

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月14日現在

機関番号：85401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20310033

研究課題名（和文）ヒト女性における放射線被ばくの遺伝的影響評価モデル

研究課題名（英文）A model for estimation of genetic risk of radiation of human female exposure

研究代表者

浅川 順一（ASAKAWA JUN-ICHI）

（財）放射線影響研究所・遺伝学部・主任研究員

研究者番号：10359458

研究成果の概要（和文）：DNA 2次元電気泳動法を用いて 2.5Gy のガンマ線を照射したメス親と非照射メス親の未熟卵母細胞に由来する F1 ラットゲノムの突然変異頻度を調べた。各群 750 匹について検査したが、照射群で欠失突然変異は増加しておらず、メス親の放射線被ばくによる遺伝的影響は認められなかった。ラット未熟卵母細胞での放射線誘発突然変異率はオスマウスの精原細胞に比べかなり低いことが示唆される。

研究成果の概要（英文）：We estimated the mutation induction rate by examining DNA samples of 750 F1 rats derived from immature oocytes of dams irradiated with 2.5 Gy of gamma rays and 750 controls by the two-dimensional electrophoresis. There was no increase of deletion mutations in the exposed group. Our data, although still preliminary, imply that the genetic risk of radiation in female immature oocytes is smaller than that in male spermatogonia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質環境科学

キーワード：未熟卵母細胞・DNA2次元電気泳動・放射線被ばく・遺伝リスク

1. 研究開始当初の背景

(1) 放射線の遺伝的影響研究において、精原細胞を標的細胞としたマウスモデルは、ヒトの男性被曝のモデルとなり、実際、マウス精原細胞における突然変異誘発率は、ヒトにおける放射線の遺伝的リスクの推定に用いら

れている。しかし、メスマウスをヒト女性被曝のモデルに使用することは出来ていない。その理由は、標的細胞（未熟卵母細胞）が、マウスでは細胞死に関して極端に放射線感受性が高く、例えばわずか 0.5Gy の照射により、実に 90%以上もの細胞が死ぬからである。

照射後生き残った未熟卵母細胞に関する突然変異誘発データは少ししかないが、全く変異を生じないという特徴が知られている。他方、ヒトの未熟卵母細胞は細胞死に関してそのような高感受性は示さない。

(2) BEIR III では、ヒトの未熟卵母細胞は放射線によってほとんど突然変異を生じないのではないかと考えたが、最近の UNSCEAR 報告では、放射線防護の観点から、未熟卵母細胞も精原細胞と同じ感受性と仮定している。どちらの解釈であれ、放射線影響研究所における原爆被爆者と F1 における遺伝調査結果を説明する上では、メス動物の実験データが不可欠なので、ヒト女性被ばくのモデルとなる動物を模索してきた。

調査の結果ラットが適切ではないかと考えるに至り、予備実験を行ったところメス Sprague Dawley (SD)ラットでは、4 Gy のガンマ線照射でもかなりの割合の未熟卵母細胞が生存していることが病理標本スライドで確認された。更に 2 Gy 照射されたメスは、照射時に未熟卵母細胞であった細胞由来の子供を長期にわたり多数出産した。哺乳動物生殖細胞の発達研究の権威である旭川医科大学・上口教授はこの発見に興味を示し、追試実験を行い、結果を確認した。上口教授は私たちの計画に参画し、2.5 Gy のガンマ線を照射したメス SD ラット及び対照群を非照射オス BN ラットと交配し、照射時に未成熟であった卵母細胞に由来する 1,500 匹の F1 及び同数の対照群 F1 を準備した。

2. 研究の目的

2.5Gy の放射線を照射したラット未熟卵母細胞における放射線の突然変異誘発率を明らかにし、生じた突然変異の特徴づけを行う。

3. 研究の方法

(1)材料：メス SD ラットにペントバルビタールナトリウム（体重 1kg 当り 25-28 mg）を腹腔内注射し、頭部と上半身を鉛で遮蔽し 2.5 Gy のガンマ線を照射した。照射時にすでに成熟していた、あるいは成熟途上にあった卵母細胞に由来する F1 を除くため、80 日以上経過したところで非照射オス BN ラット (Brown Norway) と交配した。こうして生まれた F1 ラットを照射群とした。非照射の親（別の個体）より生まれた F1 を対照群とした。F1 が

