

福島原子力発電所事故のヤマトシジミへの生物学的影響

Hiyama A, Nohara C, Kinjo S, Taira W, Gima S, Tanahara A, Otaki JM. (2012)

The biological impacts of the Fukushima nuclear accident on the pale grass blue butterfly. *Scientific Reports* 2: 570. DOI: 10.1038/srep00570

Published on 9 August 2012

要旨

福島第一原子力発電所の崩壊は環境への放射性物質の大規模な放出を引き起こした。この事故の動物への生物学的影響を評価する迅速で信頼に足る実験系は現在のところ報告されていない。我々はここに、この事故が日本で普通に見られる鱗翅目シジミチョウ科ヤマトシジミへの生理的・遺伝的損傷の原因となっていることを示した。第一化の成虫を福島地域で2011年5月に採集したところ、そのうちいくつかは比較的軽度の異常を示した。第一化の雌から産まれたF1には親世代より高い異常が観察された。この異常は次世代F2に遺伝した。2011年9月に採集した成虫の蝶には5月に採集されたものに比べ、より過酷な異常が観察された。同様の異常は、非汚染地域の個体において、外部および内部の低線量被曝により、実験的に再現された。我々は、福島原子力発電所由来の人工放射性核種がこの生物種に生理的・遺伝的損傷を引き起こしたと結論する。

諸言

大量の放射性物質が、福島第一原子力発電所から、東日本大震災により環境中へ放出された[1-6]。しかし、厳密に何が起こったのか、そして、今なお何が進行しているのかについての正確な情報は、これから立証される場所である[7,8]。この情報の不足は、生体への生物学的影響が、最終的には生態系の長期的破壊を生み、慢性病を引き起こし得るのではないかという深刻な懸念を高めている。福島第一原発由来の人工放射性核種の生物学的影響についての迅速で信頼に足る評価は乏しく、現在まで、わずかの研究が行われているに過ぎない[9,10]。チェルノブイリ事故の場合には、動物における種の構成の変化と表現型の異常[11-17]、人間における甲状腺とリンパの癌の発生増加[18]が報告されている。同様に、日本の広島・長崎における原爆生存者についても、癌発生の増加が報告されている[19]。しかし、高線量外部被曝による動物への生理学的損傷については比較的綿密な記録があるにもかかわらず、人間も含めた動物への低線量被曝の影響については未だ議論の余地がある[20-22]。さらに、もっとも大きな懸念の一つは、被曝した個体の子孫により、被曝の不利

な影響が受け継がれる可能性である。しかし、燕において生殖細胞損傷が示されている[23]ものの、放射線被曝した親の生殖細胞における、子孫によって受け継がれるような遺伝学的突然変異の実験的証拠は不十分である。

我々は、最近の福島第一原発事故に関連して、これらの重要な問題に取り組んだ。ヤマトシジミ（鱗翅目、シジミチョウ科）を環境評価の指標種として用いた。この種については信頼できる飼育法が確立されている[24]。チョウは一般的に有用な環境指標と考えられ[10,15,25,26]、この種は、福島地域を含む日本に広く分布しているため、また、その翅の色模様が環境変化に敏感である[24,27]ため、特にこの目的に適している。過去にこの種は、遺伝子組み換えトウモロコシ花粉に関する生態学的リスク評価に用いられた[28,29]。

福島第一原発のメルトダウンと爆発は、ヤマトシジミが幼虫として越冬している 2011 年 3 月 12 日に起こった。この日付以降、これらの幼虫は、外部からのみならず、摂取した食物により内部からも人工放射線に被曝している。本研究において、我々は、福島第一原発由来の人工放射性核種による損傷の結果生じた可能性のある、福島地域のこのチョウの生理的、遺伝的変異について検討した。また、外部被曝のリスク及び、摂取食物による内部被曝のリスクを評価した。

結果

現地で採集した個体とその F1 子孫における異常

我々は、事故のおよそ 2 カ月後の 2011 年 5 月 13-18 日、144 の第一化成虫(雄 111、雌 33) を 10 の地域（白石、福島、本宮、郡山、広野、いわき、高萩、水戸、つくば、東京）で採集した。採集された成虫のほとんどは形態も挙動も正常に見えたが、詳細に観察すると幾つかの個体に軽度の形態異常が見つかった（図 1b-e; 補足表 2）。(9 月に行なわれた第二段階の現地調査と比較できるよう、白石、郡山、および東京を除いた) 7 つの地域全体での異常比率は 12.4%であった(表 1)。雄の（付け根から頂端までの）前翅サイズは個々の個体群の間で異なっていた(ANOVA, $df=7$, $F=4.0$, $p=0.00093$)。; この翅サイズは福島の間でつくばの個体群と比較して著しく小さく（統合標準偏差の t 検定、 $p=0.00091$ 、28 対のホルム補正によりサンプルサイズが小さいため白石および郡山を除いた）、広野、東京、高萩の個体群に比べても同様であった（統合標準偏差の t 検定、 p はそれぞれ、0.018、0.018、0.038、上記と同様 28 対のホルム補正）（図 1c）。雄の前翅サイズは、採集地域の地表放射線量と負の相関を持っていた（ピアソン相関係数 $r=-0.74$ 、 $df=8$ 、 $p=0.029$ 、2 対のホルム補正〔地表放射線量と原発からの距離〕）（図 1d）。

