

平成 25 年度
原子力災害影響調査等事業
(放射線の生物学的影響に関する研究調査事業)

委託業務実施報告書

平成 26 年 3 月 31 日

大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構
国立遺伝学研究所

本報告書は、環境省の原子力災害影響調査等事業による委託業務として大学共同利用機関法人情報・システム研究機構国立遺伝学研究所及び公益財団法人環境科学技術研究所(再委任機関)が実施した平成 25 年度「放射線の生物学的影響に関する研究調査事業」委託業務の実施結果をとりまとめたものである。

目 次

1. 事業概要	
1.1 事業目的	----- 1
1.2 事業内容	----- 1 - 3
1.3 委託業務実施結果概要	----- 3 - 4
2. 解析の対象とする哺乳類実験動物の選定及び生体試料の採取	
2.1 哺乳類実験動物モデル	----- 5 - 6
2.2 放射線照射群・非照射群からの試料調製	
2.2.1 放射線照射設備及び放射線照射量の定量方法	----- 5 - 6
2.2.2 放射線照射プロトコル	----- 6
2.2.3 病理検査及び試料採取	----- 6 - 7
2.2.4 寿命及び病理検査結果への放射線の影響予測	----- 9 - 10
2.2.5 生体試料の保管と管理	----- 10 - 12
2.2.6 DNA の抽出と品質検査	----- 13 - 15
3. 全塩基配列の解読	
3.1 全塩基配列解読の条件検討	----- 16 - 21
3.2 大規模全塩基配列解読	----- 21 - 24
4. 親世代と仔の全塩基配列情報の比較・分析	
4.1 情報解析システムと解析プロトコル	----- 25 - 27
4.2 変異部位解析の結果とまとめ	----- 28 - 36
5. 親世代の被ばく線量と仔 DNA の塩基配列変異との関係に係わる検討	
5.1 被ばく線量と変異個数との関係について	----- 37 - 39
5.2 解析手法についてのまとめ	----- 39 - 40
6. ヒトへの外挿性に係わる検討	
6.1 本委託業務の実施内容の概要	----- 41 - 42
6.2 ヒトへの外挿性に係わる技術的検討	----- 42 - 43
6.3 ヒトへの外挿性に係わる関連事項の検討	
6.3.1 モデル生物解析結果を用いてのヒトのリスク推定について	43
6.3.2 ヒトとマウスの生物学的差異	----- 44 - 45
6.3.3 変異の特性と被ばく線量率の関係について	----- 45 - 46
6.4 まとめ	----- 46 - 47
7. 本委託業務で確認された課題に関する考察	----- 48 - 49

8. 用語解説	-----	50 - 51
9. 参考資料・文献、謝辞	-----	52
10. 情報共有等	-----	53
謝辞	-----	54

別添資料

検討会議議事要旨

1. 事業概要

1.1 事業目的

東京電力福島第一原子力発電所の事故に起因する低線量の放射線被ばくによって福島県の住民が次世代への遺伝性の影響に関する不安を抱える中で、遺伝子レベルの解析手法は、不安の解消に資する有効な手法と考えられる。

具体的な解析手法としては、父母が受けた放射線被ばく線量と、今般の事故後に生まれた子供の遺伝子の全塩基配列上に現れる突然変異との関係を調査して遺伝性影響の可能性を検討することであるが、そのような解析手法が実現できるかどうかに関して科学的な知見は少ない状況である。

本委託業務では、マウスやラット等の哺乳類実験動物を対象として放射線による遺伝性の影響に関する科学的な知見を収集することが目的である。具体的には、放射線被ばくを受けた実験動物の親世代とその仔の3個体1組（以下、「トリオ」という。）の生体試料から抽出したDNAの全塩基配列を解読し、親と仔の間及び照射トリオと非照射コントロール間で全塩基配列の情報を比較することで新たに仔に見られる突然変異の個数を調べ、親の被ばく線量と仔の突然変異との関係について調査する。また、この調査結果をもとにヒトの父母子（トリオ）に関して外挿可能な手法開発の可能性についても検討する。

1.2 委託業務内容

上記の目的に鑑み、本委託業務においては、適当な哺乳類実験動物モデルを選定し、親世代（雄親と雌親）とその仔の3個体1組以上を対象とした全塩基配列解読（配列の取得と情報解析）情報の比較・分析から親世代の被ばく線量と仔のDNA塩基配列上の変異との関係を検討し、さらにヒトへの外挿性に関わる検討を行うことが求められている。

このうち哺乳類実験動物モデルについては、以下の要件を満たす必要があると考えられる。

- (1) 放射線被ばく実験では、遺伝性の影響を検出可能な程度の低線量率放射線による長期間ばく露実験が複数個体について可能であり、再現性の確認も可能なこと。
- (2) 全身及び生殖器への被ばく線量の推計が確実にできること。
- (3) 照射動物群及びコントロールとしての非照射群のトリオを解析に供せられること。
- (4) 解析に用いる生体試料の組織及び量が明確であること。
- (5) 哺乳類実験動物として確立された種であり、実験に供する動物群の遺伝的背景が全個体について均一であると見なせるか、もしくは、遺

伝的背景の確認が比較的容易に行えること。また、実験時のハンドリングが容易であること。

- (6) 観察可能なもの（外観や挙動等）以外に、生理的な変化や遺伝子発現レベルまで含む、広い意味での表現型に関する情報が多数蓄積されており、あわせて遺伝子情報、ゲノム参照配列データベースが整備され自由に利用できること。

これらの条件を満たす実験動物として、本委託業務においては、実験室マウス C57BL/6J 系統を用いた γ 線照射実験系から得られる照射群及び非照射群について、各 1 組以上のトリオ由来試料を全塩基配列解析の対象とすることを提案した。解析対象トリオのうち、仔については、体細胞変異の影響を見積もるため別個の組織から調製した DNA についても配列決定を行う。すなわち、トリオあたり、雄親由来 1、雌親由来 1、仔由来 2 の計 4 個の全 DNA 塩基配列データセットを取得する提案である。したがって、本業務全体で全 DNA 塩基配列解析に供する試料数は、照射群 4 個、非照射群 4 個の計 8 個が一組となる。

全塩基配列の解読には、総称して新型シーケンサー、次世代型シーケンサーともよばれる超並列型塩基配列決定装置（以下、「新型シーケンサー」という。）の使用を提案した。本委託業務で使用した機種は、蛍光標識基質を用いた逐次合成型塩基配列決定装置（イルミナ社製 HiSeq2500）の最新モデルである。本装置は、委託業務実施機関である情報・システム研究機構国立遺伝学研究所（以下「遺伝研」という。）において同型機種の十分な運転経験と稼働実績を持ち、必要なデータ生産能力等、本委託業務の仕様書（別添 1）に記載の要求事項を十分満たすことのできる機種である。

本装置から得られる大規模な全 DNA 塩基配列データを対象に遺伝研で十分な利用経験のあるバイオインフォマティクス手法で比較解析を行い、変異部位の検出と、親世代の被ばく線量と仔の塩基配列上の変異との関係について検討を加えた。この解析手法の全般について遺伝研は十分な経験と能力を有しているが、一部の作業については再委任で実施した。本委託業務で提案した解析手法及び全 DNA 配列解析の結果と既知の放射線生物学、放射線医学からの知見とを勘案し、ヒトへの外挿性に関わる検討を行った。本委託業務全体の概略を図 1 に示す。

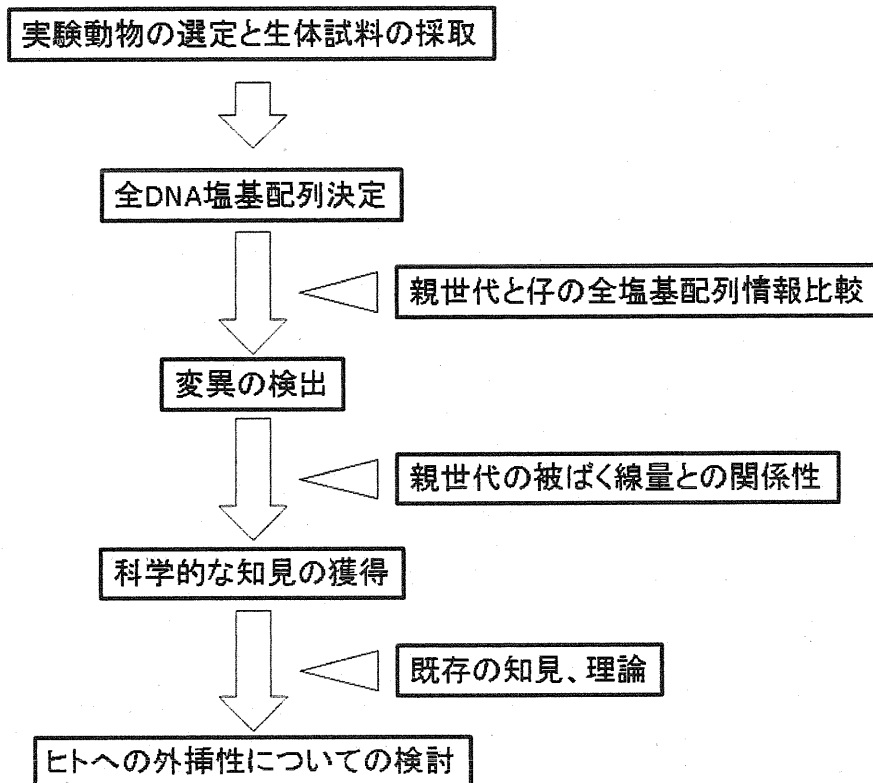


図1 本委託業務全体の概略図

1.3 委託業務実施結果概要

- (1) 実験室マウス C57BL/6J 系統を用い、照射群の雄親では、遺伝性影響の検出が期待できる 20 mGy/22 時間/日を 400 日間、集積線量が 8000 mGy になるまで γ 線照射した後に非照射雌親と交配させ、仔を得た (2.1、2.2)。
- (2) 上記の照射群トリオの各個体、及びコントロールとして同様に準備した非照射トリオから、一定量の組織 (尾) を採取した。仔については、前肢も採取し、それぞれを DNA 抽出と全 DNA 塩基配列決定に供した (2.2)。
- (3) イルミナ社製 HiSeq2500 型シーケンサーを用い照射群トリオから 4、非照射群から 4 の計 8 サンプルから、それぞれゲノムサイズの 100 倍量以上の塩基配列データを取得した (3.1、3.2)。
- (4) 上記で得られた塩基配列データをもとに計算サーバを用いて、親世代の雄、雌それぞれと仔の全塩基配列情報間の比較・分析を行い、仔の塩基配列に見られる変異部位の個数と種類を調べ、提案した方法で親の生殖系列 (germ line) で生じて仔に伝達されたと考えられる突然変異部位の候補を得るための解析を実施した (一部の解析は再委任で実施した)。解析に供したトリオ間の比較からは、照射群で変異数の有意な増大は認められていない (4.1、4.2)。

- (5) 本委託業務で用いた親世代に対する長期低線量被ばく線量と仔の塩基配列上の変異との関連性については、非照射対照群とも比較検討し、その結果をもとに長期低線量被ばく線量による遺伝性の影響に係る遺伝子塩基配列解析手法について考察を加えた(5.1、5.2、5.3)。
- (6) ヒトの父母子のトリオに関して外挿可能な手法開発の可能性について検討を加え、とりまとめを行った(6.1、6.2、6.3、6.4)。また、今後の課題についての検討を行った(7)。
- (7) 必要な用語解説を作成した(8)。

2. 解析の対象とする実験動物の選定及び生体試料の採取

2.1 哺乳類実験動物モデル

解析に用いる哺乳類実験動物は、以下の要件を満たす必要がある。

- (1) 放射線被ばく実験では、遺伝性の影響を検出可能な程度の低線量率放射線による長期間ばく露が可能であること。
- (2) 全身及び生殖器への被ばく線量の推計が確実にできること。
- (3) 照射動物群及び非照射群トリオの1組以上を解析に供せられること。
- (4) 解析に用いる生体試料の組織及び量を明確にできること。
- (5) 実験動物として確立された種であり、遺伝的背景が均一なシステムを利用できること。また、実験上のハンドリングが容易で、複数個体を用いた照射実験の実施が可能であること。
- (6) 表現型情報、遺伝子情報及びゲノム参照配列が整備されてデータベース化されており、自由に利用できること。

以上の条件を満たす哺乳類実験動物として、本委託業務では、実験室マウス (*Mus musculus*) C57BL/6J 系統を用いたγ線照射実験系を用いることとし、これから得られる照射群及び非照射群トリオ各1組に由来する試料を全DNA塩基配列解析の対象とした。

C57BL/6Jは、米国ジャクソン研究所 (<http://www.jax.org/>) で確立された近交系統で既に200世代以上を経過している実験室マウス標準系統の一つであり、遺伝的背景の均一性についての問題はない。また、C57BL/6Jは Genome Reference Consortium (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/mouse/index.shtml>) によるマウスゲノム参照配列構築にも使われており、各種の情報と併せて精度の高い全配列データが世界各地の公共データベース、UCSC (米国カリフォルニア大学サンタクルーズ校、<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?hgsid=365178099&clade=mammal&org=Mouse&db=0>) や EBI (ヨーロッパ生命情報研究所、http://www.ensembl.org/Mus_musculus/Info/Index) 等、から提供されており、本委託業務に用いる哺乳類実験動物として必要な条件を満たしている。

本委託業務の再委託先である公益財団法人環境科学技術研究所(以下「環境研」という。)では、研究に使用するマウスの維持集団を構成するための種親として、平成11年度に独立行政法人放射線医学総合研究所より SPF の C57BL/6J/ Nrs 系統マウスを導入し、以後、定法に従って兄妹交配を行い、維持集団および増殖集団を構築した。生産集団では、雌2匹に雄1匹の割合で1週間同居させるランダム交配を行った。妊娠した雌は、雄と別居させ単独で分娩・哺育させ、原則として哺育4日目に、1腹あたりの哺育仔数が8匹以下になるように、同一日齢の出生仔を哺育している他の雌親に哺育(里子)させて調整した。ま

た、3 から 4 週齢で出生仔は離乳させ、出生日毎に雄、雌に分けて各実験に供給するまで集団飼育している。

2.2 放射線照射群・非照射群トリオからの試料調製

2.2.1 放射線照射設備及び放射線照射量の定量方法

放射線照射は、環境研低線量生物影響実験施設内の照射室に設置された ^{137}Cs 線源低線量率 γ 線照射装置で行った (図 2)。照射装置の線源の放射能は 74 GBq (1994 年 11 月 15 日時点) であり、照射開始直前に照射室の日線量をガラス線量計で測定し、20 mGy/22 時間/日 (時間線量率では 0.909 mGy/hr) となるように照射架台の位置を調整した (引用文献 1)。

2.2.2 放射線照射プロトコル

雄親マウスへの照射は 56 日齢 (8 週齢) 時に開始した。日々の照射期間は、正午から翌日の午前 10 時までの 1 日 22 時間、約 400 日間連続とし、照射実験に用いる放射線量としては、仔を得ることはできるが DNA 塩基配列への影響が期待できる集積線量として、8000 mGy に達するまで照射を実施した。なお、被照射マウスは、各照射架台 (図 2) の中で 1 週毎にケージ位置のローテーションを行い線量分布の均一性を図った。実験室マウスは体躯が小さいため、透過能力の高い γ 線による全身の被ばく線量と生殖器の被ばく線量とは同一と見なすことができる。

非照射対照群雄親マウスは 456 日齢時に、照射群雄親マウスは照射期間の終了直後に 8 週齢の健常雌マウスと 1:1 または 1:2 で同一ケージに收容し、1 週間同居させた。交配済み雌親マウスは 7~20 匹の離乳マウスを收容するポリカーボネイトケージで、雄親マウス及び仔・孫マウスはポリオレフィンケージ内で飼育し、 γ 線 (30kGy) で照射滅菌した固型飼料及び高塩素 (8~12 ppm) 添加純水を自由に摂取させた。飼育ケージは床敷ごと週 1 回交換し、飼育器材は、全て洗浄・風乾の後高圧蒸気滅菌を施した後、バリア区域内の所定の場所で保管した。マウス飼育中は、その飼育環境を基準値 (実験動物施設基準研究会ガイドライン; 引用文献 2) どおり一定に保った。雄親及び仔については終生飼育し、死亡を発見後直ちに (最長で死後 50 時間程度を室温で経過する) 病理解剖及び組織採取を行った。図 3 に照射プロトコルの概要を示す。

2.2.3 病理検査及び試料採取

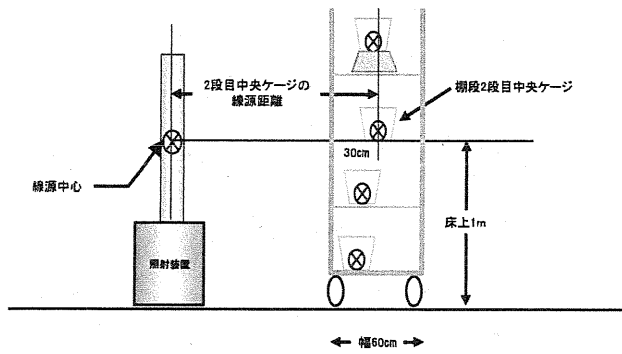
本業務のための生物試料として、雄親 (照射及び非照射) と F1 個体については死亡時、雌親については 105 日齢まで飼育した個体を供した。死亡個体は、死亡の確認後、直ちに病理解剖を行った。解剖時に体重と臓器 (心、胸腺、肺、肝、脾、腎、顎下腺、膀胱、生殖器、主要脂肪組織等) 重量を測定し、所定の用紙に病理解剖所見を記録した。解剖時下記臓器を摘出して、10%リン酸緩衝ホ

ルマリン液 (Modified Millonig's phosphate buffered formalin) で固定した。なお、精巣と精巣上体については形態保存効果の高い Modified Davidson's fluid で固定した。採取臓器は肝 (胆嚢を含む)、脾、腎、心、肺、大脳、小脳、大動脈、胸腺、気管、顎下腺、膵臓、舌、膀胱、精巣、前立腺、卵巣、子宮、膣、下垂体、甲状腺、副腎、脊椎骨、大腿骨 (骨髄を含む)、眼球、ハーダー腺、耳、鼻であり、通常、それぞれの一定部位を切出した他に、腫瘍など病変部の追加切出しも行った。

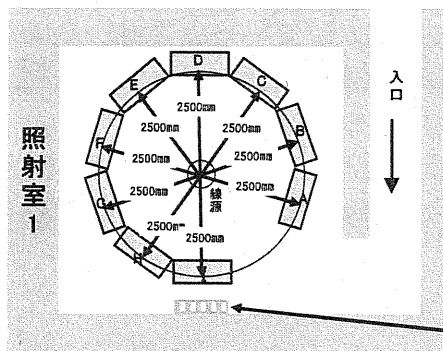
骨および頭部組織は Kalkitox 又は OsteoSoft (和光純薬) による処理で脱灰し、他の臓器とともに定法に従ってエタノール系列による脱水とキシレンによる置換後パラフィン包埋し、3~5 μ m 厚で薄切後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。これらの組織標本は、必要に応じて行った各種の特殊染色標本とともに顕微鏡下で観察し、病理組織学的所見を所定の用紙に記入し、死因および病変を診断した。

