

## 2.1.2 継世代影響・線量率効果解析 -遺伝子変異検索-

### Transgenerational Effects in the Progeny of Mice Exposed to Acute High and Chronic Low Dose-rate Gamma-rays - Germ Cell Mutation Analyses -

小倉 啓司, 田中 聡, 小村 潤一郎  
生物影響研究部

Keiji OGURA, Satoshi TANAKA, Jun-ichiro KOMURA  
*Department of Radiobiology*

#### Abstract

Transgenerational effects of low dose-rate (LDR) radiation have not been well studied. We have been estimating the incidence of copy number mutations in the progeny of male C57BL/6J mice continuously exposed to LDR (20 mGy/day, 1mGy/day, 0.05mGy/day) gamma-rays for 400 days (total respective doses: 8000 mGy, 400 mGy, 20 mGy) and to high dose-rate (HDR, 770 mGy/min) gamma-rays (total dose: 3000 mGy). This year, we analyzed 22 F1 mice from the parents in the HDR-irradiated group by use of oligo-microarray CGH to screen for copy number mutations, resulting in a total of 59 F1 mice being analyzed in this group. Using quantitative PCR, we tested all of the candidate mutations found in these 59 F1 mice to identify “real new mutations”. The frequency of F1 mice containing mutations in this group was estimated to be 11.9%.

#### 1. 目的

低線量率放射線長期連続照射及び高線量率放射線急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及び高線量率放射線急照射が子孫に及ぼす影響と線量率による影響の違いを明らかにすることを目的とする。

#### 2. 方法

オスC57BL/6Jマウスに高線量率 (770 mGy/分) ガンマ線を総線量3000 mGyまで照射し、照射10週間後に非照射メスC57BL/6Jマウスと交配して得られた仔マウスについて、これらの尾組織から抽出したゲノムDNAを用い、マイクロアレイCGH法によって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。1次スクリーニングはマウスゲノム全

体をプローブ間隔約2 kbで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プローブ約100万種類が配置されている) によって行い、2次スクリーニングは1次スクリーニングで異常値が観察されたプローブすべてに対して、それぞれのプローブの隣接領域に高密度にプローブを設計して行った。スクリーニングで検出された「異常値領域」は、便宜的に、「1次スクリーニングで異常値が観察されたプローブ」複数が見つかった「異常値領域」を「Type L異常値領域」、「1次スクリーニングで異常値が観察されたプローブ」が単独で見つかった「異常値領域」を「Type S異常値領域」に区別した。また、マイクロアレイCGH法で得られた「Type L異常値領域」及び「Type S異常値領域」のすべてについて、マイクロアレイCGH法とは原理が全く異なる定量PCR法の1種であるTaqMan Copy Number Assayによる確

認作業を行い、確認されたものを真の「新規変異」とした。

### 3. 成果の概要

本年度は、高線量率 770 mGy/分 (総線量 3000 mGy) 照射群 4 つがい (F0 オス、F0 メス) とその仔マウス (F1) 22 匹のゲノム DNA についてマイクロアレイ CGH 法によるスクリーニングを実施した。昨年度までの結果を加えると、高線量率 3000 mGy 照射群は、11 つがい (F0 オス、F0 メス) の仔マウス (F1) 59 匹のゲノム DNA についてマイクロアレイ CGH 法によるスクリーニングが終了したことになる。これら 59 匹の「Type L 異常値領域」及び「Type S 異常値領域」すべてについて、定量 PCR 法による確認作業を本年度実施した。

Table 1 に、定量 PCR 法で確認できた「新規変異」

を持つマウスの数を示す。(Table 1 には、昨年度までに行った定量 PCR 法による確認作業の結果 (20 mGy/日照射群及び非照射対照群) も示している。) 現時点では、高線量率 3000 mGy 照射群と非照射対照群の間で、変異を持つマウスの割合の違いは検出されていない。

Table 2 には、変異の種類 (欠失、重複) 及び 1 匹当たりの変異の数に関して分類した結果を示す。1 匹のマウスに 4 個以上の変異を持つマウスは、以前報告した様に非照射対照群や低線量率放射線照射群でも見られるが、高線量率照射群でも見られることを今回確認できた。このような高頻度変異は、偶然生じる現象であって放射線照射とは無関係である可能性が高いことが推測される。また、現時点までに高線量率 3000 mGy 照射群で見つかった変異の全てが欠失であった。

Table 1 Number of F1 mice with mutations screened by oligo-microarray CGH and confirmed by quantitative PCR

		No. of mice analyzed	No. of mice with mutation(s)		
			Type L	Type S	Type L+S
770 mGy/min (3000 mGy)	male	31	3 (9.7 %)	2 (6.5 %)	5 (16.1 %)
	female	28	2 (7.1 %)	0 (0.0 %)	2 (7.1 %)
	Total	59	5 (8.5 %)	2 (3.4 %)	7 (11.9 %)
20 mGy/day (8000 mGy)	male	75	13 (17.3 %)	4 (5.3 %)	17 (22.7 %)*
	female	67	9 (13.4 %)	8 (11.9 %)	17 (25.4 %)*
	Total	142	22 (15.5 %)*	12 (8.5 %)	34 (23.9 %)**
Non-irradiated	male	75	4 (5.3 %)	2 (2.7 %)	6 (8.0 %)
	female	81	5 (6.2 %)	5 (6.2 %)	10 (12.3 %)
	Total	156	9 (5.8 %)	7 (4.5 %)	16 (10.3 %)

\*P<0.05, \*\*P<0.01

Table 2 Types of mutations (deletions and duplications; the number of mutations per mouse)

		770 mGy/min	P	20 mGy/day	P	Non-irradiated
No. of mice analyzed	male	31		75		75
	female	28		67		81
	Total	59		142		156
No. of mice with mutation(s)	male	5 ( 16.1 %)	0.37	17 ( 22.7 %)	0.01	6 ( 8.0 %)
	female	2 ( 7.1 %)	0.68	17 ( 25.4 %)	0.04	10 ( 12.4 %)
	Total	7 ( 11.9 %)	0.92	34 ( 23.9 %)	<0.01	16 ( 10.3 %)
with 4 or more mutations	male	1		3		1
	female	1		2		2
	total	2		5		3
with one or two mutation(s)	male	4		14		5
	female	1		15		8
	Total	5		29		13
with deletion(s)	male	4 ( 12.9 %)	0.81	14 ( 18.7 %)	0.01	4 ( 5.3 %)
	female	1 ( 3.6 %)	0.79	13 ( 19.4 %)	0.03	6 ( 7.4 %)
	Total	5 ( 8.5 %)	0.34	27 ( 19.0 %)	<0.01	10 ( 6.4 %)
with duplication(s)	male	0		0 ( 0.0 %)		1 ( 1.3 %)
	female	0		1 ( 1.5 %)		2 ( 2.5 %)
	Total	0		1 ( 0.7 %)		3 ( 1.9 %)