラリーから、Ion PGM™ Template OT2 400 Kit および Ion OneTouch™ 2 Instrument を用いてエマルジョン PCR を行い、各フラグメントが結合した Ion Sphere™ Particles (ISPs) を Ion OneTouch ES™ と Ion PGM™ Enrichment Beads (ストレプトアビジン磁気ビーズ) を用いて回収した。手順は Ion Community から取得した説明書に従った。

(4) Ion PGM™ システムを用いたシークエンシング (特に表記のない試薬・機器は Life Technologies 社製)

Ion PGM™ システムは使用前にクリーニングを行い、その後、システムのセットアップ、イニシャライズ、およびチップテスト (使用するチップに不具合がないかを確認するステップ) を行った。これらの操作は、Ion Community から取得した説明書に従って行った。また、Torrent browser でシークエンスプロトコルを設定した。

前節で回収した ISPs に 5 µl の Control Ion Sphere™ Particles を混合して 15,500 × g で遠心した。ここから 15 µl を残して上清を除去し、12 µl の Sequencing Primer を加えた。サーマルサイクラー (Gene Amp PCR System) を用いて 95°C で 2 分、および 37°C で 2 分処理した後、3 µl の Ion PGM™ Sequencing 400 Polymerase を加えて全量を 30 µl とした。5 分間室温でインキュベートした後、これを Ion 318™ v2 Chip にロードした。ISPs をロードした Ion 318™ v2 Chip を Ion PGM™ システムにセットした。システム本体のメニュー画面から事前に設定したプロトコルを読み込み、画面の指示に従ってランを行った。これをサンプル数分 (3 回) 行った。

(5) シークエンスデータの解析

解析データは、システムに接続されたサーバ (Torrent Server) に自動的に保存される。Torrent browser 上で解析データを fastq ファイル形式 (図 3-4) に変換した。(ランの際にプラグインを設定した)。これを Torrent browser からダウンロードして解析元ファイルとして、以下の手順でデータの処理および解析を行った。

```
@2PWS2:00046:00045
ATCAAGTCCACCGGTAGACACTCATAACATGCTCTACCATAATTTTTGCAGATAATCCC
AATTTGGTTTAATAGTACATCCCAATAAAGGACGACCGTATTTGTTCAACTTATCCTTTC
AACTTGGATACCATGAGGCG
+
;:=B9<<@>>=11166:8@9=@>@AAC@DDBBBBAA=A<9<>59999+48=88@B@;991
8477/8477,499499;;;444-4<111,1,/,,...//+/9999<??<999248-4
4<>@594848824/,,-***
```

図 3-4 astq 形式の例 (実際の解析元データから抜粋)

Seq-ID (配列の名前) に続き、リードの配列情報と各塩基のクオリティ情報が「+」で関連づけられている。

- ① BLAST 検索の参照データベース構築
BOLD System v3 (<http://www.boldsystems.org/>) から *rbcL* 配列情報を multi-fasta 形式で取得
- ② Local BLAST 環境をローカルコンピュータ上に構築
- ③ Torrent server から取得した fastq ファイルを fasta ファイルに変換
- ④ 配列長 (リード長) のフィルタリング
- ⑤ テンプレートの増幅 (PCR) に使用したプライマー配列のトリミング
- ⑥ 重複する配列 (リード) の統合と重複数のカウント
- ⑦ 配列長 (リード長) の降順ソート
- ⑧ Local BLAST 検索と結果の抽出
- ⑨ 各サンプル中の生物種と出現頻度 (リード数) をまとめる

なお、データ処理に用いたプログラムの作成および解析環境の構築は、「(R)で塩基配列解析(主にNGSやRNA-seq解析)」(http://www.iu.a.u-tokyo.ac.jp/~kadota/r_seq.html) および「系統解析方法の解説とリンク」(<http://www.geocities.jp/ancientfish/tree/index.html>) を参考に、プログラミング言語の R と Perl、および Mac OS X の UNIX 系端末エミュレータである Terminal を使用して行った。

最後にバーコーディング結果と 3-2-2 で得られるアカネズミ個体ごとの放射性物質蓄積量からアカネズミの食性と個体放射線量に関する解析を実施した。

3-3 結果

3-3-1 捕獲

各地のアカネズミ捕獲結果を表3-4に示す。今年度、30km圏内では36個体(オス27個体、メス9個体)、富山県では45個体(オス32個体、メス13個体)、青森県では72個体(オス41個体、メス31個体)、合計で153個体(オス100個体、メス53個体)の捕獲に成功した。

表3-4 捕獲数

		6月	7月	8月	9月	10月	合計	合計
30km圏内	雄	-	3	17	5	2	27	36
	雌	-	3	4	1	1	9	
富山	雄	3	11	14	4	-	32	45
	雌	2	6	2	3	-	13	
青森	雄	-	22	9	10	0	41	72
	雌	-	15	11	4	1	31	

3-3-2 放射性物質蓄積量

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3-5に示した。富山県における測定値は0 Bq/kg (検出限界以下)、青森県0~4.1 Bq/kg、30km圏内(低) 2,514~15,647 Bq/kg、30km圏内(高) 3,844~42,059 Bq/kgであった。またアカネズミ捕獲地土壌の放射性物質の計測結果を図3-6に示した。30km圏内(低)における測定値は74,677~165,036 Bq/kg、30km圏内(高)では118,285~396,994 Bq/kgであった。

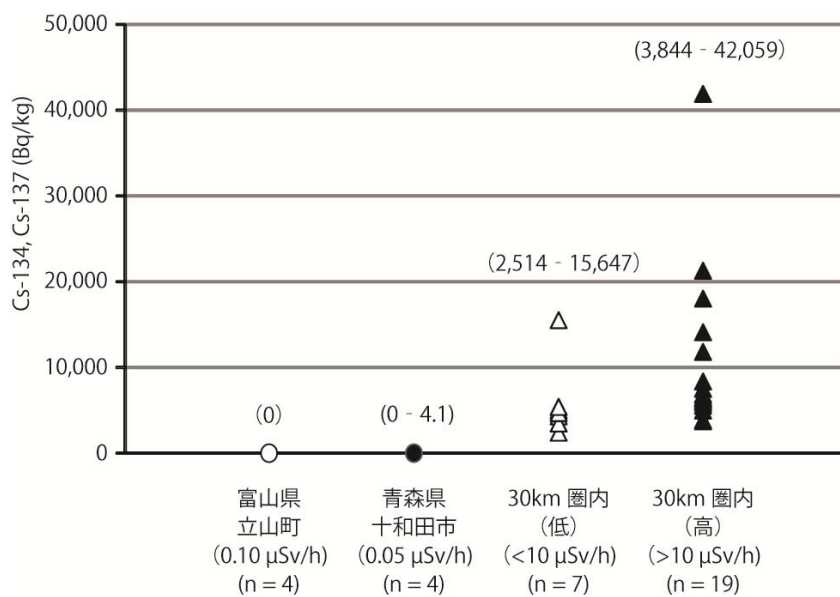


図3-5 アカネズミの放射性物質蓄積量

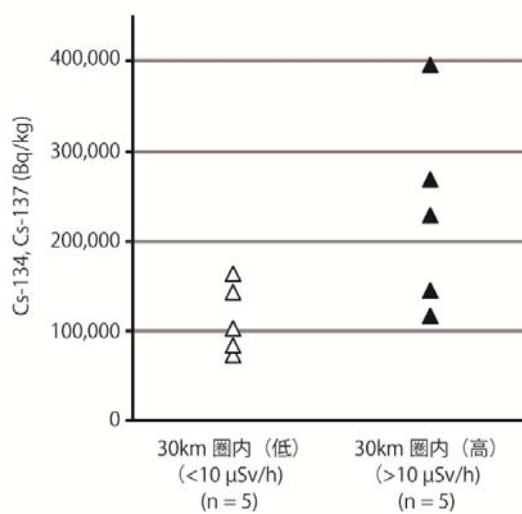


図3-6 アカネズミ捕獲地土壌の放射性物質蓄積量

3-3-3 放射線による遺伝的変異の評価

(1) 野外集団における遺伝的変異の評価

ア. ミトコンドリア D-loop、Cytb領域

ミトコンドリアD-loop領域は、263bpの配列を得て338個体の解析を行った（30km圏内（高）2012：50個体、2013：24個体、30km圏内（低）2012：18個体、2013：9個体、青森2012：73個体、2013：71個体、富山2012：53個体、2013：40個体）。各地域集団において、遺伝子多様度(gene diversity)を求めたところ、どの地域も値が0.9以上と非常に高い遺伝子型多様性を有することが明らかとなった（図3-7）。30km圏内、青森および富山との比較では、富山がわずかに低いものの、同青森では30km圏内と同等の多様度を有しており、明瞭な違いは認められなかった。また、原発事故後1年目の2012年から2年目である2013年にかけて、30km圏内特異的に多様度が増加する傾向も見られなかった。