全 DNA 配列解析に供するために尾組織、前足、筋肉組織 (一部個体)、精巣及び精巣上体 (雄のみ)、ならびに悪性リンパ腫、組織球肉腫等の腫瘍組織を -80°C で凍結保存した。

図2 低線量生物影響実験棟 照射室・架台配置

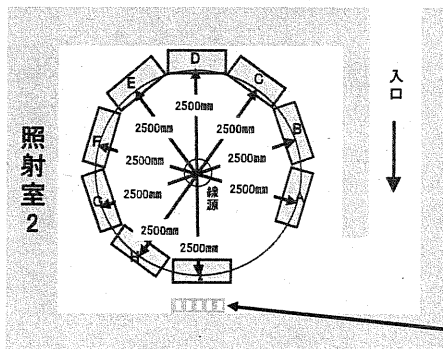


(1) 「照射室1」(20 mGy/22時間/日)の線源距離と、その架台配置図



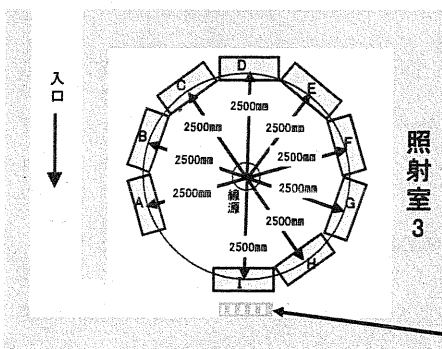
・照射室1の線源距離は「2,500mm」9架台設置

(2) 「照射室2」(1 mGy/22時間/日)の線源距離と、その架台配置図



・照射室2の線源距離は「2,500mm」9架台設置

(3) 「照射室3」(0.05 mGy/22時間/日)の線源距離と、その架台配置図



・照射室3の線源距離は「2,500mm」9架台設置

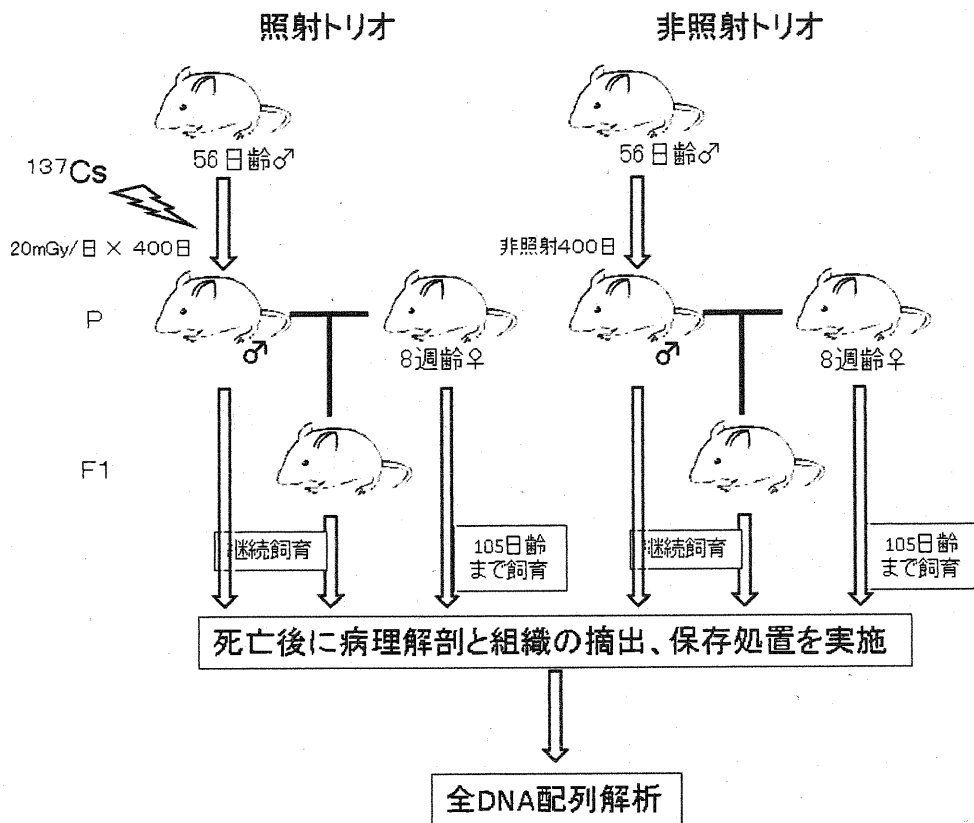


図3 照射実験プロトコルの概要

2.2.4 寿命及び病理検査結果への放射線の影響予測

環境研における交配成績では、20 mGy/22 時間/日照射群における平均出産数 [仔(F1)マウス数] 及び仔(F1)マウスの平均離乳数には、統計学的に有意

($P < 0.05$) な減少が認められているが、仔世代では、平均出産数 [孫(F2)マウス数] 及び孫(F2)マウスの平均離乳数に実験群間で有意な差は認められなかった。また離乳したマウスにおける性比においても仔世代、孫世代ともに有意な差は見られなかった (環境研未発表データ; 引用文献3)。体重の経時的推移については、親世代雄マウス、仔および孫世代マウスの全ての世代で、実験群間に有意な差は認められていない。

各実験群の平均寿命について Student's t 検定を行った結果、20 mGy/22 時間/日照射群の親世代マウス ($P = 0.003$) 及び仔(F1)世代マウス ($P = 0.044$) について、雄のみに有意な平均寿命の短縮が認められた。一方、全ての孫世代マウス及び雌マウスでは照射、非照射にかかわらず対照群と比べ寿命に有意な差は認められなかった (環境研未発表データ; 引用文献3)。

病理学的組織的検索では、親世代雄マウス、仔(F1)世代および孫(F2)世代マウスの死因、発生腫瘍の種類とその頻度に関して 20 mGy/22 時間/日照射群親世代雄マウスにおけるハーダー腺腺腫 ($P < 0.05$) の有意な発生率上昇以外、実

験群間および世代間で有意な差は見られていない（環境研未発表データ；引用文献3）。

また、マイクロアレイ CGH 法による遺伝子解析において、20 mGy/22 時間/日を 400 日間連続照射（集積線量 8000 mGy）した雄親マウスの仔にわずかではあるが新規突然変異発生率の有意な増加が認められている（環境研未発表データ；引用文献3）。

2.2.5 生体試料の保管と管理

遺伝研では、2013年12月12日と2014年2月4日の2回にわたり、環境研からドライアイス梱包で生体試料の送付を受けた。試料の重量は、尾（約200mg）、前足（300-400mg）であった。

本業務で使用する生体試料は、環境研が数年を費やして実施した照射実験から得られた貴重なものであり、保管と使用に当たっては細心の注意を払っている。受領後の試料は内容物を確認した後、遺伝研動物飼育実験棟立ち入り制限区域内に設置した鍵付き超低温（-80℃）冷凍庫に保管した。生体試料から抽出した DNA の保管についても同様である。

試料から DNA を抽出する際には、同一個体の尾、前肢など複数の組織に由来する DNA を識別するため、新たな識別番号（遺伝研 ID、IESgXX）を付与した。遺伝研 ID に続けて環境研情報_組織部位_親(P)仔(F1)_性別の順に記載したものを試料 ID とし、以後の管理に用いている（表1）。

（試料 ID の例）

IESg1 : C0101_Tail_P_M は左から順に、遺伝研 ID : 環境研個体番号_組織部位名（尾）_親仔の別（親）_性別（雄）であることを示す。

配列決定と配列解析のテストを大規模解析前に実施するため、照射群、非照射コントロール群の各8トリオの試料送付を環境研から受けた。また、仔については体細胞変異が解析に与える影響を見積もる目的で複数組織の提供を受けている。したがって、原則としてトリオあたり、雄親由来1、雌親由来1、仔由来2の計4個の試料が存在しており、本業務で大規模解析に供する試料数は、照射群4個、非照射群4個の計8個となる。同一個体由来の複数組織、同一親由来の複数仔も含め、環境研から遺伝研に送付された全検体数は102であった。表1に、環境研から受領した全検体について試料 ID と試料採取時の日齢、病理所見等をまとめてある。

表1 DNA解析用試料一覧

実験群	家族番号	個体番号	試料ID	世代	性別	死亡日齢	死因	病理番号	受領日
0 mGy/22h/d	C1	C0101	IESg1 : C0101_Tail_P_M	P	Male	1034	Dental Abscess (Fistula)	3200	2013/12/12
0 mGy/22h/d	C1	C0621	IESg2 : C0621_Tail_P_F	P	Female	105	Sacrificed		2013/12/12
0 mGy/22h/d	C1	C1868	IESg3 : C1868_Tail_F1_M	F1	Male	901	Carcinoma, Squamous Cell	3872	2013/12/12
0 mGy/22h/d	C1	C1868	IESg4 : C1868_Limb_F1_M	F1	Male	901	Carcinoma, Squamous Cell	3872	2013/12/12
0 mGy/22h/d	C2	C0107	IESg5 : C0107_Tail_P_M	P	Male	1063	Dental Caries	3230	2013/12/12
0 mGy/22h/d	C2	C0627	IESg6 : C0627_Tail_P_F	P	Female	105	Sacrificed		2013/12/12
0 mGy/22h/d	C2	C3859	IESg7 : C3859_Tail_F1_F	F1	Female	893	Acidophilic macrophage pneumonia	3843	2013/12/12
0 mGy/22h/d	C2	C3859	IESg8 : C3859_Limb_F1_F	F1	Female	893	Acidophilic macrophage pneumonia	3843	2013/12/12
0 mGy/22h/d	C3	C0134	IESg9 : C0134_Tail_P_M	P	Male	809	Carcinoma, Bronchiolo-Alveolar	2934	2013/12/12
0 mGy/22h/d	C3	C0654	IESg10 : C0654_Tail_P_F	P	Female	105	Sacrificed		2013/12/12
0 mGy/22h/d	C3	C3846	IESg11 : C3846_Tail_F1_F	F1	Female	899	Acidophilic macrophage pneumonia	3861	2013/12/12
0 mGy/22h/d	C3	C3846	IESg12 : C3846_Limb_F1_F	F1	Female	899	Acidophilic macrophage pneumonia	3861	2013/12/12
0 mGy/22h/d	C3	C3845	IESg39 : C3845_Tail_F1_F	F1	Female	836	Pneumonia, Acidophilic macropahge	3658	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C3	C3845	IESg40 : C3845_Limb_F1_F	F1	Female	836	Pneumonia, Acidophilic macropahge	3658	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C4	C0049	IESg41 : C0049_Tail_P_M	P	Male	746	Hemangiosarcoma	362	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C4	C0569	IESg42 : C0569_Tail_P_F	P	Female	105	Sacrificed		2014/02/04
0 mGy/22h/d	C4	C3420	IESg43 : C3420_Tail_F1_F	F1	Female	758	Sarcoma, Histiocytic	1311	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C4	C3420	IESg44 : C3420_Muscle_F1_F	F1	Female	758	Sarcoma, Histiocytic	1311	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C4	C1416	IESg45 : C1416_Tail_F1_M	F1	Male	845	Sarcoma, Histiocytic	1545	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C4	C1416	IESg46 : C1416_Muscle_F1_M	F1	Male	845	Sarcoma, Histiocytic	1545	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C5	C0051	IESg47 : C0051_Tail_P_M	P	Male	986	Carcinoma, Bronchiolo-Alveolar	755	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C5	C0571	IESg48 : C0571_Tail_P_F	P	Female	105	Sacrificed		2014/02/04
0 mGy/22h/d	C5	C3412	IESg49 : C3412_Tail_F1_F	F1	Female	952	Sarcoma, Histiocytic	1872	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C5	C3412	IESg50 : C3412_Muscle_F1_F	F1	Female	952	Sarcoma, Histiocytic	1872	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C6	C0054	IESg51 : C0054_Tail_P_M	P	Male	646	Pneumonia, Interstitial	242	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C6	C0574	IESg52 : C0574_Tail_P_F	P	Female	105	Sacrificed		2014/02/04
0 mGy/22h/d	C6	C1411	IESg53 : C1411_Tail_F1_M	F1	Male	1034	Sarcoma, Histiocytic	2107	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C6	C1411	IESg54 : C1411_Muscle_F1_M	F1	Male	1034	Sarcoma, Histiocytic	2107	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C7	C0066	IESg55 : C0066_Tail_P_M	P	Male	829	Hemangiosarcoma	910	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C7	C0586	IESg56 : C0586_Tail_F		Female	105	Sacrificed		2014/02/04
0 mGy/22h/d	C7	C1635	IESg57 : C1635_Tail_F1_M	F1	Male	926	Sarcoma, Histiocytic	2502	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C7	C1635	IESg58 : C1635_Muscle_F1_M	F1	Male	926	Sarcoma, Histiocytic	2502	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C8	C0098	IESg59 : C0098_Tail_P_M	P	Male	884	Pneumonia, Interstitial	1055	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C8	C0618	IESg60 : C0618_Tail_P_F	P	Female	105	Sacrificed		2014/02/04
0 mGy/22h/d	C8	C1620	IESg61 : C1620_Tail_F1_M	F1	Male	648	Sarcoma, Histiocytic	1653	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C8	C1620	IESg62 : C1620_Muscle_F1_M	F1	Male	648	Sarcoma, Histiocytic	1653	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C9	C0115	IESg63 : C0115_Tail_P_M	P	Male	669	Panarteritis	2592	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C9	C0635	IESg64 : C0635_Tail_P_F	P	Female	105	Sacrificed		2014/02/04
0 mGy/22h/d	C9	C1845	IESg65 : C1845_Tail_F1_M	F1	Male	781	Sarcoma, Histiocytic	3563	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C10	C0123	IESg66 : C0123_Tail_P_M	P	Male	689	Sarcoma, Histiocytic	2645	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C10	C0643	IESg67 : C0643_Tail_P_F	P	Female	105	Sacrificed		2014/02/04
0 mGy/22h/d	C10	C3841	IESg68 : C3841_Tail_F1_F	F1	Female	907	Acidophilic macrophage pneumonia	3884	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C10	C3841	IESg69 : C3841_Limb_F1_F	F1	Female	907	Acidophilic macrophage pneumonia	3884	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C11	C0127	IESg70 : C0127_Tail_P_M	P	Male	1013	Pneumonia, Acidophilic macrophage	3180	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C11	C0647	IESg71 : C0647_Tail_P_F	P	Female	105	Sacrificed		2014/02/04
0 mGy/22h/d	C11	C1871	IESg72 : C1871_Tail_F1_M	F1	Male	804	Hemangiosarcoma	3602	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C12	C0137	IESg73 : C0137_Tail_P_M	P	Male	623	Adenoma, Leydig Cell	2442	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C12	C0657	IESg74 : C0657_Tail_P_F	P	Female	105	Sacrificed		2014/02/04
0 mGy/22h/d	C12	C3847	IESg75 : C3847_Tail_F1_F	F1	Female	806	Pneumonia, Acidophilic Macrophage	3603	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C13	C0148	IESg76 : C0148_Tail_P_M	P	Male	877	Hemangioma	3357	2014/02/04
0 mGy/22h/d	C13	C0668	IESg77 : C0668_Tail_P_F	P	Female	105	Sacrificed		2014/02/04
0 mGy/22h/d	C13	C2007	IESg78 : C2007_Tail_F1_M	F1	Male	531	Sarcoma, Histiocytic	3627	2014/02/04
20 mGy/22h	H1	H0103	IESg13 : H0103_Tail_P_M	P	Male	899	Enteritis, hemorrhagic	3072	2013/12/12
20 mGy/22h	H1	H0623	IESg14 : H0623_Tail_P_F	P	Female	105	Sacrificed		2013/12/12
20 mGy/22h	H1	H1803	IESg15 : H1803_Tail_F1_M	F1	Male	909	Hemangiosarcoma	3890	2013/12/12
20 mGy/22h	H1	H1803	IESg16 : H1803_Limb_F1_M	F1	Male	909	Hemangiosarcoma	3890	2013/12/12
20 mGy/22h	H1	H3802	IESg17 : H3802_Tail_F1_F	F1	Female	882	Adenoma, Pars Distalis	3802	2013/12/12
20 mGy/22h	H1	H3802	IESg18 : H3802_Limb_F1_F	F1	Female	882	Adenoma, Pars Distalis	3802	2013/12/12
20 mGy/22h	H2	H0106	IESg19 : H0106_Tail_P_M	P	Male	989	Sarcoma, Histiocytic	3152	2013/12/12
20 mGy/22h	H2	H0626	IESg20 : H0626_Tail_P_F	P	Female	105	Sacrificed		2013/12/12
20 mGy/22h	H2	H1810	IESg21 : H1810_Tail_F1_M	F1	Male	885	Sarcoma, Histiocytic	3819	2013/12/12
20 mGy/22h	H2	H1810	IESg22 : H1810_Limb_F1_M	F1	Male	885	Sarcoma, Histiocytic	3819	2013/12/12
20 mGy/22h	H3	H0111	IESg23 : H0111_Tail_P_M	P	Male	952	Adenoma, Bronchiolo-alveolar	3119	2013/12/12
20 mGy/22h	H3	H0631	IESg24 : H0631_Tail_P_F	P	Female	105	Sacrificed		2013/12/12
20 mGy/22h	H3	H1845	IESg25 : H1845_Tail_F1_M	F1	Male	879	Venticle dilatation (heart failure)	3801	2013/12/12
20 mGy/22h	H3	H1845	IESg26 : H1845_Limb_F1_M	F1	Male	879	Venticle dilatation (heart failure)	3801	2013/12/12
20 mGy/22h	H4	H0119	IESg27 : H0119_Tail_P_M	P	Male	977	Pneumonia, Acidophilic macrophage	3141	2013/12/12
20 mGy/22h	H4	H0639	IESg28 : H0639_Tail_P_F	P	Female	105	Sacrificed		2013/12/12
20 mGy/22h	H4	H3834	IESg29 : H3834_Tail_F1_F	F1	Female	882	Pneumonia, Acidophilic macrophage	3811	2013/12/12