確立された飼育法[24]に基づいて（補足図 1）、我々は福島地域で採集した雌から生まれた F1 を得た。この実験と、後に続く全ての実験は、福島第一原発（図 1a 参照）から 1,750km に位置する沖縄で行なわれており、そこでは人工放射線は殆ど検知されていない。各地で採集された親の中には軽度の異常があるものがいた（補足表 2）が、本宮で採集した個体は外観からは全く異常が観察されず、形態的・挙動的に健康に見えた。F1 世代において（補足表 3,4）、幼虫、前蛹、蛹の死亡率、成虫の異常率は、いわき、広野、本宮、福島では高く、F1 成虫の全体異常率は 18.3%であり、親世代の全体異常率の 1.5 倍であった（表 1）。羽化日数のダイナミクス（図 2a）は、蛹化日数のダイナミクス（補足図 2a）同様、F1 個体群の採集地点によって異なっていた。地域個体群すべての羽化曲線は、つくばの個体群の羽化曲線と著しく異なっていた（一般化ウィルコクソン検定、全ての個体群において $p < 0.00001$ 、28 対のホルム補正）。基本的に同じ結果が、蛹化曲線においても得られた（補足図 2a）。羽化 50% 時間日は福島第一原発から採集地域までの距離と負の相関を示した（ $r = -0.91$ 、 $df = 6$ 、 $p = 0.045$ 、30 対のホルム補正〔{地表放射線量および原発からの距離}対{4 段階の（いわゆる“全体”）異常率、成虫、翅、色模様、付属肢、その他；蛹、前蛹、幼虫の死亡率；羽化 50% 日及び蛹化 50% 日}〕）（図 2b）。同様に、蛹化 50% 日は負の相関を示したが、統計的に有意なものでは無かった（補足図 2b）

我々はまた、F1 の付属肢異常率と福島原発からの距離の間にも、統計的に有意なものではなかったが（ $r = -0.86$ 、 $df = 6$ 、 $p = 0.18$ 、上記のホルム補正）、負の相関を観察した（図 2c）。肢、触覚、口肢、眼、腹部、翅を含む様々な部位（補足表 4）における形態奇形が見つかった。へこみのある複眼（図 2e 左）に加えて、眼全体の構造にも、ショウジョウバエの Bar ミュータントと同様のパターンの奇形が見られた（図 2e 右）。破れや皺を含む翅の異常は多くの個体で見つかった（図 2f）。2, 3 の個体では、後翅サイズが非対称に縮小していた（図 2f 左）。色模様の変異は比較的しばしば現れた（図 2g）。ある個体では、斑点の第 3 列が第 2 列に近づいていた。また別の個体では、斑点は、時として右または左の翅でのみ、消えたり加わったりした。また別の個体では、斑点同士が融合していた。加えて、翅全体にわたる斑点の拡大も、特にいわき由来の個体に比較的広く見られた。この斑点拡大のパターンは、分布の北限で観察されるものや、温度衝撃によって引き起こされるものとは異なっていた[24,27]。また、兄妹交配で現れるものとも異なっていた[24]。

親個体には、外観からの表現型異常が全く見られなかった本宮由来の F1 個体群について、比較的高い異常率が観察されたのは注目に値する。卵採集に用いられたその他の親個体も比較的正常で健康だった。健康な親から異常な F1 個体が得られたことは、親個体において生殖細胞が発達する段階で、形態的発達に重要な遺伝子が放射線により損傷を受けたことを示唆している。

F2 世代による異常の継承

我々は、これら異常な F1 個体の繁殖力と、その異常形質の継承についての検査を行った。(外観からわかる異常形質が全く無かった白石由来の雌 1 体を除いて) 異常形質のある F1 の雌を 10 体選び、つくば由来の異常の無い F1 個体と交配させた。得られた F1 の由来する採集地域の中で、つくばはもともと福島第一原発から距離が離れていたため、異常のない F1 成虫採取源として選ばれた。予期せぬ雄の不妊による失敗を防ぐため、未交尾の雌 1 体につき、3 体の正常な未交尾の雄を同一ケージに入れた。この交配システムは成功率が高く、雄も雌もともに繁殖力がある場合には雌 1 体につき 100 体以上の子が得られる[24]ののだが、10 体のうち 3 体の雌からは限られた数の子しか生まれず、すなわち、2 体以下の子成虫しか得られなかった(補足表 5)。それにも関わらず、我々は他の雌からかなりの数の卵を得ることができ、これらの子を成虫段階まで飼育することに成功した。

F2 世代は比較的高い異常率を示した(図 3a; 補足表 6)。F2 成虫における全体異常率は 33.5%であった(表 1)。重要なことに、F1 世代で見つかった特定の形質は F2 世代に受け継がれた(図 3b; 補足表 6)。色模様の変異は比較的しばしば見られた(図 3c)。翅全体にわたる斑点の拡大は、特にいわきの F2 世代において、上で議論したいわきの F1 世代と同様に明白に現れた。特に、"Iwaki1"と名付けた系統のいわき由来 F2 の雌 52.4%に、この形質が受け継がれた; この継承は雌に偏っていた(補足表 6)。付属肢の異常もまた、比較的しばしば見られた(図 3d)。注意を引く触覚奇形、つまり、フォーク状の触覚が、高萩由来の F2 個体で観察された(図 3d)。この異常はそれまで F1 や、我々の研究室で飼育された他の個体には見られなかったものだった。これらの結果は、F1 世代で観察される異常な形質は F2 世代に遺伝し、またこれらの特徴は、親の生殖細胞に導入された遺伝子損傷によって引き起こされた可能性が高く、それらの損傷は福島第一原発の事故による可能性があることを示している。