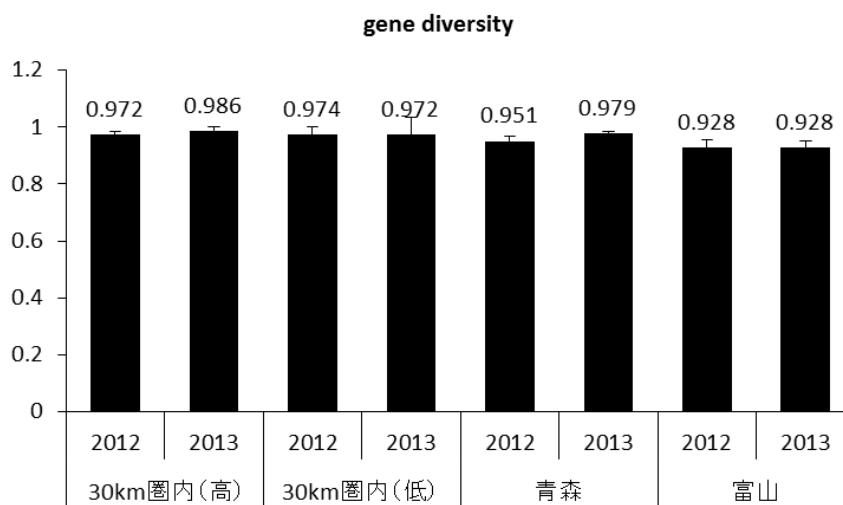


図3-7 各地域における遺伝子型多様度

バーは標準偏差を示す。

ミトコンドリアCytb領域は、941bpの配列を得て49個体（30km圏内（高）2012：34個体、30km圏内（低）2012：6個体、富山2012：9個体）の解析を行った。今後サンプルサイズを増やして解析を行う必要があるが、Cytb領域の遺伝子多様度はD-loopと同様に高い値を示した（30km圏内（高）2012：0.966±0.017、30km圏内（低）2012：0.800±0.122、富山2012：1.000±0.052、（±標準偏差））。

イ. マイクロサテライト

マイクロサテライトは、8座を得て343個体の解析を行った（30km圏内（高）2012：50個体、2013：24個体、30km圏内（低）2012：17個体、2013：9個体、青森2012：73個体、2013：59個体、富山2012：73個体、2013：38個体）。マイクロサテライト座のアリル数は、各地域集団において高い値を示した（表3-5）。さらに、ヘテロ接合度はAMS41を除いた7座位で0.8以上と高いヘテロ接合度を示したことから（表3-6）、各地域集団は高い多様性を有することが明らかとなった。

表3-5 各地域集団におけるマイクロサテライト座のアリル数

Locus	放射線汚染地域				非汚染地域			
	30km圏内 (高)		30km圏内 (低)		青森		富山	
	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013
AMS03	16	18	15	6	19	23	19	21
AMS07	17	7	10	4	19	17	21	17
AMS08	19	10	14	9	20	20	22	18
AMS12	19	10	14	9	23	24	20	17
AMS14	14	10	12	8	18	19	17	16
AMS15	14	13	12	10	20	17	19	14
AMS20	28	16	16	13	36	30	27	24
AMS41	16	14	12	10	17	17	17	18

表3-6 各地域集団におけるマイクロサテライト座のヘテロ接合度

Locus	放射線汚染地域				非汚染地域			
	30km圏内 (高)		30km圏内 (低)		青森		富山	
	2012	2013	2012	2013	2012	2013	2012	2013
AMS03	0.896	0.917	0.941	0.833	0.958	0.930	0.931	0.903
AMS07	0.951	0.875	1.000	0.500	0.917	0.846	0.903	0.826
AMS08	0.898	1.000	0.941	1.000	0.917	0.912	0.958	0.900
AMS12	0.918	1.000	1.000	1.000	0.792	0.964	0.972	0.967
AMS14	0.918	0.957	0.823	0.889	0.958	0.931	0.944	1.000
AMS15	0.959	0.957	0.941	0.889	0.917	0.947	0.894	0.842
AMS20	0.939	0.913	1.000	0.889	1.000	0.897	0.972	0.974
AMS41	0.653	0.696	0.588	0.778	0.620	0.810	0.768	0.703

各地域集団において平均遺伝子多様度(gene diversity)を求めたところ、どの地域も値が0.8以上と非常に高い遺伝子型多様性を有することが明らかとなった(図3-8)。30km圏内、青森および富山との比較では、どの地域も同等の多様度を有しており、明瞭な違いは認められなかった。また、汚染後1年目の2012年から2年目である2013年にかけて、30km圏内特異的に多様度が増加する傾向も見られなかった。

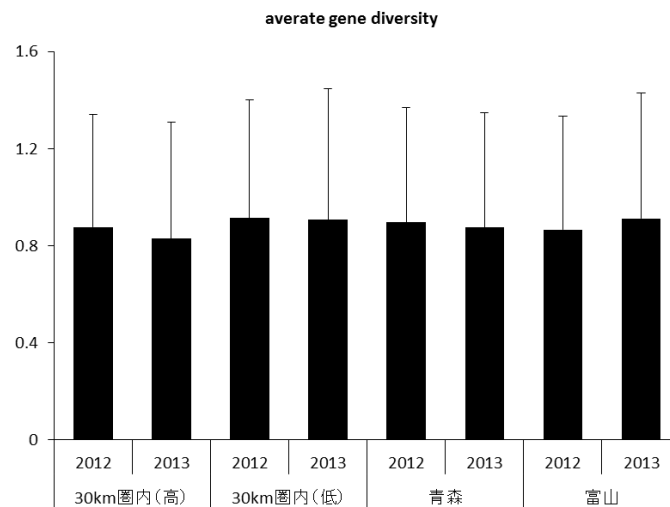


図3-8 各地域における平均遺伝子多様度 バーは標準偏差を示す。

(2) 次世代への変異の遺伝評価

ア. 母親からの変異の遺伝評価

2012年および2013年の調査で捕獲された妊娠メスのうち胎子のDNAが採取できたサンプルは、21個体であった(30km圏内：5個体、青森：12個体、富山：4個体)。一腹あたりの平均胎仔数は30km圏内が 5.2 ± 0.5 、青森 4.9 ± 0.2 、富山 5.3 ± 0.3 (平均±標準誤差)であり、胎仔数の地域差はみられなかった(Steel-Dwass test, $p < 0.05$)。妊娠メスとその胎子におけるミトコンドリアD-loop領域の塩基配列の比較を行ったところ、全ての個体において変異は見られなかった。

イ. 父親からの変異の遺伝評価 (キャピラリーシーケンサーを用いた1精子からの配列決定)

青森で捕獲された個体のサンプルから 142 個の精子を採取し、それぞれダイレクト PCR を行った。電気泳動による PCR 産物の確認と精製を経て D-loop 領域の遺伝子配列を決定できたサンプルは 79 サンプルであり、シーケンスの成功率は 55.6%であった。個体の肝 DNA 配列と各精子の DNA 配列の比較を行ったところ、肝 DNA 配列と一致したサンプルは 37 で、残りの 42 サンプルの配列では点突然変異やヘテロプラスミー、塩基の挿入および欠失が観察された。精子 DNA 配列の変異率は 53.2%であった。

捕獲された個体の精子サンプルを用い、実験的に肝 DNA 配列に対する精子 DNA 配列の変異を解析した。30km 圏内の精子サンプルの変異出現率は低く、変異のタイプは塩基の挿入欠失のみであった。一方、青森の精子サンプルの変異出現率は高く、かつ変異タイプもヘテロプラスミー、点変異など様々なタイプが観察された(表 3-7)。

表 3-7 青森県および 30km 圏内における精子 DNA 配列の変異出現率

		変異出現率 (/12 sperms)		
		ヘテロプラスミー	点変異	塩基挿入欠失
30km 圏内	(n=1)	0%	0%	8%
非汚染域：青森	(n=1)	25%	50%	8%

3-3-4 精巣および精巣上体における 8-OHdG 蓄積状況

30km 圏内で捕獲したアカネズミ 19 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を実施した。その結果 12 個体で 8-OHdG 陽性となる精子細胞を含む精細管が観察された（図 3-9）。一方、精巣上体では 8-OHdG 陽性となる精子は観察されなかった。

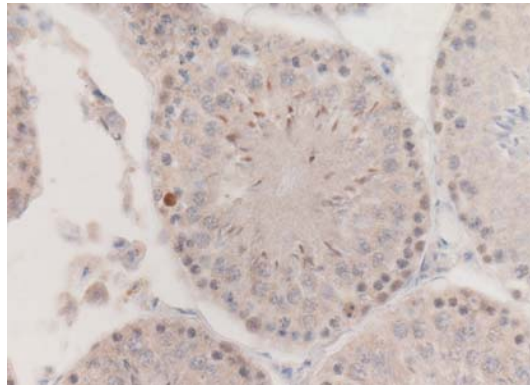


図 3-9 8-OHdG 陽性を示した精細管

3-3-5 精巣上体精子奇形

繁殖期（精巣重量1.0g以上）の成獣雄（30km圏内19個体、富山県20個体、青森県27個体）を対象に精巣上体精子奇形の観察を行った（図3-10）。アカネズミの精巣上体精子の奇形率を表3-8に示した。頭部奇形率は、30km 圏内0.5%、富山県0.9%、青森県0.6%であった。中片部奇形率は、30km圏内16.0%、富山県15.4%、青森県0.6%であった。尾部奇形率は、30km圏内4.7%、富山県5.7%、青森県3.9%であった。各地における精巣上体精子の奇形率は、統計的に有意な差は見とめられなかった。