表1 続き

20 mGy/22h	H4	H3834	IESg30 : H3834_Limb_F1_F	F1	Female	882 Pneumonia, Acidophilic macrophage	3811	2013/12/12
20 mGy/22h	H5	H0120	IESg31 : H0120_Tail_P_M	P	Male	727 Hemangiosarcoma	2754	2013/12/12
20 mGy/22h	H5	H0640	IESg32 : H0640_Tail_P_F	P	Female	105 Sacrificed		2013/12/12
20 mGy/22h	H5	H3835	IESg33 : H3835_Tail_F1_F	F1	Female	909 Adenoma, Pars Distalis	3894	2013/12/12
20 mGy/22h	H5	H3835	IESg34 : H3835_Limb_F1_F	F1	Female	909 Adenoma, Pars Distalis	3894	2013/12/12
20 mGy/22h	H6	H0124	IESg35 : H0124_Tail_P_M	P	Male	714 Congestion, Pulmonary	2718	2013/12/12
20 mGy/22h	H6	H0644	IESg36 : H0644_Tail_P_F	P	Female	105 Sacrificed		2013/12/12
20 mGy/22h	H6	H1839	IESg37 : H1839_Tail_F1_M	F1	Male	893 Pneumonia, Interstitial	3848	2013/12/12
20 mGy/22h	H6	H1839	IESg38 : H1839_Limb_F1_M	F1	Male	893 Pneumonia, Interstitial	3848	2013/12/12
20 mGy/22h	H7	H0017	IESg79 : H0017_Tail_P_M	P	Male	736 Sarcoma, Histiocytic	46	2014/02/04
20 mGy/22h	H7	H0534	IESg80 : H0534_Tail_P_F	P	Female	105 Sacrificed		2014/02/04
20 mGy/22h	H7	H1004	IESg81 : H1004_Tail_F1_M	F1	Male	1047 Necrosis, Hepatocellular	719	2014/02/04
20 mGy/22h	H7	H1004	IESg82 : H1004_Muscle_F1_M	F1	Male	1047 Necrosis, Hepatocellular	719	2014/02/04
20 mGy/22h	H8	H0035	IESg83 : H0035_Tail_P_M	P	Male	955 Sarcoma, Histiocytic	328	2014/02/04
20 mGy/22h	H8	H0555	IESg84 : H0555_Tail_P_F	P	Female	105 Sacrificed		2014/02/04
20 mGy/22h	H8	H1219	IESg85 : H1219_Tail_F1_M	F1	Male	1120 Sarcoma, Histiocytic	1702	2014/02/04
20 mGy/22h	H8	H1219	IESg86 : H1219_Muscle_F1_M	F1	Male	1120 Sarcoma, Histiocytic	1702	2014/02/04
20 mGy/22h	H9	H0044	IESg87 : H0044_Tail_P_M	P	Male	825 Pneumonia, Acidophilic macrophage	486	2014/02/04
20 mGy/22h	H9	H0564	IESg88 : H0564_Tail_P_F	P	Female	105 Sacrificed		2014/02/04
20 mGy/22h	H9	H3414	IESg89 : H3414_Tail_F1_F	F1	Female	391 Sarcoma, Histiocytic	559	2014/02/04
20 mGy/22h	H9	H3414	IESg90 : H3414_Muscle_F1_F	F1	Female	391 Sarcoma, Histiocytic	559	2014/02/04
20 mGy/22h	H11	H0077	IESg91 : H0077_Tail_P_M	P	Male	1037 Sarcoma, Histiocytic	1395	2014/02/04
20 mGy/22h	H11	H0597	IESg92 : H0597_Tail_P_F	P	Female	105 Sacrificed		2014/02/04
20 mGy/22h	H11	H1654	IESg93 : H1654_Tail_F1_M	F1	Male	905 Sarcoma, Histiocytic	2438	2014/02/04
20 mGy/22h	H11	H1654	IESg94 : H1654_Muscle_F1_M	F1	Male	905 Sarcoma, Histiocytic	2438	2014/02/04
20 mGy/22h	H12	H0117	IESg95 : H0117_Tail_P_M	P	Male	544 Pneumonia, Interstitial	2167	2014/02/04
20 mGy/22h	H12	H0637	IESg96 : H0637_Tail_P_F	P	Female	105 Sacrificed		2014/02/04
20 mGy/22h	H12	H1828	IESg97 : H1828_Tail_F1_M	F1	Male	835 Congestion, Pulmonary	3657	2014/02/04
20 mGy/22h	H13	H0130	IESg98 : H0130_Tail_P_M	P	Male	997 Ossifying Fibroma	3163	2014/02/04
20 mGy/22h	H13	H0650	IESg99 : H0650_Tail_P_F	P	Female	105 Sacrificed		2014/02/04
20 mGy/22h	H13	H1842	IESg100 : H1842_Tail_F1_M	F1	Male	792 Hemangiosarcoma	3580	2014/02/04
20 mGy/22h	H13	H3837	IESg101 : H3837_Tail_F1_F	F1	Female	886 Amyloidosis	3823	2014/02/04
20 mGy/22h	H13	H3837	IESg102 : H3837_Limb_F1_F	F1	Female	886 Amyloidosis	3823	2014/02/04

2. 2. 6 DNA の抽出と品質検査

まず、超低温 (-80°C) 冷凍庫で保管されている生体試料 (尾あるいは前肢) から約 5mm を別のチューブにとり分け、予備実験を実施した。最初のテストでは Qiagen 社の Puregene kit による DNA 調製法を試みたが、タンパク質の分解を効率的に行うため、PK (Proteinase K) を含まない溶液中においてジルコニアボールによる組織の破碎 (Qiagen 社、Tissuelyser) を行い、その後に 55°C で PK 処理による蛋白質の分解を行った。続いて夾雑物の除去および DNA の沈殿を行った。DNA は室温で乾燥させ、TE (Tris-EDTA) 緩衝液に溶解した。調製したゲノム DNA の濃度は Life Technologies 社製 Qubit® 2.0 蛍光光度計を使用して、Molecular Probes dsDNA Assay kit により測定した (表 2)。試料はさらにアガロースゲル担体 (1%アガロース、トリス/酢酸/EDTA 緩衝液) で電気泳動を行い、臭化エチジウムによる染色および紫外線照射下での写真撮影による分析で、DNA の断片化の確認等の品質検査を行った (図 4a)。また、HiSeq2500 による大規模 DNA 解読に通常用いている方法 (液体窒素温度で組織を破碎した後、タンパク変性剤存在下でイオン交換クロマトグラフィーによる精製) についても同様な検討を加えた (図 4b)。

表 2 予備実験により得られた DNA の濃度

I D	#	DNA 濃度 ng/μ l	I D	#	DNA 濃度 ng/μ l
IESg1	①	54.4	IESg7	⑦	214
IESg2	②	326	IESg8	⑧	768
IESg3	③	202	IESg9	⑨	228
IESg4	④	434	IESg10	⑩	408
IESg5	⑤	202	IESg11	⑪	256
IESg6	⑥	336	IESg12	⑫	656

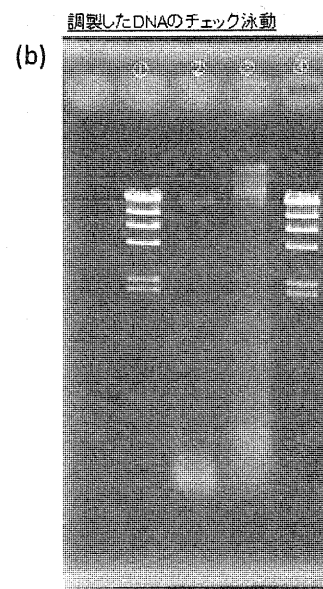
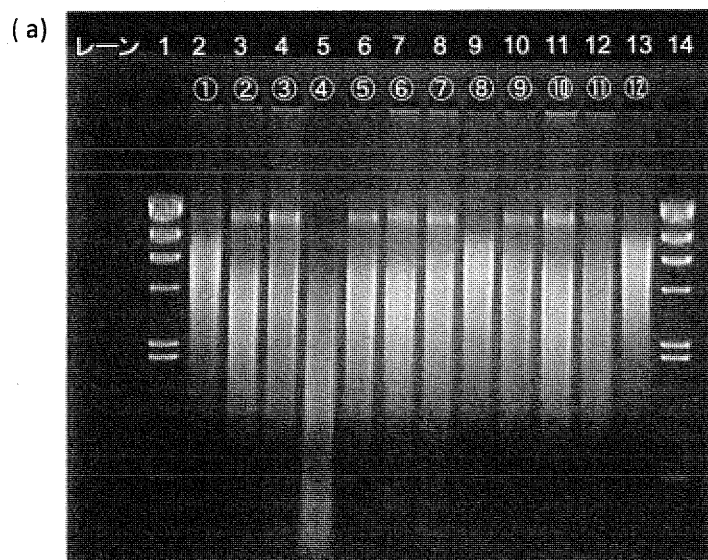


図4 予備実験により得られた DNA のアガロースゲル電気泳動像

(a) レーン 1 及び 14 : λ -HindIII マーカー (フラグメント上部より、23.1、9.4、6.5、4.3、2.3、2.0、0.5、0.1、単位は kbp でおおよその値を示す)、
 レーン 2 : ① (IESg1)、レーン 3 : ② (IESg2)、レーン 4 : ③ (IESg3)、レーン
 5 : ④ (IESg4)、レーン 6 : ⑤ (IESg5)、レーン 7 : ⑥ (IESg6)、レーン 8 : ⑦
 (IESg7)、レーン 9 : ⑧ (IESg8)、レーン 10 : ⑨ (IESg9)、レーン 11 : ⑩
 (IESg10)、レーン 12 : ⑪ (IESg11)、レーン 13 : ⑫ (IESg12)
 (b) ①④ : λ -HindIII マーカー、② : IESg17、③ : IESg18

以上の予備実験の結果、予想以上に DNA の断片化が起きることが確認されたので、以後の処理においてはジルコニアボールによる組織の破碎は行わず、転倒混和のみによる穏やかなタンパク質の消化処理に変更した。さらに、最終的な DNA 抽出物の断片化あるいは塩基配列解読のためのサンプル処理への適性を考慮して、PK 処理以降はフェノール・クロロホルム処理による従来法により行った。以下に照射および非照射群の生体試料から調製した DNA の濃度およびアガロースゲル電気泳動像を示す。表 3 は、高放射線照射群の試料より得られた DNA の濃度；図 5 は、検証および高放射線照射群の試料より得られた DNA のアガロースゲル電気泳動像；表 4 は、非照射群の試料より得られた DNA の濃度；図 6 は、非照射群の試料より得られた DNA のアガロースゲル電気泳動像である。

表 3 高放射線照射群の試料より得られた DNA の濃度

I D	#	DNA 濃度 ng/ μ l	I D	#	DNA 濃度 ng/ μ l
IESg13	④	582	IESg16	⑦	270
IESg14	⑤	1020	IESg17	⑧	1120
IESg15	⑥	532	IESg18	⑨	7.18

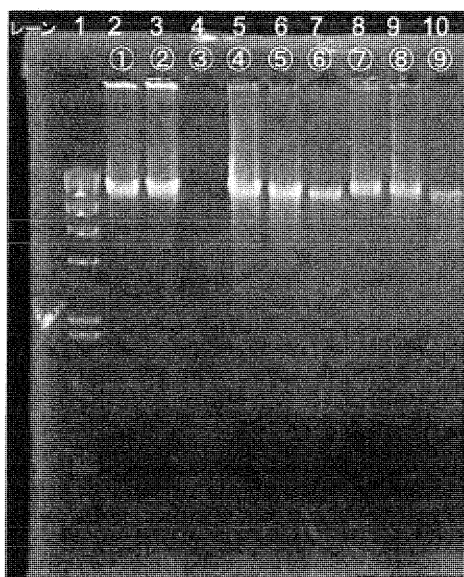


図 5 高放射線照射群の試料より得られた DNA のアガロースゲル電気泳動像

レーン 1 : λ -HindIII マーカー、レーン 2 :
 ① (筋肉由来のコントロールサンプル)、レーン 3 : ② (筋肉由来のコントロールサンプル)、
 レーン 4 : ③ (blank)、レーン 5 : ④ (IESg13)、
 レーン 6 : ⑤ (IESg14)、レーン 7 : ⑥
 (IESg15)、レーン 8 : ⑦ (IESg16)、レーン
 9 : ⑧ (IESg17)、レーン 10 : ⑨ (IESg18)

表 4 非照射群の試料より得られた DNA の濃度

I D	#	DNA 濃度 ng/μ l	I D	#	DNA 濃度 ng/μ l
IESg1	①	144	IESg7	⑦	440
IESg2	②	630	IESg8	⑧	704
IESg3	③	516	IESg9	⑨	1608
IESg4	④	690	IESg10	⑩	1592
IESg5	⑤-1	123	IESg11	⑪	216
IESg5	⑤-2	115	IESg12	⑫	152.4
IESg6	⑥	434			

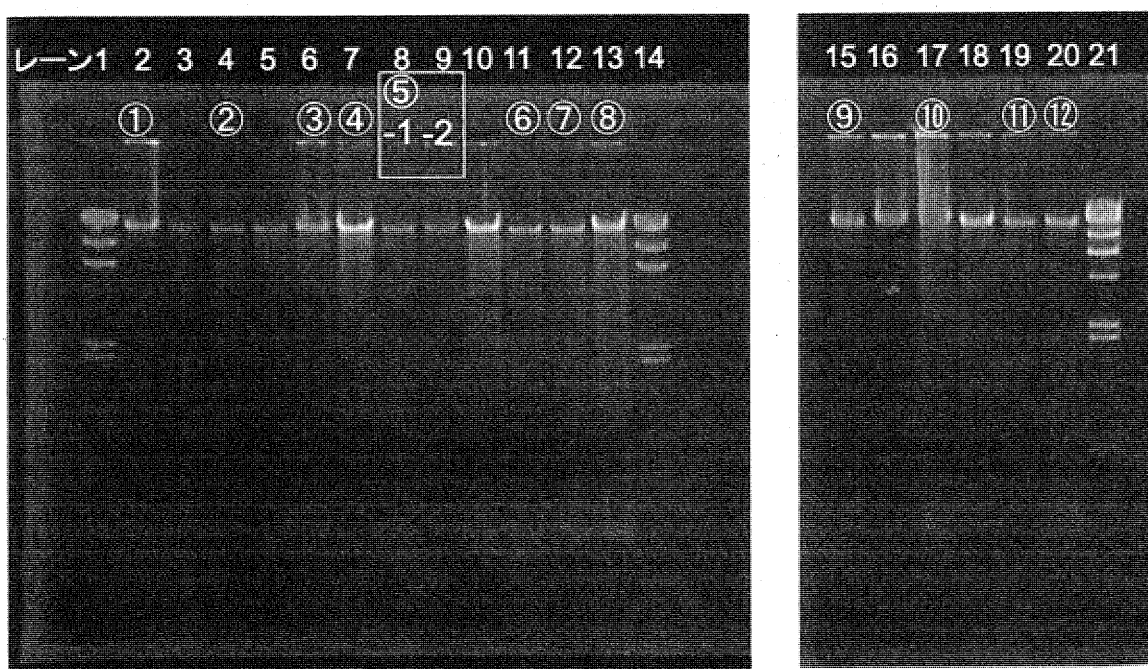


図 6 非照射群の試料より得られた DNA のアガロースゲル電気泳動像

レーン 1 : λ -HindIII マーカー、レーン 2 : ① (IESg1)、レーン 3 : IESg2 予備サンプル、レーン 4 : ② (IESg2)、レーン 5 : IESg3 予備サンプル、レーン 6 : ③ (IESg3)、レーン 7 : ④ (IESg4)、レーン 8 : ⑤-1 (IESg5)、レーン 9 : ⑤-2 (IESg5)、レーン 10 : IESg6 予備サンプル、レーン 11 : ⑥ (IESg6)、レーン 12 : ⑦ (IESg7)、レーン 13 : ⑧ (IESg8)、レーン 14 : λ -HindIII マーカー、レーン 15 : ⑨ (IESg9)、レーン 16 : IESg9 予備サンプル、レーン 17 : ⑩ (IESg10)、レーン 18 : IESg10 予備サンプル、レーン 19 : ⑪ (IESg11)、レーン 20 : ⑫ (IESg12)、レーン 21 : λ -HindIII マーカー

3. 全塩基配列の解読

本委託業務では、放射線照射の影響を科学的に調査するため、哺乳類実験動物（マウス）トリオの各個体から抽出した DNA を全塩基配列情報解析の対象とする。全塩基配列の解読に用いる新型シーケンサーとして、イルミナ社製 HiSeq2500 型の最新モデルを採用した（図 7、引用文献 4）。遺伝研が同型機種について十分な運転経験と稼働実績を持つことと、業務委託契約締結時において仕様書に記載の必要性能を満たす唯一の機種であることが選択理由である（この状況は、平成 25 年度末においても変わらない）。

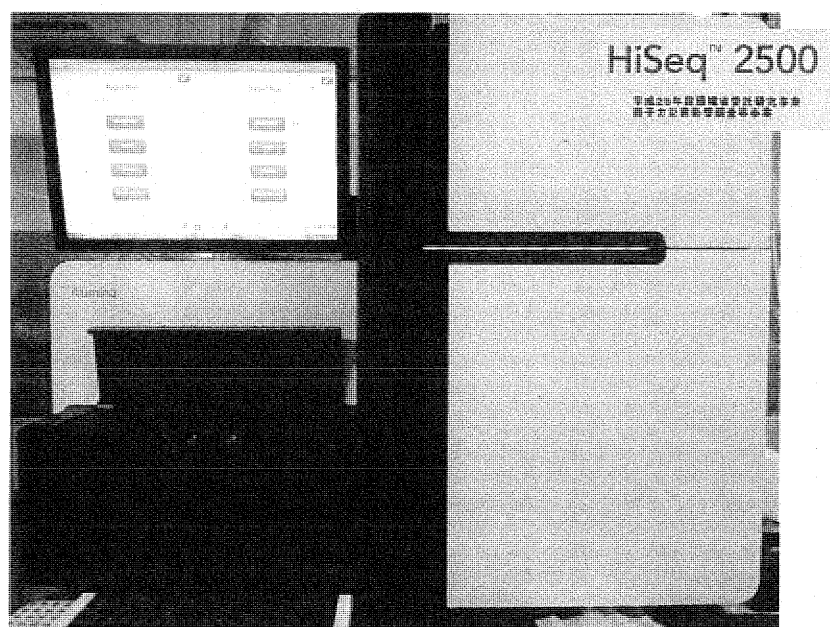


図 7 HiSeq2500 型シーケンサー

遺伝研における大規模 DNA 塩基配列解読の経験に従い、本業務の DNA 試料は、図 8 に示す手順で全塩基配列データを生産することとした。最終的に本装置から得られる塩基配列データは、いったん専用サーバに保存した後、バイオインフォマティクスの手法で比較解析を実施することになる（第 4 章参照）。

3.1 全塩基配列解読の条件検討

一般に新型シーケンサーを用いた全塩基配列解読（以下「NGS」と略す。）では、目的に応じて異なる手法が使われており、本委託業務で実施するタイプの配列解読は再シーケンシングとよばれる（引用文献 4、5）。既存の全ゲノム参照配列に対し、NGS から得られた DNA 塩基配列データを配列相同性を元に配置し（アラインメント）、特定部位と前後の領域ごとに塩基を比較して、変異の部位と種類とを検出する方法である。本業務では、全ゲノム参照配列としてマウス C57BL/6J 由来の GRCm38/mm10 データセット (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/mouse/index.shtml>) を使用する。

NGS ではシーケンシングに先立ち、まず試料 DNA を無作為に断片化して、なるべく長さの揃った（再シーケンシングの場合で 400-500 塩基対）DNA 断片のセット（鋳型 DNA ライブラリという）を調製する必要がある。再シーケンシングの場合には、各断片の塩基配列を配列の相同性に基づいて参照配列の上に配置することにより、DNA 塩基配列上の特定箇所ごとに塩基を同定する。この場合、ある特定箇所の塩基を覆う配列の数（リード数）が多いほど、つまりデータの冗長性が高いほど、同定された塩基の信頼度が高まることになる。したがって、一定以上の精度（信頼度）で塩基配列変異部位を検出して塩基を同定し、有意さを保証するためには、もとの DNA 分子を何回も配列決定を行った場合に相当する量の塩基配列データが必要である。この回数のことをカバレッジという。

