

旧警戒区域内で飼養継続中の肉用牛の PIXE 分析

片桐光貴¹、小島貴文¹、和田成一¹、世良耕一郎²、

岡田啓司³、佐藤 至³、柿崎竹彦¹、夏堀雅宏¹

¹北里大学獣医学部

034-8628 青森県十和田市東二十三番町 35-1

²岩手医科大学サイクロトンセンター

020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

³岩手大学農学部

020-8550 盛岡市上田 3 丁目 18-8

1 緒言

2011年3月11日の東日本大震災に伴い発生した福島第一原子力発電所事故によって環境中に多量の放射性物質が拡散し、ヒトと生態系への影響が懸念されている。福島第一原発事故の旧警戒区域内では今でも数百頭の牛が数 μ ~数十 μ Sv/hの環境中で継続的に飼育されている。低線量率長期被ばくが生体に与える影響は未だ不明な点が多く、これらの牛は放射性物質の動態や低線量率長期被ばくの影響に関する貴重な研究対象である。また、この旧警戒区域内で飼育している複数の牛で白斑症が発生したが、この原因は明らかになっていない。我々は2012年に現地の畜産農家とともに「原発事故被災動物と環境研究会（現在名）」を設立し、150頭ほどの牛を対象に調査・研究活動を行っている。

肉用牛における生体内各種元素の体内動態などについては未だ不明な点が多く¹、データの蓄積が求められる。また、被毛中各種元素含量が牛の健康状態や栄養状態と関連して変動する²⁻⁵こと、および被毛の採取は採血に比べて家畜への侵襲が少ないこと、保存が簡便であるという利点があることから、生体内各種元素を測定することは牛の栄養生理状態を把握するための有用な指標となり得る。

そこで本研究では、旧警戒区域内で飼養継続中の肉用牛（黒毛和種）において、PIXE法を用いて血清・被毛中各種元素濃度を測定し、評価することを目的とし、低線量率長期被ばくや白斑症が血清中各種元素濃度に与える影響、またすでに報告されている肉用牛^{4,9}や乳牛の被毛⁶中の各種元素濃度と本測定結果を比較検討した。

2 材料および方法

2.1 供試牛

福島県の旧警戒区域内で飼養継続中の黒毛和種のうち、大熊町の牧場の49頭、浪江町小丸地区の牧場の

62頭、同じく浪江町の高瀬地区の牧場の28頭を用いた。また、原発事故による影響が小さいと思われる対照群として、北里大学獣医学部十和田キャンパス（青森県十和田市）で飼養している黒毛和種3頭を用いた。調査対象牛は雌牛と去勢雄牛を含み、年齢は3~14歳であった。試料採取時期は旧警戒区域内においては2016年5月、8月、12月であった。また、対照群は9月に採取した。

2.2 測定試料の調製およびPIXE分析

血清については、血清試料100 μ lに内部標準となるパラジウム（Pd）を10 μ l添加した。十分に混合してから、PIXE用ホルダーに装着したポリエチレンフィルム上に約5 μ l滴下し、仁科記念サイクロトロンセンターのサイクロトロンにおいてPIXE分析に供した。

被毛における分析は無標準無調製法によって以下のように行った。被毛を水で強く攪拌して水洗し、十分に乾燥させた。長さ、および太さが平均的なものを10本程度選び、なるべく隙間無くPIXE用ホルダーのウェル中央部を横断するように接着テープで保定し、仁科記念サイクロトロンセンターのサイクロトロンにおいてPIXE分析に供した。

2.3 結果の解析方法

測定された元素のうち、血清試料では全123試料、被毛では全77試料の分析値が得られ、その測定時の標準誤差が分析値に対して50%未満のものを、以下の解析の対象とした。

旧警戒区域内における血清試料の分析結果において、雌雄差、年齢差、牧場間における差、白斑牛と非白斑牛の各種元素濃度の差について、t検定またはTukey's検定を行った。また同様に、旧警戒区域内と対照群（青森県十和田市）の血清試料の各種元素濃度の差についてもt検定を行った。一方、被毛試料については黒毛和種と乳牛⁶の分析結果を比較検討した。

