

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 estimated the incidence of copy number variations (CNVs) in the progeny born from 65 week-old male C57BL/6J mice after continuous exposure to gamma-rays at several LDRs (0.05, 1 or 20 mGy/day for 400 days to total doses of 20, 4000 or 8000 mGy, or 20 mGy/day for 150 days to a total dose of 3000 mGy) or from 18 week-old male C57BL/6J mice after exposure to a high dose-rate (HDR) of 770 mGy/min (total dose 3 Gy). This year, using array CGH to screen for CNVs, we analyzed the progeny born from male mice after exposure to a LDR of 20 mGy/day (total dose 3000 mGy) and the progeny born from male mice after exposure to a LDR of 1 mGy/day (total dose 400 mGy). To identify “real new mutations,” we tested all candidate CNVs found using quantitative PCR and estimated that the frequencies of F1 mice containing CNVs in these groups are 30.0% and 11.0%. So far, we have observed a statistically significant increase in the frequency of F1 mice with CNVs born from male mice exposed to 20 mGy/day LDR radiation for 400 days (total dose 8000 mGy).

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、欠失・重複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のゲノム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マウスに対する高線量率ガンマ線照射の10週間後、もしくは低線量率ガンマ線長期照射の終了直後に非照射メスC57BL/6Jマウスと交配して得られた仔マウスについて、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「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、20 mGy/日低線量率照射群（集積線量3000 mGy）の仔マウス（F1）16個体のゲノムDNAと、前調査で得られた0.05 mGy/日低線量率照射群（集積線量20 mGy）の仔マウス54個体のゲノム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。これら70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実施した。調査最終年度であることから、これまでに得たデータの総合解析を行った。

表1には、マイクロアレイCGH法により検出された変異の候補及びそのうち定量PCR法により確認できた新規変異（ほとんどは欠失、[]内は重複）の数を以前に得た非照射群と20 mGy/日低線量率照射群（集積線量8000 mGy）の結果とともに示した。0.05 mGy/日低線量率照射群（集積線量400 mGy）については、以前に得た46個体分と今年度得た54個体分の結果の合算である。20 mGy/日低線量率照射群（集積線量3000 mGy）については、昨年度得た20個体分と今年度得た16個体分の結果の合算である。

表2には、定量PCR法で確認できた新規変異（[]内は重複）を持つマウスの数をこれまでに得たすべての実験群の結果とともに示した。Fisherの正確確率検定を用いた場合、非照射対照群と比較して、20 mGy/日低線量率照射群（集積線量8000 mGy）では有意な変異の増加（ $P<0.05$ ）、0.05 mGy/日低線量率照射群（集積線量400 mGy）では有意な変異の減少（ $P<0.05$ ）が検出された。低線量率照射群における線量や線量率と変異の率との関係、高線量率照射群で影響が検出されなかったこと、それぞれの変異の詳細な構造などについては、今後さらに調査を行う必要がある。

Table 1 The numbers of the (candidate) CNVs detected by array CGH and confirmed by qPCR

1次スクリーニング陽性プローブ数	2次スクリーニング陽性プローブ数	非照射		20 mGy/日 (8000 mGy)		20 mGy/日 (3000 mGy)		0.05 mGy/日 (20 mGy)	
		CGHにより検出	PCRにより確認	CGHにより検出	PCRにより確認	CGHにより検出	PCRにより確認	CGHにより検出	PCRにより確認
≥2 (Type L)		9	9 [1]	22	22 [1]	5	5	2	2
	≥5	1	1 [1]	5	5	2	2	0	0
1 (Type S)	4	1	0	2	1	0	0	4	1
	3	3	1 [1]	2	1	1	1	2	0
	2	21	3	3	2	10	0	9	0
	(Total)	26	5 [2]	12	9	13	3	15	1
(Type L + S)		35	14 [3]	34	31 [1]	18	8	17	3
(解析仔マウス数)		156		142		36		100	

1匹の中にType Sが4個以上含まれる個体が、それぞれの群に2匹、4匹、1匹、0匹あるが、この表では除外した。各群には変異が2個含まれるマウスがそれぞれ1匹、3匹、1匹、0匹見つかった。[]内は重複の数(内数)。

Table 2 The numbers of F1 mice with CNVs

		解析した仔マウス数	新規変異を持ったマウスの数 (%)		
			Type L	Type S	Type L+S
非照射	メス	81	5 (6.2)	5 (6.2) [2]	10 (12.3) [2]
	オス	75	4 (5.3) [1]	2 (2.7)	6 (8.0) [1]
	メス+オス	156	9 (5.8) [1]	7 (4.5) [2]	16 (10.3) [3]
0.05 mGy/日 (20 mGy)	メス	46	2 (4.3)	0 (0.0)	2 (4.3)
	オス	54	0 (0.0)	1 (1.9)	1 (1.9)
	メス+オス	100	2 (2.0)	1 (1.0)	3 (3.0) *
1 mGy/日 (400 mGy)	メス	43	2 (4.7)	4 (9.3) [2]	6 (14.0) [2]
	オス	57	4 (7.0) [1]	1 (1.8)	5 (8.8) [1]
	メス+オス	100	6 (6.0) [1]	5 (5.0) [2]	11 (11.0) [3]
20 mGy/日 (3000 mGy)	メス	18	3 (16.7)	2 (11.1)	4 (22.2)
	オス	18	1 (5.6)	1 (5.6)	2 (11.1)
	メス+オス	36	4 (11.1)	3 (8.3)	6 (16.6)
20 mGy/日 (8000 mGy)	メス	67	9 (13.4) [1]	7 (10.4)	16 (23.9) [1]
	オス	75	13 (17.3)	5 (6.7)	16 (21.3)
	メス+オス	142	22 (15.5) * [1]	12 (8.5)	32 (22.5) * [1]
770 mGy/分 (3000 mGy) 交配週齢: 18	メス	28	2 (7.1)	0 (0.0)	2 (7.1)
	オス	31	3 (9.7)	2 (6.5)	5 (16.1)
	メス+オス	59	5 (8.5)	2 (3.4)	7 (11.9)
770 mGy/分 (3000 mGy) 交配週齢: 65	メス	25	1 (4.0)	1 (4.0)	2 (8.0)
	オス	19	0 (0.0)	1 (5.3) [1]	1 (5.3) [1]
	メス+オス	44	1 (2.3)	2 (4.5) [1]	3 (6.8) [1]

表2 前調査(平成16~25年度)および今期調査(平成26~令和2年度)においてマイクロアレイCGH法と定量PCR法により明らかになった新規変異を持つマウス数

複数の変異を持つマウスは、この表においてはそれぞれ1匹としてカウントされている。[]内は重複の数、残りは欠失。*P<0.05 (Fisherの正確確率検定)。

The numbers in brackets indicate those of mice with duplications (internal numbers). *P<0.05, **P<0.01