本委託業務においては、カバレッジ 100（以下、「100X」と略す。）以上の初期配列データを生産することが求められている。GRCm38/mm10 に登録されているマウスゲノムのサイズは、ほぼ 2.7×10^9 塩基対であるから、100X の塩基配列データを得るためには、 2.7×10^{11} 塩基分の配列データが必要であり、HiSeq2500 型で使用するフローセルの 7 レーン分から出力されるデータ量にほぼ相当する。本委託業務では、遺伝研における従来からの経験に基づき、平均鎖長が 400 塩基対の DNA 断片に対して、両末端側からそれぞれ 150 塩基対の配列データ（ペアエンド配列）を取得することとした。

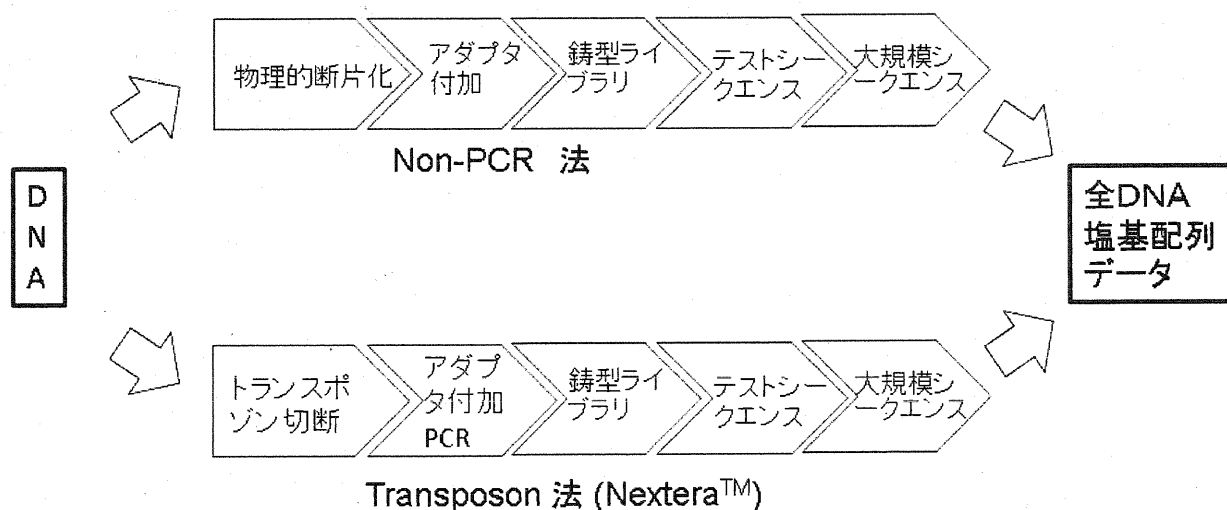


図 8 全塩基配列データ生産の概略図

図 8 に、HiSeq2500 による NGS でよく用いられる鋳型 DNA ライブラリ作成手法である Non-PCR 法と Nextera™ による DNA 処理の流れを示した。Non-PCR 法では、超音波処理や物理的剪断力を利用して元の DNA 分子を無作為的に切断し、

その後、文字通りに PCR 増幅を行う事なく NGS 用の鋳型ライブラリを作成することができる。この方法の利点は、鋳型調製の過程で PCR 法による増幅を省略することもできるため、PCR 増幅に伴う塩基配列のエラーと NGS に供する鋳型 DNA の組成に偏りが生じにくいことであるが、一方で Nextera™ を用いる方法よりも多量で高純度かつ損傷の少ない DNA を必要とする (図 9)。図 8 の下段に示した Nextera™ を用いる方法 (図 10) は、操作が簡便で出発材料とする DNA の量が少なく済むのが利点であるが、一方で、DNA 鎖の切断に組換え型トランスポゾン転移酵素による生化学的な挿入/切断反応を利用するため、この段階で転移酵素の特異性による偏りが生じることと、最終的な鋳型分子を生成させるために数回の PCR 反応が必要であり、最終的な鋳型 DNA セットに含まれる分子組成に偏りが生じる可能性がある。そこで、本業務を実施するに当たり、まず、DNA 試料と両手法との組み合わせについての比較検討を行った。

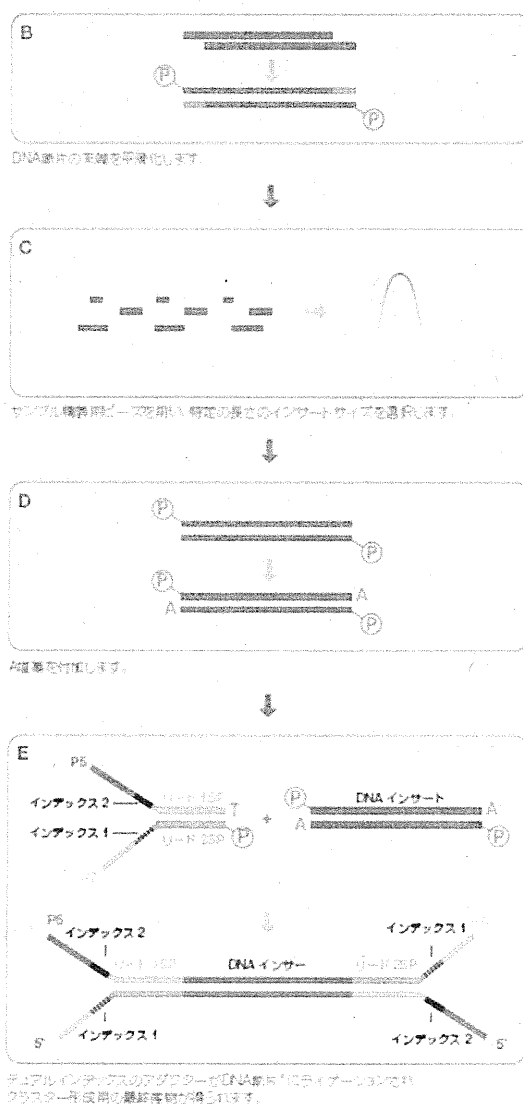
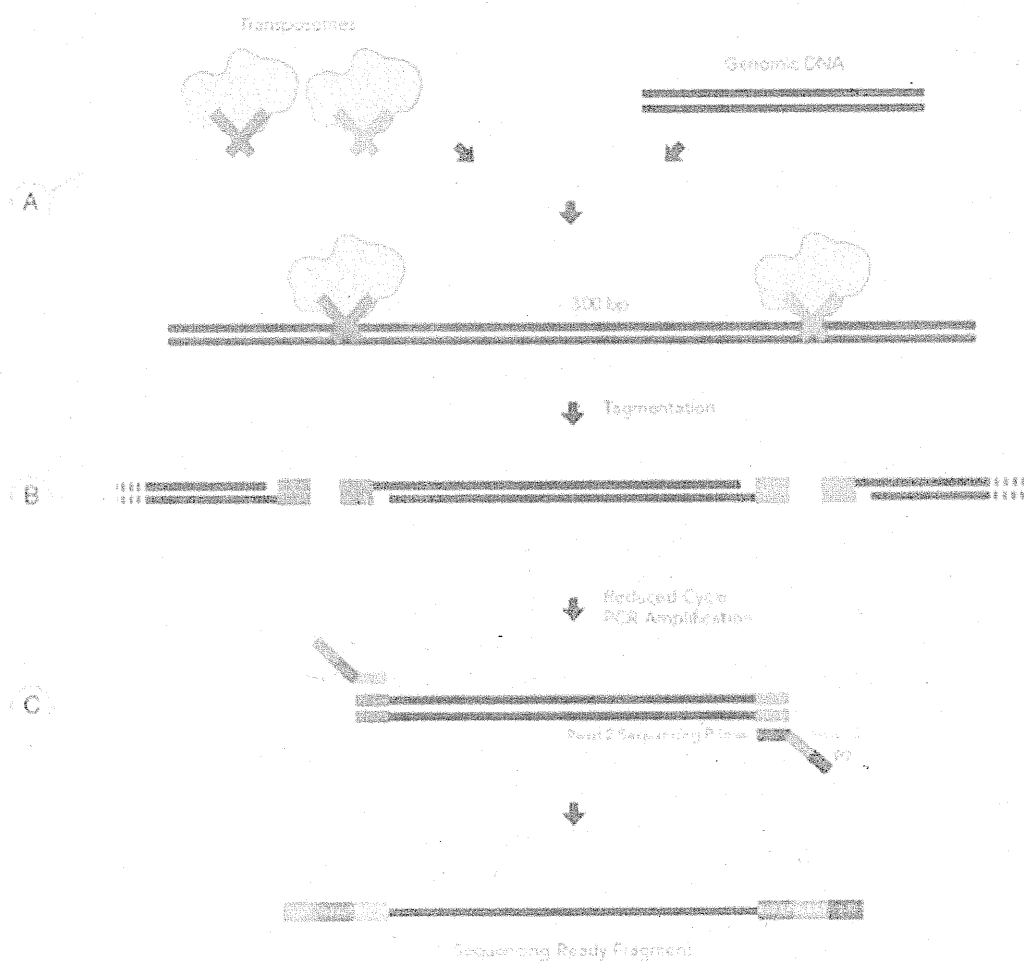


図9 Non-PCR 法による鋳型調製 (出典、 http://www.illumina.com/document/pdf/datasheet_truseq_DNA_pcr-free_sample_prep-j.pdf)



- A Nextera XT transposome with adapters is combined with template DNA
- B Tagmentation to fragment and add adapters
- C Limited cycle PCR to add sequencing primer sequences and indices

図10 Nextera™法による鋳型調製 (出典 http://supportres.illumina.com/documents/myillumina/2a3297c5-8a34-4fc5-a148-3e16666fd65e/nextera_DNA_sample_prep_guide_15027987_b.pdf)

表5に、予備実験として2.2.1で調製したDNA試料を使い、Non-PCR法及びNextera™法による鋳型調製の効率を検討した結果を示す。まず、表2に対応する非照射群試料についてNon-PCR法プロトコルによる鋳型調製効率を検討したが、最終段階で実施した検討用PCRが遺伝研における基準値(5-10倍)に達しなかったため、この試料DNAの大規模配列解析への使用は中止し、DNA調製方法に再検討を加えた。

表 5 非照射群試料についての検討

ID	濃度	使用量	サイズ選択後濃度	PCR 8Cycle 後濃度	表 2#
IESg9	228ng/ul	20ul	7.2ng/ul	8.2ng/ul	⑨
IESg10	408ng/ul	12ul	6.7ng/ul	1.2ng/ul	⑩
IESg11	256ng/ul	19ul	4.8ng/ul	1.2ng/ul	⑪
IESg12	656ng/ul	7ul	4.7ng/ul	7.7ng/ul	⑫

次に、表 3 に対応する照射群試料について、同様の検討を行った結果を表 6 に示す。図 5 に示すように高分子量 DNA が抽出できているが、一部 (④と⑥) を除いて増幅効率が基準値に達しない結果となった。何らかの夾雑物の混在が影響することも考えられたため、再精製及び Ampure™ による低分子量 DNA の除去操作を行ったが、特段の状況の改善は見られなかった。

表 6 照射群試料についての検討

ID	濃度	使用量	サイズ選択後濃度	PCR 8Cycle 後濃度	表 3#
IESg_13	1358ng/ul	2ul	1.4ng/ul	11.6ng/ul	④
IESg_14	1544ng/ul	2ul	1.7ng/ul	1.1ng/ul	⑤
IESg_15	906ng/ul	2.5ul	2.4ng/ul	15ng/ul	⑥
IESg_16	269ng/ul	10ul	2ng/ul	0.6ng/ul	⑦
IESg_17	209ng/ul	15ul	2.1ng/ul	1.1ng/ul	⑧
IESg_18	12ng/ul	中止			⑨

同じく表 3 に対応する試料 DNA について Nextera™ による鋳型調製を試みた結果をまとめたものが図 11 である。通常のアガロースゲル電気泳動ゲルからの切り出しによるサイズ選択を行っている。増幅後に加え、サイズ分布についても良好であることを示す結果が得られている。

以上の結果から、情報解析段階でバイアスに対する検討を行う必要が考えられるものの、まずは解析の基礎となる配列データを安定に取得することを目指し、本委託業務では Nextera™ による鋳型調製プロトコルを採用することとした。

ID	濃度	使用量	PCR 前濃度	PCR 5Cycle後濃度	400bpサイズ選択後濃度
IESg_13	1358ng/ul	1.2ul	3.8ng/ul	105ng/ul	8.9ng/ul
IESg_14	1544ng/ul	0.4ul	2.8ng/ul	80.5ng/ul	5.9ng/ul
IESg_15	906ng/ul	2.5ul	2.3ng/ul	74.5ng/ul	8.4ng/ul
IESg_16	269ng/ul	1.5ul	2.1ng/ul	77.8ng/ul	4.8ng/ul
IESg_17	209ng/ul	1.5ul	2.8ng/ul	87.8ng/ul	7.6ng/ul
IESg_18	12ng/ul	24ul	2.7ng/ul	63.7ng/ul	7.1ng/ul

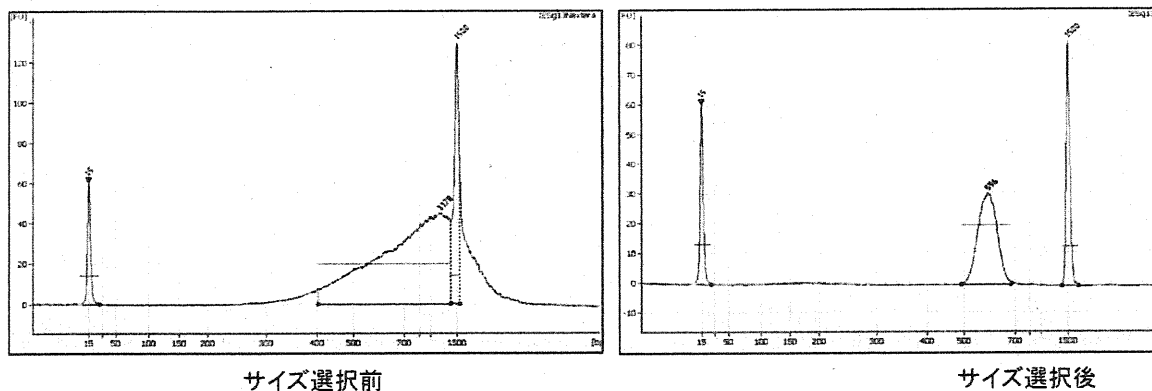


図 11 Nextera™による鋳型調製結果

鋳型調製プロトコルの検討に続き、Nextera™法と Non-PCR 法で調製した鋳型 DNA について HiSeq2500 による配列データ生産テストを行った結果が図 12 である。Nextera™法で調製した鋳型の方が配列の分布が広がる傾向にあることが見てとれるが、全 DNA 塩基配列解析に対する影響については、今後の検討課題である。

ReadDepthの分布

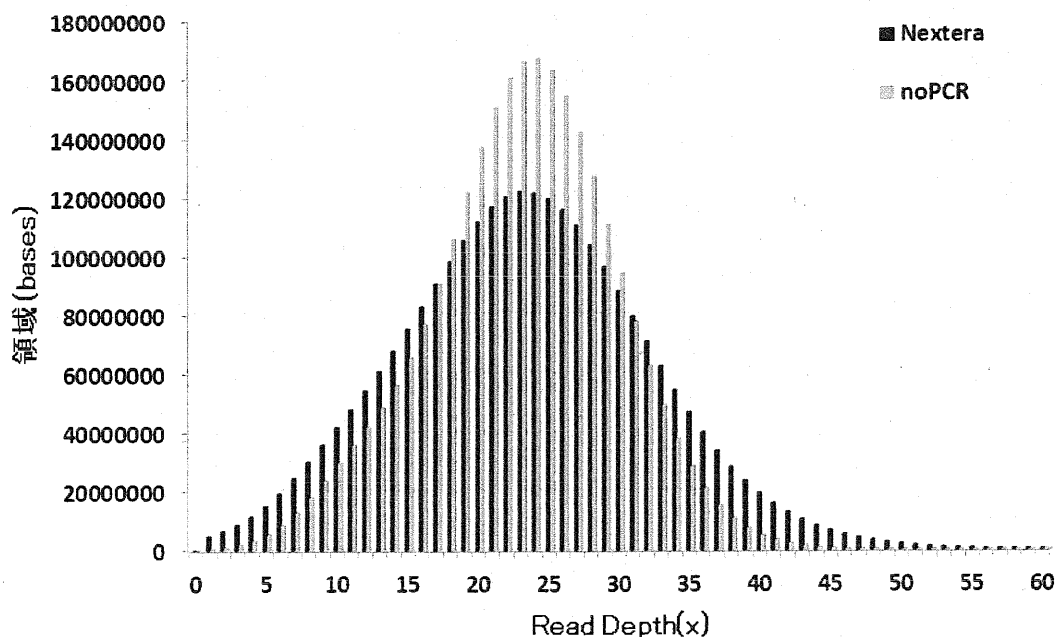


図 12 Non-PCR 法と Nextera™法との比較

3.2 大規模全塩基配列解読

DNA 塩基配列決定については、まず少量試料でテストランを実施して良好な鋳型ライブラリの調製できたトリオ DNA を選択し、その後大規模化する方針で臨んだ。

表 7 に、試料ごとの配列決定の経過（一部省略）を示す。まず、前項で述べた予備テストの結果から、表 1 の照射群トリオ H1 と非照射群トリオ C3 についてテスト配列決定を始めたが、表 7 に示すように良好な結果が得られたため、両トリオを本委託業務における解析対象トリオとして選択し、そのまま大規模配列データ生産に移行して配列決定を継続した。最終的に、全検体についてカバレッジ 100X 以上の塩基配列データを得た。

表 7 照射群トリオ H1 と非照射群トリオ C3 の大規模 DNA 塩基配列決定

サンプル名	ラン終了日	QF リード数 (M)	総塩基数 (Gb)	累計塩基数 (Gb)	累計カバレッジ(x)	備考
IESg13_H0103_Tail_P_M_20131225 (Nextera)	20140131	307.7	461.5	461.5	16.9	テストラン
	20140206	325.9	488.9	950.4	34.8	テストラン
	20140217	318.1	477.1	3,340.1	122.3	テストラン
IESg13_H0103_Tail_P_M_20131225 (no PCR)	20140207	243.0	364.6	364.6	13.4	テストラン (No
	20140209	245.1	367.6	732.2	26.8	テストラン (No
	20140209	239.2	358.8	1,091.0	39.9	テストラン (No
IESg14_H0623_Tail_P_F_20131225	20140217	337.4	506.0	506.0	18.5	テストラン
	20140223	315.0	472.5	1,447.5	53.0	
	201403090	297.7	446.5	2,843.2	104.1	
IESg17_H3802_Tail_F1_F_20131225	20140217	327.9	491.8	491.8	18.0	テストラン
	20140223	324.0	486.0	977.8	35.8	
	20140303	297.7	446.5	2,843.2	104.1	
IESg18_H3802_Limb_F1_F_20131225	20140226	226.8	340.2	340.2	12.5	テストラン
	20140306	330.1	495.2	1,544.7	56.6	
	20140309	258.3	387.5	2,816.9	103.2	
IESg9_C0134_Tail_P_M_20131216	20140223	253.3	380.0	380.0	13.9	
	20140305	243.9	365.8	745.8	27.3	
	20140309	229.1	343.6	3,022.1	110.7	
IESg10_C0654_Tail_P_F_20131216	20140223	264.8	397.2	397.2	14.5	
	20140305	278.6	417.8	815.1	29.8	
	20140310	301.2	454.7	3,067.2	112.3	
IESg11_C3846_Tail_F1_F_20131216	20140223	271.6	407.3	407.3	14.9	
	20140228	284.8	427.2	834.5	30.6	
	20140301	285.7	428.6	2,970.8	108.8	
IESg12_C3846_Limb_F1_F_20131216	20140223	246.2	369.3	369.3	13.5	
	20140303	313.0	469.6	838.8	30.7	
	20140306	312.8	469.1	3,186.4	116.7	

