# 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). 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 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、染色体の欠失・挿入等ゲノム の変化(copy number variations, CNVs)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マウスに高線量率ガンマ線を照射 10週間後、もしくは低線量率ガンマ線を照射終了直 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、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、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、20 mGy/日低線量率照射群(集積線量 3000 mGy)の仔マウス(F1)20 個体のゲノム DNA と、前調査で得られた1mGy/日低線量率照射群(集 積線量 400 mGy)の仔マウス 40 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 60 匹の「Type L 異常値領 域」及び「TypeS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。

Table 1 には、アレイ CGH により検出された変異 の候補及びそのうち定量 PCR により確認できた新 規変異([]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。1mGy/日低線量率照射群(集 積線量 400 mGy) については、以前に得た 60 個体分 と今年度得た40個体分の結果の合算である。

Table 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。現時点では、 非照射対照群と比較して有意な変異の増加を示すも のは20mGy/日低線量率照射群(集積線量8000mGy) だけである。

Number of	Number of	Nieve investigate al	20 mGy/day	20 mGy/day				
positive	positive	INON-Irradiated	(8000 mGy)	(3000 mGy)				
probes	probes							

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

Number of	Number of	Non-irradiated		20 mGy/day			20 mGy/day				1 mGy/day			
positive	positive				(8000 mGy)			(3000 mGy)			(400 mGy)			
probes	probes													
in 1st	in 2nd	Detected	Confirmed		Detected	Confirmed		Detected	Confirmed		Detected	Conf	imed	
screening	screening	by CGH	by qPCR		by CGH	by qPCR		by CGH	by qPCR		by CGH	by q	PCR	
≧2 (Type L)		9	9 [1]		23	23 [1]		5	5		6	6	[1]	
1 (Type S)	≧5	1	1 [1]		5	5		2	2		0	0		
	4	1	0		2	1		0	0		1	1		
	3	3	1 [1]		2	1		1	1		4	2		
	2	21	3		3	2		10	0		14	9	[1]	
	(Total)	26	5 [2]		12	9		13	3		25	15	[1]	
(Type L + S)		35	14 [3]		35	32 [1]		18	8		6	3	[1]	
(No. of mice analyzed)		156			142			20			100			

The numbers in brackets indicate those of duplications (internal numbers).

There were 1, 3, 1 and 4 mice with two CNVs in individual groups. They are included in both Tables 1 and 2.

There were 2, 4, 1, and 0 mice with 4 or more CNVs in individual groups. They are excluded from Table 1 but included in Table 2.

Table 2	The numbers of F1 mice with CNVs

		No. of mice					No. of	mice	e with CN	√V(s) (%	⁄6)			
		analyzed	Type L Type S						Type L+S					
Non- irradiated	Female	81	5	(	6.2	)	5	(	6.2	) [2]	10	(	12.3	) [2]
	Male	75	4	(	5.3	)[1]	2	(	2.7	)	6	(	8.0	)[1]
Mating age: 65 week old	Total	156	9	(	5.8	)[1]	7	(	4.5	) [2]	16	(	10.3	) [3]
20 mGy/day	Female	67	9	(	13.4	)[1]	7	(	10.4	)	16	(	23.9	)* [1]
(8000 mGy)	Male	75	13	(	17.3	)	5	(	6.7	)	16	(	21.3	)*
Mating age: 65 week old	Total	142	22	(	15.5	)** [1]	12	(	8.5	)	32	(	22.5	)** [1]
20 mGy/ day	Female	11	3	(	27.3	)	2	(	18.2	)	4	(	36.4	)
(3000 mGy)	Male	9	1	(	11.1	)	1	(	11.1	)	2	(	22.2	)
Mating age: 65 week old	Total	20	4	(	20.0	)	3	(	15.0	)	6	(	30.0	)
1 mGy/ day	Female	43	2	(	4.7	)	4	(	9.3	) [2]	6	(	14.0	) [2]
(400 mGy)	Male	57	4	(	7.0	)[1]	1	(	1.8	)	5	(	8.8	)[1]
Mating age: 65 week old	Total	100	6	(	6.0	)[1]	5	(	5.0	) [2]	11	(	11.0	) [3]
0.05 mGy/ day	Female	21	1	(	4.8	)	0	(	0.0	)	1	(	4.8	)
(20 mGy)	Male	25	0	(	0.0	)	1	(	4.0	)	1	(	4.0	)
Mating age: 65 week old	Total	46	1	(	2.2	)	1	(	2.2	)	2	(	4.3	)
770 mGy/min	Female	28	2	(	7.1	)	0	(	0.0	)	2	(	7.1	)
(3000 mGy)	Male	31	3	(	9.7	)	2	(	6.5	)	5	(	16.1	)
Mating age: 18 week old	Total	59	5	(	8.5	)	2	(	3.4	)	7	(	11.9	)
770 mGy/min	Female	25	1	(	4.0	)	1	(	4.0	)	2	(	8.0	)
(3000 mGy)	Male	19	0	(	0.0	)	1	(	5.3	)[1]	1	(	5.3	)[1]
Mating age: 65 week old	Total	44	1	(	2.3	)	2	(	4.5	)[1]	3	(	6.8	)[1]

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