表3-8 精巣上体精子の奇形率

平均値±標準偏差 (%)	30km圏内 (n = 19)	富山県 (n = 20)	青森県 (n = 27)
頭部奇形率	0.5 ± 0.6	0.9 ± 1.0	0.6 ± 0.9
中片部奇形率	16.0 ± 11.2	15.4 ± 6.9	13.0 ± 5.5
尾部奇形率	4.7 ± 4.2	5.7 ± 3.5	3.9 ± 2.8
正常形態率	80.5 ± 12.1	80.3 ± 7.8	83.6 ± 6.0

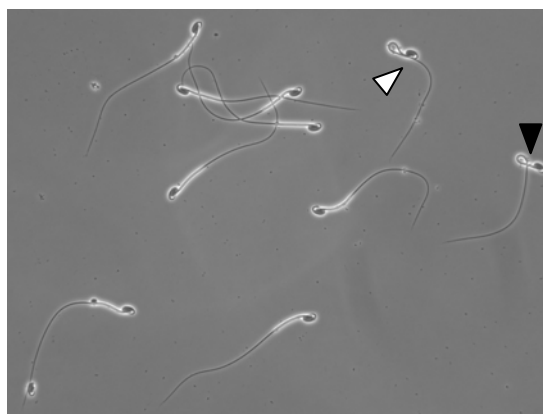


図 3-10 アカネズミ精巣上体精子（位相差顕微鏡像、×100）

正常な生理状態においても、精子の奇形が存在する。矢頭（白抜）：中片部ヘヤピン状、矢頭（黒塗）：中片部旋回。

3-3-6 食性

(1) 各個体の植物性の採餌傾向

30km 圏内で捕獲した 36 個体の植物性の採餌パターンを解析した。本研究では、Ion PGM™システムによる解析、およびその後のデータ処理によって得られたすべてのリードのうち、10 回以上読まれたリード（データ処理ステップの 6 で重複数が 10 以上であったもの）を解析対象とした（図 3-11）。

最も高頻度に出現した植物種はアズマネザサ (*P. chino*) で、全リード数の 79~96%を占めていた。以下、カキノキ (*D. kaki* : 2.7~13.8%)、クロマツ (*P. thunbergii* : ~1.7%)、トキワマンサク (*L. chinense* : ~1.2%) と続いた。また、BLAST 検索で同一のスコアを示したカキノキ/トキワマンサク (*D. kaki/L. chinense*) は 1.1~5.9%とであった（図 3-12）。なお、凡例上で「Others」としたのものの中には、ホトケノザ (*L. amplexicaule*)、アマチャヅル (*G. pentaphyllum*)、ノビル (*A. macrostemon*)、スマレ属 (*Viola* sp.)、シオデ属 (*Smilax* sp.)、アキギリ属 (*Salvia* sp.)、およびチシマゼキショウ (*T. coccinea*) が含まれている（全リード数の ~0.3%）。これらの結果はすべて、BLAST の相同性検索でトップスコアではあるが 100%マッチしたものではなかった。このことは、福島県には自生していないとされるトキワマンサクを含め、表記した植物種の「近縁種」が摂餌されているということを示めている。

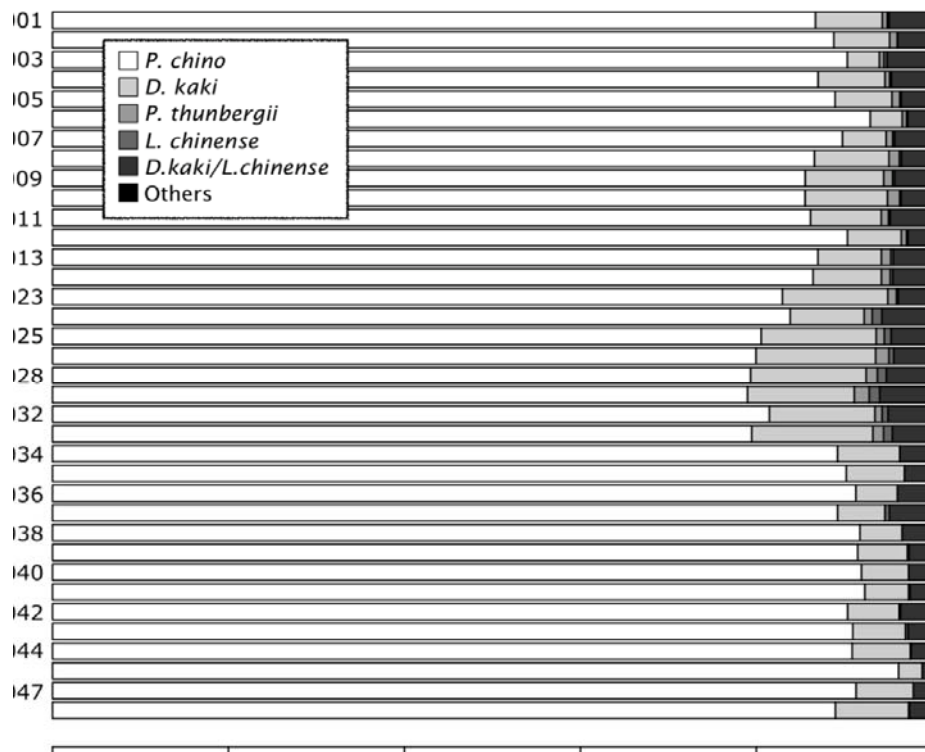


図 3-11 植物性餌の食性解析結果

縦軸は解析個体番号、横軸は植物種の割合（解析対象の全リード数に対する割合）を示す。

(2) 植物性採餌傾向と個体線量の関係

(1) で解析した 36 個体の中で、個体重が 30g 以上であった成獣個体について、採餌傾向と個体線量にどのような関係があるかを解析した。図 3-11 に示した結果から個体重 30g 以上の個体を抽出し、個体線量との相関を解析した（図 3-12）。各パラメータ間での相関係数を算出した結果、アカネズミが採餌した植物種 (A~F) と個体線量 (Cs) には相関が認められなかった（表 3-9）。

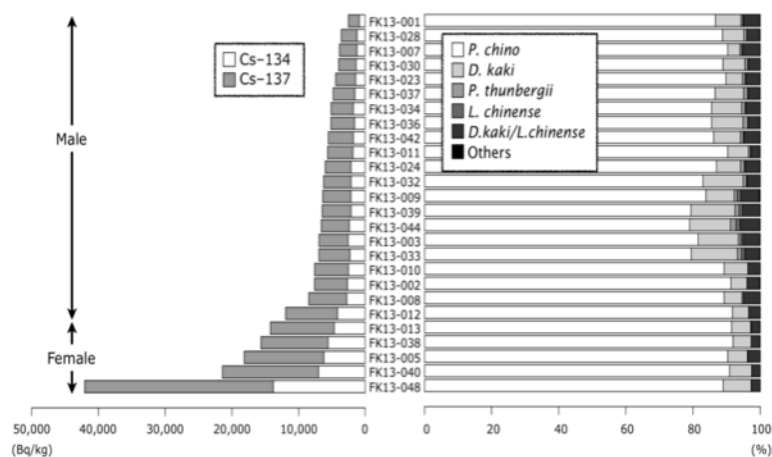


図3-12 個体線量（左）と植物性採餌パターン（右）の関係

(左) 縦軸は個体番号、横軸は個体線量 (Bq/kg) を示す。(右) 図3-11 で示したグラフから体重 30g 以上の個体を抽出し、線量データと対応するように並べ替えた。

表3-9 採餌パターンと個体線量および各種パラメータ間の相関係数

表中の A から F はそれぞれ *P. chino*, *D. kaki*, *P. thunbergii*, *L. chinense*, *D. kaki/L. chinense*, Others を示す。また、Point データは高線量地点を1、低線量地点を0とし、Sex データは雄を1、雌を0として算出した。

B	-0.94	1.00									
C	-0.80	0.68	1.00								
D	-0.82	0.67	0.59	1.00							
E	-0.66	0.40	0.54	0.73	1.00						
F	-0.29	0.15	0.35	0.45	0.33	1.00					
Month	-0.12	0.10	-0.04	0.03	0.18	0.14	1.00				
Point	-0.49	0.34	0.59	0.43	0.54	0.26	0.07	1.00			
Sex	-0.21	0.35	-0.08	0.18	-0.16	-0.04	-0.23	-0.08	1.00		
Weight	0.23	-0.19	-0.09	-0.24	-0.25	0.06	-0.49	-0.37	-0.14	1.00	
Cs134	0.02	-0.14	0.19	-0.12	0.26	0.11	0.48	0.24	-0.81	-0.10	1.00

3-4 考察

3-4-1 精子細胞への放射線の影響について

今年度も、精巣における 8-OHdG の蓄積は確認できるものの、精巣上体において 8-OHdG 陽性となる精子は認められなかった。また、30km 圏内における精巣上体精子の奇形率も他の地域と比較して差はないことが明らかになった。加えて、精巣上体の精子が極端に減少している個体も確認されていないことから、30km 圏内に分布するアカネズミのオスは十分な繁殖能力を有していると考えられる。