3 結果および考察

3.1 血清における旧警戒区域内での各種元素濃度の比較

PIXE分析によって29種類の元素が血清試料から分析された。そのうちすべての血清試料に、あるいは高頻度で検出され定量できたのは、Br、Cu、Na、P、Cl、K、Fe、Zn、Ca、Sの10元素であった。

3.1.1 雌雄差

旧警戒区域内の3カ所の牧場で飼養されている牛を雌雄（雌、去勢雄）にわけて比較したところ、各元素間に有意な差は認められなかった（ $p>0.05$ ）（図1）。よって、PIXE分析で得られた黒毛和種の血清中元素濃度について、雌雄差はないと考えられた。

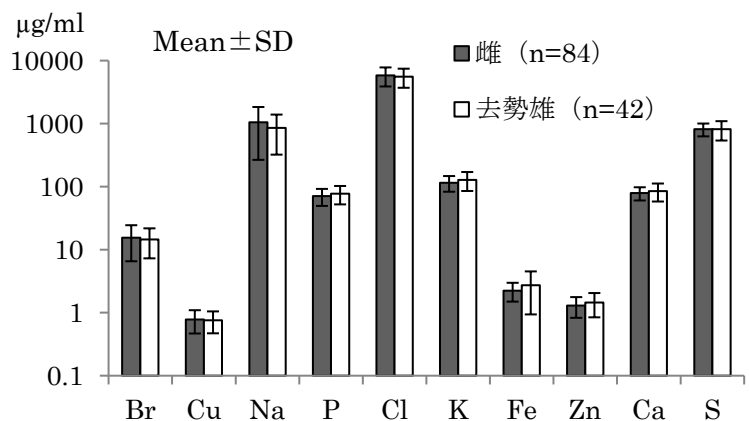


図1. 旧警戒区域内における黒毛和種の血清中元素濃度の雌雄差

3.1.2 年齢差

次に旧警戒区域内の牛を3~5歳、6~8歳、9~11歳、12~14歳のように3歳齢ごとの群に、分けて血清中元素濃度を比較したところ、各群間における有意な差は認められなかった（ $p>0.05$ ）（図2）。よってPIXE分析で得られた黒毛和種の血清中元素濃度について、年齢差はないと考えられた。

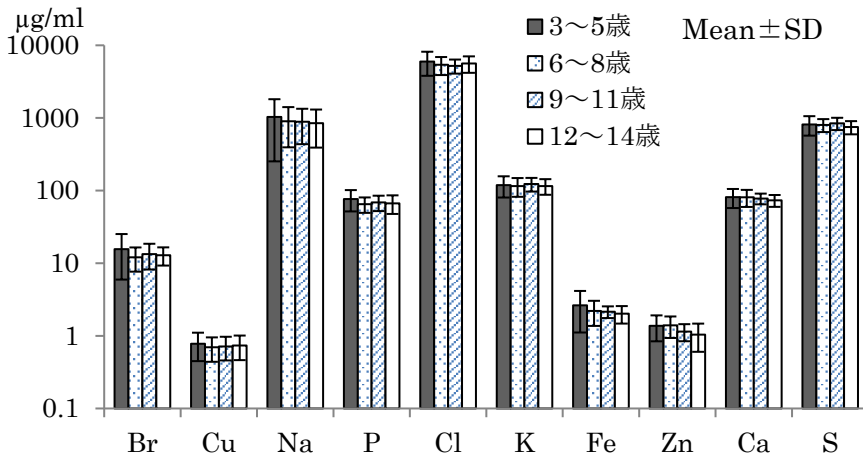


図 2. 旧警戒区域内における黒毛和種の血清中元素濃度の年齢差

3.2 血清試料における旧警戒区域内と青森県十和田市との比較

福島第一原発事故時から現在まで低線量率長期被ばくを受けてきた旧警戒区域内の黒毛和種と、原発事故による影響がないとされる青森県十和田市の北里大学で飼養している黒毛和種の血清中元素濃度を比較した(図 3)。