4. 親世代と仔の全塩基配列情報の比較・分析

本委託業務では、雄親に低線量率 γ 線を長期間照射（20 mGy/日を約400日間、総線量8000 mGy）したマウストリオ試料から得られた全塩基配列データを、マウスゲノム参照配及び非照射のトリオから得られた全DNA塩基配列データと比較することにより、放射線照射による変異出現率の変化について考察する。また、仔については、異なる組織から抽出したDNAの配列データについても比較検討を加えた。被ばく条件の20 mGy/22時間/日 \times 400日照射は、マウスに対して低線量長期被ばく実験を実施している国内唯一の機関である環境研において、最も被ばく線量の高い条件である。

本委託業務で解析対象とするマウストリオにおいては、照射実験の期間中に図13に示すような変異がDNA中に生じると考えられ、その一部については全DNA塩基配列データの解析から検出できることが期待される。環境研で研究用に維持されているマウスは、2.1項に述べたように平成11年度に独立行政法人放射線医学総合研究所から導入されたC57BL/6J系統である。参照配列の構築に使用したC57BL/6J個体との共通祖先から別れて以来（図14）、それぞれの系列のゲノムには独立に変異が生じ、一部については集団内に固定されたことが予想される。図13に示した▲SNVs C57BL/6Jは、参照配列から見たときに環境研のマウスに共通に見いだされることが予想される変異であり、近交化されていることから大部分はホモ変異で、仔世代、孫世代に伝搬されるはずのものである。また、図13に示した体細胞変異とは、親世代、仔世代共に受精卵から試料採取時まで体細胞DNAに生じるであろう変異である。体細胞変異は各組織、細胞の発生系列ごとに独立に発生すると考えられ、次世代に伝えられることはない。放射線被ばく雄親マウスのDNA中には、放射線の影響による体細胞変異も存在する可能性があるが、この変異は仔世代には伝わらない。雌親の体細胞に生じた変異についても同様である。仔世代DNAの塩基配列中には、これらに加え、父親側の生殖細胞DNAに生じた変異に由来するが放射線によらない新規変異と放射線の影響による新規変異の両方、母親側の生殖細胞DNAに由来する新規変異の存在が考えられる。本業務では同一の近交系マウスを両親に用いているため、個々の変異の由来を同定することは不可能である。この点については、照射実験系の検討を含め、将来の検討課題である。仔のDNAについては、異なる組織で独立に生じた体細胞変異を情報処理の過程で相殺できる可能性があるため別個の組織から調製したDNAについても配列決定を行うが、将来の検討課題として孫世代（F2）マウスの解析が望まれる。また、本委託業務には、情報解析の結果推定できた変異部位についての検証実験は含まれていない。したがって、本報告書で取り扱う変異は確定したものではなく、あくまでも変異部位の候補であり、検討内容についてもその範囲内のものであることには留意されたい。

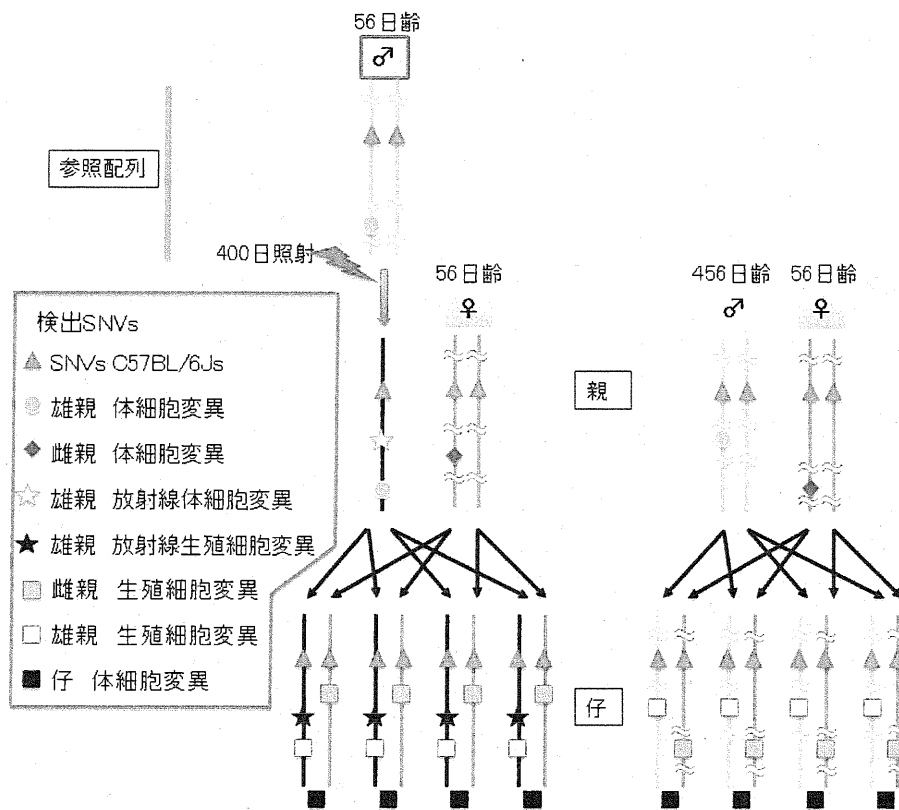


図13 トリオ全DNA解析で検出できる可能性のある変異

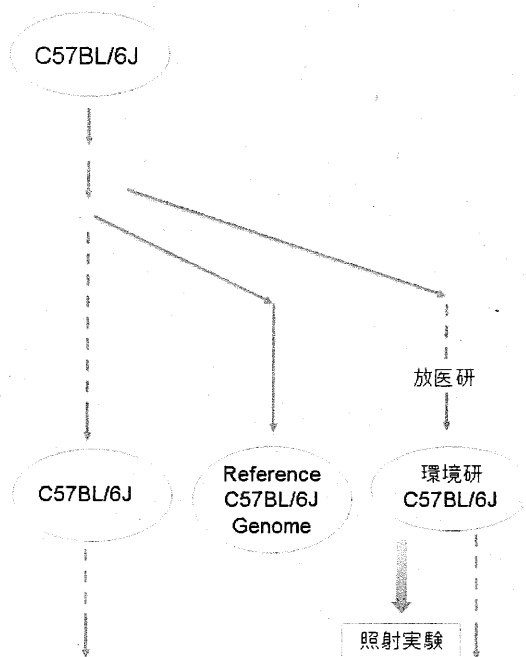


図14 本委託業務で使したマウス系統と参照配列構築に使したマウスとの系統関係

4. 1 情報解析システムと解析プロトコル

本委託業務で大規模解析に供する全 DNA 塩基配列データセットは、トリオあたり、雄親由来 1、雌親由来 1、仔由来 2 の計 4 個であり、照射群と非照射群とを合わせて計 8 個である (表 7)。本業務における NGS 解析では、各個体由来の長鎖 DNA から平均鎖長 400 塩基対の鋳型 DNA ライブラリを作成し、両末端側からそれぞれ 150 塩基対の配列データ (ペアリード。NGS による個々の塩基配列データを「リード」という。) を、カバレッジ 100 x 以上の量で取得している (表 7)。本業務の目的は、先行調査の結果から少数であることが予想される新規変異部位の検出にあるため、低品質リードの除去を丁寧に行った後、各リードを全 DNA 参照配列との相同性にもとづいてゲノム配列上に配置する処理 (マッピングという。) を行うこととした。参照配列上に一意に配置できたリード (ユニークマップという。) の配列を参照配列と比較し、変異候補部位の検出と統計的有意性の検討を行った。変異候補部位は、本来は確認のために別途検証実験を行い、変異部位として確定すべきものであるが、本年度の委託業務仕様には含まれておらず将来実施すべき検討課題として残されている。

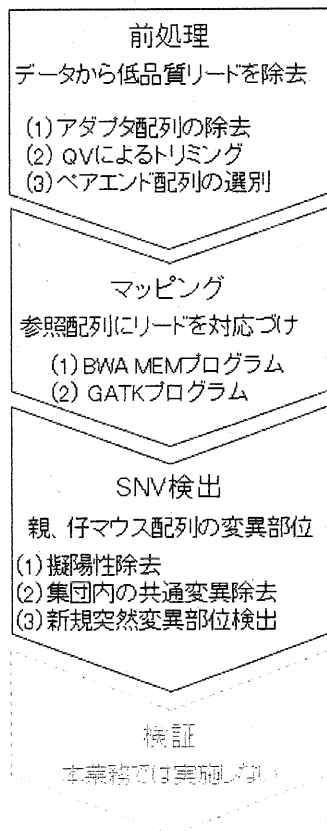


図 15 全塩基配列情報解析プロセスの概要

解析の基本的な手法は、ヒトトリオの解析やヒト集団の多型解析等で既に論文発表されている考え方と同様で、塩基配列の相同性に基づく変異候補の抽出と統計検定である (引用文献 6、7)。解析の細部については、遺伝研における経験及び本業務に適したプロトコルを採用した。各データセットは数十億個の配列データを含む大規模なものであるため (表 7)、解析サーバに加え、遺伝研スパコンも利用して解析を行った。

図 15 に、配列解析の全体の流れについての概略を示す。まず、各個体から得られた全配列データから低品質リードを取り除くために以下の前処理を行った。まず、配列中に NGS の過程で使用したアダプタ配列が含まれるものについてはその除去を行った。次に、配列両端の Quality Value (QV) の低い塩基を取り除くため、端から QV が 20 以上 (エラー率が 1%以下) の塩基が 11 塩基以上連続するように配列両端の塩基を除去した。この時、配列の 5' 末端側塩

基が除去されるリードについては、後段階での PCR 重複の検出に支障があるためデータセットから除外した。この処理の後、配列長が 100 塩基対以上ずつ

残ったペアリードだけを解析に用いた。この前処理によりデータ量は初期全配列データの約 80%になるが、解析結果の信頼性向上のために必須なプロセスである。前処理後に残った高品質リードの度数分布を各検体について示した (図 16)。

次に、BWA MEM プログラム (引用文献 8) を用いて、ペアリード配列をマウス全 DNA 参照配列 (GRCm38/mm10) にマッピングした。マッピングのパラメータには推奨値を使用し、その後有効なアライメント (各リードと、それに対応する参照配列領域の組のこと) の取捨選択を行った。まず、リードの全長が参照配列と対応できたアライメントのうち、変異候補部位 (塩基置換、挿入、欠失、またはエラー) の個数が配列長の 5%以下のアライメントを有効とした。ここで、挿入・欠失部位については、その長さにかかわらず入った箇所をカウントすることで、長い (100 塩基以下) 挿入・欠失にも対応できるように工夫している。次に、ペアリード配列の両方がこの条件を満たし、かつ参照ゲノム

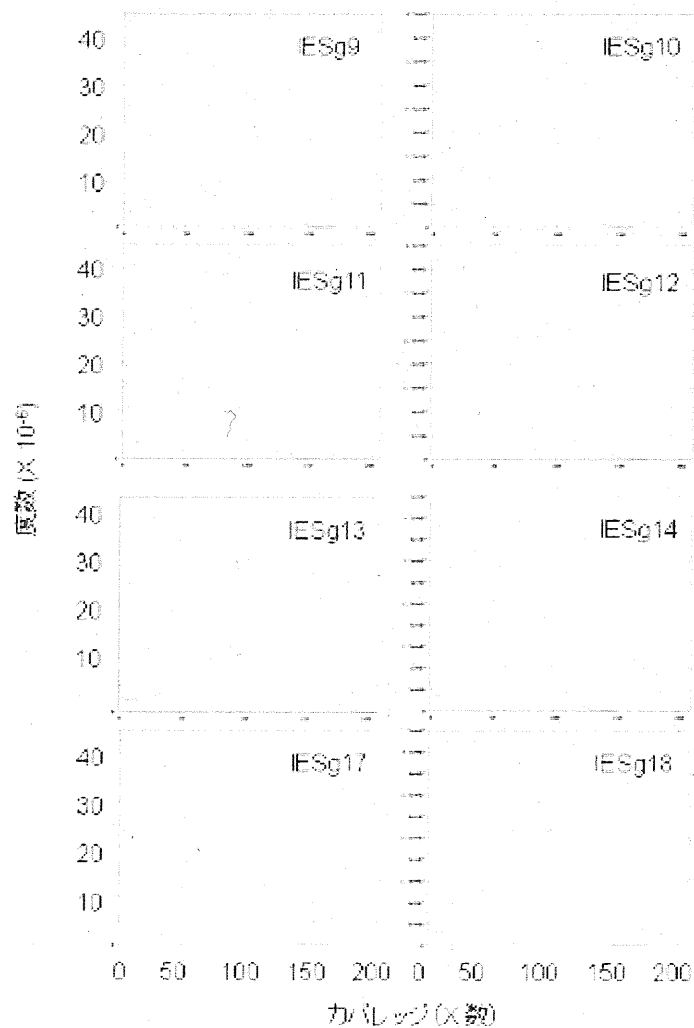


図 16 リードの度数分布

配列の同じスキファールド（参照配列中の、一連の連続領域のこと）上に、一意にマップされるものだけを選び出した。また、被覆度の二重カウントを避けるため、参照配列ゲノム上で重なってマップされているペアリードはデータセットから除外した。その後、Picardプログラム(<http://picard.sourceforge.net>)を用いて領域のソートとPCR重複の除去を行い、残ったアライメントについてGATKプログラム(<http://www.broadinstitute.org/gatk/>)による再アライメントを行って最終的なアライメントとした。以上のマッピングに関する解析手順を図17に示す。

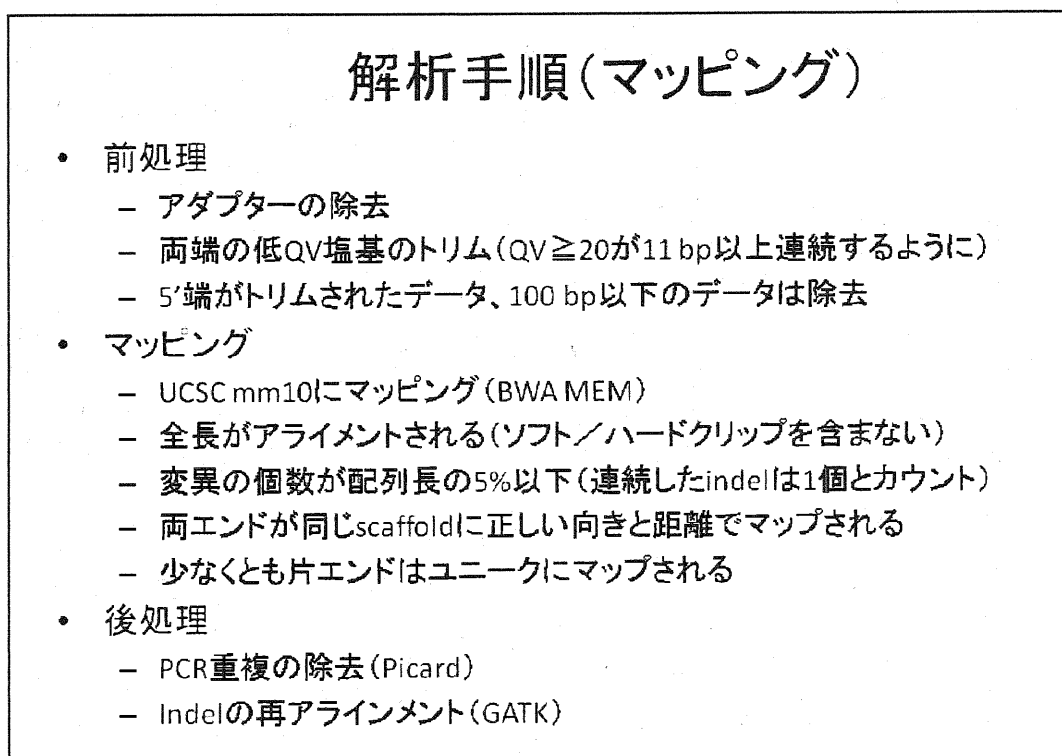


図17 解析手順の概要

次に、このアラインメントをもとに、次の条件で変異候補部位の抽出を行った。まず、本業務で採用したNGSシステムに固有のエラーが解析結果に影響する可能性を低減させるため、リードがDNAの両鎖について一定以上の頻度で、極度な偏りなく存在する部位を選択した。具体的には、参照配列DNAの両鎖のそれぞれにマップされるリードの個数の和が、参照配列全体に対するリードのカバレッジ（被覆度）分布の最大値の1/2から2倍までの範囲内で、かつ、少なくとも片鎖の配列データが7個以上存在することを各候補部位について検定している。これにより、ヘテロの変異候補部位を、たかだか1%の取りこぼしで検出できている（二項分布として計算した）。

また、以上の解析に用いた計算サーバの準備及び必要パラメータ設定後の大規模解析は再委任で実施した（別添資料5）。

4. 2 変異部位解析の結果

照射、非照射各トリオの全8検体から得られた塩基配列データに対して前項で述べた処理を行った結果得られた変異の総数を表8にまとめた。参照配列の約3/4に相当する領域が解析対象となっている。図中の項目のうちのホモ変異は、本業務における実験に供した環境研マウス集団中に固定された変異で、図13に示した▲に相当する。塩基置換の種類（転移と転換）については後述する。

表8 照射、非照射トリオの各個体で検出された変異総数

ID	領域 (Gb)	塩基置換	転移	転換	転移/転換	挿入 (bp)	欠失 (bp)	ホモ変異
IESg9 C_P_M	2.02	1,842	1,091	751	1.45	1,601 (6,089)	1,757 (6,871)	13,905
IESg10 C_P_F	2.03	1,912	1,150	762	1.51	1,785 (6,844)	1,997 (7,747)	14,060
IESg11 C_F1_tail	2.02	1,981	1,125	856	1.31	1,719 (6,481)	1,920 (7,610)	13,843
IESg12 C_F1_limb	2.06	2,100	1,233	867	1.42	1,879 (7,096)	2,094 (8,081)	15,029
IESg13 H_P_M	2.08	1,586	938	648	1.45	1,734 (6,786)	1,995 (7,987)	15,108
IESg14 H_P_F	2.02	1,983	1,135	848	1.34	1,828 (6,974)	1,895 (7,518)	13,721
IESg17 H_F1_tail	2.04	1,959	1,121	838	1.34	1,804 (6,919)	1,952 (7,795)	14,293
IESg18 H_F1_limb	2.06	2,252	1,264	988	1.28	1,994 (7,557)	2,261 (8,907)	14,690

