

6.1.2 低線量率ガンマ線連続照射オス親マウスの仔・孫への影響

-生殖細胞突然変異の検索-

Transgenerational Effects in Mice Exposed to Continuous Low dose-rate Gamma-rays - Analysis of Germ Cell Mutation -

小倉 啓司, 藤川 勝義, 田中 イグナシヤ, 一戸 一晃, 田中 聡, 小村 潤一郎
生物影響研究部

Keiji OGURA, Katuyoshi FUJIKAWA, Ignacia TANAKA, Kazuaki ICHINOHE,
Satoshi TANAKA, Jun-ichiro KOMURA
Department of Radiobiology

Abstract

Transgenerational effects of continuous low dose-rate (LDR) gamma-ray irradiation of male mice have not been well studied. The incidence of copy number aberrations (CNAs) in the progeny of male C57BL/6J mice continuously exposed to LDR (20 mGy/22 h/day, 1 mGy/22 h/day, 0.05 mGy/22 h/day) gamma-rays for 400 days (total dose: 8000 mGy, 400 mGy, 20 mGy) and to high dose-rate (HDR, 0.8 Gy/min) gamma-rays (total dose: 4000 mGy) were analyzed. Using oligo-microarray CGH (Agilent Technologies), we analyzed a total of 461 genomes (111 progenies from 20 sires in the 20 mGy/22 h/day irradiated group, 48 progenies from 7 sires in the 1 mGy/22 h/day irradiated group, 46 progenies from 6 sires in the 0.05 mGy/22 h/day irradiated group, 6 progenies from 1 sire in the 4000 mGy HDR irradiated group and 140 progenies from 21 pairs of parents in the non-irradiated group). Progenies from the 20 mGy/22 h/day, 1 mGy/22 h/day irradiated mice had significantly higher frequencies of genomic aberrations than progenies from the non-irradiated mice. These aberrations were all verified by the TaqMan Copy Number Assay as "new mutations".

1. 目的

低線量率 γ 線を長期連続照射したオスマウスと非照射メスマウスとを交配し、その仔孫を得、これらのマウスより採取された尾組織試料を用いて、染色体の欠失・挿入等ゲノムの変化を網羅的に高い精度で解析することによりオス親マウスへの低線量率放射線長期連続照射が仔孫に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。低線量放射線生物影響実験調査（継世代影響・線量率効果解析）の初年度にあたる今年度の調査では前年度までの低線量放射線生物影響実験調査（継世代影響とその遺伝子変異に係る実験；平成16～25年度）の結果を全く別の方法による結果と対比することにより、手法の信頼性を

確認する。さらに、線量率効果解析のため、広範囲の線量率（より低い線量率および高線量率）への当該手法の適用を検討することとした。

2. 方法

目的のデータを得るための至適放射線照射線量および実験手法を決定するための予備実験として、高線量率（0.8 Gy/分） γ 線を総線量4 Gyまで照射したオスC57BL/6J Nrsマウスを照射10週間後に非照射メスC57BL/6J Nrsマウスと交配して得た仔マウス（この群を0.8 Gy/分照射群と呼ぶ）及び昨年度までにサンプリングした1 mGy/22時間/日の低線量率で γ 線を400日間連続照射したオスC57BL/6J

Nrsマウスと非照射メスC57BL/6J Nrsマウスとを交配して得られた仔マウス（この群を1 mGy/日照射群と呼ぶ）から尾組織をサンプリングした。これらの尾組織から抽出したゲノムDNAを用い、マウスゲノム全体をほぼ均等にカバーした1Mフォーマットアレイ（1枚のスライド上に約60塩基長のオリゴヌクレオチド約100万種類が搭載されている）によるオリゴマイクロアレイCGH法による変異解析を行い、仔マウスゲノムに新たに生じた欠失等の変異をスクリーニングした。このスクリーニングにおいて連続した複数のプローブが異常値を示す領域を「Type L異常値領域」と定義し、オス親マウスやメス親マウスに見られる変異と仔マウスに見られる変異のゲノム上での位置を比較することにより、仔マウスだけに見られる（新規の）「Type L異常値領域」を分別した。定量PCR法の一つであるTaqMan Copy Number Assay (Life technologies)を利用して、ここで見つかった（新規の）「Type L異常値領域」が「新規変異」であることを検証した。

3. 成果の概要

0.8 Gy/分照射群のオス親とメス親1対及びその仔マウス6匹及び1 mGy/22時間/日照射群のオス親

とメス親7対及びその仔マウス48匹についてオリゴマイクロアレイCGH法によるスクリーニングを実施した。その結果、1 mGy/22時間/日照射群の仔48匹中5匹（10.4 %）で「Type L異常値領域」を検出したが、0.8 Gy/分照射群の仔6匹の解析では全く検出されなかった（Table 1）。