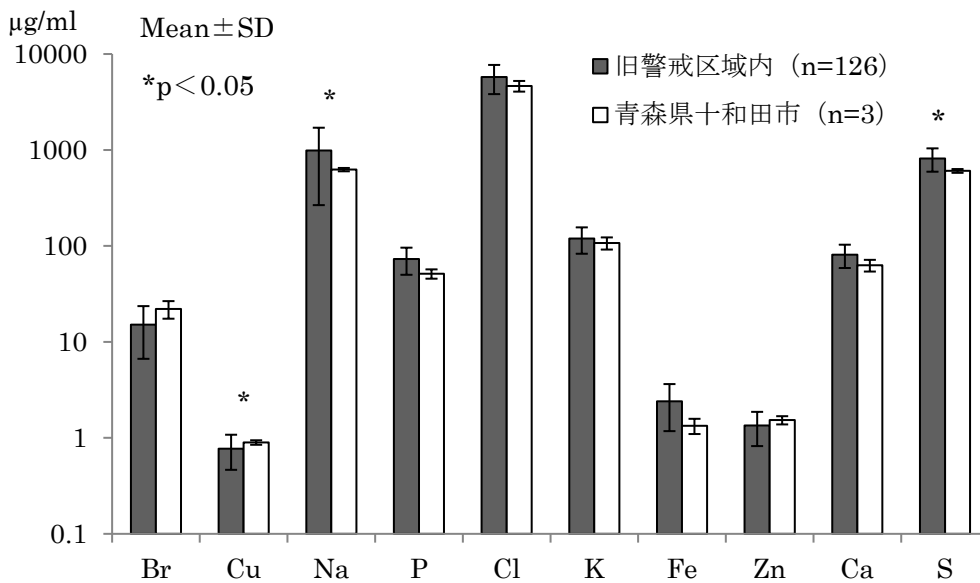


図 3. 旧警戒区域内と対照群（青森県十和田市）との血清中元素濃度の比較

血清中 Cu 濃度は旧警戒区域内の牛において、青森県十和田市の牛よりも有意に低かった (* $p < 0.05$)。一方、Na、S については旧警戒区域内の牛において、青森県十和田市の牛よりも有意に高かった (* $p < 0.05$)。その他の元素間では有意な差は認められなかった。Cu、Na、S は肉用牛に必須な無機物である。Na は牧草の摂取量、または摂取する牧草の発育ステージなどによって変動する⁷。Cu、S は飼料中含量が多いほど血清中濃度が高まることが知られている⁷。そのため血清中 Cu、Na、S 濃度の有意な差は、摂取している飼料の影響であると推測された。しかし、対照群の例数が旧警戒区域内に比べて少ないことから、さらに例数を増やして検討する必要があると考えられる。

3.3 白斑牛における血清中元素濃度および低線量率長期被ばくの影響

旧警戒区域内において白斑症を発症した牛群と、発症しなかった牛群における血清中元素濃度を比較した(図4)。Cuにおいて白斑牛群が非白斑牛群と比較して有意に低かった(* $p < 0.05$)。その他の元素間では有意な差は認められなかった。Cu欠乏の症状として被毛の退色があることから、白斑症にはCu不足が関与していると考えられた。

