



福島の水水域における
放射能汚染と魚類に及ぼす影響

ギンブナに対する低線 量放射性セシウム長期 曝露の影響についての 組織学的検証

平井 俊朗 小川 智史
柴田 安司 阪本 憲司
原 将樹 中嶋 正道

**Histological analysis for the long-term effects
of low dose radioactive cesium (^{137}Cs) in
triploid silver crucian carp, *Carassius auratus
langsdorfii*.**

**Toshiaki Hirai • Satoshi Ogawa • Yasushi
Shibata • Kenji Sakamoto • Masaki Hara •
Masamichi Nakajima**

ひらい としあき : 岩手大学農学部 /
同三陸水産研究センター
おがわ さとし : 帝京科学大学生命環境学部
しばた やすし : 帝京科学大学生命環境学部
さかもと けんじ : 福山大学生命工学部
はら まさき : 東北大学大学院農学研究科
なかじま まさみち : 東北大学大学院農学研究科

福島第一原発事故による野生淡水魚への影響調査が実施され、被爆の影響と疑われる所見が報告されている。しかし、野外調査によって観察された異常についての実験的検証の例は少ない。そこで、クローンギンブナを用いて、放射性セシウムによる長期低線量被爆試験を行ない、各臓器への影響を組織学的に検証した。

1. はじめに

福島第一原発事故により、多くの放射性物質が広い範囲の海洋や山林などに放出され、それらは地元住民の生活のみならず、被災地域の豊かな自然環境にも多大な影響を与えた。水産業が被災地域の基幹産業の一つであることから、水産生物の汚染状況については水産庁を中核とした関係機関による継続的なモニタリングが続けられてきた^[1]。事故から年月を経るにつれて、海域における放射能汚染が確実に減少していることが明らかにされる一方で、陸域では人間の居住地域から離れた山間地を中心として、いまだにホットスポットと呼ばれる高濃度汚染地域が残されている。原発事故によって放出された放射性物質の中には安定同位体に変化するまでに長い時間を要する物があり、除染作業が及ばない山間地では、今後も一定レベルの放射線が放出され続けると推察される。河川や湖沼といった陸水域は山林に降下した放射性物質が濃縮されるところであり、このような環境に生息する淡水魚は放射性物質の影響を受けやすいと考えられる。被災地域における広域汚染モニタリングは、環境中あるいは生物個体全体、ならびに筋肉を中心とした可食部の放射線量測定がほとんどであり、その地域に生息する生物個体内における影響についての情報は不足している。そこでわれわれを含めた複数のチームにより、福島県内の河川に生息する魚類について放射性物質による汚染状況と生体内における影響について様々な角度から調査が実施された。その結果、放射能汚染との関連性が疑われるいくつかの所見が得られた(詳細は本特集の他稿を参照されたい)。しかし、環境調査によって観察された所見と放射性物質

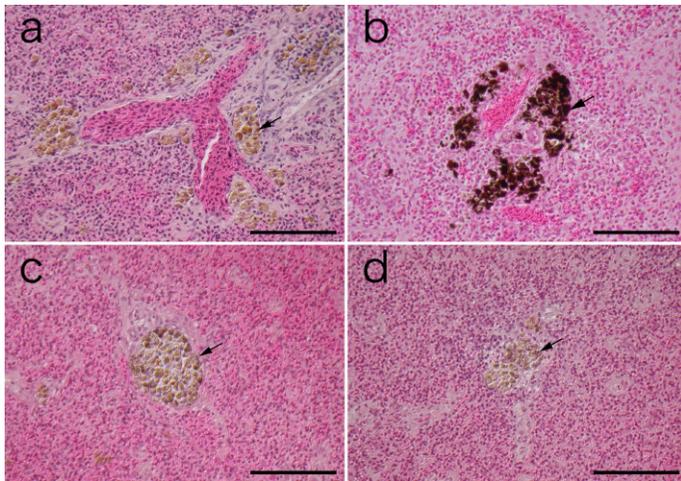


図1 脾臓で観察された沈着物。a: ギンブナ脾臓 (対照区; 処理開始 11 ヶ月後), b: サクラマス脾臓 (阿武隈川捕獲個体), c: ギンブナ脾臓 (対照区; 処理開始 28 ヶ月後), d: ギンブナ脾臓 (10,000Bq区; 処理開始 28 ヶ月後), 矢印は沈着物, バーは 100 μ mを示す。ギンブナにおける黄褐色沈着物の大きさ, 出現頻度は, 曝露区と対照区の間で差は見られなかった。