3 週齢に達した段階で屠殺し、脾臓、腎臓、肝臓を摘出し、液体窒素で急速冷凍した後 -80°C に保存した。

(2)2 次元電気泳動： F1 ラットの脾臓 DNA を *NotI-EcoRV* で消化し、*NotI* 切断点を ³²P 標識 dCTP と dGTP でアイソトープ標識した。1 次元目の電気泳動を行った後ゲルを取り出し、DNA をゲルごと *HinfI* で消化しさらに小さな断片にした後 2 次元目の電気泳動を行った。*NotI-EcoRV* 断片の大きさが 1-4 kb と 4-10 kb の 2 種類のゲルを作製した。2 次元電気泳動後ゲルを乾燥しオートラジオグラフィで DNA 断片をスポットとして X 線フィルム上に可視化した。得られた電気泳動像についてコンピュータ画像解析を行った。

突然変異候補スポットが検出された場合には、同じ F1 個体の腎臓と肝臓から得られた DNA を検査して確認すると共に、突然変異の生じたスポットの塩基配列を決定し、分子遺伝学的解析を行い、突然変異の種類（欠失、挿入、塩基対置換など）を明らかにした。

4. 研究成果

(1)対象スポットの選択とスクリーニング： F1 ラット 1 匹当たり 2 種類のゲルを作製した。2 次元電気泳動オートラジオグラムを図 1 A と 1 B に示した。画像解析では最初に再現性と分離を検討し突然変異の検索に適したスポットを選抜した。予備実験として、4 家系（50 匹の F1 と 8 匹の親ラット）について検討した結果、2 つのオートラジオグラムで検出される合計約 3,000 個のスポットのうち、約 20% は SD あるいは BN ラットに固有の 1 コピースポット、約 80% は両系統ラットのスポットが同じ位置に移動する 2 コピースポットであった。メス親 SD ラット由来のスポット 162 個、オス親 BN ラット由来のスポット 179 個、共通のスポット 1,387 個が再現性、分離が良く突然変異の検索に適していると判定された（SD は 1,549 個、BN は 1,566 個の遺伝子座テストに相当する）。2.5Gy のガンマ線を照射したメス親ラットから生まれた照射群 F1 と対照群 F1 各々 750 匹から作成した画像合計 3,000 枚についてコンピュータ画像解析でスポットの定量を行った。スポットの大きさ（面積×濃度）が 2 コピーから 1 コピーへと半減したものと 1 コピースポットが消失したものを突然変異候補とした。

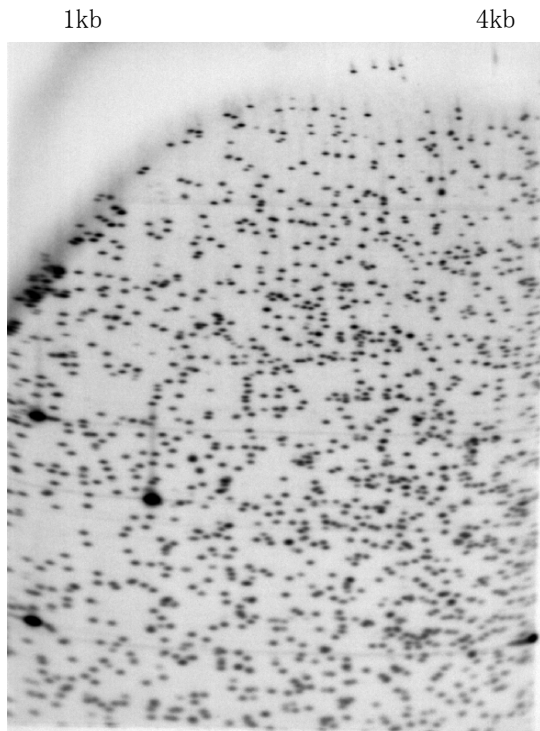


図 1 A. ラット DNA 2 次元電気泳動像(1-4kb)