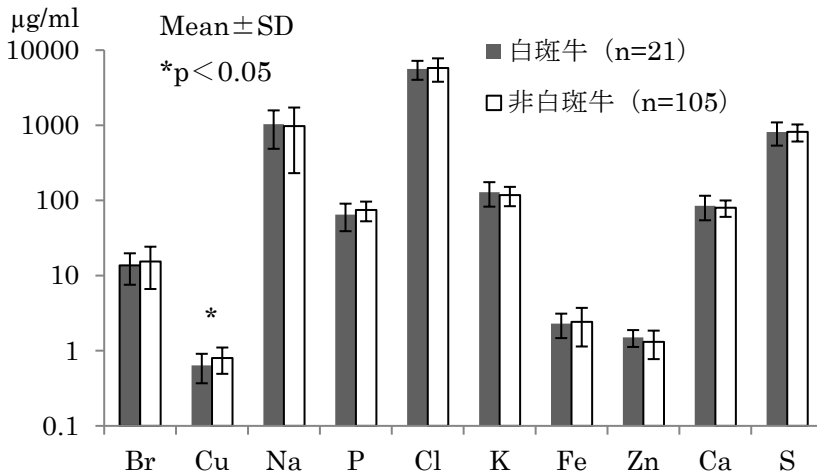


図4. 旧警戒区域内における白斑牛と非白斑牛の血清中元素濃度の比較

そこで、各牧場における白斑牛と非白斑牛の血清中Cu濃度(図5)と、白斑牛の発生頭数と2016年5月時点の空間線量率を示した(図6)。

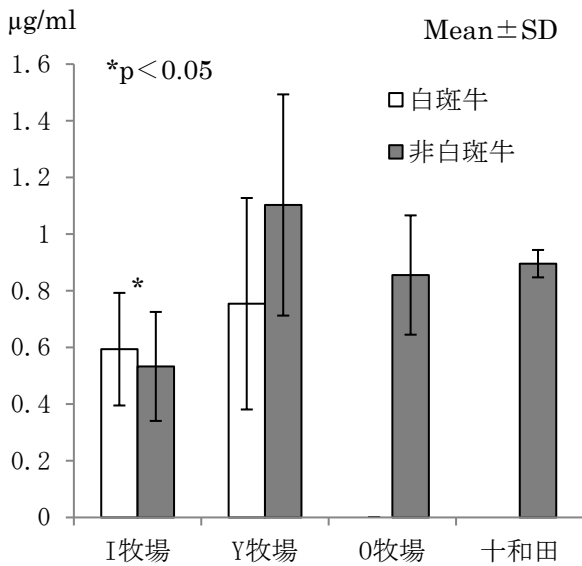


図5. 旧警戒区域内の各牧場における白斑牛と非白斑牛の血清中Cu濃度

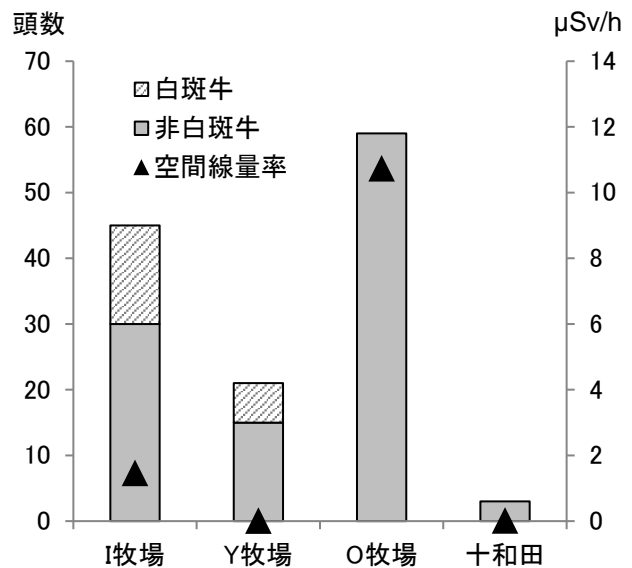


図6. 白斑牛の発生頭数と空間線量率

図6より、最も白斑牛の発生頭数が多いのはI牧場で次に多いのはY牧場であった。O牧場では白斑牛の発生はみられなかった。空間線量率の高いO牧場で白斑牛が発生していないにもかかわらず、空間線量率の低いI牧場、Y牧場では白斑牛が発生していることから、白斑症と低線量率長期被ばくとの関連性は低いと考えられた。

図5より、I牧場とY牧場における白斑牛群と非白斑牛群の血清中Cu濃度に有意な差は認められなかった。一方で、白斑牛が多く発生しているI牧場の血清中Cu濃度はO牧場、Y牧場に比べ有意に低かった($p < 0.05$)。血清中Cu濃度の正常範囲は0.9~1.5 $\mu\text{g/ml}$ である⁸ことから、特にI牧場では血清中Cu濃度が不足している可能性が示唆された。わが国の牧草中Cu含量は大部分が肉用牛のCu要求量以下であるため、肉用牛の微量元素栄養管理においてCuの不足に注意が必要である⁷。I牧場では白斑牛、非白斑牛ともに血清中Cu濃度が他の牧場より有意に低くなった原因として、I牧場の牧草中Cu含量がO牧場、Y牧場の牧草よりも少ない可能性が示唆された。しかしCu欠乏の症状である貧血、運動失調、下痢などその他の症状がみられなかったことから、白斑症はCu欠乏だけが原因ではなく、震災後に急変した飼養環境による様々なストレス(過密状態、低栄養状態の持続、寒冷感作など)やメラノサイトやメラニン色素に対する自己免疫なども影響していると考えられた。