汚染との関連性について, 実験的に検証された例はほとんどない。

これまでに魚類を用いた放射性物質の影響評価研究^[2]があるが, これらの多くは致死レベルに近い高線量の放射線を短時間, 外部被曝させる実験であり, 低線量を長時間, 内部被曝させた場合の影響評価, 特に組織学的検証は行われていなかった。ギンブナ (*Carassius auratus langsdorfii*) には, 通常の有性生殖を行う 2 倍体 ($2n = 100$) 集団に加えて, 雌性発生を行う 3 倍体 ($3n = 156$) および 4 倍体 ($4n = 206$) の集団が存在する^[3]。雌性発生集団では, 精子は受精時の卵賦活のみに働き, 精子ゲノムは次世代には受け継がれないため, 母親と同一のゲノムを有するクローン集団となる。したがって, 有性生殖を行う種と比較して集団内の個体差による影響が小さく, 放射線被曝の影響をより直接的に検知できることが期待される。そこでモデル実験として, 3 倍体クローンギンブナを用いて放射性セシウムによる長期低線量被曝試験を行ない, 造血器官 (脾臓, 頭腎) をはじめとする臓器への影響についての組織学的検証を行った。

2. 放射性セシウムの長期低線量被曝による各臓器への影響

3 倍体クローンギンブナ (約 3 月齢) を放射線

管理区域内に設置した 150 L 水槽に各 60 尾収容し, $^{137}\text{CsCl}$ を 100, 1,000, 10,000 Bq/kg となるように含浸させた飼料を 1 日あたり総体重の 1% になるように 3 回に分けて給餌した。対照区は通常飼育室にて通常餌 (CsCl 非添加) を同様に給餌した。投与開始後, 経時的に各区から最大 5 尾ずつサンプリングし, 各臓器 (脾臓, 頭腎, 生殖腺, 眼球, 肝臓) を摘出後, 眼球は組織用迅速固定液スーパーフィックス KY-500 (クラボウ社)^[4], 他はブアン氏液にて固定し, 常法によりパラフィン切片を作製した。以下に各臓器の観察結果の概要を述べる。

(1) 脾臓

魚類は骨髓造血系を欠き, 脾臓は腎臓と並ぶ主要な造血器官であり, 劣化した血球の破壊・除去の役割も担っている。造血障害は放射線障害の一つとして古くから知られていることから, 放射性セシウム曝露の影響を検証した。ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色において, 核形態ならびに細胞質染色性から複数種の細胞の存在が確認されたが, 曝露区と対照区の間で, 各細胞種の染色像に違いは見られなかった (図 1a, c, d)。また, 血球系細胞の細胞診断に汎用されるギムザ染色像とは固定法ならびに染色法が異なっていたため, 観察された細胞像から細胞種を同定することはできなかった。今後, 各血球種に特異的な分子マーカー