表8に示したのは、各トリオの各検体についての個別の解析結果であるが、相互に比較可能なように解析対象領域を全8検体に共通の領域とした結果が表9である。

表9では、参照配列の70.3%に相当する1.90Gbの領域が全検体に共通の解析対象となっている。ホモ変異の数は全検体を通して約11,000個 (5.79×10^{-6})と、ほぼ一定の値となっており、実験に供したマウス集団で近交化が成立していることを示している。また、塩基置換の個数、欠失部位の個数、挿入部位の個数について、照射トリオの仔由来の検体であるIESg17、18と、非照射トリオの仔由来の検体であるIESg11、12の間で際だった差は見られない。照射雄親であるIESg13と、非照射雄親であるIESg9についても同様であり、放射線被ばくによる変異数の増加は確認できなかった。

表 9 照射、非照射トリオ各個体の共通領域に検出された変異数

ID	領域 (Gb)	塩基置換	転移	転換	挿入/転換	挿入 (bp)	欠失 (bp)	新規変異
IESg9 C_P_M	1.90	1,144	676	468	1.44	1,038 (4,035)	1,151 (4,598)	11,140
IESg10 C_P_F	1.90	1,240	734	506	1.45	1,132 (4,408)	1,250 (5,032)	11,015
IESg11 C_F1_tail	1.90	1,252	722	530	1.36	1,079 (4,149)	1,270 (5,061)	11,035
IESg12 C_F1_limb	1.90	1,240	727	513	1.42	1,062 (4,077)	1,205 (4,719)	11,052
IESg13 H_P_M	1.90	1,013	595	418	1.42	1,034 (4,126)	1,136 (4,601)	11,166
IESg14 H_P_F	1.90	1,341	763	578	1.32	1,189 (4,598)	1,280 (5,052)	10,878
IESg17 H_F1_tail	1.90	1,270	717	553	1.30	1,110 (4,296)	1,231 (4,959)	11,003
IESg18 H_F1_limb	1.90	1,301	747	554	1.35	1,125 (4,384)	1,339 (5,376)	10,940

表 9 に示した結果から、照射トリオ、非照射トリオの子マウスについて、親世代と共通する変異を除去し、仔世代の DNA に新たに出現した変異（親世代の生殖細胞変異と仔世代の体細胞変異との和）の数を表したものが表 10 である。共通領域の全体と、これからさらに反復配列を除去したユニーク領域（Repeat Masker プログラム; <http://www.repeatmasker.org/> を使用した。）の各々についての検出結果が表示してある。表の数字から明らかなように、塩

表 10 照射、非照射トリオの仔個体由来検体中に特異的に検出された変異数

条件	ID	領域 (Gb)	塩基置換	転移	転換	挿入/転換	挿入 (bp)	欠失 (bp)	新規変異
共通領域 新規変異	IESg11 C_F1_tail	1.90	250	137	113	1.21	112 (386)	115 (435)	69
	IESg12 C_F1_limb	1.90	256	152	104	1.46	92 (304)	131 (462)	85
	IESg17 H_F1_tail	1.90	164	86	78	1.10	62 (209)	85 (356)	42
	IESg18 H_F1_limb	1.90	184	103	81	1.27	91 (332)	92 (451)	49
反復配列 領域以外	IESg11 C_F1_tail	1.16	113	69	44	1.57	17 (23)	21 (43)	8
	IESg12 C_F1_limb	1.16	126	79	47	1.68	13 (18)	29 (56)	14
	IESg17 H_F1_tail	1.16	76	33	43	0.77	11 (20)	14 (67)	3
	IESg18 H_F1_limb	1.16	90	48	42	1.14	7 (9)	14 (93)	4

基置換、挿入、欠失のいずれについても、照射トリオの仔由来検体である IESg17、18 と、非照射トリオの仔由来検体である IESg11、12 との間に、当初に予想した照射トリオの方に変異が多いという結果は見られない。反復配列以外の領域で IESg17、18 の方に欠失塩基数が多くみられるが、これが雄親の放射線被ばくを原因とするものかどうかについては今後の検討が必要である。また、表 10 の結果には、親の生殖細胞に生じた変異に加え、仔が発生/老化の過程で体細胞に蓄積した変異も含まれている事にも留意する必要がある（「5. 親世代の被ばく線量と仔 DNA の塩基配列変異との関係に係わる検討」で議論する）。

体細胞変異は受精後の発生過程で細胞系列ごとに無作為に生じると仮定し、表 10 の結果から、さらに尾と前肢由来の DNA に観察された変異で両者に共通な部位を抽出したものが表 11 である。つまり、表 11 に示した変異部位の大部

表 11 照射、非照射トリオの仔個体由来検体中に特異的に検出された、生殖系細胞由来新規変異数

条件	ID	ゲノム (Gb)	生殖細胞	老化	照射	発生/老化	挿入 (nb)	欠失 (nb)	ホモ変異
共通領域 生殖細胞系 列新規変異	IESg11 C_F1_tail	1.90	195	115	80	1.44	48 (142)	71 (242)	31
	IESg12 C_F1_limb	1.90	194	115	79	1.46	46 (134)	70 (238)	35
	IESg17 H_F1_tail	1.90	105	51	54	0.94	28 (89)	38 (172)	11
	IESg18 H_F1_limb	1.90	108	54	54	1.00	28 (93)	38 (172)	8
反復配列領 域以外	IESg11 C_F1_tail	1.16	102	65	37	1.76	12 (17)	21 (43)	6
	IESg12 C_F1_limb	1.16	101	65	36	1.81	12 (17)	21 (43)	7
	IESg17 H_F1_tail	1.16	58	24	32	0.75	6 (8)	11 (64)	1
	IESg18 H_F1_limb	1.16	57	25	32	0.78	6 (8)	11 (64)	0

分は、親の生殖細胞系列に生じた新規突然変異と見なすことができる。表中の反復配列を除いた領域について塩基置換、挿入、欠失、ホモ変異数の和を 1 世代経過することで新たに生じ変異と見なして変異率を計算すると、照射群で 3.19×10^{-8} / ntd./generation、非照射群では 6.08×10^{-8} /ntd/generation となり、照射/非照射比は 0.52 で、この数値を見る限りは、照射群の方が 2 倍ほど低い変異率となっている。文献によるマウスの変異率は 3.699×10^{-8} とされており、本業務で用いた照射群についての値とほぼ一致する（引用文献 10）。また、ヒトについての推測値が文献 6 にまとめられており、対象と計算手法によって値は異なるが、 $0.96 - 2.17 \times 10^{-8}$ /ntd. / generation とされている。また、照射個体である 17/18 の塩基置換に転換変異が多く見られるが、この原因については、

今後の検討課題である。

表 8~11 に示した変異部位は、図 17 に示す解析手順に従い、取りこぼし率を 1%以下としたときに得られた結果であるが、次に示す表 12 は、取りこぼし率を 0.1%以下とし、変異部位の検索範囲を広げた（つまり、誤検出数が増加する可能性のある）解析結果についての、表 11 に相当するデータである。本業務で採用したプロセスでは、仔の変異から親に見られるものは除去し、さらに異なる組織間での共通部位のみを選択するので、表 11 と表 12 との間にそれほど大きな数字の変化は見られなかった。本報告書では、表 11 にもとづく変異率を表示する。

表 12 取りこぼし率を<0.1%とした時の、生殖系列細胞由来新規変異数

変異	ID	検出数 (n)	挿入数	欠失数	挿入/欠失	挿入 (n)	欠失 (n)	欠失/挿入
共通領域 生殖細胞系 列新規変異	IESg11 C_Fl_tail	190	180	104	78	1.37 (168)	52 (70)	19 (203)
	IESg12 C_Fl_limb	190	179	104	75	1.39 (153)	48 (71)	23 (207)
	IESg17 H_Fl_tail	190	97	47	50	0.94 (62)	18 (30)	3 (172)
	IESg18 H_Fl_limb	190	98	48	50	0.96 (70)	19 (30)	1 (172)
反復配列領 域以外	IESg11 C_Fl_tail	116	96	60	38	1.67 (16)	13 (23)	5 (46)
	IESg12 C_Fl_limb	116	95	60	35	1.71 (16)	13 (23)	6 (46)
	IESg17 H_Fl_tail	116	51	26	25	1.04 (5)	4 (11)	0 (36)
	IESg18 H_Fl_limb	116	51	26	25	1.04 (5)	4 (11)	0 (36)

次に、照射群と非照射群とで挿入/欠失変異の長さの分布を比較したが、挿入変異については両者で差が見られなかった。一方、欠失変異については照射群の方が 5ヌクレオチド以上の欠失が多い傾向があるともいえ、本業務とほぼ同程度の低線量 γ 線被ばくをさせたマウス組織由来 DNA を用いた先行研究と同様な傾向を示している(引用文献 11)。しかし、検出された変異の個数が少ないことと 1 個体間での比較であるため、現状では推測の域を出るものではない。今後は更に例数を増やし、メカニズムまで踏み込んだ検討が必要であろう。

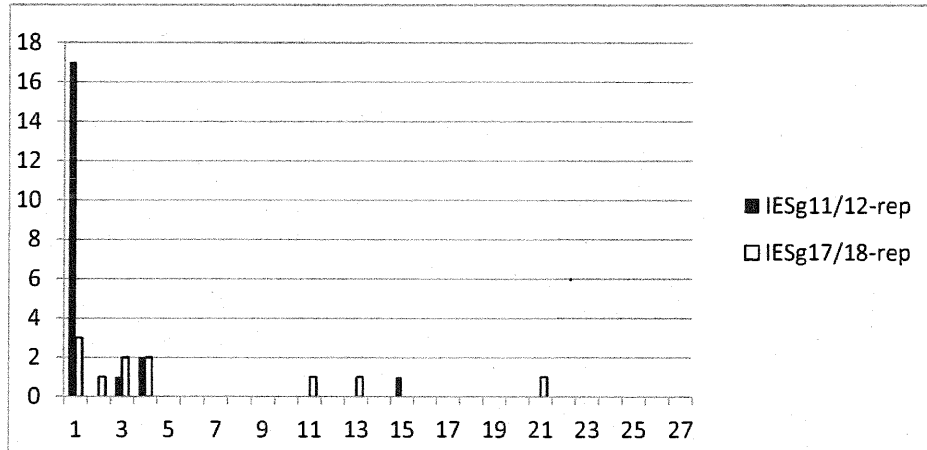


図 18 反復配列以外の領域で認められた欠失変異 (表 11) サイズの分布。
横軸：欠失サイズ(ヌクレオチド数)、縦軸：度数

本章末の表 13、14 は、各々表 11 の IESg11、IESg17 の変異部位について参照配列上での位置と種類とをまとめたものである。

以下、本業務から得られた解析結果をまとめる。

- 全 DNA 塩基配列解析のため、雄親に低線量率 γ 線を長期間照射 (20 mGy/日を約 400 日間、総線量 8000 mGy) した実験室マウス C57BL/6J 系統のトリオから 1 家系 (H1; 表 1) 及び非照射コントロールトリオから 1 家系 (C3; 表 1) を選択した。
- トリオの各個体(仔については 2 組織)から抽出した DNA に対して >100X の全 DNA 配列を決定した。
- 図 15~図 17 に示す条件で情報解析を行い、各検体について塩基置換、挿入、欠失変異部位を検出した。
- 仔については、最終的に異なる組織間で共通に検出される変異を選択し、これを親世代の生殖細胞系列で生じた新規変異部位とし、残りを体細胞変異として分別した。
- 検出できた新規変異の個数を、照射、非照射トリオ間で比較したが、照射群のユニーク領域内欠失変異の塩基数がやや多いのみで、変異の個数についてはいずれも照射群の方が低くなる結果を得た。表 11 の新規塩基置換、挿入、欠失、ホモ変異数から世代当たりの変異率を計算すると、照射群で 3.19×10^{-8} /ntd./generation、非照射群では 6.08×10^{-8} /ntd./generation となり、照射/非照射比は 0.52 で、この数値を見る限りは、照射群の方が 2 倍ほど低い変異率を示している。
- 塩基置換部位については、転移置換 (プリン塩基からプリン塩基、もしくはピリミジン塩基からピリミジン塩基) 頻度に比べ転換置換 (プリン塩基からピリミジン塩基、またはその逆) の頻度が照射群で相対的に高い結果が得られた。

表13 IESg11変異部位リスト

染色体番号	位置	参照配列塩基	Fw カバレッジ	Rv カバレッジ	別アレル	Fw カバレッジ	Rv カバレッジ	CDS*
chr1	11721251	T	20	24	A	14	19	
chr1	23371163	G	16	26	A	18	25	
chr1	40634039	G	24	20	A	24	14	
chr1	62241351	C	22	3	-	29	4	
chr1	63056751	A	27	14	-	24	10	
chr1	70708582	T	17	21	-	16	23	
chr1	108565000	A	21	14	T	40	15	
chr1	126035435	G	16	13	A	9	17	
chr1	129222724	G	19	17	C	13	16	
chr2	33075492	C	16	12	T	19	16	
chr2	51463848	G	15	11	g	9	14	
chr2	68091741	T	19	12	G	18	16	
chr2	76768589	G	20	11	A	29	10	*
chr2	126714933	T	27	15	-	28	14	
chr2	161342745	G	24	31	A	14	29	
chr2	166040055	T	21	24	t	12	26	
chr2	166270796	T	37	13	t	43	6	
chr2	173229173	C	16	35	A	8	29	
chr3	15457753	T	22	27	attt	15	24	
chr3	15577104	A	31	36	G	22	36	
chr3	27098685	T	32	17	G	21	32	
chr3	45694655	G	12	26	A	15	34	
chr3	52575924	C	29	8	T	21	11	
chr3	56963311	C	13	17	A	20	23	
chr3	57491615	G	14	16	A	19	18	
chr3	74631849	C	14	23	T	8	18	
chr3	83355858	T	28	14	C	23	22	
chr3	129962473	G	31	8	A	41	14	
chr3	143094005	G	45	15	A	31	17	
chr3	148531881	C	36	23	T	23	21	
chr4	3165323	A	20	17	G	13	7	
chr4	10057773	C	28	8	T	27	6	
chr4	10364054	C	11	19	T	11	19	
chr4	30298595	G	29	18	T	33	17	
chr4	56854938	T	5	13	A	10	12	
chr4	74160273	A	48	4	-	45	10	
chr4	86047413	A	22	31	aca	16	38	
chr4	90932814	G	35	25	A	26	24	
chr4	117311929	A	11	14	G	6	19	
chr4	130338348	T	19	24	A	19	24	
chr4	146053320	T	20	34	t	15	32	
chr4	147451018	G	22	39	C	17	37	
chr4	147451019	G	23	39	A	17	37	
chr5	19499528	A	14	16	C	24	10	
chr5	21305014	T	14	18	G	9	16	
chr5	37013134	C	14	16	T	18	17	
chr5	54005871	C	14	36	T	11	21	
chr5	56721720	G	32	16	A	41	14	
chr5	63868820	G	28	26	A	23	24	
chr5	76064055	C	4	1	G	36	32	
chr5	83746369	C	5	34	T	9	37	
chr5	86590099	A	21	16	a	11	15	
chr5	87534682	T	9	18	A	17	20	
chr5	111804493	G	11	32	A	22	17	
chr5	120070331	A	17	27	C	6	33	
chr5	145630655	C	34	32	A	27	21	
chr5	147766508	C	5	27	T	5	25	
chr6	13837429	G	20	24	A	22	13	
chr6	14540224	C	29	24	G	40	27	
chr6	19362155	A	17	22	G	11	16	
chr6	32551792	A	13	22	T	21	13	
chr6	41607311	C	20	19	T	13	15	
chr6	63771267	C	22	24	G	18	26	
chr6	63932155	C	15	8	T	14	7	
chr6	65281815	T	20	20	C	20	16	
chr6	87844244	A	10	20	-	10	22	
chr6	104681996	A	26	21	T	27	24	
chr6	117479982	T	20	32	t	28	21	
chr6	143564188	G	9	25	T	10	18	
chr6	146947603	A	25	35	-	20	39	
chr6	146947604	T	25	35	G	20	39	
chr7	34793158	T	9	14	-	9	15	
chr7	50512263	G	2	1	T	40	17	

chr7	51192821	A	18	21	-	18	24	
chr7	76714975	T	0	0	A	36	29	
chr7	77280692	A	21	27	T	15	21	
chr7	105517894	A	12	25	G	20	29	
chr7	108667328	T	17	28	A	15	20	
chr7	111575615	A	12	17	-	10	9	
chr7	135762357	G	26	19	A	33	17	
chr7	136621251	A	19	7	-	9	9	
chr8	23159580	G	15	26	A	21	26	
chr8	37195559	T	16	16	-	10	33	
chr8	87106484	G	14	16	C	13	19	
chr8	89569616	G	26	11	A	15	12	
chr8	93952157	T	26	9	C	30	10	
chr8	99160805	C	21	8	T	21	14	
chr8	99622710	C	29	20	T	23	17	
chr8	106806959	C	28	18	A	30	8	
chr8	121242065	C	27	17	T	34	12	
chr8	129264329	A	14	9	G	13	6	
chr9	3338631	C	18	10	T	21	7	
chr9	51144507	G	21	23	A	31	17	
chr9	52710795	A	16	28	G	15	23	
chr9	95526636	G	0	0	A	46	54	
chr9	102663690	G	0	0	A	40	31	
chr10	6795746	T	13	19	t	10	20	
chr10	20208812	C	29	10	G	22	6	
chr10	69646669	T	43	7	G	35	4	
chr10	83137909	G	14	22	-	11	18	
chr10	113008234	A	29	17	-	21	17	
chr10	113484361	A	14	6	a	7	22	
chr11	33055652	C	11	28	T	21	33	
chr11	47169083	G	28	13	T	18	10	
chr11	68588380	C	13	21	T	19	13	
chr11	82257875	C	25	14	T	13	25	
chr11	90175179	G	13	16	C	18	19	
chr11	120959742	C	15	2	A	21	10	
chr12	7601789	G	16	37	A	20	36	
chr12	11691472	C	18	18	T	14	22	
chr12	17300501	G	21	12	A	28	7	
chr12	40745894	G	37	13	A	37	11	
chr12	53124118	C	18	22	-	15	18	
chr12	57772660	G	8	16	T	8	19	
chr12	66889188	T	45	18	g	34	13	
chr12	106871054	A	29	20	-	29	19	
chr13	10101971	G	14	19	A	8	22	
chr13	20817810	C	18	35	T	8	27	
chr13	24426422	A	21	20	T	20	24	
chr13	99502107	T	8	29	A	8	21	
chr14	43278830	T	29	42	C	30	23	
chr14	45367713	A	15	33	G	9	26	*
chr14	50510749	A	13	34	a	11	37	
chr14	72858756	T	18	14	A	19	9	
chr14	74139277	C	5	10	T	13	16	
chr14	74315905	T	10	30	-	15	46	
chr14	85304359	C	39	12	T	46	14	
chr14	90318265	A	22	26	G	26	22	
chr15	13212702	A	30	15	T	35	8	
chr17	27442716	G	35	11	-	25	6	
chr17	35436873	T	29	32	t	25	16	
chr17	51788283	G	35	24	A	36	19	
chr17	68876360	C	18	15	T	15	20	
chr17	71340892	T	22	20	-	15	21	
chr18	3045736	G	32	11	A	17	12	
chr18	38515784	G	18	16	T	7	21	
chr18	39163279	G	16	32	A	18	31	
chr18	78594385	C	13	14	T	21	15	
chr19	3840848	C	17	19	T	18	16	
chr19	24783734	C	11	19	-	20	13	
chr19	51515064	T	27	22	-	14	15	