3.4 旧警戒区域内の黒毛和種における被毛中元素の種類および分析値の変動幅

PIXE分析によって27種類の元素が被毛試料から分析された。そのうちすべての試料中に、あるいは高頻度で検出され定量できたのは、Mn、Ga、Br、Sr、Hg、Ti、Cu、Na、Mg、Al、Si、P、Cl、K、Fe、Zn、Ca、Sの18元素であり、18元素における全試料分析値の平均値、最大値、最小値を表1に示した。

表1. 黒毛和種(旧警戒区域内)の74試料におけるPIXE分析値の平均値、最大値および最小値($\mu\text{g/g}$)

	平均値	最大値	最小値		平均値	最大値	最小値
Mn	7.24	1.72×10	1.57	Al	4.81×10^2	1.29×10^3	7.61×10
Ga	2.05	3.05	1.06	Si	8.09×10^2	2.54×10^3	1.61×10^2
Br	7.41	3.02×10	1.44	P	3.82×10^2	6.79×10^2	1.95×10^2
Sr	3.29	6.02	1.80	Cl	5.69×10^2	2.50×10^3	2.38×10
Hg	5.51	1.03×10	2.90	K	4.92×10^2	2.00×10^3	9.41×10
Ti	2.07×10	6.08×10	5.50	Fe	2.31×10^2	6.31×10^2	5.58×10
Cu	1.88×10	3.82×10	5.41	Zn	1.97×10^2	2.84×10^2	1.44×10^2
Na	1.86×10^2	4.06×10^2	7.43×10	Ca	1.49×10^3	2.23×10^3	5.14×10^2
Mg	1.24×10^2	1.93×10^2	7.75×10	S	4.38×10^4	4.86×10^4	3.64×10^4

平均値が最も高かったのはSで、次いでCa、Cl、Siが高値を示した。元素によっては最大値と最小値の変動幅は異なっていた。すなわちSやZnのように最大値が最小値の2倍程度未満というように比較的安定しているものから、最大値が最小値の104.7倍となるClや21.3倍となるKのようにばらつきが著しく大きい元素まで、さまざまであった。分析された元素の中にはGa、Sr、Hgなどのように生体にとって必須とされおらず、栄養生理学的意義についてこれまでほとんど知見の得られていない元素も含まれていた。

放牧主体で飼養される肉用牛(去勢雄または雌牛)の被毛中微量元素含量について既にいくつか報告がある^{1-6,9-12}。本報の結果をそれらの報告と比較したところ、平均値の異なる元素が認められた。本報におけるCu含量はF. Szabo⁴らの報告における値の6から8倍程度であったが、一方F. Szabo⁴やO'Mary⁹らが報告している他の元素の測定結果と本報の結果を比較したところ、似たような傾向を示した。本報における供試牛は、低線量率長期被ばくを受けてはいるが、少なくとも臨床的には健康とみなされた牛であった。そのため、ここでの結果は生理的変動の範囲とみなしてよいと考えられるが、変動も大きく正常範囲も知られていないため、更なる検証が求められる。

3.5 旧警戒区域内の2牧場における黒毛和種と乳牛の被毛中元素含量の比較

旧警戒区域内のO牧場とI牧場で採取した被毛中の元素と、ホルスタイン種搾乳牛の被毛中元素に関する

報告⁶で共に定量された元素について比較した(図7)。グラフには平均値と、エラーバーを用いて最大値から最小値までの幅を表した。

I牧場とO牧場の被毛中元素含量に大きな違いはみられなかった。両牧場と乳牛⁶の被毛中元素含量を比較したところ、AlとFe含量は黒毛和種(O牧場、I牧場)と比較して乳牛の被毛中に少ない傾向がみられた。また、Cl、K含量は黒毛和種(O牧場、I牧場)と比較して乳牛の被毛中に少ない傾向がみられた。また、今回測定した黒毛和種の被毛のみでGa、Br、Hg、Ti、Siが高頻度で検出されたのに対し、乳牛の被毛からはSe、Pb、Rbが高頻度で検出された。このように、品種間により検出された元素の種類が異なっていた。