事故 6 か月後のより過度な異常

ヤマトシジミ個体群に、福島原発事故によって起こる可能性のある遺伝的、生態学的影響を評価するため、我々は第一化の雌から我々の研究室で得られた F1 及び F2 世代に見つかったのと同様な異常が、事故 6 か月後の現地で観察されるかどうか訊ねた。我々は再びヤマトシジミの成虫を 7 つの地域(福島、本宮、広野、いわき、高萩、水戸、つくば; 2011 年 9 月 18 - 21 日)と神戸(2011 年 10 月 3 - 4 日)で採集した(図 1a 参照)。それらは恐らく、その年 4 番目か 5 番目に生まれた個体である。我々は合計で 238 の個体(雄 168、雌 70)をこれらの地域から採集した(補足表 1)。翅の色模様の異常と同様に、肢と触覚にもしばしば現れる奇形が観測された(図 4a; 補足表 7)。

(5 月に行った第一段階野外調査との比較が可能ないように神戸を除いた) 7 つの地域につ

いての全体異常率は28.1%で、5月に我々が現地で採集した、第一化の成虫で観察されたものの2倍以上であった(表1)。2011年9月に野外採集された成虫の全体異常率は、採集地域の地表放射線量と相関していた($r=0.84$, $df=6$, $p=0.13$, 14対のホルム補正[{地表放射線量と原発からの距離} 対 {成虫の翅、色模様、付属肢、その他の異常率と、雄および雌の翅の大きさ}]) (図4b)。

9月のサンプルからのF1世代においては、死亡率と異常率は比較的高く(補足表3, 4) 9月に野外で採集されたサンプルで観察されたのと同様な異常が観察された(図4c)。F1成虫の全体異常率は59.1%であった(表1)。これらの結果は、福島地域における9月の個体群が5月の個体群と比較して悪化しており、それは、我々がその前に行った、第一化の成虫を用いた飼育実験から予測されたように、福島第一原発事故由来の放射線によって引き起こされた遺伝的損傷による可能性があることを示した。

外部被曝および内部被曝の影響

野外及び飼育実験で得られた異常な表現型を実験的に再現するため、我々は沖縄で採集された雌から得られた幼虫と蛹を、福島第一原発から放出された主要な放射性核種のひとつであるCs137による放射線に、55mSv (0.20mSv/h) まで、または125mSv (0.32, mSv/h) まで人工的に被曝させた。両方の被曝レベルにおいて、異常な形質が観察され(図5a)、被曝させられていないコントロール個体と比較した前翅サイズの縮小が、どちらの性においても見られた(t検定, いずれの性においても $p<0.00001$) (図5b)。生存曲線は線量依存性を示唆した; 55mSvの曲線と、125mSvの曲線とは互いに有意に異なっていた(一般化ウィルコクソン検定, $p=0.000026$, 上記のホルム補正)。生存曲線はまた、外部被曝がしばしば前蛹段階での死を引き起こし、より高い被曝は主に前羽化及び羽化の段階に影響を及ぼすことを示唆した(図5c)。

摂取された食物による内部被曝の影響を評価するため、我々は福島とその他の地域(福島、飯館の山間地域、飯館の平野域、広野、宇部; 図1参照; 補足表8)で採集した食草植物の葉を、人工放射性核種に被曝したくない沖縄の幼虫に与えた。これらの葉は高い放射能のCs134及びCs137を確かに含んでいたことを確認した。非汚染地域(すなわち宇部)由来の葉を消費したほとんど全ての個体は生存し、一方で汚染地域由来の葉を消費した個体の多くは、上手く生き延びることができなかった(図5d)。汚染地域由来の葉を与えられた4つのグループにおける生存曲線は、宇部のグループにおける生存曲線とは著しく異なっていた(一般化ウィルコクソン検定, 全てのグループで $p<0.000001$, 10対のホルム補正)。広野と福島の生存曲線の間($p=0.0017$, 上記のホルム補正)、また広野と飯館平野部の生存曲線の間($p=0.00035$, 上記のホルム補正)の有意な相違により、線量依存傾向が示唆された。蛹の死亡率($r=0.91$, $df=3$, $p=1.0$, 32対のホルム補正[{地表放射線量, 地表 β

線量, 食草植物における Cs137 の放射能, 食草植物における Cs134 の放射能} 対 {4 段階の (全体) の異常率, 成虫の、翅, 色模様, 付属肢, その他の異常率, 蛹および幼虫の死亡率}]) と色模様異常率 ($r=0.96$, $df=3$, $p=0.34$, 上記のホルム補正) は、採集された葉の Cs137 放射能との間に高い r 値を示したが、統計的に有意なものではなかった (図 5e)。前翅サイズの違いは雄の間で (ANOVA, $df=4$, $F=25$, $p<0.0000001$)、また雌の間で (ANOVA, $df=4$, $F= 8.0$, $p=0.0000073$) で観察された (図 5f)。宇部のサンプルと比較して、雄の前翅サイズの縮小は、福島个体群 (スチューデントの t 検定, $p<0.000001$, 10 対のホルム補正)、飯舘平野部个体群 (ウェルチの t 検定, $p=0.00015$, 上記のホルム補正)、飯舘山間地域の雄 (ウェルチの t 検定, $p=0.00015$, 上記のホルム補正) で見つかった (図 5f)。同様に、雌の前翅サイズの縮小は、宇部と飯舘平野部のサンプルの間で観察された (スチューデントの t 検定, $p=0.000041$, 上記のホルム補正)。色模様の異常を含む形態異常 (図 5g) は、幼虫期に汚染された葉を摂取した成虫に見られた。

これらの結果は、外部および内部からの放射線照射過程が、ともに同様の不利な生理的影響に繋がることを示した。放射線照射された個体の異常な形質が、福島地域で野外採集された成虫に見られた異常と、また、その F1 及び F2 世代の異常と似通っていたことは重要である。