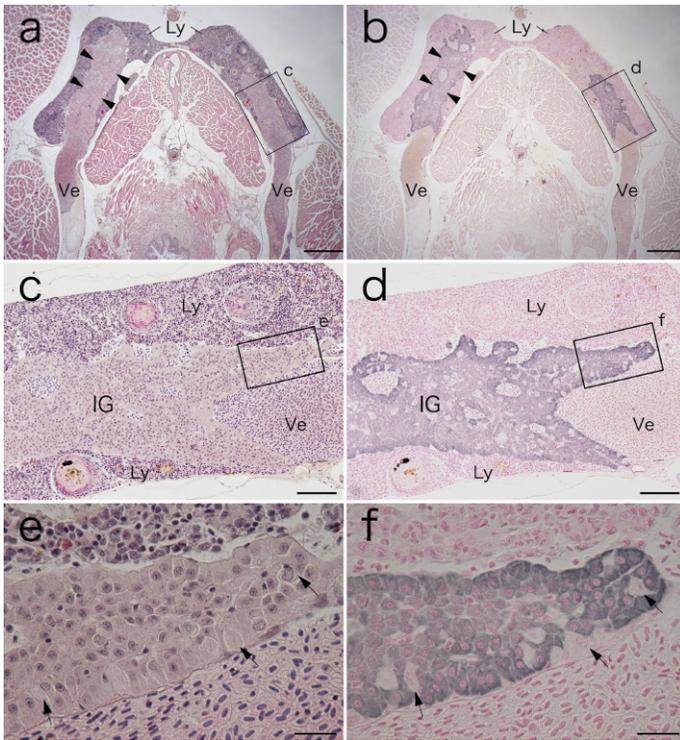


図2 頭腎の組織構造. 孵化後約10ヶ月目(対照区; 処理開始6ヶ月後)の例を示す. 左列は頭部-体腔間の横断面のHE染色像, 右列は近接切片に対する抗 3β -HSD (3β -水酸化ステロイド脱水素酵素)抗体による免疫組織染色像(対比染色としてケルンエヒトロート染色(淡赤色)を施した)である. 免疫染色の陽性反応(ステロイドホルモン産生細胞)は青灰色となっている. 各列上段, 中段ではそれぞれ中段, 下段の拡大像の対応部位を枠で示す. IG: 間腎腺, Ly: リンパ様組織, Ve: 静脈, 矢印: クロム親和細胞 (3β -HSD陰性の間腎腺内の細胞群), 矢じり: 静脈を覆う上皮組織, バーは500 μ m (a,b), 100 μ m (c,d), 25 μ m (e,f)を示す. 実験期間を通して, 曝露区と対照区の間で明確な差は見られなかった.

などを用いて, 血球組成についても調査をする必要がある. 一方, 脾臓中組織中には, 散在する大小の黄褐色沈着物が見受けられたが, 曝露区と対照区に関係なくほぼ全ての個体で認められ, その大きさや出現頻度にも差異は認められなかった. これらの褐変部は脾臓においては通常観察され, 老化した赤血球の崩壊過程で生じるとされるヘモジデリン沈着^[5]と思われた. 一方, 福島県内において野外調査で捕獲されたコイ(本特集の鈴木の報告を参照されたい)^[6]では, 脾臓や腎臓において深い黒色の沈着物が確認されており, われわれが実施したサクラマスの捕獲調査でも同様の所見が観察された(図1b). 鈴木によれば, これはメラノマクロファージセンターと呼ばれる黒色あるいは褐色のマクロファージ集塊とのことであるが, 光学顕微鏡レベルの観察では, 今回ギンブナで観察された褐変部がこれらと同様の細胞性的のものであるかについては確証を得るには至らず, 今後の課題として残された.

(2) 頭腎

硬骨魚類の腎臓は, 体腔背側を縦走する左右一対の臓器である. その頭部側末端部は多くの種で膨大化しており, 頭腎と呼ばれる. 頭腎には腎小体は存在せず, リンパ様組織と間腎腺と呼ばれる副腎に相当する内分泌組織からなっているが, その組織構築は魚種によって多様性があることが知られている^[7]. 放射性セシウム投与の影響解析に先立ち, ギンブナ頭腎の組織構築確認を行った. HE染色(図2a, c, e)では, 明確な二層構造が確認され, 中心部を走行する血管の周囲に比較的大型で染色性の弱い核を有する細胞からなる組織が, 周縁部には比較的小型で染色性の強い核を有する細胞からなる組織が観察され, 後者はリンパ様組織の様相を呈していた. 内部側の組織の同定のために, ステロイドホルモン産生細胞のマーカーとして汎用される 3β -HSD (3β -水酸化ステロイド脱水素酵素)の特異抗体を用いた免疫染色を行ったところ, 明確な陽性反応が得られ, この組織