3-4-2 遺伝的変異の評価

チェルノブイリ事故による野生動物への遺伝的変異の影響として、bank vole を生物指標に用いた D-loop 領域の遺伝的多様性の評価に関する報告が多数ある(Baker *et al.*, 2001; Heather *et al.*, 2007)。本研究では日本固有種であるアカネズミを生物指標に、同じくミトコンドリアの D-loop, Cytb、さらにマイクロサテライトを用いた解析を行ったが、いずれも非常に高い多様性を有していることが明らかとなった。放射線汚染地域と非汚染地域の比較では、多様性に差は見られなかった。放射線汚染地域および非汚染地域に共通して観察された多数の遺伝子多型は、元来アカネズミに遺伝的変異を積極的に維持する自然選択（平衡選択）が働いている可能性があり、野外集団での評価には変異を検出する遺伝子領域について検討する必要がある。

3-4-3 放射性物質の蓄積量と食性の関連について

アカネズミが採餌した植物種と個体線量には相関が認められなかった、すなわち、個体線量は植物性の採餌パターンに依存していないと推定される。個体線量と相関が見られたパラメータは、Sex（性別）($r=-0.8$)と Month（捕獲した月）($r=0.5$)であった。Sex については、雌の個体での線量が高い傾向が明らかである。Month に見られた中程度の相関は、捕獲時期の進行に伴って (1) 植物以外の採餌傾向が変化する、もしくは (2) 植物の生育による放射性セシウム蓄積量に変化する、という可能性を示唆する。(1) については、植物ではなく（今回は測定していない）昆虫・動物や菌類の採餌パターンに個体線量が依存している可能性があるため、昆虫・動物種の採餌パターンを引き続き次世代シーケンサーを用いて解析していく。また、アカネズミ各個体の C/N 比の測定を行い、個体間で C/N 比に偏りや変動が見られるかについて解析することで、植物性と動物性の餌をどのような割合で採餌しているかを検討していく。(2) について、今回の解析データを見ると、多年生植物である *P. chinensis* や樹木である *D. kaki*, *P. thunbergii* が主な植物種として得られた（図 3-11）。この結果は、これらの植物種の生育によって地下茎や種子・果実などに蓄積される放射性セシウム量に変化することにより、アカネズミへの放射性セシウムの移行量が季節で変動している可能性が推察される。植物種間における放射性セシウムの移行係数ないし蓄積量の相違がこれに寄与していると考えられる。

引用文献

1. Suzuki H, et al. (1997) Zoological Science 14: 167-173.
2. Stacy JE et al. (1997) Mol. Ecol. 6: 751-759.
3. Azuma N et al. (2013) Conservation Genet. Resour. 5: 1001-1003.
4. 桑野良三ら(2002) Clinical Neuroscience 20: 502-503.
5. CBOL Plant Working Group (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106:12794-12797.
6. Leray M et al. (2013) Front Zool. 10: 34.
7. Tatsukawa K and Murakami O (1976) Physiol. Ecol. Japan, 17: 133-144.
8. Hebert PDN et al. (2003) Proc. R. Soc. B, 270 (Supplement): S96-S99.
9. Baker RJ et al. (2001) Ecotoxicology 10:211-216
10. Meeks HN et al. (2007) Environmental toxicology and chemistry 26:361-369

4 野生菌類（キノコ類・地衣類）における放射性セシウムの動向把握

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された。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。特に、菌類は記載種数が約10万であるのに対し、真の多様性は150万種を超えると推定されており、未記載種のほうがはるかに多い分類群であり、種レベルの分類は非常に困難である。また、形態的な特徴で区別できない、いわゆる隠ぺい種が多数存在することも予想される。そのため、種ごとの放射性物質蓄積特性を調べるうえで、証拠標本の確保とDNAレベルの種同定が必須となる。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した。そのために、関東地方及び福島県を中心とした森林に自生する野生菌類を網羅的に採取し放射能を測定し、放射性物質の長期モニタリングに必要な種のスクリーニングを行なった。また、原発事故前に採取された野生菌類の放射能の測定を実施した。

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ECM菌）、木材腐朽菌（以下LIG）、地上性腐生菌（以下SAP菌）に分けることができる。ECM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することを目的とした。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、将来的には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こと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、ECM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ECM菌の一種、*Paxillus involutus*からは80万ベクレル/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ECM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、ECM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菌および地衣類という、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。

4-2 地衣類を活用した放射性物質モニタリングにむけての基盤調査

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、永續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。以下、筑波大学構内に生育している葉状地衣類についての調査結果を示す。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 $20,553 \pm 339 \text{ Bq/kg}$ 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 applanata*)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、未だに筑波大学構内の地衣類からは $10,000 \text{ Bq/kg}$ を超える値が検出されている。以上の結果はイギリスの学術雑誌 *Lichenologist* に論文として出版した (Ohmura et al. 2013)。本委託業務では、以上の調査も踏まえ、東日本の広範囲に適用可能な地衣類を活用した放射性セシウムのモニタリング手法の確立を目指したものである。本目的の達成のために、次の内容を実施するものとする。1) 放射性物質が降下した東日本の地域で幅広い分類群の地衣類の採集を行い、基礎資料として標本庫に保管する。2) 森林における長期放射性物質の影響モニタリングにむけて地衣類の選定のための基礎調査を行う。3) 地衣類における原発事故前後の放射性濃度の変遷を明らかにす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、放射性セシウム濃度を測定する。

平成25年度は、放射性降下物と地衣類に蓄積されている放射性セシウム濃度の関係を明らかにするために、1) 地衣類の放射性物質の濃度分布調査をつくば市広域において網羅的に実施し、2) 地衣類の生物学的半減期を推定するため、筑波大学構内に設定した定点観測地点において継続的モニタリングを実施した。

4-3 つくば市における地衣類の放射性物質濃度分布

4-3-1 材料および方法

平成23年度に調査された空間線量マップによると、つくば市では概ね北部から南部地域に向かって線量が多くなる傾向 ($0.092 \sim 0.295 \mu\text{Sv/h}$) があつた (つくば市2013)。本研究ではそのマップに基づいて、低線量から高線量地域をなるべく網羅できるように調査地点を選定した (図4-1)。調査は、平成25年8月6日～8日の3日間、つくば市の許可を得た上で、市が管理する公園25地点において実施した。公園内の樹木の樹幹または路

面から各種の大形葉状地衣類を採取し、研究室に持ち帰り、種の同定を行った。なお、地衣類が十分量生育している地点では複数の樹木からそれぞれ試料を採取した。

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。必要に応じて、地衣体に含まれる化学成分(地衣成分)の検出や DNA 情報の決定などを行い、同定の参考とした。地衣成分の検定は呈色反応法(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。

測定用試料は、60°C48 時間で乾燥させた後、試料を粉碎器で粉末状にし、100ml プラスチック容器 (U-8、アズワン) に入れて、乾燥重量を測定した。Cs-137 濃度は、筑波大学アイソトープ環境動態研究センターにおいて、低バックグラウンド γ 線測定装置 (IGC25190, Princeton Gamma Tech; MSA7800, SEIKO EG6G) を用いて、5000 秒計測した。証拠標本は全て国立科学博物館植物標本庫 (国際ハーバリウムコード: TNS) に保管されている。学名および和名は Kurokawa & Kashiwadani (2006) に従った。

4-3-2 結果および考察

つくば市内の公園から測定用試料として十分な量が採取できた地衣類は以下の種であった。ウメノキゴケ *Parmotrema tinctorum*, キウメノキゴケ *Flavoparmelia caperata*, コカゲチイ *Hyperphyscia crocata*, コフキメダルチイ *Dininaria applanata*, シロムカデゴケ *Physcia orientalis*, ナミガタウメノキゴケ *Parmotrema austrosinense*, ナメラクロムカデゴケ *Phaeophyscia spinellosa*, ハクテングケ *Punctelia borrieri*, マツゲゴケ *Parmotrema clavuliferum*, ロウソクゴケ *Candelaria concolor*. これらのうちコフキメダルチイが最も多くの地点 (16 地点) で採取することができ、次いでシロムカデ (14 地点)、コカゲチイ (4 地点)、ウメノキゴケ (3 地点)、ナメラクロムカデゴケ、ナミガタウメノキゴケ、マツゲゴケ (各 2 地点)、キウメノキゴケ、ハクテングケ、ロウソクゴケ (各 1 地点) であった。



図4-1 つくば市で採集された地衣類

A.ウメノキゴケ, B.キウメノキゴケ, C.コカゲチイ, D.コフキメダルチイ, E.シロムカデゴケ, F.ナミガタウメノキゴケ, G.ナメラクロムカデゴケ, H.ハクテングケ, I.マツゲゴケ, J.ロウソクゴケ, K.採集場所の例1. つくば市中央公園, L.採集場所の例2. つくば市梅園公園.