論考

我々は福島地域のヤマトシジミが生理的・遺伝的に悪化していることを示した。恐らくは、我々の野外調査と研究室内実験により示唆されたように、この悪化は福島第一原発由来の人工放射性核種によるものである。第一化の親においては必ずしも見られなかった異常が F1 世代で観測され、それらの F1 異常は F2 世代に受け継がれた。このことは、遺伝的損傷がこの蝶の生殖細胞に導入されたことを示唆している。また、9 月に野外採集されたサンプルには、5 月に採集されたサンプルよりも高い異常が観察された。さらに、我々は、野外調査と飼育実験の結果を、人工的な外部及び内部被曝によって実験的によく再現した。これら全ての結果は、放射線が生理的・遺伝的なレベルで不利な影響を及ぼしたことを示している。第一化の個体の生殖細胞が、2011 年 3 月 12 日の福島第一原発から、事故直後の一度の爆発で放出されたヨウ素及びその他の人工放射性核種による大規模な外部被曝によって、遺伝的に損傷を受けた可能性がある [1-6]。それに続く損傷は、主として摂取された葉による低線量内部被曝に起因するのではないかと思われる。外部被曝と内部被曝の累積的な影響が个体群レベルの悪化という結果に至った。

5 月に採集したサンプルの F1 世代においては、羽化と蛹化の著しい遅れが明白であった。

体細胞の様々な形態的異常に加え、何体かの雌に不妊が見つかった。いくぶん予想外だったことには、50%羽化時間および50%蛹化時間と、福島第一原発からの距離との間には相関があったが、地表放射線量との間には相関がなかった（データは示されていない）。この結果の理由は明らかでないが、距離は測定誤差の影響を受けにくいいためかもしれない。与えられた採集地域における線量測定は、時に、野外における放射性核種の非一様な分布のために数メートルの範囲内で一桁以上変動しうる。この変動のし易さのために、地表放射線量の一連のデータは恐らく、（データは示さないが）正規性の検定から示唆されたように（正規領域内ではあっても）正規分布からよりずれており、このことが線量・異常相関を不明瞭にしたのではないかと思われる。我々の野外での絶対線量の評価は、主に短半減期放射性核種の放射能減衰による時間依存変化を考慮していないこともまた、認める。

全体異常率（OAR）は9月のサンプルの方が5月のサンプルより高かった。メルトダウン直後の、I131のような短半減期放射性核種の大量放出のために、個体ごとの被曝線量は、9月のサンプルより5月のサンプルの方がはるかに高かったのが確かなので、この結果は、より高い線量や個体ごとのより長い被曝ということでは説明できない。ヤマトシジミの1個体の寿命が短いこともまた注意すべきである：ライフサイクルはおよそ一か月で完了する。この研究で行われた他の実験を考慮すると、OARの相違は何世代にもわたる継続的低線量被曝による突然変異の蓄積で説明できるかもしれない。

形態の調査に基づいて生理的な、あるいは遺伝的な悪影響を見分けるのは難しく思われる。付属肢の奇形と翅の色模様の異常は、野外採集された第一化の成虫及び、放射線照射された成虫に見られた。それ故、これらの異常は放射線の生理的影響によるものである。しかし、同様の異常は、異常のなかった第一化成虫由来のF1及びF2世代にも見られた。これらの発見は、それらの異常が遺伝的影響の結果であることを示唆している。我々の放射線照射実験では、前翅サイズの縮小、色模様の変化、付属肢及び眼の特定の奇形が生理的影響として引き起こされ得ることが示された。これらの特徴はまた、2011年5月に採集された第一化成虫においても見られた。しかし、特定の型の異常はF1及びF2世代においてのみ見られた。これらの異常には、ショウジョウバエのBarミュータントの眼に類似した複眼の奇形、後翅サイズの非対称な縮小、翅全体にわたる斑点の拡大、触覚の枝分かれが含まれる。生理的影響と遺伝的影響を区別する為にはより多くの実験が必要であるが、これらの異常は遺伝的損傷によるものであるとするのが最も確からしいと思われる。

本研究を通じて、多くの異常形質が非対称であり、子孫に見つかった異常形質は必ずしもその親のものとは同一ではなかった。恐らくこれらの結果は、突然変異体の表現型の発現度が高くないために得られたのであろう。加えて、付属肢と色模様の異常形質がしばしば観察されるので、Distal-less 遺伝子のように[30-35]、蝶の付属肢と翅の色模様の双方の発

達に関わる一群の多面発現性遺伝子に変異を起こしている可能性がある。

ウリミバエの蛹を不妊にする線量の外部被曝は羽化率や成虫の寿命には影響を与えない事が報告されている[36]。同様に、蚕の蛹は外部被曝に対して、高度に耐性を持つと報告されている[37]。しかし、放射線照射後の様々な昆虫成虫の形態を詳細に観察することにより、精巣、触覚、翅に形態的損傷があること、しばしば蛹や幼虫が脱皮をし損なうことにより死亡することが示されてきている[38-40]。我々は、ヤマトシジミが Cs137 による 55mSv 程度の外部被曝に敏感であることを示した。恐らく、この放射線レベルは福島第一原発周辺の少なくともいくつかの地域の野外被曝レベルに近いと思われる。本研究におけるヤマトシジミの被曝レベルは比較的低いですが、この蝶において観察された異常は他の昆虫で先に報告されたものと類似していた[38-40]。更には、我々の結果は、蝶の個体群が高度に人工放射性核種による汚染に敏感であることを示した、以前のチェルノブイリと福島での野外調査の結果と一致している[10, 15, 17]。総括して、今回の研究はヤマトシジミが恐らく日本における放射性核種汚染に対する最善の示標種のひとつであることを示唆している。