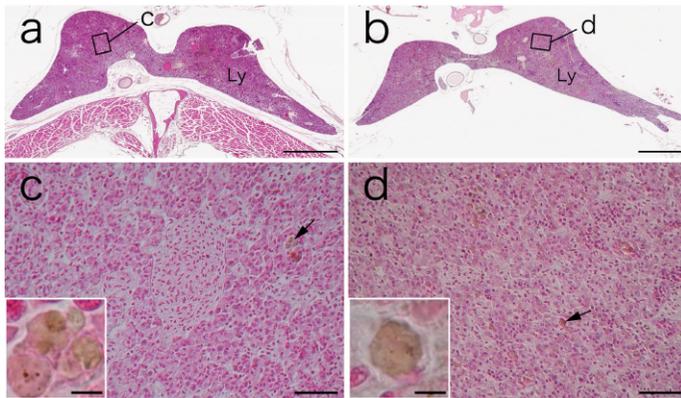


図3 処理開始28ヶ月後における頭腎への影響. 左列は対照区, 右列は曝露区(10.000Bq区)のHE染色像を示す. Ly: リンパ様組織, 矢印: 黄褐色沈着物, 挿入図は矢印が示す部位の拡大像, バーは1mm (a,b), 50µm (c,d), 5µm (挿入図)を示す. 黄褐色沈着物の大きさ, 出現頻度は, 曝露区と対照区の間で差は見られなかった.

が間腎腺であることが証明された(図2b, d, f). 間腎腺内には3β-HSD陰性の細胞が散在し, 副腎髄質に相当するクロム親和細胞であると推察された. 以上のようにギンブナにおいても造血組織(リンパ様組織)と内分泌組織(間腎腺)からなる組織構築が確認された. また, それぞれにおいて核形態ならびに細胞質染色性から複数の細胞種の存在が確認された. これらの知見に基づいて放射性セシウム曝露の影響を検証した(図3). 造血組織内には, 脾臓と同様に黄褐色色素沈着が確認されたが, その大きさや出現頻度は, 対照区との間で差は見られなかった. 造血組織, 内分泌組織ともに, 構成する細胞の形態や組織構造等において曝露との相関性をうかがわせる差異は確認できなかった.

(3) 生殖腺

3倍体ギンブナは減数分裂を行うことなく, 体細胞と同じ染色体構成を持つ非還元卵(3n卵)を形成する. これらの卵は精子核を受け入れることなく, 卵核のゲノムのみで単為発生するため, 母親と遺伝的に同一なクローン全雌集団となることが知られている^[8]. われわれはこの点を利用して, 放射性セシウム長期低線量被曝の次世代への影響を評価しようと考えた. すなわち, 父母由来のゲノムの混合によって発生する通常の魚種と比べて3倍体ギンブナでは卵形成過程で受けた遺伝的影響をより直接的に評価できることが期待された. 今回, 遺伝的解析に先立って生殖腺組織への

影響を調査したところ, 大部分の個体で正常な卵形成(成熟途上期)が確認されたが, 一部の個体では完全な精巢化が確認された(図4, 表1). しかし, これらの雄性化個体は対照区でも確認され, 放射性セシウム曝露との相関性は確認できなかった. ギンブナ養殖において, 種苗中に1割程度の頻度で雄個体が出現し, それらの精子は運動性を有することが報告されている^[9,10]. 本研究でも観察した58個体中4個体で精巢化が観察され, 今回使用した系統についても同様の特性があることがうかがわれた. 通常雌のみからなる倍数性ギンブナにおいても, 雄性ホルモン投与により精巢化が誘導されることが知られている^[11]. また, 近縁種であるキンギョ(*Carassius auratus auratus*)では, 高温依存的に雄の比率が増加することが報告されていることから^[12], 今回の実験においても放射線とは別の何らかの要因によって性ホルモン作用に変化が生じた結果, 一部の個体で性転換が生じたものと推察された.

(4) 眼球

硬骨魚の眼は他の脊椎動物と共通の基本構造を有している. 眼球の外側は前極(もしくは外極)と呼ばれ, その表層部は外側から外層, コラーゲン層, 内層からなる3層構造を有している. 角膜の内側中央にはほぼ球形の水晶体があり, その周縁を虹彩が囲んでいる^[13,14]. 水晶体は薄膜性の水晶体嚢(もしくは水晶体包)で覆われ, その直下に水晶体上皮が位置している. 水晶体嚢に包まれた