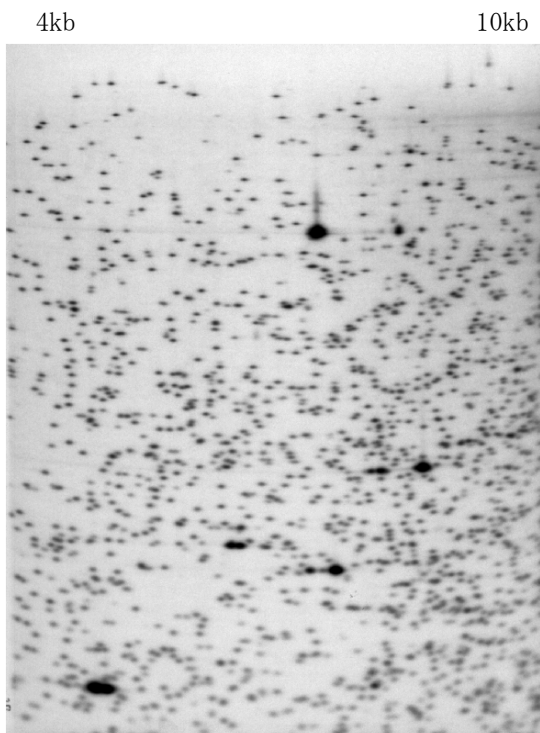


図 1 B. ラット DNA 2 次元電気泳動像(4-10kb)

(2) 検出された突然変異

照射群・対照群、各群メス親由来のスポットとオス親由来のスポットそれぞれ、合計約 1,130,000 スポットについて検索した。その結果、照射群で 18 個、対照群で 32 個、合計 50 個の生殖細胞突然変異を検出した。図 2 に検出された 2 例の突然変異画像を示した。

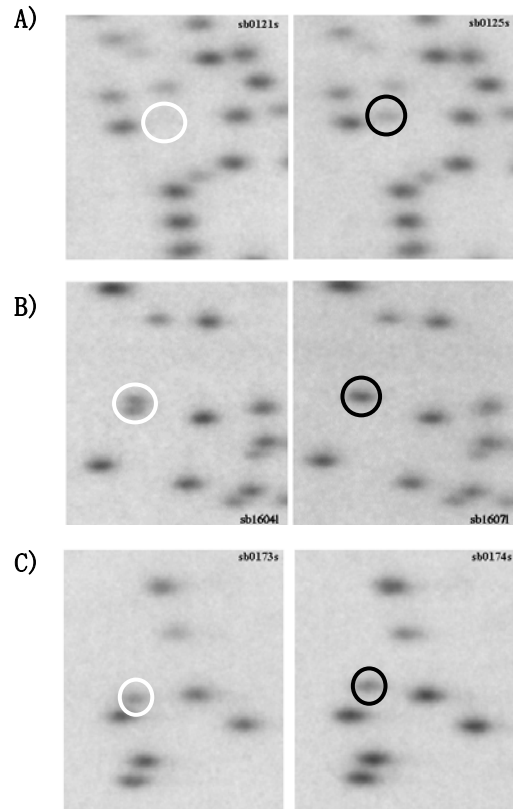


図 2. 検出された突然変異(白丸) : 右が正常パターン、A) 左の画像では白丸で示したスポットが消失している (欠失突然変異の候補)、B) 左図では右図黒丸で示したスポットが 2 つに分離している、C) 白丸で囲ったスポットが下に移動。B), C) にみられる様なパターンの多くはマイクロサテライトの繰り返し配列数の変化した突然変異であり、放射線の影響とは考えられていない。

検出された 50 個の突然変異の殆どは図 2B) と図 2C) に例を示した様な突然変異であった。2 コピースポットの大きさが半減し、元の位置のすぐ近くにもう 1 個のスポットを伴うもの、あるいはスポット位置が上下に移動したものであった。これらの突然変異はマイクロサテライトと呼ばれる遺伝的に不安定な遺伝子座を構成する (CA)_n とか (TAG)_n のような 2~8 塩基対の短い単純反復配列の繰り返し配列数が変化した突然変異で、放射線の影響とは考えられていない。マイクロサテライトの中には遺伝的に不安定なものがあり、高頻度で突然変異を起こすものが知られている。実際に私たちのラットゲノムのスクリーニングでも RS158 (BN オス由来) と RS163 (SD メス由来) と命名したスポットにそれぞれ 15 個と 10 個の C) 型突然変異を検出した。塩基配列の解析結果、正常 RS158 は (GCGGGGC) の 20 回反復配列、RS163 は (GCGGGGC) が 25 回の反復する配列を含んでおり、25 個の突然変異はこれら反復配列の増減