採集したこれらの10種の地衣類試料について、 ^{137}Cs 濃度 (Bq/kg, dry weight) を測定したところ、最も低い濃度は、T41 地点で採取されたウメノキゴケ $1726.7 \pm 61.4 \text{ Bq/kg}$ で、最も高かった濃度は、T21 地点で採取されたシロムカデゴケ $35407.4 \pm 191.9 \text{ Bq/kg}$ であった。T41 地点の空間線量は平成23年度で $0.103 \mu\text{Sv/h}$ 、平成24年度で $0.093 \mu\text{Sv/h}$ であり、T21 地点の空間線量は平成23年度で $0.198 \mu\text{Sv/h}$ 、平成24年度で $0.159 \mu\text{Sv/h}$ であった。各種地衣類の ^{137}Cs 濃度と平成23年度および平成24年度の空間線量をグラフ上にプロットし、関連を調べた(図4-2)。それらの結果から、地衣体に含まれる ^{137}Cs 濃度は、空間線量が高い地点ほど、濃度が高くなる傾向が見られた。採集された地衣類のうち、多くの調査地点に広く分布していたコフキメダルチイとシロムカデゴケについて年度ごとの空間線量との違いについてグラフにプロットし関連を調べた(図4-3)。その結果、シロムカデゴケは空間線量との相関がはっきりと見られたのに対し (H23年度 $R^2=0.7724$; H24年度 $R^2=0.677$)、コフキメダルチイははっきりとした関係は支持されなかった (H23年度 $R^2=0.1509$; H24年度 $R^2=0.0597$)。両種は生育場所や形態が類似しているにも関わらず、 ^{137}Cs 蓄積濃度に差が見られたのは大変興味深い。さらに、シロムカデゴケの ^{137}Cs 濃度と年度ごとの空間線量とを比較すると、シロムカデゴケの ^{137}Cs 濃度は、H23年度の方がH24年度の空間線量よりも相関が高いことが分かった。環境中の放射性物質は、自然減衰や除染などにより大幅に減少してきており、事故当時の放射性降下物の濃度分布は当時とは様子が変わってきている。しかし、地衣類(特にシロムカデゴケ)に着目して ^{137}Cs を測ることにより、事故当時の放射性降下物の濃度分布を推定出来る可能性が示唆された。本調査により、モニタリング種を選定していく上で参考となる重要なデータを得ることができた。

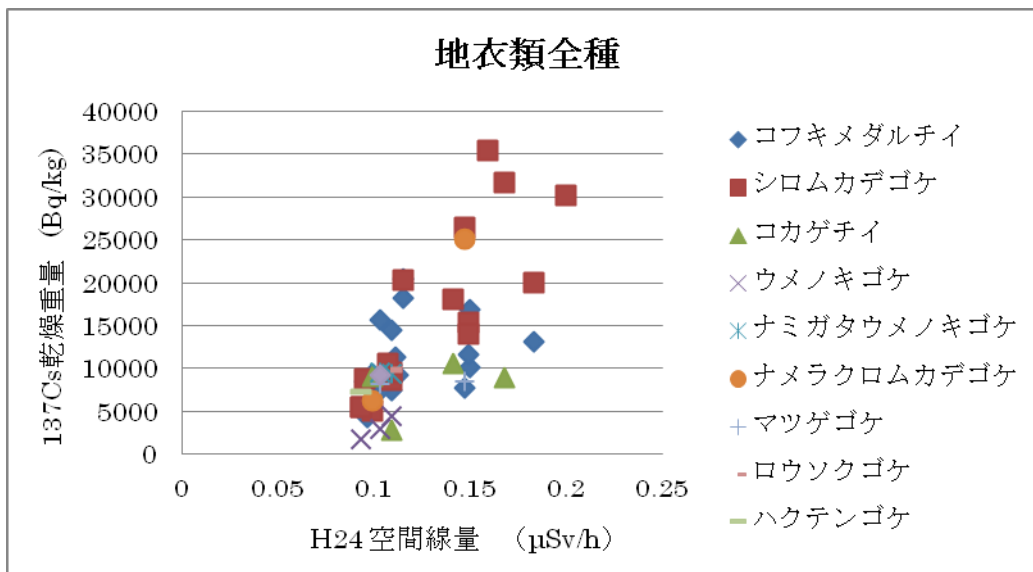


図4-2 つくば市における地衣類の¹³⁷Cs濃度と平成24年度の空間線量との関係

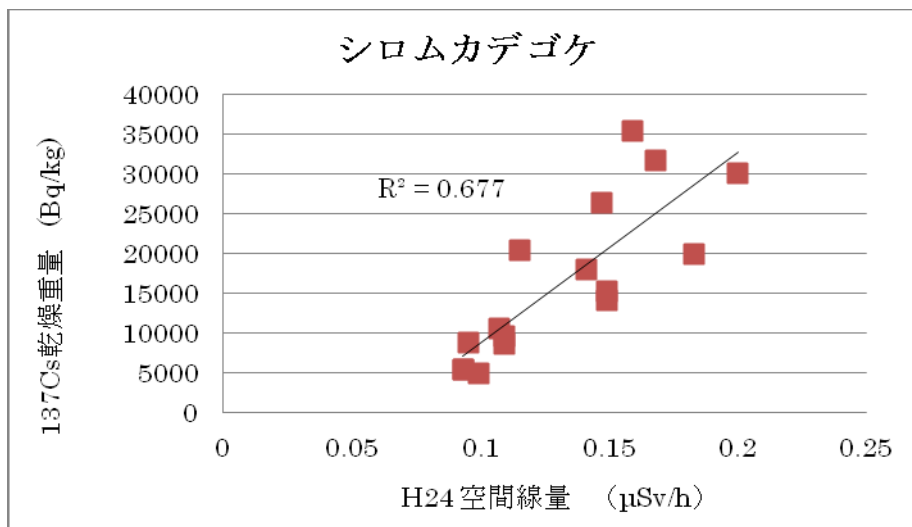


図4-3 つくば市で採取されたシロムカデゴケの¹³⁷Cs濃度と平成24年度の空間線量との関係

4-4 地衣類ナメラクロムカデゴケにおける生物学的半減期の推定

4-4-1 材料および方法

調査は2011年4月26日から2013年10月7日までに、筑波大学構内において定点調査を行った。対象種は、構内コンクリートフェンスに多数生育しているナメラクロムカデゴケとした。コンクリートフェンスの水平面および垂直面から地衣類コロニーを採取し、 ^{137}Cs および ^{134}Cs 濃度 (Bq/kg, dry weight) を測定後、それらの平均値を採集日ごとにグラフにプロットした (図44)。

4-4-2 結果および考察

放射性セシウムの半減期 (物理学的半減期) は、 ^{134}Cs が2.1年、 ^{137}Cs が30.2年であることが知られている。一方、地衣体に含まれる放射性セシウムは、代謝または受動的に体外に排出されていく。そのような生物のもつ性質によって濃度が半分になるまでの時間を生物学的半減期という。さらに、実際に生体から検出される放射性セシウム濃度が半減するときの時間のことは実効半減期という。本研究で、ナメラクロムカデゴケを定点調査した結果、放射性セシウムは、物理学的減衰よりも著しく早く地衣体より逸脱することが明らかとなった。実効半減期は ^{134}Cs で約1年、 ^{137}Cs で約2年程度となった。地衣類は一般に放射性物質を長期に渡って保持するとされており、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)。ナメラクロムカデゴケの生物学的半減期を推定するためには、さらに継続的な調査により値を追加し、計算を行う必要があるが、少なくともこれまで知られている地衣類の生物学的半減期よりもさらに早い値となることは間違いない。

地衣類の生物学的半減期は、*Xanthoria parietina* で59ヶ月(Topcuoglu et al. 1995)、*Pseudevernia furfuracea* で37ヶ月、*Cetraria islandica* で29ヶ月であることが報告されている(Heinrich and Remele 1996)。それらの違いが種によるものなのか生育場所の違いによるものなのかについては、よく分かっていない。本研究で対象としたナメラクロムカデゴケの生育場所は高さの低いコンクリートフェンスであり、水が流れやすく、樹木と違って樹幹流などによる放射性物質の供給なども非常に少ないと考えられる。それに対して、既報告種は樹幹上や地上生種であり生育場所としてはコンクリートフェンスと比べると放射性物質が留まりやすい環境のように思われる。定点観測については地衣類が長期的に十分に得られる場所で、なおかつ外的環境条件が均一な場所で行っていく必要があり、現在のところ本対象種以外で調査を行える場所が見つかっていない。また、地衣類は成長が非常に遅いため、一度採取してしまうと同じ個体を測定するということができない。したがって、表面汚染計でカウンター数を測定するなどして、地衣体を損傷せずにモニタリングする方法などを開発していく必要もある。