「別アリル」が塩基置換の時はA,C,G,Tが1文字、挿入の時は小文字でa,c,g,tを複数個、欠失の時は - を複数個で表した。挿入時の「位置」は、挿入のすぐ後ろ(IESg11: chr17 35436873の場合、35436872と35436873の間に挿入)。欠失時の「位置」は、欠失の5'端の位置(IESg11: chr19 51515064の場合、51515064-51515067の4塩基欠失)。

表14 IESg17変異部位リスト

染色体番号	位置	参照配列塩基	Fw カバレッジ	Rv カバレッジ	別アレル	Fw カバレッジ	Rv カバレッジ	CDS*
chr1	29927876	G	15	18	T	24	22	
chr1	39849039	C	22	15	T	12	23	
chr1	147609250	T	7	17	t	6	15	
chr1	172190152	G	20	16		18	8	
chr2	41932456	G	15	19	A	25	31	
chr2	114151065	T	25	19	C	26	30	
chr2	133535047	T	29	10	A	28	14	
chr2	140552784	A	13	35	C	15	30	
chr2	172123589	T	19	24		23	30	
chr3	15330831	A	50	15	G	33	8	
chr3	15576880	T	37	39	t	24	31	
chr3	106155882	T	33	46	tt	24	32	
chr3	138288125	T	28	19	G	17	15	
chr3	138288126	C	27	19	T	17	15	
chr4	3059020	A	40	28		27	21	
chr4	3059055	A	47	38	T	32	26	
chr4	18346933	A	34	27	T	29	24	
chr4	18346936	C	33	28	A	29	24	
chr4	51913671	A	16	8	C	25	18	
chr4	97174425	G	22	7	A	29	15	
chr4	145428982	A	33	15	aa	23	6	
chr4	145428983	T	34	15	A	23	6	
chr4	146058910	A	34	28	G	18	21	
chr4	146076751	G	19	24	C	10	18	
chr4	147333364	A	21	16	G	14	13	
chr4	147418317	T	27	8		15	10	
chr4	147452572	C	22	26	T	13	20	
chr4	147467570	T	35	36	G	35	21	
chr4	147787063	C	28	28	A	17	25	
chr4	148044282	T	37	19	t	24	15	
chr4	149256065	T	33	17	A	33	20	
chr5	75089712	T	25	18	A	15	15	
chr5	97385198	T	13	25	C	28	28	
chr5	105405355	C	12	29	A	19	21	
chr6	15362464	T	19	37	C	13	27	
chr6	15362465	T	19	37	C	13	27	
chr6	32551792	A	24	14	T	18	20	
chr6	136875540	C	13	17	T	21	12	
chr7	12012564	G	13	18	g	8	16	
chr7	119959835	C	12	32	T	6	38	
chr7	119959836	C	12	32	T	6	38	
chr8	6206033	T	28	9	G	25	8	
chr8	43215057	A	17	18	T	17	19	
chr8	80162938	C	10	16	T	18	25	
chr8	99622781	C	10	29	T	4	30	
chr8	99622790	C	10	30	G	4	33	
chr8	99622798	T	9	35	G	4	35	
chr9	6297884	T	14	16		10	24	
chr9	6297889	C	12	15	G	10	24	
chr9	19365301	A	22	23	C	18	30	
chr9	21539309	A	26	13	T	29	18	
chr9	124272875	A	9	60	T	11	41	
chr10	31192091	A	14	21	T	17	30	
chr10	62415316	T	36	29	G	27	36	
chr10	62997005	C	20	22	T	27	38	
chr10	64351885	T	12	19	A	13	24	
chr10	118549824	A	37	20		25	12	
chr10	118549828	T	36	20	C	25	13	
chr11	27731455	A	5	36		10	24	
chr11	83057387	A	13	7	G	11	22	
chr12	34720392	T	30	9		29	12	
chr13	43055350	T	16	21	G	15	35	
chr13	43055352	T	16	21	C	15	34	
chr14	34886600	C	22	24	T	17	29	

表14 続き

chr15	75836144	A	25	22		20	12	
chr16	18664351	T	24	27		19	16	
chr16	55043943	G	19	19	T	17	20	
chr16	59296180	C	18	28	T	11	29	
chr16	95794519	A	35	18		20	15	
chr17	65372951	G	18	32	C	12	35	
chr17	83490920	G	23	27	A	20	15	
chr18	3013134	C	45	26	G	27	21	
chr18	3013140	G	44	25	T	25	19	
chr18	9764414	C	19	17	T	20	11	

「別アレル」が塩基置換の時はA,C,G,Tが1文字、挿入の時は小文字でa,c,g,tを複数個、欠失の時はを複数個で表した。挿入時の「位置」は、挿入のすぐ後ろ (IESg17: chr7 12012564の場合、12012563と12012564の間に挿入)。欠失時の「位置」は、欠失の5'端の位置 (IESg17: chr16 18664351の場合、18664351-18664353の3塩基欠失)。

5. 親世代の被ばく線量と仔 DNA の塩基配列変異との関係に係わる検討

生殖細胞に対する低線量放射線の長期被ばくが次世代個体の DNA にもたらす影響を、全 DNA を対象に塩基配列レベルで網羅的に解析した研究報告は、業務担当者が知る限りこれまでに存在しない。本業務では、長期の低線量被ばくによる遺伝性影響に係る遺伝子塩基配列の解析手法について考察すること、及び本業務で得られた知見をもとに、ヒトの父母子のトリオに対する適用可能性についても検討することが求められている。

そこで本業務では、実験室マウス C57BL/6J 系統を哺乳類実験動物とし、雄親に対して低線量 γ 線を、一日の被ばく線量 20 mGy/22 時間/日（1 時間あたり、909 μ Gy）を約 400 日間継続照射し、総被ばく線量を 8Gy としたトリオを解析の対象とした。照射実験は青森県上北郡六ヶ所村の環境科学技術研究所で実施されているが、当地の環境放射能レベルは多めに見積もっても 0.5 μ Gy/日以下であり（<http://gensiryoku.pref.aomori.lg.jp/atom1/index.html>）、被ばく実験に用いた照射線量の 2 万分の 1 以下である。また、8Gy の放射線量は、数分間にばく露されたときにはマウスの 100%致死線量にほぼ一致する。

全 DNA の配列解析には、わが国でもヒトの全ゲノム多型解析等に標準的に用いられるようになってきた新型シーケンサーによる全ゲノムショットガン法を用いた。遺伝研は 2008 年度から新型シーケンサーを導入して各種生物の全ゲノム解析研究を行っており、わが国におけるゲノム研究の先導的中核機関であり、その経験をもとに本委託業務を実施した。

全 DNA 配列の一連の解析は、参照配列上にペアリードが一意に配置された常染色体領域とし、性染色体と大部分の反復配列領域は解析のノイズとなるために対象から除外した。また、大規模な挿入欠失や逆位、転座については存在しても頻度が低いことが予想され、不可能ではないものの別手法による配列解析が必要となるため、本業務では対象から除外し、頻度の高いことが予想される塩基置換部位と 100 塩基以下の挿入欠失部位に解析の的を絞った。

5. 1 被ばく線量と変異個数との関係について

本業務で用いた試料と同一の照射プロトコルによる先行調査が環境研で実施されている（引用文献 3）。その成績によると、雄マウスに 20 mGy/22 時間/日、総照射線量=8000 mGy の γ 線被ばくをさせると、平均出産数 [仔(F1)マウス数]及び仔(F1)マウスの平均離乳数に、統計学的に有意 ($P<0.05$) な減少が認められ、照射雄親及び照射群雄 F1 に寿命短縮効果が認められている。また、環境研による先行調査の成績によると、マイクロアレイ CGH 法による遺伝子解析において、被ばく雄親マウスの仔にわずかではあるが新規突然変異発生率の有意な増加が認められており、異常領域が検出できた同条件照射群 F1 マウスの観察頻度は 21.6%である（環境研未発表データ；引用文献 3）。

NGS と CGH 法とでは変異の検出範囲と検出感度に差があるが、本業務で検出した親世代生殖系列細胞に生じた変異に由来する塩基置換、挿入、欠失部位の数については照射と非照射とで差はなく、むしろ照射群の方が少ない変異数が検出されている。De novo 変異率についても約 2 倍の差が見られる(4.2 ; 表 11 ~13)。照射群での検出変異数が低い点については先行調査の結果と矛盾するものではないが、本来は独立の方法で各変異部位について検証実験を行った上で議論を行うべきものである。本業務では検証実験を実施していないため、これについては今後の検討課題として残されている。

先行研究として、マウスの雄親にさまざま線量と線量率の放射線を照射し、数個の遺伝子を対象として仔に及ぼす影響を数万頭レベルで大規模に調査した結果をまとめた Russell と Hunsicker による論文が報告されているが、これによると 0.0007-0.8 R/min(原著に従い 1R=8.7mGy とすると、8Gy/日~8660 mGy/日)を総線量約 2500-5000 mGy で雄マウスに照射した場合、仔に見られる変異の数にはほぼ変化がなく、種類も大規模な DNA 損傷に限られるとされている(引用文献 9)。また、この論文では非照射の方が変異数が高くなっていることも興味深い。いずれも 1960 年代から 80 年代初期に実施された実験に基づく結果であり、本業務で得られた結果との関連性については今後の検討課題である。

生体試料となるトリオの選定に当たっては、F1 に雌個体を選んだ以外は無作為に行ったが、偶然に変異の少ない個体を選択した可能性は否定できない。照射群の方が DNA 変異の数が低くなる理由として、放射線照射による DNA 修復活性が長期にわたって誘導された可能性も考えられるが、本業務では近交系マウスを用いているため父方と母方の各々に由来する生殖細胞突然変異の区別が難しい。変異の総数が小さいため、今後は解析対象トリオの数を増やし、解析の母集団を大きくすることによって、照射群と非照射群とで観察される変異数の差についての統計的信頼度を高められる可能性はある。

表 11 では、同一個体由来の別組織に共通に見られる変異を、仔世代における生殖細胞系列由来の変異とした。照射群については、このうちのいくつかが放射線照射に起因するものである可能性は否定できないが、総数が小さいこともあり、自然突然変異と区別することは、現時点では困難である。

前述したように、本業務で用いた照射総線量 (8Gy) は、短期被ばくにおける 100%致死線量に相当する(その際に DNA が受ける損傷の程度は不明である)。例数を増やした今後の検討が必要だが、本業務から得られた結果は、低線量被ばくの長期間照射により、修復不能な損傷を受けた細胞をアポトーシス等で排除することも含めて、かなりの程度に修復が進む(もしくは修復活性が誘導される)事を示唆する可能性もある。照射雄親 (ID= IESg13) について、体細胞(本業務の場合は、尾を構成する組織)に照射を原因とする変異が集積し、それが検出される可能性も考えられるが、表 8~10 の結果からは、変異数

の増加は観察されていない。これも、長期間の低線量被ばくの中に DNA 修復が進むことを示唆する考えと矛盾するものではない。

5. 2 解析手法についてのまとめ

本業務における全 DNA 配列解析には、解析結果に十分な統計的信頼度が得られることを期待し、全ゲノムの 100 倍以上の配列データを全ゲノムショットガン法で取得した。また、マウス C57BL/6J 系統については高精度の全ゲノム参照配列が利用できるため、情報解析時の曖昧さを低減させることができ、解析時間の節約もできる。

実際の配列解析に当たっては、NGS による構造変異解析で問題となることの多い偽陽性を最大限除去するため、遺伝研におけるゲノム解読の経験及び先行研究（引用文献 6、7）を参考にし、(4.1) に示した設定条件で全 DNA 配列解析を行った。解析対象とした範囲は、常染色体でリードが一意的に配置される領域で、パラメータを調節することにより、全 8 検体の共通部分が 1.90Gb（常染色体領域の約 76%に相当する）となった。このうち反復配列領域を除いた部分は 1.16Gb（同じく約 46%に相当する）であるが、対象領域としては十分な範囲を確保できている。

変異の検出と同定に当たっては、上記の領域で 99%以上（取りこぼし率が 1%以下）の変異部位を検出できるように条件を設定した。当然この中には誤検出によるエラーも含まれるので別手段による検証作業は欠かせないが、本業務では実施していない。また、表 12 に示したように、変異の取りこぼし率が 0.1%以下となるようなパラメータ設定（つまり、それだけエラー率が高くなる）でも解析を行ったが、表 11 と表 12 を比較するとわかるように異なるパラメータ設定でも最終的な結果には大きな影響は見られなかった。今回の解析のように、もともとの変異が均一な近交系マウスを使用し、親世代との差分を取ったり複数の組織間での共通項を取ったりできる場合には、取りこぼしを少なくするようなパラメータ設定の方が有効な可能性がある。

大規模な挿入欠失や逆位、転座については存在しても頻度が低いことが予想され、また、不可能ではないものの本業務で用いた手法（ゲノム再シーケンシング）とは別の手法（新規ゲノムシーケンシング）による配列解析が必要となるため、本委託業務では塩基置換部位と 100 塩基以下の挿入欠失部位の検出と解析を行った。新型シーケンサーを用いて大規模な挿入欠失や逆位、転座を検出するためには、参照配列との相同性を利用する再シーケンシングではなく、配列解析用の鋳型ライブラリを何種類も作成したり、長鎖 DNA の配列決定が可能なシーケンサーを利用したりする新規ゲノムアセンブリの手法を用いれば、ゲノムの性質にもよるがある程度は実行可能であろう。ゲノム構造の状況がより複雑なヒトを対象にする場合については後述する。

本業務では高精度の参照配列が利用できるため、まず実験に用いたマウス群

に固定化された変異については、ホモ変異として除去することが可能である。また、トリオを利用しているため、親世代と仔世代とで同一部位に存在する同一タイプの変異は相殺することにより、仔世代に生じた変異が同定できる（表 10）。一世代でホモ変異が出現するためには 2 回の変異（雄と雌の生殖系列細胞、または仔の体細胞で）が同一部位に起こらねばならないため、その出現頻度は低いはずであり、理想的には表 10 におけるホモ変異はゼロになるはずのものであるが、実データではこの程度のぶれが生じている。

表 10 に示されている変異には、両親の生殖系列細胞に生じ、受精を通じて仔に伝えられた変異（生殖系列変異）と、受精卵が発生分化し、老化して死亡するまでに生体組織細胞 DNA に蓄積された変異（体細胞変異）とが含まれている。報告によっては両者が区別されていないために注意が必要だが、本業務では、仔世代の試料として同一個体から採取した異なる組織に由来する 2 検体を解析対象としているため、細胞ごとに無作為に生じると考えられる体細胞変異の一部については比較によりこれを相殺することが可能である。表 11 では、仔の 2 組織から得た DNA 間で共通に存在する変異を生殖系列変異と見なした（図 18、表 12、13）。本業務では近交系マウスを用いたため、各変異の雄、雌の由来についての判定は不可能である。引用文献 9 にまとめられている DOE の報告のように、両親に異なる系統のマウスを用いればある程度の判別は可能と思われるが、放射線感受性に対する系統間差なども考えられるため、かなりの規模の実験になるとと思われる。

以上の解析手法により、ゲノム当たり 100 個以下の低頻度の変異を検出することが実現できた。配列データのカバレッジを減らすことも可能であるが、それに従いエラーは増加するので、特にヒトに適用する場合には検証実験は欠かせない。

本業務で検出できた変異数は当初の予想以上に少なかったため、照射放射線量と変異率との関連性については未解決なままで残された。先行研究の結果からは、低線量率照射の場合に次世代に遺伝性の影響が現れる頻度について、ある程度の不感領域の存在も考えられるが、照射線量の増減や検体数の増加などを含めた今後の検討課題である。

6. ヒトへの外挿性に係わる検討

本委託業務では、「放射線生物学的影響に関して実験動物のトリオから得られた科学的な知見をもとに、ヒトの父母子のトリオに対する適用可能性について検討し、種間差などの外挿する上で必要と思われる各要素を抽出して報告書にとりまとめること。」が要求されている。これを受け、本委託業務への入札時に提出した提案書には、具体的検討事項を下記のように記載した。

「従来実施されてきた、広島、長崎の被爆者の子供の調査結果では継世代影響が見出されていない。しかし、この調査では調査人数、調査指標、被ばく線量などが限られており、より感受性の高い調査方法が模索されている。本提案の成果として、8000 mGy 被ばくマウスでその影響の一端が明らかにできれば、その手法をヒトにも適応できるかどうかについて、一段進んだ検討が可能となる。具体的には、対象とする被ばく線量の範囲、変異の検出感度と信頼性、検査対象とする臓器特性、調査対象人数の規模等について検討する。

本委託業務で用いられる解析手法とそこから得られ結果をヒトに対して適用できる可能性を検討するに際しては、従来の放射線生物学研究から得られている知見（論文及び公益財団法人放射線影響研究所の報告書等）をもとに、被ばく線量、被ばく条件、種間差、臓器依存性等の比較検討が必要な諸要因について精査し、報告書に取りまとめる。」

本項では、まず本受託業務の実施内容を概観し、次いで解析手法についての検討結果内容を述べた後、本業務の結果をヒトに適用する際に考慮すべき問題点について考察を加えた。

6.1 委託業務実施内容の概要

本委託業務では、実験室マウス C57BL/6J 系統を用い、雄親に 20 mGy/22 時間/日を 400 日間、集積線量=8 Gy の γ 線照射を行ったトリオと、放射線非照射のトリオの各個体から抽出した DNA を試料とし、NGS による全塩基配列解読を行った。次に、得られた塩基配列情報についての解析を行い、仔世代に新たに生じた変異について照射群と非照射群との比較を行った（1~5）。

全 DNA 配列の解析には、ヒトトリオの解析にも用いられている一般的なプロトコル（図 15, 16）を採用し、徒に独自プログラムを使用することによる適応性の低下を防いでいる。また、マッピングの条件を工夫することで、全ゲノムの約 75% の領域を対象に初期解析を実施できるようになっており、対象範囲が狭まることによる偏りの生じる可能性を低減させている。

変異の検出と同定に当たっては、上記の領域で取りこぼし率が 1% 以下の変異部位を検出できるように条件を設定した。当然この中には誤検出によるエラーも含まれるので別手段による検証作業は欠かせないが、本業務では実施していない。また、表 12 に示したように、変異の取りこぼし率が 0.1% 以下となる

ようなパラメータ設定、（つまり、それだけエラー率が高くなる）でも解析を行ったが、表 11 と表 12 を比較するとわかるように異なるパラメータ設定でも最後の結果には大きな影響は見られなかった。今回の解析のように、もともとの変異が均一な近交系のマウスを使用し、親世代との差分を取ったり複数の組織間での共通項を取ったりできる場合には、取りこぼしを少なくするようなパラメータ設定の有効性を示唆する結果である。

最終的に得られた生殖系列由来新規変異率（塩基置換、挿入、欠失）は、照射群で 3.19×10^{-8} / ntd./generation、非照射群では 6.08×10^{-8} /ntd/generation となり、照射/非照射比は 0.52 で、この数値を見る限りは、照射群の方が 2 倍ほど低い変異率となっている。文献によるマウスの変異率は 3.699×10^{-8} とされており、本業務で用いた照射個体についての値とほぼ一致する（引用文献 10）。また、ヒトについての推測値が文献 6 にまとめられており、対象と計算手法によって値は異なるが、 $0.96 - 2.17 \times 10^{-8}$ /ntd./ generation とされている。また、照射個体である 17/18 の塩基置換に転換変異が多く見られるが、この原因については、今後の検討課題である。