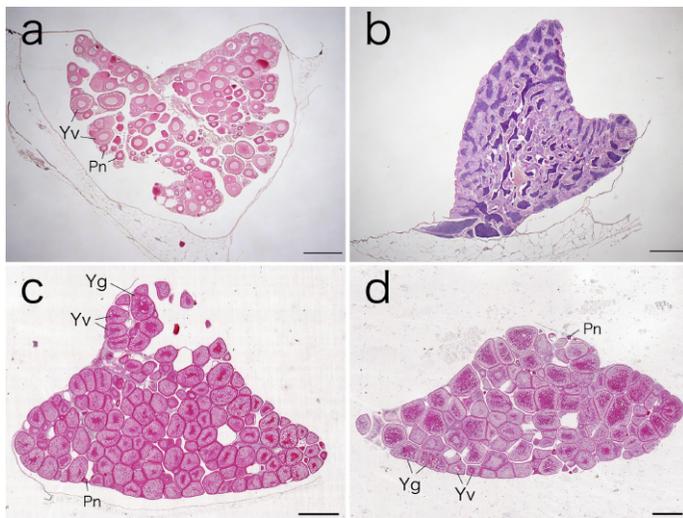


図4 生殖腺への影響. 本研究において得られた生殖腺HE染色像の例を示す. a: 卵巣(対照区; 実験開始時), b: 精巣(対照区; 処理開始11ヶ月後), c: 卵巣(10,000Bq区; 処理開始28ヶ月後), d: 卵巣(10,000Bq区; 処理開始28ヶ月後), Pn: 周辺二期卵母細胞, Yg: 卵黄球期卵母細胞, Yv: 卵黄胞期卵母細胞, バーは500 μ m (a, b), 1mm (c, d)を示す. 一部の個体で精巣化が確認されたが, 放射性セシウム曝露との因果関係は確認できなかった.

月齢	¹³⁷ Cs曝露期間(月)	投与量(Bq/kg餌)	生殖腺		
			卵巣(尾)	精巣(尾)	卵巣発達
3	投与開始時		5	0	2.0
6	2	0	5	0	2.0
		10,000	5	0	3.0
		1,000	5	0	2.0
		100	4	1	2.0
10	6	0	5	0	2.2
		10,000	4	1	2.5
15	11	0	3	2	3.0
		10,000	5	0	2.4
31	28	0	5	0	2.6
		10,000	3	0	2.7
			5	0	2.6

表1 放射性セシウム曝露のギンブナ生殖腺への影響. 各実験区について経時的に生殖腺を採取, 組織観察を行った. 3倍体クローンギンブナは全雌であるが, 一部の個体で精巣化(切片全体で精子を確認)が確認された. 雌個体の卵巣発達段階は, 組織切片中で最も発達した卵母細胞の発達段階(1: 周辺二期, 2: 卵黄胞期, 3: 卵黄球期に分類)を指標として, その発達段階番号(1, 2, 3)で表した. 各実験区における, 雌雄個体の出現数および卵巣発達段階番号の平均値(精巣化個体は除外)を示す.

水晶体質は水晶体線維で構成され, この線維は水晶体上皮が変化したもので扁平な六角柱の形状になっている. 今回, 組織切片作製法を工夫することにより, 組織構造を維持したまま角膜, 水晶体を含む前極側半球を正中断切片として観察することができた(図5a). ヒトをはじめとする哺乳類では, 放射線障害の一つとして放射性白内障(水晶体泥濁)が知られており, このことは眼球中で水晶体が最も放射線感受性が高いことを意味している. 魚類においては放射線障害による白内障の事例は報告されていないが, 養殖現場における稚魚・幼魚の発達不良による白内障の症例が報告されている[15,16]. それらの病理組織観察結果によると, 水晶体の白濁に加えて, 虹彩支質血管の

血流障害, 硝子体変性, 水晶体上皮増生と変性細胞出現, 水晶体線維層膨潤および融解変性, 水晶体被膜変形などの所見が報告されている. 本研究ではこれらの先行研究に基づいて水晶体の角膜側表層部を中心として組織観察を行った(図5b, c). しかし, 上記のような病変は確認できず, 構成する細胞の形態や組織構造等において曝露との相関性をうかがわせる差異は確認できなかった.