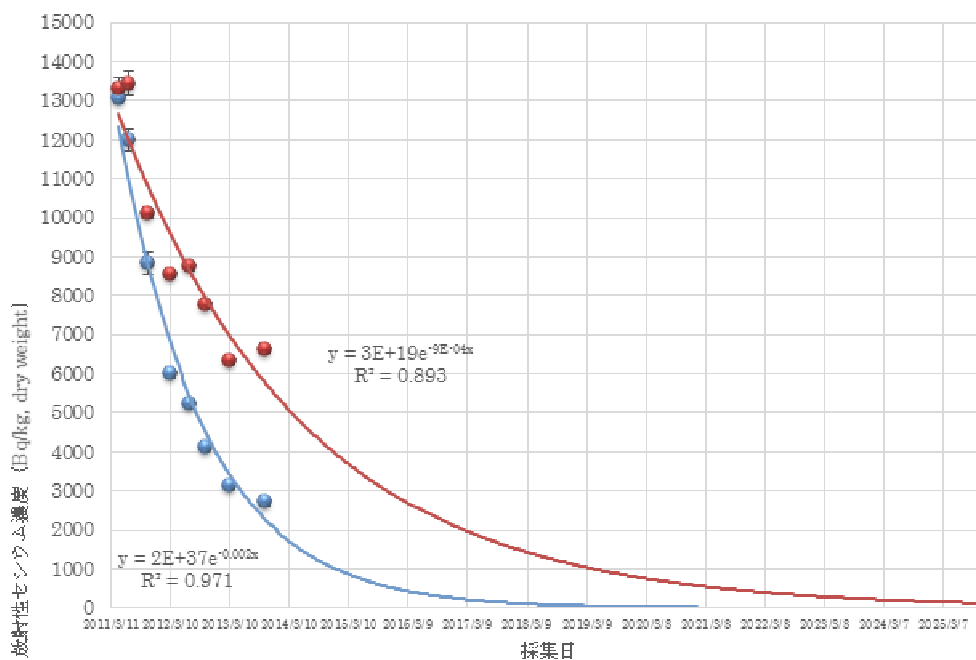


図4-4 ナメラクロムカデゴケの ^{137}Cs および ^{134}Cs 濃度 (Bq/kg) の経時変化
赤は ^{137}Cs , 青は ^{134}Cs 。

4-5 茨城県つくば市内を中心とする地域におけるキノコ類の放射性セシウム濃度の動向

4-5-1 はじめに

放射性物質による汚染は、つくば市周辺にも影響を与えている。放射能濃度はさほど高くないとはいえ、これまでにないレベルの放射性セシウムが検出されるようになったのも事実である。本研究では、放射性物質の蓄積特性が特に高い野生のキノコ類を対象に、今後数十年にわたる長期モニタリングを想定し、つくば市周辺地域を中心としつつ、東北地方（福島県～宮城県）・栃木県日光市周辺・富士山周辺地域に至る一帯より野生キノコ類を網羅的に採集し、放射性セシウム濃度を測定した。

4-5-2 材料と方法

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。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、改良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。

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容器に充滿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2000秒また

は 5000 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滿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。この測定は筑波大学アイソトープ総合センターおよび中外テクノス株式会社の各施設で行った。

4-5-3 結果

測定したキノコ類で乾燥重量 1kg あたりの放射性セシウム (Cs-137) が 100,000 Bq/kg を超える値を示したサンプルが 2 点あり、両方とも外生菌根菌 (ECM 菌) であった。最大値は宇都宮大学船生演習林から採集されたクサウラベニタケ *Entoloma rhodopolium* で Cs-137 濃度は 171,233 Bq/kg を示した (図 4-5)。もう 1 点は茨城県ひたち海浜公園から採集されたチチタケ属 *Lactarius* で、Cs-137 濃度は 116,7825 Bq/kg であった。両方とも 2012 年の後半に採集されたものである。茨城県つくば市で採集されたサンプルについては、2013 年後半までに測定した全てのサンプルにおいて 100,000 Bq/kg を超える値は検出されなかった。

Cs-137 濃度が 10,000 Bq/kg 以上、100,000 Bq/kg 未満の値を示したサンプルは主に福島県、栃木県などで採集されたものが多く含まれたが、つくば市内で採集されたキノコ類も 3 点あった。そのうち、Cs-137 濃度が最大値を示したものは 2011 年 4 月に採集されたスエヒロタケ *Schizophyllum commune* (木材腐朽菌=LIG 菌) の 21,572 Bq/kg であり、次いで 2012 年 12 月に採集されたクサウラベニタケ (ECM 菌) の 16,310 Bq/kg、2011 年 4 月に採集されたツチグリ *Astraeus hygrometricus* (ECM 菌) の 11,847 Bq/kg であった。

Cs-137 濃度が 1,000 Bq/kg 以上、10,000 Bq/kg 未満の値を示したサンプルは約 130 点あり、その中にはつくば市内で採集されたキノコ類約 40 サンプルが含まれる。この中には、EMC 菌、LIG 菌、腐生菌 (SAP 菌) それぞれがほぼ同数含まれており、キノコ類の生態的特性とセシウム蓄積量の間には明確な相関は見られなかった。また、EMC 菌・LIG 菌・SAP 菌それぞれにおいて、2011 年～2013 年の 3 年間で採集されたサンプルが全て含まれており、時間の経過と蓄積量の間には明確な相関は見られなかった。

4-5-4 考察

一般的に、ECM 菌のほうが SAP 菌や LIG 菌に比べ、セシウム蓄積能力が高いと言われている。しかし、福島第一原発事故以降これまでの測定結果を見る限り、そのような生態的特徴と蓄積度合の間に明確な相関があるとは言いがたい。ただし、事故直後に 10,000 Bq/kg 前後の非常に高い値を示した LIG 菌 (スエヒロタケやチャカイガラタケ *Daedaleopsis tricolor*) などが、時間がたつにつれて低い値を示す傾向にある。これは原発事故直後のフォールアウトにより、子実体表面に降下したセシウムを検出した結果であり、これら LIG 菌の体内に取り込まれていただけではないことを示唆している。

一方、ECM 菌も全体を見ると、100,000 Bq/kg を超える非常に高い値を示すものから、検出限界以下のものまであり、種や発生地域ごとにかなりばらつきがあることがわかる。ただし、クサウラベニタケを含むイッポンシメジ属 *Entoloma* やフウセンタケ属 *Cortinarius* などは相対的に高い値を示す傾向にあり、今後も数値をモニタリングする必要があるであろう。また、ECM 菌のうちニガイグチ属 *Tylopilus* やベニタケ属 *Russula* などの一部の種において、同じ地点で採集されたサンプルでも、2011 年より 2012 年・2013 年に採集されたもののほうが高い値を示す場合が多く見られた。この増加傾向は、LIG 菌や SAP 菌では見出すことはできなかった。

セシウムの蓄積量は、キノコ類の生理的特性というよりは、土壌中のどこに菌糸を優占させているか、ということのほうが重要かもしれない。すなわち、リター層に多くの菌糸を分布させるキノコに対して、より地中深くに菌糸が多いキノコがあれば、その土壌においてセシウムがどのように分布しているかによって、吸収するセ

シウム量は大きく変わることが予想される。原発事故当初、樹冠やリターに降り注いだセシウムであるが、その後リターの分解が進むなどして、現在では土壤中のやや深い部分に分布の中心が移ってきていることは明白である。よって今後は、土壤表層よりも深い位置に菌糸を張り巡らす特性のある ECM 菌が、セシウム吸収の主角となってくることは容易に想像がつく。最初の2年間の調査ではこの変化を明確にすることはできなかったが、すでに高い値を示しているイッポンシメジ属やフウセンタケ属を対象として、長期モニタリングを継続すると同時に、現在はそれほど高い値を示さないいくつかの ECM 菌についても、引き続きセシウムの動向を追っていく必要があるであろう。



図 4-5 クサウラベニタケ (TNS-F-40685)

本研究で最高値のセシウム濃度を示した。

4-6 2011年3月以前のキノコ類標本から探るセシウムの動向

4-6-1 はじめに

2011年3月に起こった東京電力福島第一原子力発電所の事故により、東日本を中心とする広範囲に放射性セシウムが拡散した。これにより日本各地の様々な生物から放射性セシウムが検出される事態となったわけであるが、放射性セシウムが生態系に取り込まれるのは今回が初めてではない。代表的な事例としては1986年に起こったチェルノブイリ原子力発電所事故があげられるが、その他にも1950-60年代を中心に行われた大気圏内核実験により飛散した放射性物質は日本においても検出されている。

このような状況であるので、日本国内においても、特に放射性物質を蓄積しやすいと考えられているキノコ類からは、福島の事故前から高濃度のセシウムを蓄積したものが存在していた可能性がある。ただし、当時日本国内で野生キノコ類の放射性濃度を測定した事例は乏しく、わずかに Muramatsu et al. (1991) や Sugiyama et al. (1994) に見られる程度である。よって、過去の生態系において放射能濃度を検証することは困難である。

ただし、博物館に収蔵されている標本を活用することで、過去の放射能濃度を時系列で検証することが可能である。今回の研究では、国立科学博物館の菌類標本庫に収蔵されているキノコ類標本のうち、同一地域で福島第一原発事故前後に複数回採集されている種を選択し、過去から現在に至る放射性セシウム濃度の遷移について検証した。

4-6-2 材料と方法

測定に用いたサンプルは全て、国立科学博物館植物研究部の菌類標本庫に保管されている、キノコ類の乾燥標

本である。まず、標本データベースを活用して、つくば市から採集された標本に限定して探索した。そして、2011年3月以前と以後の両方から採集されている種をリストアップし、測定のための候補種とした。

次に、濃度測定をするのに十分量が確保できるかを検証した。保管されている標本は分類学その他の研究に今後利用されるためのものであるし、また過去の研究成果の証拠標本でもある。そのため、放射能濃度測定のために全体を粉末化し、標本の価値が損なわれることは避けなくてはならない。今回の研究では、必要以上の粉末化を避けると同時に、標本の一部を失ったとしても、十分量が残る場合に限り、測定に用いた。