エピジェネティックな影響を完全に否定することは出来ないが[41]、最も確からしいことには、観察された異常な表現型は、放射線被曝により引き起こされたランダムな突然変異により発生したのではないかと思われる。福島地域における、この異常な表現型の急激な増加は、以前福島第一原発からおよそ 400 km北西に位置するこの種の北限の深浦地域で観察された色模様の変化の急激な増加とは非常に異なっている[27]。この変化急増時の深浦個体群は、色模様の明瞭な変調を示すが、他に翅の変形や異常は全く見られない温度衝撃型で構成されていた。更に、我々の知る限りにおいて、付属肢にも他の部位にも全く奇形は見つからなかった[27, 41-43]。一方で、福島地域における異常の急増は、様々な予想されなかった異常な表現型を含む。これらの異常は正常な個体群の示す表現型の可塑性の範囲内では発現しえない。この情報とこの研究で得られた実験データから、現在の福島地域における異常個体の急増は、福島第一原発由来の人工放射性核種のために、生理的影響に加えてのランダムな遺伝的変異が起こったことにより引き起こされたと結論できる。

ある種の蝶における放射能汚染のための低線量被曝によって引き起こされた、継承される生殖細胞の遺伝的損傷についての我々の実験は、動物への放射線の将来起こりうる影響に関して、計り知れない貴重な示唆を含んでいる。福島第一原発から放出されたプルトニウム検出[44]を考慮して、摂取食物からの内部被曝により起こり得るリスクは、近い将来、より精密に調査されるべきである。

方法

蝶

ヤマトシジミ *Z. maha* は（「日本のシジミ蝶」を意味する名で）、日本名の示唆する通り、沖縄（琉球列島）を含めて、北海道を除く日本中に一般的に生息している[45,46]。この種は単食性である。日本語でカタバミという背の低い植物 *Oxalis corniculata* の、地面に近いところにある葉を食べている。この植物 *O. corniculata* と *Z. maha* は、ヒトの活動が環境に影響を及ぼす都市や村で力強く成長する。この種は多化性であり、一世代におよそ 1 か月を要する。ヤマトシジミは幼虫段階で、地表上で越冬する。それ故、この蝶は地上に蓄積された放射性物質への感受性が高いと思われ、ヒトの居住地における環境汚染の生物学的影響をモニターするための示標種として適切である。原発事故時、この種の個体群は幼虫として越冬しており、人工放射線に外部被曝した。春の間、この蝶は汚染された葉を摂取し、それ故内部被曝もした可能性がある。

野外調査

我々は第一化の *Z. maha* の成虫を 10 地域（図 1a；付属表 1）で、2011 年 5 月 13 日から 18 日に採集した。2011 年 3 月 12 日の福島第一原発のメルトダウンと爆発以来、越冬していた幼虫はおよそ 2 か月の間、幼虫、蛹、そして成虫として、放射線に被曝し続けていた。我々はまた、2011 年 9 月 18 日から 21 日に 7 つの地域で、また 2011 年 10 月 3 日から 4 日に一地域(神戸) で、第四化あるいは第五化の成虫を採集した（図 1a；付属表 1）。これらの 9 月の地域は、2011 年 5 月の第一段階の野外調査の間、調べられた地域とほぼ同一であった。

採集場所はほとんど、公園や水田などの、人工的な開けた地面であった。採集地域は行政上の境界によって限定され、数か所の異なる場所を含む場合がある。各々の採集場所では、同時に 4 人の昆虫網を用いる徒歩の採集者によって、少なくとも 20 分の採集試行一回が、一つの物理的地点の周囲で行われた。採集者はこの 20 分間試行の間に可能な限り多くの *Z. maha* 成虫個体を捕えることを期待されたが、雌の方が好まれた。この最初の採集試行のあと、この場所での採集を続けるかどうかについて決定が行われた。続けることにした場合には、その後の試行はなるべく多くの個体がいる場所の周りで行われた。我々は採集の偏りの可能性を取り除くことはできないが、一つの地域は数か所の異なる採集場所を含み、そのことが存在しうる採集の偏りを軽減する。採集された生きた成虫は冷却された箱に入れられ、我々の研究室に運ばれた。蝶の採れた場所に最も近い食草植物の位置で、地表 0 cm、30 cm、100 cm の高さでの放射線量を Hitachi Aloka Medical TCS-161 シンチレーションサーベイメータ (Tokyo, Japan) を用いて測定した。同様に、我々はまた、一分毎のカウント値を Hitachi Aloka TGS-133GM サーベイメータ (Tokyo, Japan) を用いて計測

した(データは示されない)。測定はそれぞれの測定場所で行われ、それ故与えられた地域の地表線量はそれらの平均値と期待される。ある地域で一つの採集場所しか訪れなかった場合は、放射線量測定は与えられた場所の二つの異なる地点で二回行われた(付属表 1 参照)。

交配と飼育

交配、雌からの卵採集、幼虫の飼育は、交配用に 30(高さ) × 30 (幅) × 30 (奥行) cm のガラスタンクを用い、卵採集を $26 \pm 1^\circ\text{C}$ で行ったことを除いて、先行研究[24]の通り行われた。2011 年 5 月の成虫採集については、我々は指定された採集地域から、より健康で元気な雄と雌を選んだ。各々の地域の成虫は一つのタンクに入れられた(白石については 2 頭の雄と 1 頭の雌、福島については 3 頭の雄と 5 頭の雌、本宮については 3 頭と 3 頭、広野については 3 頭と 4 頭、いわきについては 3 頭と 6 頭、高萩については 3 頭と 4 頭、水戸については 4 頭と 5 頭、つくばについては 3 頭と 5 頭)。これらの個体のうちいくつかは軽度の異常を示したが、本宮の雄と雌、いわき、高萩、つくばの雌は、検知できる異常を全く示さず(付属表 2)、形態的・挙動的に健康に見えた。雌は産卵に 9 日または 10 日を与えられた。2011 年 9 月及び 10 月に採集された成虫については、我々はより健康な(異常の無い)雄と雌、及び異常な雄と雌の両方を一つの採集地域から選び、一つのタンクに入れた(神戸については 2 頭の雄と 5 頭の雌、高萩については 2 頭と 4 頭、いわきについては 2 頭と 4 頭、広野については 2 頭と 3 頭、本宮については 2 頭と 5 頭、福島については 4 頭と 5 頭)。これらの個体の中で、神戸の 7 頭の成虫は全て異常が無かったが、他の地域の成虫は、異常のない個体も異常な個体も両方含んでいた。雌は産卵に 7 日または 8 日を与えられた。