O'Mary¹¹らはホルスタインとヘレフォードの被毛中元素含量の報告で、品種間で被毛中元素含量が異なる可能性を示した。すなわち今回の測定結果のように、黒毛和種とホルスタイン種搾乳牛の間で違いがみられたのは品種による違いが原因であると考えられた。また、被毛中元素含量は飼料からの摂取量に影響を受けることが知られており、ホルスタイン種搾乳牛は黒毛和種に比べ泌乳のための採食量およびミネラル摂取量が増加するためK、Clが黒毛和種よりも高くなり、また黒毛和種の飼料中Al含量が高かったために、乳牛の被毛中含量に比べて黒毛和種の被毛中Al含量が高くなったと考えられた。また乳牛においては、泌乳により相当量のミネラルを体外に排出するため、乳汁中にFeが移行し、被毛中のFe含量が黒毛和種よりも低値を示したと考えられた。同じく乳汁中に排泄される元素であるCaについては体内含量の恒常性が強く保たれているために生理的な変動幅が小さく、各種要因の影響を受けなかったと考えられた。加えて、採取する季節によっても被毛中元素含量が異なる報告があり^{9,10,12}、これら様々な要因により、本報における被毛中元素含量の平均値が乳牛被毛⁶と必ずしも一致しなかったと考えられた。

また、本報における黒毛和種の被毛中元素含量と乳牛の被毛中元素含量における報告⁶については、共にPIXE法を用いて測定したが、被毛の処理方法が異なっていた。本報では被毛を強く攪拌・水洗しただけであったが、乳牛の被毛中元素含量における報告⁶では攪拌・水洗後にアセトン清拭をしていた。この処理方法の違いにより土壌由来の元素の混入具合が異なったり、アセトンにより一部の元素が溶出している可能性があるため、結果の考察については留意する必要があると考えられる。