以上の条件に見合う標本から、最終的に23種、106点の標本を測定に用いた。23種の選択に際しては、キノコ類の生態的特徴（菌根性、腐生性、木材腐朽性）も考慮した。

放射性セシウム濃度の測定は、国立科学博物館が所蔵する、パーキンエルマー社のWIZARD2 2480-0010型ガンマカウンターを用いた。測定容器は容量20mlの低拡散ポリエチレンバイアルを使用し、なるべく容器を充満させる程度のサンプル量を確保したが、標本が小型でその量に満たない場合は、最低限5ml程度の容量を満たしたうえで測定に用いた。キノコ類においては通常、柄よりもカサ部分でより高濃度のセシウムが検出されることが知られているが、今回はとくに制約が無い限り、子実体の全体を測定に用いた。測定時間は全て2000秒で行った。

4-6-3 結果と考察

測定に用いた23種、106点の標本のうち、最も古いものは1977年に採集されたものである。また、今回の研究では福島第一原発事故前後の標本から測定することが重要であったので、ここ2年以内の標本は用いず、一番新しい標本でも2011年11月に採集されたものである。

全サンプル中、Cs-137が検出されなかったものは、10種19標本のみであった。ただしこのうち11標本についてはCs-134のみが検出されており、通常では考えにくいパターンであるため、コンタミの可能性も含め何らかのエラーであると考えられる。残りの8標本（6種）はほぼ全て2011年3月以前に採集されたものであったが、唯一クロハツ *Russula nigricans* の1標本は、2011年7月に採集されたものであった。本標本からはCs-134も未検出であり、福島第一原発事故の影響が及ぶ前の試料であると言えよう。ただし、本種は必ずしも放射性セシウムを吸収しにくい種というわけではなさそうである。なぜなら1990年採集の標本からは2,000 Bq/kgを超えるCs-137が検出されており、これはほぼ間違いなくチェルノブイリ事故（1986年）の影響と考えられるからである。よってクロハツについてはこれから数年後に、Cs-137の数値が上昇することが予想される。

ほとんどの標本においては、2011年3月以降の値が急激に上昇する傾向が見て取れるが、いくつかの種については、明確な違いが見られなかった。例えばガンタケ *Amanita rubescens* のCs-137濃度を見ると、2000年に採集された標本で100 Bq/kg前後の値が検出されているが、2011年9月に採集された標本の値は31 Bq/kgに過ぎない。また、ウスタケ *Gomphus floccosus* は、2011年10月に採集された標本はCs-137濃度が1293 Bq/kgであるが、2009年採集の標本でも739 Bq/kgを示している。この2種ともにECM菌であるので、セシウムの沈着から体内への吸収が起こるまでにタイムラグがある可能性がある。今後採集される標本から、Cs-137濃度がさらに上昇するのか、モニタリングする必要があるであろう。

上記の通り、ほとんどの種において、2011年3月以降のCs-137濃度が上昇する傾向にあるが、2011年後半までの間に事故前との比較で100倍以上の上昇を示したのがシラタマタケ *Kobayasia nipponica* である。事故前の2008年採集標本は24 Bq/kgであったのに対し、2011年採集標本では6,000 Bq/kg以上の値を示した。本種は特に成長が速いわけではなく、子実体も長期間発生するものではない。太い根状菌糸束を持ち、土壤中の水分を効率的に吸収していると考えられるが、それとセシウム濃度の上昇が関連しているかどうかは不明である。

その他注目すべき種としてはムジナタケ *Psathyrella velutina* が挙げられる。今回用いたサンプルで Cs-137 濃度の最高値を記録したのは、2011 年のサンプルではなく、1986 年 10 月に採集された標本であった。これは明らかにチェルノブイリ事故の影響だと推定されるが、事故の数か月後に発生した子実体から高濃度のセシウムが検出されていることは興味深い。福島第一原発事故後のサンプルではこれほど高濃度の値は出ておらず、今後このまま減少する傾向にあるのか、モニタリングする必要があるであろう。

ニガイグチモドキ *Tylophilus neofelleus* も同様に、福島第一原発事故前のサンプルのほうが高い Cs-137 濃度を示す種である。ただしムジナタケのパターンとはやや異なり、同じ 1991 年に採集された標本でも、ひとつは 507Bq/kg を示し、もうひとつからは検出されていない。また、2011 年採集標本でも 112~304Bq/kg と幅がある。これは個体による差なのか、それとも微環境の違いによる差なのかは、今後検討する必要がある。

以上から明らかに言えることは、博物館所蔵の標本から、過去のセシウムの動向を把握することは十分に可能である、ということである。測定に用いるサンプル量を小さくすることで、標本の価値を損なうことなく研究を行うことができる。ただし、サンプル量が小さいことで、測定値の誤差も大きくなることが予想され、それが今回測定された、いくつかの奇妙な値の原因である可能性もある。サンプル量による測定誤差、ゲルマニウム半導体検出器による値との相関、キノコ子実体の各部位における濃度の違い、などは今後詳細に検証していく必要がある。

表 4-1 福島第一原発事故前後のキノコ類標本における放射性セシウム濃度

ID	voucher#	Genus	species	生態的特徴	採集年月日	Cs-134	Cs-137
1-1	TNSF-1801	Amanita	hemibapha	ECM	2000.9.21	0	0
1-2	TNSF-1291	Amanita	hemibapha	ECM	2000.11.30	35.25560783	0
1-3	TNSF-39656	Amanita	hemibapha	ECM	2011.6.22	127.2256853	300.8452858
1-4	TNSF-42046	Amanita	hemibapha	ECM	2011.9.3	1410.892645	4276.072544
1-5	TNSF-42118	Amanita	hemibapha	ECM	2011.9.22	14.25405647	250.396259
2-1	TNSF-30193	Amanita	rubescens	ECM	1982.7.18	97.37629086	0
2-2	TNSF-1312	Amanita	rubescens	ECM	2000.9.	0	169.1271768
2-3	TNSF-1292	Amanita	rubescens	ECM	2000.11.30	0	93.01608552
2-4	TNSF-41173	Amanita	rubescens	ECM	2011.7.7	72.80725872	271.1311285
2-5	TNSF-42050	Amanita	rubescens	ECM	2011.9.3	0	31.79394259
3-1	TNSF-171870	Auricularia	polytricha	LIG	1982.6.	0	53.74615584
3-2	TNSF-38817	Auricularia	polytricha	LIG	2011.4.29	103.374821	1519.193947
3-3	TNSF-39642	Auricularia	polytricha	LIG	2011.6.19	181.8668532	231.1493648
4-1	TNSF-6343	Boletus	violaceofuscus	ECM	2000.9.20	56.60589615	22.06588993
4-2	TNSF-1225	Boletus	violaceofuscus	ECM	2000.9.21	0	57.45802716
4-3	TNSF-39676	Boletus	violaceofuscus	ECM	2011.6.26	0	153.4405882
4-4	TNSF-41353	Boletus	violaceofuscus	ECM	2011.8.11	0	105.0085586
5-1	TNSF-27660	Trametes	versicolor	LIG	1986.10.10	0	48.49286058
5-2	TNSF-34982	Trametes	versicolor	LIG	1991.6.5	1.867591003	48.69868317

5-3	TNSF-41264	Trametes	versicolor	LIG	2011.7.18	671.2127838	2429.539832
5-4	TNSF-42152	Trametes	versicolor	LIG	2011.10.2	104.8111464	816.6776199
6-1	TNSF-3511	Daedaleopsis	tricolor	LIG	1987.10.10	0	288.5902736
6-2	TNSF-182757	Daedaleopsis	tricolor	LIG	1997.9.30	6.25104772	83.50806086
6-3	TNSF-11469	Daedaleopsis	tricolor	LIG	2005.2.	52.21771309	11.05252787
7-1	TNSF-33520	Gomphus	floccosus	ECM	2009.9.23	0	739.284456
7-2	TNSF-42149	Gomphus	floccosus	ECM	2011.10.2	238.8222375	1293.995345
8-1	TNSF-25244	Helvella	acetabula	ECM	2006.5.	0	50.9196039
8-2	TNSF-38822	Helvella	acetabula	ECM	2011.4.29	262.2216121	857.6432057
8-3	TNSF-38837	Helvella	acetabula	ECM	2011.5.8	118.4961686	254.9616772
9-1	TNSF-30171	Hypholoma	fasciculare	LIG	1983.8.14	0	22.98636747
9-2	TNSF-25907	Hypholoma	fasciculare	LIG	1985.10.10	10.81091498	0
9-3	TNSF-6180	Hypholoma	fasciculare	LIG	1986.10.10	0	52.63078851
9-4	TNSF-35177	Hypholoma	fasciculare	LIG	1990.10.17	46.03234377	162.0065628
9-5	TNSF-11895	Hypholoma	fasciculare	LIG	2005.10.16	39.97549013	62.02754004
9-6	TNSF-32889	Hypholoma	fasciculare	LIG	2008.11.6	0	154.7652762
9-7	TNSF-42099	Hypholoma	fasciculare	LIG	2011.9.16	111.4211778	556.2516634
9-8	TNSF-42274	Hypholoma	fasciculare	LIG	2011.10.27	86.53529686	1005.530766
9-9	TNSF-42290	Hypholoma	fasciculare	LIG	2011.11.4	620.6123107	1516.550382
10-1	TNSF-32887	Kobayasia	nipponica	SAP	2008.10.31	0	24.63216095
10-2	TNSF-41976	Kobayasia	nipponica	SAP	2011.8.31	1737.165771	5261.782535
10-3	TNSF-42138	Kobayasia	nipponica	SAP	2011.10.2	1627.763522	5040.776367
11-1	TNSF-35182	Laccaria	vinaceoavellanea	ECM	1990.10.17	0	35.85626494
11-2	TNSF-41159	Laccaria	vinaceoavellanea	ECM	2011.7.6	239.295926	625.7500635
12-1	TNSF-174727	Lepista	nuda	SAP	1997.12.7	0	95.19957766
12-2	TNSF-42261	Lepista	nuda	SAP	2011.10.27	287.5324404	900.524762
13-1	TNSF-182672	Macrolepiota		SAP	1997.9.24	0	3.59350203
13-2	TNSF-41303	Macrolepiota		SAP	2011.8.1	0	79.97069226
13-3	TNSF-42054	Macrolepiota		SAP	2011.9.8	0	18.52166831
14-1	TNSF-34959	Marasmius	maximus	SAP	1991.6.5	0	0
14-2	TNSF-182754	Marasmius	maximus	SAP	1997.9.30	0	164.9011431
14-3	TNSF-1259	Marasmius	maximus	SAP	2000.9.25	0	44.63205588
14-4	TNSF-17109	Marasmius	maximus	SAP	2004.6.	0	10.37727383
14-5	TNSF-41282	Marasmius	maximus	SAP	2011.7.29	0	1752.69813
15-1	TNSF-14715	Morchella	cf. esculenta	ECM	1982.6.	21.07737038	173.7831809
15-2	TNSF-26472	Morchella	cf. esculenta	ECM	1998.4.30	162.4464976	0
15-3	TNSF-100791	Morchella	cf. esculenta	ECM	1999.4.1	119.6838588	0