幼虫は、別の場合にそう示されない限り、琉球大学西原キャンパスの周辺で採集された食草植物の葉の上で飼育された。2011 年 5 月に採集された第一化の雌からの F1 個体間の交配のために、比較的異常な 1 頭の交尾前の雌が選ばれて(付属表 5)、3 頭のつくばの未交尾の雄と一つのタンクにともに収容され、6 地域から 10 の系統を生み出した。F2 世代は F1 世代に用いられたのと同様の方法で得られ、飼育された。蛹化曲線と羽化曲線を構成するために、蛹化した個体と羽化した個体が毎日記録された。蛹化した日と羽化した日は、それぞれの地域のグループについて、ひと産卵ごとの卵採集のまさに最初の日から数えられた。

異常の識別と記録

従来型の解剖組織用顕微鏡が異常の識別に使用された。標本全体の外部形態的検査が行われた。全ての異常は、形態異常の評価について一人の人間の内部で起こる可能性のある不一致を避けるため、二人の人間、A.H.と C.N.によって探査された。意見の不一致はしばしば、明らかな異常の見落としから生じた。それ故、二人の意見が食い違った際には、そ

の食い違いについて、それらの問題に関する意見一致に至るまで共に討論した。成虫の異常形質は、ある異常形質が属する器官に基づいて、下記の4つのカテゴリーに分類された；翅の形態（色模様を除く）、翅の色模様、付属肢（肢、触覚、鬚、吻を含む）、及びその他の異常（眼、胸部、腹部を含む）。異常率は、それぞれの採集地域でのそれぞれのカテゴリーについて計算された。成虫異常率はある与えられた採集地域で、4つ全てのカテゴリーを含む。総異常率（4つの（成長）段階の異常率）は成虫異常率と死亡率の和、及び、幼虫、前蛹、蛹の異常率を含む。全体異常率は、ある与えられた採集もしくは飼育試行において、異常な成虫の総数を全て（もしくはほとんど）の地域の検査された成虫の数で割ったもので定義され、パーセンテージで表された。異常な翅の写真は、必要な場合には、翅々の間で色模様を比較するため、Adobe Photoshop を用いて水平方向に置き換えられた。前翅サイズは基部から頂端までを SKM-S30A-PC デジタル顕微鏡と、SK measure と呼ばれるその連携ソフトウェア（斉藤光学、横浜、日本）を用いて測定された。

外部放射線被曝

CsCl 放射線源（実験時 14.3MBq；日本アイソトープ協会、東京、日本）からの Cs137 放射線を用いた放射線照射実験が、二回、異なる放射線レベルで行われた。それぞれの場合において、200 の幼虫が雌の在庫の中から集められ、200 の中からランダムに選ばれた 150 の幼虫がプラスチックのコンテナに入れられて、累積放射線被曝がそれぞれ 3-55mSv あるいは 57-125mSv になるように、180-280 時間または 177-387 時間放射線照射された。それぞれの場合について 50 の幼虫が放射線照射されず、対照として飼育された。

内部放射線被曝

内部被曝実験のため、5つの地域（図 1a；付属表 1）から野生の *O. corniculata* の葉を採集した。宇部を除くすべての地域について、葉は 2011 年の 7 月 17-19 日および 2011 年 8 月 2 日に 採集された。宇部については、葉は 2011 年の 7 月 15, 17, 28 日に採集された。採集された葉は、餌として使われるまで冷蔵庫で保存された。卵は沖縄で野外採集された雌により、鉢植えされた沖縄の葉の上に産み付けられた。特定の地域由来の葉は、後期第一齢の幼虫、または第二齢の幼虫に与えられた。この植物試料に関わる β 線放射線量は、低バックグラウンド 2π ガスフローカウンター（日立 Aloka Medical LBC-4211-R2、東京、日本）で測定された。cpm 値は 60 分以内にその葉からの灰 1.6g について 2 回測定された（下記参照）。その平均値からバックグラウンド値を差し引いたものが、灰化率とともに最終的な出力のために用いられた。採集された野生の *O. corniculata* 植物に対する灰化率は、初期物質の水分含有量または乾燥度に依存し、加工の数日前に採取された東京の試料について 2.07%（n=3 の平均）と決定された。

葉の中の人工放射性核種の放射能を定量するため、以下のような灰化加工が施された。まず、葉は完全に空気乾燥され、続いてシリコン塗装されたホットプレートで、資料が完全に灰色になるまで火がつかないように焼かれた。その灰はプラスチック容器（直径 5.0 cm、高さ 3.0 cm）に一様に広げられ、ゲルマニウム半導体放射線検知器（Canberra GCW-4023、Meriden, CT, USA）の中に、厚い鉛のシールドと共に入れられた。測定は、測定値のエラー率が 5%を下回るまで行われた。セシウムの放射能は、以下の値を用いて計算された：Cs134 (605keV) 及び Cs137(662keV) の検知効率値は各々 3.81%及び 3.54%、その分岐比は各々 97.6%及び 85.1%。上に示されたように、灰化率 2.07%が用いられた。