表 1 A. 対照群での突然変異

	ID	由来親	種類
1	S1-1	♂&♀	マイクロ
2	S1-2	♂&♀	マイクロ
3	S1-3	♂&♀	マイクロ
4	S2	♂	マイクロ
5	S3	♂&♀	マイクロ
6	S4	♀	マイクロ
7	S5	♂&♀	マイクロ
8	S6-1	♀	塩基置換
9	S6-2	♀	塩基置換
10	S7	♂&♀	マイクロ
11	S8	♂&♀	マイクロ
12	S9-1	♂	マイクロ
13	S9-2	♂	マイクロ
14	S9-3	♂	マイクロ
15	S9-4	♂	マイクロ
16	S9-5	♂	マイクロ
17	S9-6	♂	マイクロ
18	S9-7	♂	マイクロ
19	S9-8	♂	マイクロ
20	S10-1	♀	マイクロ
21	S10-2	♀	マイクロ
22	S10-3	♀	マイクロ
23	S10-4	♀	マイクロ
24	S10-5	♀	マイクロ
25	S10-6	♀	マイクロ
26	S10-7	♀	マイクロ
27	S10-8	♀	マイクロ
28	S11-1	♂	マイクロ
29	S11-2	♂	マイクロ
30	S12-1	♀	マイクロ
31	S12-2	♀	マイクロ
32	S13	♂	欠失

表 1 B. 照射群での突然変異

	ID	由来親	種類
1	S14	♂&♀	マイクロ
2	S15	♂&♀	マイクロ
3	S16	♂	欠失
4	S17	♂&♀	塩基置換
5	S18	♀	マイクロ
6	S19	♂&♀	マイクロ
7	S20	♂&♀	欠失
8	S9-9	♂	マイクロ
9	S9-10	♂	マイクロ
10	S9-11	♂	マイクロ
11	S9-12	♂	マイクロ
12	S9-13	♂	マイクロ
13	S9-14	♂	マイクロ
14	S9-15	♂	マイクロ
15	S10-9	♀	マイクロ
16	S10-10	♀	マイクロ
17	S21	♂&♀	マイクロ
18	S22	♂	欠失

による自然突然変異であった。これらを含み、合計 32 個の突然変異が C) 型の突然変異であった。一方、B) 型の突然変異は異なる 9 個のスポットに 11 例の突然変異 (1 スポットに 3 例のケースを含む) が認められた。

対照群の 2 個、照射群の 1 個、合計 3 個は制限酵素認識部位に生じた塩基置換型突然変異であったが、これらも自然突然変異と考えられる。

放射線の遺伝的影響評価の指標となる欠失型突然変異は対照群に 1 個、2.5 Gy 照射群に 3 個検出された。しかしながら、照射群の 3 個の内 2 個はオス由来のスポットに生じたものであった。残る 1 個は両親のスポットが同じ位置に電気泳動される 2 コピースポットに検出された。この突然変異の由来親は決定できなかった。この欠失突然変異が仮に照射したメス親由来であるとしても、メス未熟卵母細胞における放射線誘発突然変異頻度はオスの精原細胞におけるものに比べかなり低く、メス被ばくの遺伝的影響は極めて小さいと考えられる。

5. 主な発表論文等
〔学会発表〕(計3件)

①浅川順一、DNA2次元電気泳動法を用いた放射線のラット未熟卵母細胞に及ぼす遺伝的影響評価：ヒト女性被曝の動物モデル実験、日本放射線影響学会、2010年10月20日、京都

②浅川順一、A genetic risk estimate of radiation in mice and rats based on whole genome scanning by two-dimensional DNA gel. 欧州放射線影響学会、2009年8月28日、プラハ

③浅川順一、メスラットを用いた放射線の遺伝的影響評価、中国支部・日本放射線影響学会、2009年7月29日、広島

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅川 順一 (ASAKAWA JUN-ICHI)

(財)放射線影響研究所・遺伝学部・

主任研究員

研究者番号：10359458