

2. 1. 2 低及び高線量率ガンマ線照射オス親マウスの子孫への影響

-生殖細胞突然変異の検索-

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 analyzing the incidence of copy number aberrations 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 13, 31, and 16 progenies from the parents in the HDR-irradiated group, the 20 mGy/day LDR-irradiated group, and the non-irradiated group, respectively, using oligo-microarray CGH (Agilent Technologies). The accumulated data of the 20 mGy/day LDR-irradiated group and the non-irradiated group were deposited into the Gene Expression Omnibus (GEO), a public genomics data repository in the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

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、オリゴマイクロアレイ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全てに対して、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。このようにして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複数のプローブ」が並んで見つかった「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、低線量率20 mGy/日 (総線量8000 mGy) 照射群と非照射対照群からオリ

ゴマイクロアレイ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、オリゴマイクロアレイ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による検証を行った。

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 2つがい（F0 オス、F0 メス）とその仔マウス（F1）13匹のゲノムDNAについてオリゴマイクロアレイCGHを実施した。昨年度までの結果を加えると、3 Gy 急照射群は7つがい（F0 オス、F0 メス）とその仔マウス（F1）37匹となる。解析の結果、37匹の仔マウス中「Type L異常値領域」が3匹に検出されたが、非照射群と比較すると有意な差は見られなかった。しかし、検索数がまだ少なく検出感度が小さいことから、検索数を増やしてスクリーニングを継続する必要があると考えられた。

また、「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」で得られたサンプルについて、本年度は、20 mGy/日照射群 31匹、非照射対照群 16匹分のゲノムDNAについてオリゴマイクロアレイCGHを実施した。本年度までの合計で、20 mGy/日照射群 25つがい（F0 オス、F0 メス）50匹とその仔マウス（F1）142匹、

非照射対照群 25つがい（F0 オス、F0 メス）50匹とその仔マウス（F1）156匹、合計 398 匹分のデータが得られたので、これらを改めて解析したところ、これまでの結果と同じく、20 mGy/日照射群では非照射群と比較し「Type L異常値領域」を持つマウスの発生頻度が有意に高いことが再確認された。Table 1にはこれまでに行ったオリゴマイクロアレイCGH法によるType L異常値領域の解析結果をまとめた。これらのオリゴマイクロアレイCGHのデータについては、国際的な遺伝情報のデータベースに供託を行った。

昨年度は、「Type L異常値領域」はオリゴマイクロアレイCGH法の結果でほぼ十分であるが、「Type S異常値領域」には偽陽性が含まれるため、定量PCR法による検証作業の必要性があることを示した。本年度は、定量PCR法による検証作業をさらに進めて、20 mGy/日照射群の18匹、非照射対照群の13匹で検出された異常値領域について検証を行った。この検証作業については、高頻度変異マウスを除いては、おおむね完了した。Table 2は、高頻度変異マウスを除く定量PCR法によって確認された異常値領域である。異常値領域の多くは欠失であって、欠失は非照射対照群に比べ20 mGy/日照射群で有意に多いが、欠失の大きさの分布については両群間で違いは認められなかった。

Table 1 Accumulated results of the detection of Type L aberrations by oligo-microarray CGH

		No. of mice examined using oligo-microarray assay	No. of mice with type L aberrations (percentage)	
20 mGy/day (Total dose 8000 mGy)	Female	67	9	(13.4%)
	Male	75	13	(17.3%)
	TOTAL	142	22	(15.5%)
1 mGy/day (Total dose 400 mGy)	Female	35	2	(5.7 %)
	Male	25	3	(12.0%)
	TOTAL	60	5	(8.3 %)
0.05 mGy/day (Total dose 20 mGy)	Female	21	1	(4.8 %)
	Male	25	0	(0.0 %)
	TOTAL	46	1	(2.2 %)
770 mGy/min (Total dose 3000 mGy)	Female	15	1	(6.7%)
	Male	22	2	(9.1%)
	TOTAL	37	3	(8.1 %)
Non-irradiated	Female	81	5	(6.2 %)
	Male	75	4	(5.3 %)
	TOTAL	156	9	(5.8 %)

Table 2 Accumulated results of the verification of aberrations by TaqMan Copy Number Assays

	No. of probes with aberrations	No. of aberrations detected by oligo-microarray CGH		No. of aberrations verified by TaqMan® Copy Number Assays	
		Non-irradiated	20 mGy/day	Non-irradiated	20 mGy/day
Type L		9	22	9	22
Type S	≥5	1	5	1	5
	4	1	3	0	1
	3	3	2	1	1
	2	12	8	3	2
	Total	17	18	5	9
TOTAL (Type L+S)		26	40	14	31