統計

数値的なデータは、R バージョン 2.14. 2（統計コンピューティングのための R 基金、ウィーン、オーストリア）を用いて統計的な解析にかけられた。野外採集された標本の前翅サイズ相違について、対に関する比較のための（統合準偏差を用いた）両側二標本 t 検定が行われた。標本の数の少なさのため、summary(aov(X~Y))での ANOVA のポストホックテストとして、pairwise.t.test (X, Y, p.adj="holm") を利用したホルム補正（連続補正）法が用いられた。外部被曝実験の前翅サイズ相違については、スチューデントの t 検定が t.test(X, Y, var.equal=T)を用いて行われた。内部被曝実験の前翅サイズ相違については、ANOVA のポストホックテストとしての分散の均一性によって、スチューデントの、あるいはウェルチの t 検定が、t.test(X, Y, var.equal=T)または t.test(X, Y, var.equal=F)を用いて行われ、p 値は p.adjust(p, method="holm")を用いたホルム法により補正された。t 検定が行われる前に、標本の分散の正規分布性と等分散性の両方が調べられた。

相関解析のため、地域に対する代表値として平均値が用いられた。標本の正規分布性がチェックされた後、ピアソンの相関係数 r が、散布図に対して、cor.test(X, Y, method="pearson")を用いて決定され、p 値は p.adjust(p, method="holm")を用いてホルム法により調整された。生存曲線については、一般化ウィルコクソン検定が、survdiff(formula=Surv(X)~Y, fho=1)を用いて行われ、p 値は p.adjust(p, method="holm")を用いてホルム法により調整された。

t 検定と相関解析のためのデータセットの正規分布は、qqnorm(X)を用いた直線性プロット及び、Shapiro.test(X)を用いたシャピロ-ウィルク検定によりチェックされた。正規分布個体群からの無作為抽出の帰無仮説が 1%の有意性レベルで棄却されない場合は、それを正規分布と考えた。分散の均一性は var.test(X, Y)を用いた F 検定によりチェックされた。

図1 第一化の採集と異常

(a)採集地域。赤い点は福島第一原発の位置を示す。黒い点と黒い半分の点は第一化の成虫が採集された都市を示す。茶色い点と、半分茶色い点は、内部被曝実験の為に食草植物の葉が採取された都市を示している。全ての実験は青い点で印された沖縄で行われた。差し込み図は原発の周囲の採集地域を示す。

(b)正常（最左）な、及び異常な色模様の、代表的な翅。数字1, 2, 3, 4は、最初の、第二の、第三の、第四の斑点の列をそれぞれ示し、"D"は円盤状の斑点（ディスク・スポット）を示している。赤い矢印は斑点の、欠損、転位、弱い発現（左の個体）、弱い発現と転位（中の個体）、拡大（右の個体）を示す。これらの標本は、いわきで捕えられた最左の異常のない標本を除き、水戸で捕えられた。スケールバーは1.0 cm。

(c)様々な地域の雄の前翅サイズ。第一の4分位数及び第三の4分位数は、それぞれ四角形の底面と上面の水平なバーで表される。中央値は四角形の内の中程の線で示される。アウト라이어は点線で示される。赤い点は平均値、赤いバーは標準偏差（SD）を示す。ホルム補正されたp値が示された。それは統合標準偏差でのt検定を用いた8つの地域間での対比較のために得られたものである。雌の標本は卵採集に用いられた際、卵採集処置による結果として翅を破られてしまうので、ここには雄の標本のみ示されている。白石由来の標本（n=5）及び郡山由来の標本（n=3）は標本サイズが小さいため除外された。

(d)雄の前翅サイズとそれぞれの採集地域の地表放射線量の散布図。ピアソン相関係数 $r = -0.74$ （ホルム補正された $p = 0.029$ ）。

(e)代表的な形態異常。左から右へ、凹みのある眼（白石）、変形した左眼（いわき）、変形した右の鬚（高萩）、変形した翅形（福島）。矢じり形は、変形の位置を示す。スケールバーは、最右の1.0 cmのものを除き、0.5 mm。

図2 F1の異常

(a)羽化時間ダイナミクス。羽化した個体の累積パーセンテージが羽化日に対してプロットされている。全ての地域個体群は、筑波の個体群と有意に異なる（一般化ウィルコクソン検定、ホルム補正された $p < 0.00001$ ）。

(b) 50%羽化時間と原発から採集地域までの距離の散布図。50%羽化時間は(a)に示された羽化時間ダイナミクスから、50%の蛹が羽化した時間として求めた。50%羽化時間に対するピアソン相関係数は $r = -0.91$ （ホルム補正された $p = 0.045$ ）。

(c)付属肢の異常率と原発からの距離の散布図。ピアソン相関係数 $r = -0.86$ （ホルム補正された $p = 0.18$ ）。

(d)付属肢の代表的な形態異常。小型化した左前脚ふ節（福島のF1、最左）、未発達の左中脚ふ節（福島のF1と広野のF1、それぞれ左から二番目と三番目）未発達鬚（高萩のF1、最右）は構造的に異常であり、ショウジョウバエのDistal-lessミュータントを思わせる。矢じり形は異常な構造の位置を示す。差し込み図は四角で囲まれた領域の拡大を示す。ス

ケールバーは 0.50 mm。

(e)眼の代表的形態異常。両方の複眼にくぼみがある(福島 F1、左)。また、左の複眼の形が棒状になっている(広野 F1、右)ものは、ショウジョウバエの Bar ミュータントを連想させる。スケールバーは 0.50 mm。

(f)代表的な翅のサイズ及び形状の奇形。右の後ろ翅が、同個体の左の後ろ翅と比較してはるかに小さい(福島 F1、左)。翅が折れ曲がっている(高萩 F1、中)。翅がしわになっている(いわき F1、右)。スケールバーは 1.0 cm。