15-4	TNSF-16457	Morchella	cf. esculenta	ECM	2005.4.18	0	0
15-5	TNSF-38863	Morchella	cf. esculenta	ECM	2011.4.26	0	156.2735132
15-6	TNSF-38813	Morchella	cf. esculenta	ECM	2011.4.29	242.9117603	336.7135261
16-1	TNSF-51086	Pleurotus	ostreatus	LIG	1977.10.7	9.75669845	60.56622878
16-2	TNSF-29356	Pleurotus	ostreatus	LIG	1982.5.20	0	36.74644752
16-3	TNSF-29357	Pleurotus	ostreatus	LIG	1982.6.4	0	74.77336688
16-4	TNSF-6151	Pleurotus	ostreatus	LIG	1986.10.10	17.28737091	82.7653807
16-5	TNSF-42156	Pleurotus	ostreatus	LIG	2011.10.2	0	405.9341585
17-1	TNSF-51089	Psathyrella	velutina	SAP	1977.10.7	102.9526427	0
17-2	TNSF-25982	Psathyrella	velutina	SAP	1982.6.	123.1819892	0
17-3	TNSF-6192	Psathyrella	velutina	SAP	1986.10.10	60.62124194	1101.41274
17-4	TNSF-12037	Psathyrella	velutina	SAP	2006.6.5	0	60.63582294
17-5	TNSF-39611	Psathyrella	velutina	SAP	2011.6.19	41.72845583	506.1859071
17-6	TNSF-42132	Psathyrella	velutina	SAP	2011.10.2	155.6630298	177.0748111
18-1	TNSF-182975	Russula	delica	ECM	1997.10.6	75.83813492	4.43393952
18-2	TNSF-1183	Russula	delica	ECM	1999.10.22	0	601.8447803
18-3	TNSF-6340	Russula	delica	ECM	2000.10.18	1.159518483	0
18-4	TNSF-41233	Russula	delica	ECM	2011.7.13	72.7776563	576.8778375
18-5	TNSF-41969	Russula	delica	ECM	2011.8.18	119.6551666	360.0253967
19-1	TNSF-25806	Russula	nigricans	ECM	1982.6.	0	45.05720292
19-2	TNSF-6060	Russula	nigricans	ECM	1987.10.10	211.6040889	193.9487812
19-3	TNSF-35187	Russula	nigricans	ECM	1990.10.17	0	2161.275762
19-4	TNSF-182744	Russula	nigricans	ECM	1997.9.29	0	0
19-5	TNSF-1134	Russula	nigricans	ECM	2000.10.5	0	30.11533579
19-6	TNSF-41243	Russula	nigricans	ECM	2011.7.13	0	0
19-7	TNSF-42283	Russula	nigricans	ECM	2011.10.27	68.52087227	0
20-1	TNSF-29259	Schizophyllum	commune	LIG	1982.6.1	0	35.89038553
20-2	TNSF-29381	Schizophyllum	commune	LIG	1982.6.7	0	178.3466495
20-3	TNSF-14700	Schizophyllum	commune	LIG	1982.6.	0	3591.840942
20-4	TNSF-25845	Schizophyllum	commune	LIG	1982.6.	0	78.08644435
20-5	TNSF-39409	Schizophyllum	commune	LIG	2011.5.23	1256.399507	3505.077529
20-6	TNSF-39610	Schizophyllum	commune	LIG	2011.6.19	1047.701952	2683.566764
20-7	TNSF-39668	Schizophyllum	commune	LIG	2011.6.25	286.1697193	1054.780713
20-8	TNSF-41333	Schizophyllum	commune	LIG	2011.8.1	277.2456786	940.3875873
21-1	TNSF-28770	Strobilomyces	nigricans	ECM	1982.6.	0	0
21-2	TNSF-34984	Strobilomyces	nigricans	ECM	1991.7.12	0	68.11981429
21-3	TNSF-41945	Strobilomyces	nigricans	ECM	2011.8.18	157.9113565	735.5851039

22-1	TNSF-29400	Stropharia	rugosoannulata	SAP	1982.5.1	0	268.1079789
22-2	TNSF-29399	Stropharia	rugosoannulata	SAP	1982.6.16	112.5101583	315.1597397
22-3	TNSF-181984	Stropharia	rugosoannulata	SAP	1996.10.29	52.06545983	82.37050516
22-4	TNSF-38802	Stropharia	rugosoannulata	SAP	2011.4.29	40.28168177	438.4873477
22-5	TNSF-39418	Stropharia	rugosoannulata	SAP	2011.5.23	1932.458578	5784.037095
23-1	TNSF-34987	Tylophilus	neofelleus	ECM	1991.7.1	0	0
23-2	TNSF-34983	Tylophilus	neofelleus	ECM	1991.7.3	82.15036068	507.2504292
23-3	TNSF-182690	Tylophilus	neofelleus	ECM	1997.9.29	163.07823	0
23-4	TNSF-100215	Tylophilus	neofelleus	ECM	1998.7.30	49.98684875	0
23-5	TNSF-1383	Tylophilus	neofelleus	ECM	2000.10.16	0	0
23-6	TNSF-39658	Tylophilus	neofelleus	ECM	2011.6.22	21.73826284	112.4720816
23-7	TNSF-41193	Tylophilus	neofelleus	ECM	2011.7.7	60.35883601	384.7448437
23-8	TNSF-42064	Tylophilus	neofelleus	ECM	2011.9.8	0	149.6874865

引用文献 (なお、web は 2014 年 11 月 10 日にチェックした。)

1. 黒川道. (1964)国立科学博物館, 東京. 39pp.
2. つくば市. (2013) 市内全域の汚染状況調査. <<http://www.city.tsukuba.ibaraki.jp/14210/14224/011168.html>> (2013 年 10 月 30 日閲覧).
3. Asahina, Y. (1936-1940) 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.
4. Bretten, S. et al. (1992) Analyst 117: 501-503.
5. Culbertson, C. F. and Johnson, A. (1982) J. Chromatogr. 238: 483-487.
6. Feige, G. B. et al. (1990) In: H. M. Jahns (ed.): Contributions to Lichenology in Honour of A. Henssen. Bibliotheca Lichenologica. 38: 63-77.
7. Heinrich, G. and Remele, K. (1996) Gesellschaft 53, 243-250.
8. Iurian, A. R. et al. (2011) Romanian Journal of Physcis 56: 983-992.
9. Kurokawa, S. and Kashiwadani, H. (2006) - National Science Museum Monographs No. 33, National Science Museum, Tokyo. 157 pp.
10. Muramatsu Y. et al. (1991) Sci. Total Environ. 105: 29-39.
11. Nimis, P. L. (1996) Studia Geobotanica 15: 3-49.
12. Ohmura, Y. et al. (2013) Lichenologist 45: 685-689.
13. Palmer, H. E. et al. (1963) Science 142: 64-66.
14. Puhakainen, M. et al. (2007) Boreal Environment Research 12: 29-35.
15. Salo, A. et al. (1964) - Nature 201: 1177-1179.
16. Sugiyama H. et al. (1994) J. Food Hyg. Soc. Japan 35: 13-22.
17. Topcuoglu, S. et al. (1995) Journal of Environmental Radioactivity 29, 157-162.
18. Tuominen, Y. et al. (1973) In: V. Ahmadjian & M. E. Hale (eds.): The Lichens. Academic Press, New York and London, pp. 185-223.