(5) 肝臓

肝臓は脊椎動物体内における物質代謝の中心であり, 消化管から吸収された物質が血流によって運搬される臓器である. ギンブナなどコイ科魚類では, 肝臓は消化管の周囲に密着する不定形の臓器であり, 脾臓組織が複雑に嵌入(かんにゅう)し

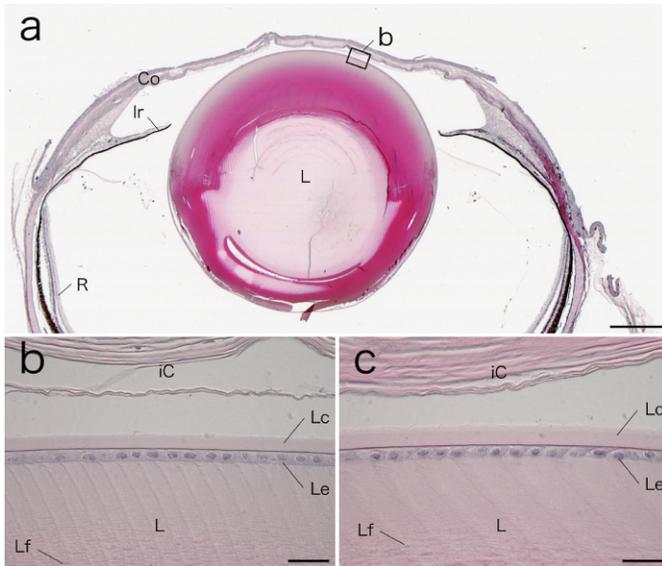


図5 水晶体への影響. 処理開始28ヶ月後の眼球を角膜に対して水平断し、水晶体側半球の正中断切片(HE染色)を作製した. 全体像(a)中の枠で示した領域について水晶体の組織構造を検証した. a, b: 対照区, c: 10,000Bq区, a: 水晶体側半球の全体像, b, c: 水晶体角膜側表層部の拡大像. Co: 角膜, iC: 角膜内層, Ir: 虹彩, L: 水晶体, Lc: 水晶体嚢, Le: 水晶体上皮細胞, Lf: 水晶体線維細胞, R: 網膜, バーは500 μ m (a), 25 μ m (b, c)を示す. 対照区と曝露区の間で明確な差異は見られなかった.

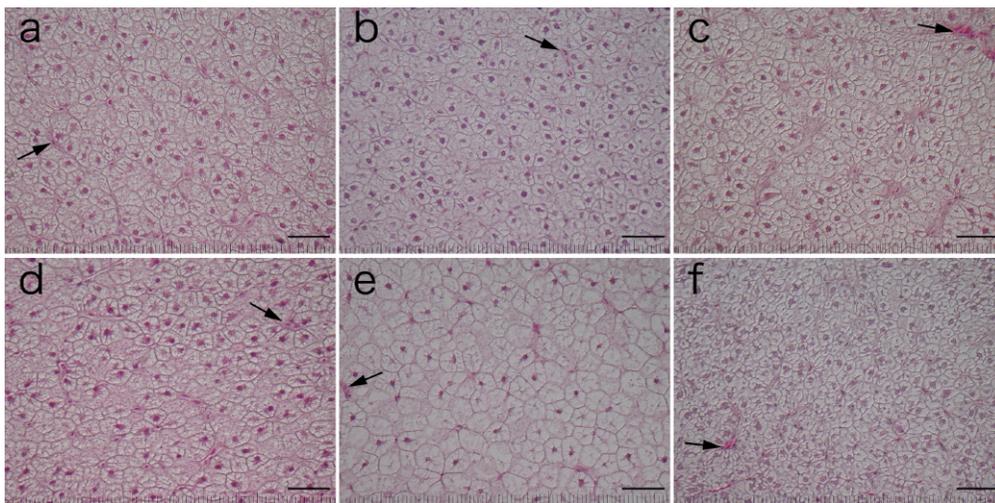


図6 肝細胞への影響. 上段に対照区, 下段10,000Bq区のHE染色像を示す. a, d: 処理開始6ヶ月後, b, e: 処理開始11ヶ月後, c, f: 処理開始28ヶ月後, 矢印: 血管, バーは50 μ mを示す.