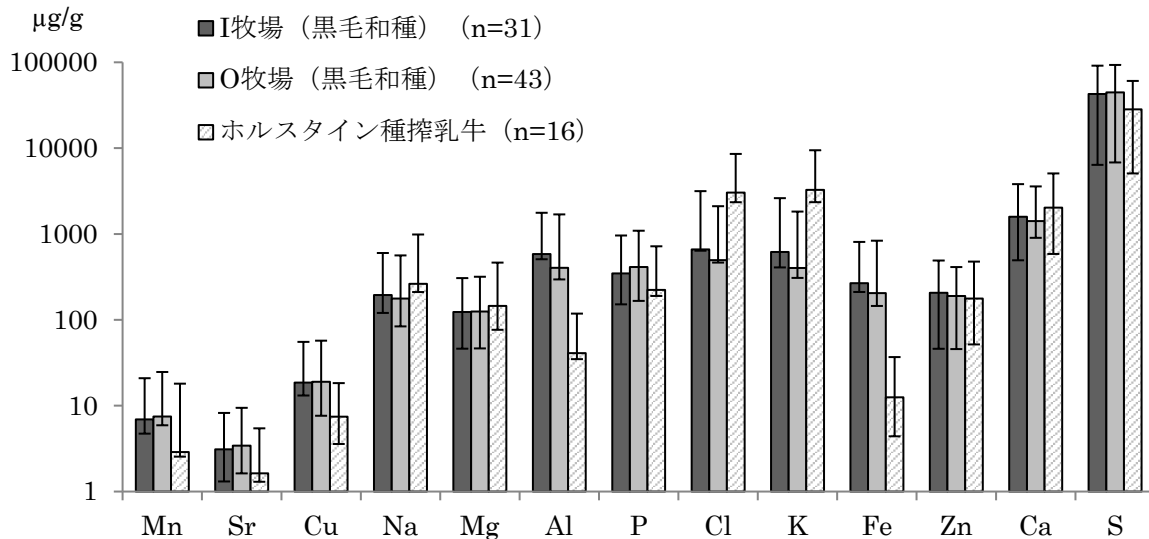


図7. 被毛中元素含量の比較

4 まとめ

旧警戒区域内で飼養継続中の肉用牛(黒毛和種)において、PIXE法を用いて血清・被毛中各種元素濃度を測定し、評価した。

全123試料の血清試料から安定的に定量された元素はBr、Cu、Na、P、Cl、K、Fe、Zn、Ca、Sの10

元素であった。PIXE 分析で得られた旧警戒区域内の黒毛和種の血清中元素濃度について、雌雄差、年齢差はないと考えられた。旧警戒区域内の黒毛和種と、原発事故による影響がないとされる青森県十和田市の北里大学で飼養している黒毛和種の血清中元素濃度を比較したところ、旧警戒区域内の黒毛和種で Cu 濃度が有意に低く、Na、S 濃度は有意に高かったが、これは摂取している飼料の違いが影響していると考えられた。また、旧警戒区域内において白斑牛の発生と低線量率長期被ばくとの関連性は低かった。旧警戒区域内の黒毛和種を牧場ごとに分け、各牧場間での Cu 濃度について検証したところ、白斑牛が多く発生している I 牧場で、O 牧場、Y 牧場に対して有意に Cu 濃度が低かったことから、Cu 欠乏が白斑症の発生に関与している可能性が考えられた。しかし一般的に Cu 欠乏により引き起こされる臨床症状(貧血、運動失調、下痢など)は白斑牛において認められていないことから、Cu 欠乏は白斑症の直接的な原因ではなく、震災後に急変した飼養環境に基づく様々なストレス(過密状態、低栄養状態の持続、寒冷感作など)やメラノサイトやメラニン色素に対する自己免疫なども影響していると考えられた。

PIXE 法により全 77 試料の被毛試料から安定的に定量された元素は Mn、Ga、Br、Sr、Hg、Ti、Cu、Na、Mg、Al、Si、P、Cl、K、Fe、Zn、Ca、S の 18 元素であった。本報の結果より、被毛中元素含量は生理的な範囲でも相当な範囲で変動することが示唆された。品種間や処理方法の違いにより黒毛和種と乳牛の被毛⁶中に検出される元素が異なっていると考えられた。黒毛和種の被毛が乳牛の被毛の報告⁶よりも Cl、K 含量が低く、Al 含量が高かったが、これは摂取している飼料の違いが影響していると考えられた。Fe 含量は黒毛和種(O 牧場、I 牧場)と比較して乳牛の被毛中に少ない傾向がみられたが、これは乳汁中に Fe が移行するため乳牛の被毛中 Fe 含量は黒毛和種に比べて低くなったと推察された。被毛の最適な処理方法も含めてデータを蓄積することで各要因が被毛中含量に及ぼす影響をさらに検討する必要がある。

現在も旧警戒区域内で飼育されている牛の健康状態は概ね良好であり、低線量被ばくの影響を示唆する明確な変化は認められていない。福島第一原発事故により特に線量の高い初期被ばくを含めて、24 時間 365 日放牧されて被ばくを受け続けた牛たちは、長期被ばくを研究する上で貴重な研究対象であり、今後も長期間的に及ぶ低線量被ばくとその影響評価は継続される必要がある。