これまでのデータをまとめると、「Type L異常値領域」の発生頻度は20 mGy/22時間/日照射群では9.9%、1 mGy/22時間/日照射群では10.4%、0.05 mGy/22時間/日照射群では2.1%、非照射対照群では2.1%と推定され、20 mGy/22時間/日照射群と1 mGy/22時間/日照射群で有意（ $P < 0.05$ 、イエーツの補正カイ二乗検定）に高い発生率であった。さらに、これらの「Type L異常値領域」はTaqMan Copy Number Assayで全て「新規突然変異」であることが確認できた。また、「新規突然変異」を持つ20 mGy/22時間/日照射群11匹中3匹、非照射対照群4匹中2匹の仔マウスから孫マウスが生まれており、これら孫マウス5匹についてTaqMan Copy Number Assayで確認したところ、仔マウスに認められた「新規突然変異」は、孫マウスに遺伝していることが確認できた（Fig 1）。

Table 1 Number of mice with aberrations detected by oligo-microarray CGH

		No. of F ₁ mice analyzed	No. of mice with aberrations
20 mGy/ 22h/day irradiated group	♀	48	3 (6.3 %)
	♂	63	8 (12.7 %)
	♀+♂	111	11 (9.9 %)
1 mGy/ 22h/day irradiated group	♀	27	4 (14.8 %)
	♂	21	1 (4.8 %)
	♀+♂	48	5 (10.4 %)
0.05 mGy/ 22h/day irradiated group	♀	21	1 (4.7 %)
	♂	25	0 (0.0 %)
	♀+♂	46	1 (2.1 %)
0.8 Gy/ min (4 Gy) irradiated group	♀	5	0 (0.0 %)
	♂	1	0 (0.0 %)
	♀+♂	6	0 (0.0 %)
Non irradiated group	♀	73	1 (1.4 %)
	♂	67	2 (4.4 %)
	♀+♂	140	3 (2.1 %)

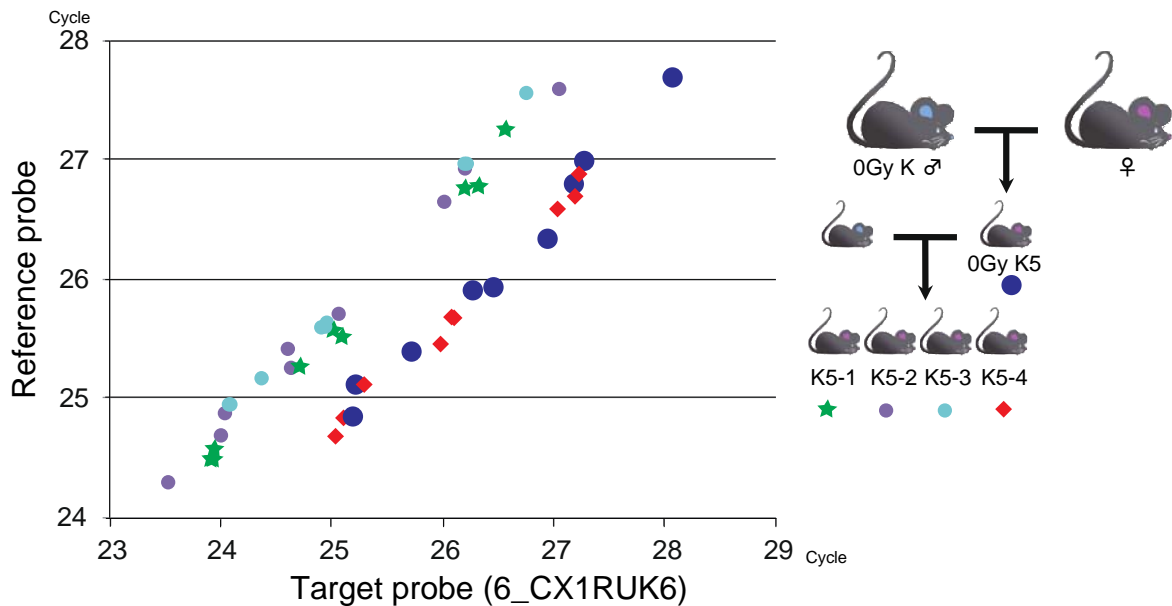


Fig. 1 TaqMan® Copy Number Assay showed that one of the F2 mice, K5-4 (◆) had only one copy of the genomic region 6_CX1RUK6, as well as the F1 mouse, 0GyK5 (●), whereas, the other litter mates K5-1(★), K5-2(●), K5-3(●) mice had two copies of the region. The transferrin receptor (Tfr) gene was used as the copy number reference.