ていることから肝臓と呼ばれることもある. 本研究では, 放射性セシウムを餌に含浸させて投与したこともあり, 組織学的解析の対象として加えることにした. 肝細胞の細胞質は, 蓄積された脂質などのためHE染色により染色されにくい. また, 哺乳類などは異なり組織に明確な小葉構造は見られなかった. 曝露区の処理開始11ヶ月後

では, 対照区ならびに曝露区他時期と明らかに異なる印象の組織像が得られ, 肝細胞の肥大による密度低下であると思われた(図6). そこで切片上の単位面積あたりの核数により細胞密度を算出したところ, 同時期に観察した曝露区2区(10,000 Bq区, 1,000 Bq区)において有意に細胞密度の低下傾向が確認された(図7). 肝細胞密度低下

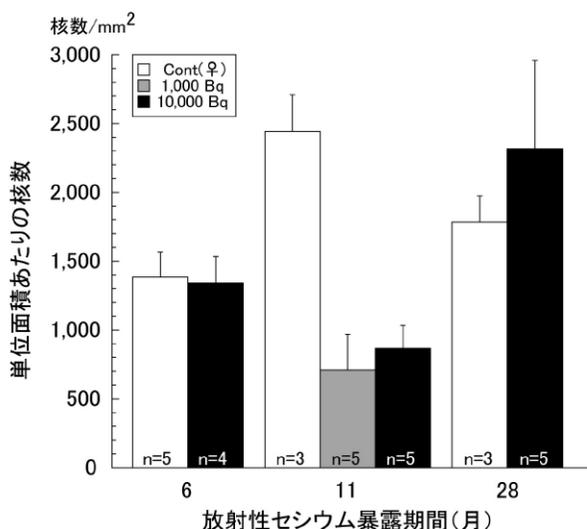


図7 肝細胞密度への影響. 対照区(白)と10,000Bq区(黒), 1,000Bq区(グレー)について単位面積あたりに含まれる肝細胞核数を求め、細胞密度の指標とした。太線は平均値、ヒゲ線は標準偏差を示す。雌雄差を考慮して、雄化(精巣化)の結果を除外して算出した。処理開始11ヶ月後において10,000Bq区、1,000Bq区で有意に細胞密度の低下(肝細胞の肥大化)が観察された。

(細胞肥大化)の原因については不明であるが、処理開始28ヶ月後には対照区と同等に復帰していることから考えて、放射性セシウム曝露の影響とは結論できなかった。肝細胞の大きさは、個体の栄養状態などの体内環境によって変動することが知られている。また、魚類のような卵生動物では、卵黄の主成分となるピテロジェニンを肝臓で合成することから、生殖周期に伴って雌では肝細胞の大きさが変動することも知られている^[17]。したがって、今回、曝露区で観察された肝細胞の肥大化は各区における成熟状態を反映している可能性がある。

3. おわりに

今回、福島県での野外調査(サクラマスやコイなど)において観察された組織学的異常所見の実験的検証を目指して、2年余におよぶ低線量放射性セシウム曝露実験を行ったが、放射性セシウム曝露による影響を確認することはできなかった。セシウムは生体内ではカリウムに類似した挙動を示し、イオン態として細胞内に多く存在すると考えられている。淡水真骨魚では、環境水からイオンを積極的に取り込み、一方で腎臓から大量の尿として水を排出することで、体内のイオン量(浸透圧)を維持している。渡邊と金子(2015)は、淡水

真骨魚の場合、カリウムイオンが環境水に比べて体内では約1,400倍存在することから、放射性セシウムについても同様の傾向となることを想定し、イオン態セシウムが環境水中に放出された場合、その影響は淡水中でより大きくなると予測している^[18]。一方で、環境中に放出された放射性セシウムの多くが、イオン態ではなく、土壌などに吸着した状態か、生体内に取り込まれた状態で検出されていることに着目し、消化器系を経由した放射性セシウムの可能性についても言及している。その中で胃酸分泌においてカリウムイオンが吸収されることを取り上げ、餌に含まれるセシウムも同様にイオン化、吸収される可能性を示唆した。そのため、ギンブナを含むコイ科など胃を持たない魚類ではこの作用は欠如しており、腸管(消化管)では餌由来のイオンのみが吸収されるとしている。今回、実験施設上の制約などから、ギンブナにおける放射性セシウムの体内動態については調査することができなかったが、ギンブナでは餌からの放射性セシウムの吸収効率が他種と比べて低いかもしれない。また、今回の実験における投与量(最大10,000Bq/kg飼料)の設定が、野外調査個体の汚染量に相当する物であったかについても検証する必要がある。