引用文献

- 1) 志賀隴郎, 第 3 章・代謝の生理と内分泌制御. 第 4 節・無機物代謝, 反芻動物の栄養生理学(佐々木健康之監修). pp-pp. 農山漁村文化協会発行. 東京.
- 2) Hidiroglou, M. and Spurr, D. T., Influence of cold exposure and diet change on the trace element composition of hair from Shorthorn cattle, *Can. J. Anim. Sci.*, 55,31-38(1975)
- 3) Fisher, D. D., Wilson, L. L., Leach, R. M. and Scholz, R. W., Switch hair as indicator of magnesium and copper status of beef cows, *Am. J. Vet. Res.*, 46, 2235-2240(1985)
- 4) Szabb, F., Zele, E., Polgar, J. P. and Wagenhoffers, Z., Study on peat bog soil pastures for sustainable development beef cattle farming, *Livest. Prod. Sci.*, 61, 253-260(1999)
- 5) 青木康浩, 安藤貞,. 乳用牛の栄養条件と体毛 PIXE 分析値との関係. NMCC 共同利用研究成果報文集. 9: 126 - 131. (2001)
- 6) 青木康浩, 安藤貞,. 乳牛の被毛 PIXE 分析値の生理的変動. NMCC 共同利用研究成果報文集. 10: 149 - 153 (2002)
- 7) 農業・食品産業技術総合研究機構編, 日本飼養標準(2008 年版). 肉用牛. pp-pp. 中央畜産会発行. 東京. (2008)
- 8) 日本獣医内科学アカデミー編, 獣医内科学第 2 版大動物編, 文永堂出版株式会社発行
- 9) O'Mary, C. C., Butts Jr., W. T., Reynolds, R. A. and Bell, M. C., Effects of irradiation, age, season and color on mineral composition of Hereford cattle hair, *J. Anim. Sci.*, 28, 268-271(1969)
- 10) Combs, D. K., Goodrich, R. D. and Meiske, J. C., Mineral concentrations in hair as indicators of

mineral status : A review, *J. Anim. Sci.*, 54, 391-398(1982)

- 11) O'Mary, C. C., M. C. Bell, N. N. Snead and W. T. Butts, Jr., Influence of ration copper on minerals in the hair of Hereford and Holstein calves. *J. Anim. Sci.* 31:626. (1970)
- 12) 青木康浩, 安藤貞,. 乳牛被毛の PIXE 分析値に対する各種要因の影響. *NMCC 共同利用研究成果報文集.* 11: 79 - 84 (2003)

PIXE analysis of Japanese black cattle continuously kept in the former evacuation zone

K. Katagiri¹, T. Kojima¹, S. Wada¹, K. Sera², I. Sato³, T.Kakizaki¹ and M.Natsuhori¹

¹School of Veterinary Medicine, Kitasato university
35-1 Higashi23bantyo, Towada, Aomori 034-8628, Japan

²Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

³School of Agriculture, Iwate University
2-18-8 Ueda, Morioka 020-8550, Japan

Abstract

On March 11th 2011, the Great East Japan Earthquake occurred, which led to large amounts of radioactive substances being released into the environment, due to the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant (FNPP) accident. In this study our main objection was to use PIXE analysis to measure trace elements in serum and hair samples, from the Japanese black cattle that have been kept continuously in the former evacuation zone. We investigated on the correlation between continuous low-dose exposure and vitiligo to the trace elements found in the serum samples, and also compared the amount of each trace element in the hair samples provided to the already reported amounts in beef and dairy cattle. From the PIXE analysis of serum samples collected from the Japanese black cattle, we found out that there was no trace element concentration disparity in different sex and age. When we compared the serum samples between the Japanese black cattle kept at Kitasato University (in Towada city, Aomori, in the area that is said to have not been affected by the power plant accident) and the cattle in former evacuation zone, Cu concentration from Fukushima was significantly lower and Na and S concentration from Fukushima was significantly higher than those taken from Towada campus. This was supposed to be due to the difference in forage or diet that they have been taken. Also, there was no significant correlation between the dose rate exposure and vitiligo. The Cu concentrations from the serum was significantly lower in the ranch where cattle with multiple white spots were frequently found. This may suggest that vitiligo and low Cu may have some correlation. However, Cu deficiency normally causes other symptoms, but in these vitiligo cattle there was no symptoms. The Cu deficiency is not solely the direct cause, but this might have contributed one of the multiple stressors after the severe environmental changes after the earthquake. In 77 hair samples collected, the trace elements that were frequently found were 18 elements namely Mn, Ga, Br, Sr, Hg, Ti, Cu, Na, Mg, Al, Si, P, Cl, K, Fe, Zn, Ca, and S. The trace elements levels greatly differ in each cattle, and may have also varied with how the samples were treated and the samples by breed. The Japanese black cattle hair samples had lower Cl and K and higher Al than those from the dairy cattle. This was supposed to be the difference of the breed and in the forage they ingested. The Fe concentration was lower in the hair from daily cow. This was most likely due to the Fe is transferred into the milk from the dairy cow.