(g)代表的な翅の色模様変化。上部左の 3 個体はいわきの親からの F1 で、上部最右の個体は広野の F1。株の標本は左から右へ、広野、水戸、白石、本宮、本宮の F1 個体。矢印は変形した斑点。スケールバーは 1.0 cm。

図 3 F2 の異常

(a)F2 世代の異常率。x 軸は系統の名で、親世代の由来する地域を示す。個体の総数。(100% に対応) が、それぞれの系統に対して示されている。付属表 3 も参照。

(b)同一異常率と相同異常率。親 F1 と同一の異常形質を示す個体の数を、得られた個体の総数で割ったものが、パーセンテージで表わされた。同様に、親 F1 と相同の器官、例えば翅、付属肢などに異常形質を示す個体の数を、得られた個体の総数で割ったものが、パーセンテージで表された。異常な個体の総数(100% に対応) が、それぞれの系統に対して示されている。

(c)代表的な、翅色模様の異常。矢印は変形した斑点及び翅の部分を示す。上段最左の翅は、いわき F2 の翅全体にわたる斑点の伸長型で、図 2 に示された親 F1 のそれと同様の表現型である。上段の 4 つの標本は左から右へ、いわきの F2、高萩の F2、いわきの F2、福島 F2 の個体である。下段の全ての標本は福島 F2 個体である。下段中央と最右の翅は後翅の形の変形を示し、これは図 2 f に示されている小さな後翅をもった福島 F1 の子孫から得られた。スケールバーは 1.0 cm。

(d)触覚と脚の奇形。左のパネルは、左触覚の奇形をもつ高萩 F2 個体を示し、この触覚は短く、分岐している(矢じり形)。右のパネルは左の後脚腿節に変形のある高萩 F2 個体を示す。差し込み図は異なる角度から撮られた写真である。スケールバーは 0.50 mm。

図 4 2011 年 9 月に採集された成虫標本における異常と、その F1 子孫における異常

(a)野外捕獲された個体の代表的形態異常。差し込み図は四角で囲まれた領域の拡大図。左後脚のふ節が構造的に異常(広野、左)、右前脚のふ節が全く発達していない(福島、左から二番目)、右触覚(矢じり形)が延びており、その部分が異常な構造と色あいになっている(本宮、右から二番目)、翅の色模様と翅の形が矢印で示されるように変形している(いわき及び福島、右)。全てのスケールバーは最右の 1.0 cm のものを除き、1.0 mm。

(b)地表放射線量と野外捕獲された成虫の異常率の散布図。ピアソン相関係数 $r=0.84$ (ホル

ム補正された $p=0.13$)。

(c)代表的な F1 世代の異常。左側の 3 つのパネルは、左前脚ふ節 (矢じり形) (高萩の F1、上) の奇形、胸部下側面の腫瘍状の固い突出部 (矢じり形) (高萩の F1、中)、凹みのある眼 (福島 F1、下)。左の 3 つのパネル内のスケールバーは全て 1.0 mm を示す。F1 標本の翅の色模様の変形 (矢印) が右に示されている。左から右に、いわき、いわき、本宮、広野、高萩 (上段)、高萩、本宮、本宮、福島、本宮、本宮 (下段)。翅のパネル内のスケールバーは 1.0 cm を示す。

図 5 外部被曝及び内部被曝

(a)外部被曝により得られた代表的な異常。異常な構造を示した左後脚の脛節及びふ節、触覚、鬚、眼 (左下の個体を除き、全て、125mSv 被曝させられた。左下の個体は 55mSv 被曝させられた。全てのスケールバーは 1.0 mm。異常な翅の色模様は矢印と四角で示されている。(左の翅は 55mSv、右の翅は 125mSv 被曝。スケールバーは 1.0 cm。) 差し込み図は四角で囲まれた領域の拡大図。

(b)55mSv 外部被曝させられた個体における前翅サイズの減少 (t 検定)。

(c)外部被曝させられた個体の生存曲線。55mSv 被曝させられた標本と、その対照標本との間の相違 (ホルム補正された $p=0.018$)、および、125mSv 被曝させられた標本と、その対照標本との間の相違 (ホルム補正された $p=0.0000026$) は統計的に有意であった (一般化ウィルコクソン検定)。

(d)異なる地域からの、汚染された葉を摂取した個体の生存曲線。食草植物の採集地域が示されている。全ての曲線は汚染されていない宇部についての曲線と異なっていた (一般化されたウィルコクソン検定、ホルム補正された $p<0.000001$)。広野についての曲線は福島についての曲線とは異なっており (ホルム補正された $p=0.0017$)、また、飯館の平地部についての曲線とも異なっていた (ホルム補正された $p=0.00035$) (一般化されたウィルコクソン検定)。

(e)食草植物の Cs137 放射能と蛹の死亡率 ($r=0.91$)、及び色模様異常率 ($r=0.96$) との散布図。

(f) 内部被曝させられた個体における前翅サイズの縮小 (t 検定)。

(g)汚染された葉を摂取した個体の代表的な異常。パネルは、左上から右下へ、右触角の奇形 (飯館山地部)、右鬚の異常 (福島)、凹みのある左複眼 (飯館平地部)、羽化の失敗 (福島)、曲がった翅 (福島)、また一体の曲がった翅 (福島)、異常な翅色模様 (福島)、円盤状斑点の傍の転位した黒い斑点 (飯館平地部; 差し込み図内に拡大)。矢じり形は異常部分を示し、矢印は変形した翅の斑点を示す。上段の 4 つのパネルに対するスケールバーは 1.0 mm、下段の 4 つのパネルに対するスケールバーは 5.0 mm。

(翻訳: 深町ひろみ)