謝辞：3 β -HSD（3 β -水酸化ステロイド脱水素酵素）特異抗体をご提供いただいた北海道大学大学院水産科学研究院、足立伸次博士、井尻成保博士に深謝いたします。

参考文献

- [1] 国立研究開発法人水産総合研究センター編 (2016) 福島第一原発事故による海と魚の放射能汚染, 成山堂書店, 東京.
- [2] 江上信雄 (2013) 生きものと放射線, UPバイオロジー, 東京大学出版会, 東京.
- [3] 小林弘 (1984) 倍数性ギンブナの日本および日本周辺地域の分布とその起源について. 海洋科学, 17, 75-81.
- [4] 山本直樹 (2008) 水晶体上皮における増殖領域と組織幹細胞の同定 -新しい固定液を用いた良好な組織切片による解析-. 顕微鏡, 44 (4), 286-288.
- [5] 隆島史夫 (1982) 脾臓. 日比谷京 (編), 魚類組織図説 正常組織と病理組織, 講談社, 東京, pp. 64-65.
- [6] 鈴木譲 (2018) 福島の溜池に生息するコイの健康状態. 月刊海洋, 50 (1), 30-38.
- [7] 小林牧人, 金子豊二, 会田勝美 (2002) 間腎腺とクロム親和細胞群. 会田勝美 (編), 魚類生理学の基礎, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 146-149.
- [8] 間田康史, 海野徹也, 荒井克俊 (2001) 皇居上道灌漑における三倍体および四倍体ギンブナ *Carassius langsdorfii* の雌性発生生殖とクローン性の証拠. 日水誌, 67 (2), 217-221.
- [9] 佐藤敦彦, 星野勝弘, 松井資元, 松岡栄一 (2000) ふるさとの魚保護増殖試験 ギンブナの種苗生産. 群馬水試研報, (6), 41-44.
- [10] 佐藤敦彦, 星野勝弘, 松岡栄一 (2001) ふるさとの魚保護増殖試験 ギンブナの種苗生産-II. 群馬水試研報, (7), 31-34.
- [11] 野田正彦, 田下聰, 福田達也, 梶島孝雄 (1984) 倍数性ギンブナ雌の雄性ホルモンによる性の転換倍数性ギンブナ雌の雄性ホルモンによる性の転換. 信州大学理学部紀要, 19 (1), 89-98.
- [12] Goto-Kazeto, R., Abe, Y., Masai, K., Yamaha, E., Adachi, S. and Yamauchi, K. (2006) Temperature-dependent sex differentiation in goldfish : establishing the temperature-sensitive period and effect of constant and fluctuating water temperatures. Aquaculture, 254 (1), 617-624.
- [13] 横手元義 (1982) 眼. 日比谷京 (編), 魚類組織図説 正常組織と病理組織, 講談社, 東京, pp. 42-47.
- [14] 植松一眞, 神原淳 (2002) 視覚. 会田勝美 (編), 魚類生理学の基礎, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 75-83.
- [15] 松里寿彦, 上松和夫, 田代文男 (1975) 養殖アマゴの白内障に関する研究-I 病魚の発生状況および症状について. 魚病研究, 10 (1), 10-16.
- [16] 松里寿彦, 金沢庸一 (1975) 養殖アマゴ *Oncorhynchus rhodurus f. macrostomus* (GÜNTER) の白内障-II 眼球の病理組織所見. 南西水研報, 8, 113-124.
- [17] Ishii, K. and Yamamoto, K. (1970) Sexual differences of the liver cells in the goldfish, *Carassius auratus L.*. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ., 21 (3), 161-167.
- [18] 渡邊壮一, 金子豊二 (2015) 水生動物における放射性物質の取り込みと排出. 黒倉寿 (編), 水圏の放射能汚染 福島の水産業復興をめざして, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 54-80. □