6.2 ヒトへの外挿性に係わる技術的検討

本委託業務で用いた NGS 及びデータ解析の手法は、NGS に使用した機種の違い及び一部に独自の改良点はあるものの、基本的な流れはヒトトリオについての新規突然変異検索研究で使われた手法とほぼ同じである（引用文献 7）。ただし、本委託業務では、検出された変異部位についての個別的な検証を行っていないため、現時点での結果の信頼性については、変異候補部位を統計的に可能な限り絞り込んだ状態のものであることには留意すべきである。

NGS を用いた全 DNA 解析から変異を検出する手法の信頼性に対する批判としてよく挙げられるのが、塩基置換に対する偽陽性の高さと、特に電離放射線被ばくで生じる DNA の二本鎖切断の修復に起因する欠失変異の検出の難しさである。どちらの批判もある意味では真ではあるが、NGS 技術の進歩は早く、読み取り精度と読み取り塩基長が大幅に増加し、コストダウンに伴うデータ深度の増大が比較的容易に可能な現在の NGS 技術に対して、数年前の次世代型シーケンサーについての議論を一概に適応して批判を加えることにはかなりの無理がある。読み取り長の増加（NGS が登場した 2007 年 - 2008 年当時の 35 塩基から、現在では 150 塩基 - 300 塩基に伸張している）に伴い、検出できる欠失変異も大きくなっているが、100%エラーフリーの技術は存在しない。次項でも述べるように、重篤な遺伝子変異の存在が疑われる等の重要な部位については、別の技術による検証が行なわれるべきである。

本報告書の 1-3 章において、試料からの DNA 調製方法及び配列決定用ライブラリ作成についての詳しい検討を行った。解析に用いた組織が雌親以外は終生飼育した老化個体に由来すること、最長で死後 50 時間程度を室温で経過し

ていること、試料組織採取後に -80°C 冷凍庫で長期保存された組織であること等が原因となって、DNAの回収量が低く質的にも損傷を受けているか混在物の影響を受けている可能性が考えられたからである。このため、配列決定用ライブラリ作成にはトランスポゾンを用いるNextera™を使用した。この影響については将来の検討事項である。

ヒトを対象とする場合には、生体試料の候補として低侵襲的に得られる組織が主となる。具体的には、血液もしくは口腔内細胞が候補となろう。子については臍帯血からのDNA抽出も考えられる。血液（もしくは臍帯血）をDNA抽出の材料に用いる場合には、手法も確立しており、NGSによる全DNA塩基配列解析も日常的に行われているため、配列データの取得に格別の問題があるとは思えない。通常の手技で採血したヘパリン添加静脈血から、数十 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の高分子DNAが抽出可能と思われる。EBV(エプスタイン・バーウイルス)による不死化リンパ芽球培養細胞も利用可能であるが、培養状態での変異蓄積の程度が見積もれないことや、施設ごとの細胞培養技術の違い、細胞組成に偏りが生じる可能性等を見逃すことができないため、全DNA配列解析にもとづく変異率を比較する目的には不適であろう。また、血液を使用した場合の結果の解釈については、採血時の年齢や性別等の一般的な問題に加え、白血球の場合には細胞の交換率が高く、したがって体細胞変異の蓄積も多いと考えられる組織であることも考慮する必要がある。

次に、配列解析に使用するデータ量について述べる。本委託業務では、近交化され均一なゲノムDNAをもつ実験室マウスを使用した上で初期データ量を100xに設定し、変異を高信頼度で確実に検出することを図っている。一般的にSNP検出を目的にヒト全ゲノムを再配列解析する場合には、0.1%程度のSNPを検出するために平均30Xのデータ量が必要とされている。多くの大規模ヒト多型解析プロジェクトにおいて個人あたり30x程度のデータ量を取得しているのはこのためである。しかし、いわば野生生物であり、ゲノムに0.1%程度の多型をもつヒトについて近交系マウスと同じ信頼度で変異部位を検出するためには、より多くのデータを必要とすることは自明であろう。本業務で近交系マウスから得られたデータにもとづく程度の信頼度でヒトの場合に適応できるかについては、実際のヒトトリオ家系を用いて本業務と同じ方法でデータ解析を行い、検証まで実施するのが、回り道ではあるが最短かつ最善の方法であると考えられる。ヒトを対象とする際に考慮すべき可能性のある問題については、あらためて次項で検討する。

6.3 ヒトへの外挿性に係わる関連事項の検討

6.3.1 モデル生物解析結果を用いてのヒトのリスク推定について

放射線の遺伝的影響（生殖細胞系列への影響）については、これまで長年に

わたり広島・長崎の被ばく者の親子を対象にさまざまな指標を用いて解析されてきたものの、明確な影響は見出されていない。例えば、10mSv以上の被ばくを受けた（平均被ばく線量は約0.4 Sv）親の子供約1万人と非被ばく者の子供約1万人を対象にして蛋白質のアミノ酸の変化を電気泳動法を用いて調査した結果、非被ばく群と被ばく群に差は見出されていない（原爆放射線の人体影響第2版 2012年文光堂刊）。しかしながら多くの生物種の解析において遺伝的影響が明らかにされていることから、ヒトにおいても、十分な被ばく線量と十分な解析個体数という条件が確保できれば、影響は検出されるものと考えられている。この状況のもとで、ヒトでの遺伝的影響を推定するために、モデル動物、具体的にはマウスでの結果（たとえばラッセル夫妻らによる特定座位法によるもの；引用文献9）を参照して算出された「倍加線量」が使用されている（江島・木村著 放射線生物学 第2版 2011年オーム社刊）。このようなマウスのデータを用いた計算から、低線量率放射線の場合、約1 Gyの被ばくによって突然変異率は非被ばくの場合（自然突然変異率）の2倍に増加する、すなわち、倍加線量は1 Gyとされている。（高線量率の場合、この3分の1の値。）ヒトの遺伝的影響の推定にマウスのデータを使用することについては、培養細胞（体細胞）を用いて測定した（たとえばHPRT遺伝子についての）放射線誘発突然変異率は、生物種が異なっても同様であること（UNSCEAR 2000年報告書 邦訳は2002年実業公報社刊）などから、一応正当化されると考えられる。

なお、リスク推定の際に、線量効果関係については、低線量域においても線量に比例して遺伝的影響が生じるという閾値なしの直線モデル（linear non-threshold model、LNTモデル）が採用されている。これは、放射線防護の観点からは、最も合理的なモデルと考えられている。

線量効果関係については、次世代シーケンシングのような新しい方法を用いて、多くの線量、線量率ポイントにおける放射線誘発突然変異率が、統計処理に耐えるほどの多くのマウス個体について得られた際には、線量効果関係や線量率効果に関するこれまでの知見を再検討することになるであろう。しかし本調査におけるような限られた線量・線量率における限られた個体数の解析の場合、上記の条件が満たされるまでは、これまで使用されてきた関係式をそのまま援用する以外の選択肢はないと思われる。

6.3.2 ヒトとマウスの生物学的差異

一般論として、ヒトと各種哺乳類との間に放射線に対する感受性に大きな差はないと考えられている。上記の体細胞におけるHPRT遺伝子の突然変異率に関するものなど多くのデータがこれを支持している。ただし、すべての遺伝子について2倍程度の差がないかどうかについては判断が難しい。

ここでは、放射線の遺伝的影響がヒトとマウスで異なる可能性についても、

多少論じておく。

[放射線による DNA 損傷を修復する酵素群の活性や正確さに差がないか？]

ヒトやマウスの細胞が高線量率で比較的大きな線量の放射線を受けた時の DNA 損傷生成や DNA 修復については、分子生物学的な解析がかなり行われている。これに関して、ヒトとマウスの間にきわめて大きな差異があるとするような報告（例えば、放射線に対するある特定の反応系が片方の生物でのみ完全に欠如しているなど）は、現時点でわれわれが知る限り存在しない。それゆえ、本研究でマウスを用いて得られた知識をヒトのリスク評価に用いることに、大きな問題はないと考えている。しかしながら、ヒトとマウスの相違について、いくつか留意すべき点もある。電離放射線よりはむしろ紫外線、化学発癌剤などによる DNA 損傷の修復経路のひとつである転写共役修復（除去修復の一種）の活性は、ヒト細胞では高く、マウス細胞では極めて低いことが明らかになっており、このことは、紫外線誘発体細胞突然変異の遺伝子上の分布に影響を与えている（Friedberg 他著 DNA Repair and Mutagenesis 第2版 2005年 ASM Press 刊）。また、Metnase（もしくは SETMAR）なるタンパク質の遺伝子は、霊長目で新たに出現したものであり、マウスでは存在しない。このタンパク質は、放射線による DNA 損傷を修復する非相同末端結合と呼ばれる修復系の補助因子として働く（引用文献 12）。

[遺伝子に変異をもった生殖細胞が細胞分裂、減数分裂、発生、分化等の過程で、あるいはアポトーシスなどによって排除される効率に差がないか？]

これについても、ヒトとマウスの間にきわめて大きな差異はないと思われる。しかし、卵母細胞に関しては例外で、マウスの卵母細胞は放射線の致死効果に対して著しく感受性であるので、マウスの雌の生殖細胞系列における放射線誘発突然変異のデータを直接ヒトに適用することはできないとされている（引用文献 13）。

[ヒトに特有と考えられる精神の発達などへの影響をどのようにして検討するか？]

遺伝的影響ではないが、胎児期被ばくの影響として、精神発達遅滞が知られている。このような影響を解析する際には、動物実験はごく限られた知見しか与えないおそれがある。

6.3.3 変異の特性と被ばく線量率の関係について

突然変異のさまざまなタイプのうちで、放射線の場合に特徴的なものは、（次世代シーケンシングが不得意とされるどころの）大きい欠失であるとされている。例えば、培養細胞の *HPRT* 遺伝子における解析結果では、大きい欠失（遺伝子全部の欠失）>小さい欠失（遺伝子の一部の欠失）>点突然変異の順に少なくなっている（放射線基礎医学 第12版 2013年金芳堂刊）。ただ

し、特に小さい変異を効率よく検出するような実験系では、確かに点突然変異や小さい欠失も数多く検出されているのであって（引用文献 14）、まれというわけではない。これまでの研究では、主に高線量率放射線が用いられてきたが、この場合、大きい欠失が特に効率よく生成すると考えられており、実際ラッセル夫妻らの結果を再吟味した場合の結論もそうであった（引用文献 9）。高線量率で細胞が照射された場合、すでにある切断が修復される前に次々と新しい切断が生成するので、同一細胞内に同時に多くの切断が存在することになる。放射線による DNA 二本鎖切断は、哺乳類では主に非相同末端結合（non-homologous end joining、NHEJ）と呼ばれる修復系によって再結合されるが、同時に同一細胞内に多くの二本鎖切断が存在している状況下では、異なる切断間で（もとは異なる組み合わせで）断端の結合が生じる可能性が高くなり、大きい欠失や転座が生成しやすくなると考えられる。一方、低線量率照射の場合、二本鎖切断生成速度が修復速度に比べて遅く、同一細胞内に同時に存在する二本鎖切断の数は少ないことから、NHEJによって、もともとの組み合わせで断端が結合される確率が高いと考えられる。高線量率と低線量率との間のこの違いが、いわゆる「線量率効果」の分子レベルでの一つの説明とされている。ただ、たとえ、もともとの組み合わせで断端が結合されたとしても、このとき、必ずしももとの DNA 配列が完全に復元されるわけではない。放射線が DNA を切断する化学反応においては、切断点で通常 1 ヌクレオチドが失われる

（Friedberg 他著 DNA Repair and Mutagenesis 第 2 版 2005 年 ASM Press 刊）。NHEJ 機構による修復の際には、ふたつの断端は独立に繰り返しヌクレアーゼやポリメラーゼ等の処理を受け、両方が適切な形態となった時点でリガーゼによって結合される（引用文献 15）。結果として観察されるものは、小さい欠失、塩基置換、付加、およびその組み合わせのことが多いであろう。これらのことから、低線量率被ばくによる突然変異には、むしろ次世代シーケンシングによる解析に適したものがかなり多いと推測される。また、ヒトの低線量率被ばくによる突然変異スペクトルを類推するための動物実験には、低線量率照射を使用することが望ましいと思われる。

6.4 まとめ

過去のさまざまな研究結果から、マウスとヒトの間で放射線による雄の生殖細胞系列の突然変異誘発に関して原理的に大きな差異はないと推測される。しかし、マウスの実験結果からヒトの特定の集団のリスク評価のためのサンプル解析実施へ進む場合には、解析手段の検出感度、被ばくの状況、線量や個体数などについて十分に考察を加え、差を検出するかどうか慎重に検討することが求められる。ただし今回のような次世代シーケンシングによる解析は過去に報告がなく、従来の方法による解析の結果から推測されることがどれほど当てはまるかは全く未知数である。今回の調査における方法論や解析結果の詳細な

検討の上に立ち、ヒトサンプル、特に高線量急性被ばくサンプルなども用いて更なる検討を行うことにより、ヒトの遺伝的影響調査およびリスク評価におけるゲノム配列解析の有用性を包括的に論ずることができるようになると考えられる。

以上の議論に加え、本業務で実施したのと同様な全ゲノム解析を人に対して適用する場合には、集団を対象にして平均変異率の算出を行えば済むのか、それとも個人を対象とした半ば診断に近いレベルでの解析を行うのかという、調査実施主体側の基本姿勢に加え、全ゲノムを解読することから派生する倫理的法的社会的問題(ELSI)についての事前の考慮と社会的コンセンサスを得ることがより重要である。特に、本事業の出発点が、「東京電力福島第一原子力発電所の事故に起因する低線量の放射線被ばくによって福島県の住民が次世代への遺伝性の影響に関する不安を抱える中で、遺伝子レベルの解析手法は、不安の解消に資する有効な手法と考えられる」とされていることを考慮し、また、個人レベルでの不安が解消されない限りは地域の不安が解消するとは考えにくいいため、本事業の最終的な目的達成のためには、被験者の希望に応じ(対応の可否についても、事前のガイドライン設定等により決定しておく必要があるだろう。)、対象を個人レベル/家族レベルとした対応をとることも可能な体制が必要ではないかと思ふ。

また、個人ゲノム解読におけるELSIについては現在でも議論が行われているところであるが、これに関連して気づいた事項を順不同に列挙しておく。

(1) 平成25年4月1日から施行されている、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、いわゆる三省指針 (http://www.lifescience.mext.go.jp/files/pdf/n1115_01.pdf) との整合性。

(2) 事前同意(I.C.)を得るために必要な同意書の内容と書式。

(3) 誰でも人はゲノム中に数十個の変異遺伝子を内包している。全ゲノム解読により、これらの変異についても同時に検出される可能性が高い。その際に、本人に対する通知、非通知の問題や、情報開示の範囲の問題、例えば、本人には変異率、変異個数のみを通知、または、重篤な影響が生ずる可能性がある場合にのみ(範囲を決めて)通知する等、についても事前に考慮されるべき問題である。

7. 本委託業務で確認された課題に関する考察

本委託委託業務では、時間的制約もあり、照射放射線量については 20mGy/日、総線量 8Gy のトリオ 1 組と非照射群トリオ 1 組とを対象に DNA 解析を実施した。そこから得られた結果は、設定した被ばく条件では照射群と非照射群間の差異が小さい可能性を思わせるものであるが、個体数も変異の総数も少ないという問題がある。そのため、個体間差や集団内での分散を見積もるため、まず同一条件下での解析対象個体数を増やす必要があると思われる。照射による DNA 損傷は偶発的に起こるため、ある程度の個体数は必要と思われるが、その数はデータの分散の程度に依存する。使用したマウスは近交系であるため個体間差は小さいものと予想されるが、現時点での事前の見積もりは難しい。また、理想的には F2 世代も解析でき、先行調査の結果からは寿命や性差についての情報もあるので、それらについての検討も行えると良いだろう。使用したマウスの系統間差については本質的な問題ではない可能性が高いが、将来的に解析例間での相互比較を行う場合等のためには考慮する必要があるかもしれない。

全 DNA 配列解析については、解析コストに直結する配列データ量と信頼度の再検討が必要かもしれない。構造変異検出プロトコルについては、大規模な変異を検出するために NGS による新規ゲノム配列決定を実施することも可能であるが、その前にマイクロアレイ法による事前スクリーニングを行うのが有効であろう。

本委託業務には含まれていなかったが、放射線損傷に特徴的とされる変異部位のいくつかについては、PCR/再シーケンシングや、マスアレイ法による変異部位の検証実験が必要である。以下、あまりなじみのないマスアレイ法による検証実験について解説する。

解析には NGS と比較して規模は小さいが、高精度な DNA の高速遺伝子型解析が可能な SEQUENOM (シーケノム) 社の MassARRAY (マスアレイ) システムを使用し、MassARRAY® iPLEX Gold により行う。機械本体は国立遺伝学研究所の共通利用機器として付置されている(図 19)。シーケノム・マスアレイシステムは、質量分析計による塩基 (A: アデニン、T: チミン、G: グアニンおよび C: シトシン、など) の質量の違いを検出することで、塩基配列中の多型を検出するシステムである(図 20)。検出は PCR を活用したシ

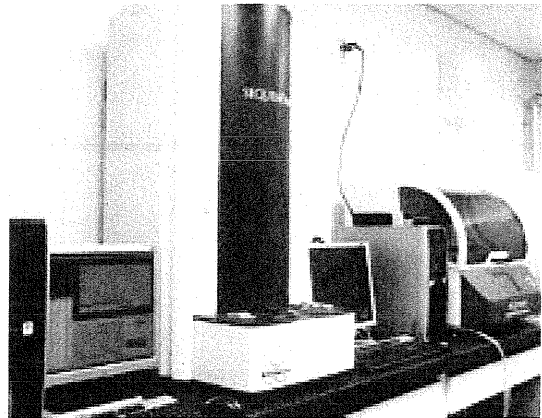


図 19 シーケノム社 マスアレイシステム (遺伝研に付置されているものを撮影)

ンプルなプロトコルと、MALDI-TOF 質量分析計を組み合わせた手法とからなる。遺伝子型解析アプリケーションは、PCR 反応による試料調製を行い、並列化させることで、最大 40 座位を 1 反応で解析でき、一日最大 1~10 万箇所程度の中規模の解析に向いている。蛍光色素による標識や、ハイブリダイゼーション反応など従来の類似した検出系と比較して低コストで解析できることに利点がある。

具体的な解析には、NGS により解析したすべての個体の DNA を使用する。NGS により解読されたリード深度を複数のカテゴリーに分類して、カテゴリーごとの多型の検証を行うことで、リード深度に関する多型検出の信頼度も算出する。解析対象の多型座位の数に関しては、まず欠失・挿入および塩基置換各 100 座位の計 200 座位程度をテストする。候補座位がこれより少ない場合はすべてを対象にできるだろう。これと併用して PCR ベースによる特定塩基配列構造の変化の検出、あるいは ABI3730 型キャピラリーシーケンサによる PCR ベースの塩基配列解読も行う。以上、検証したデータは個体および項目ごとにまとめ報告する。

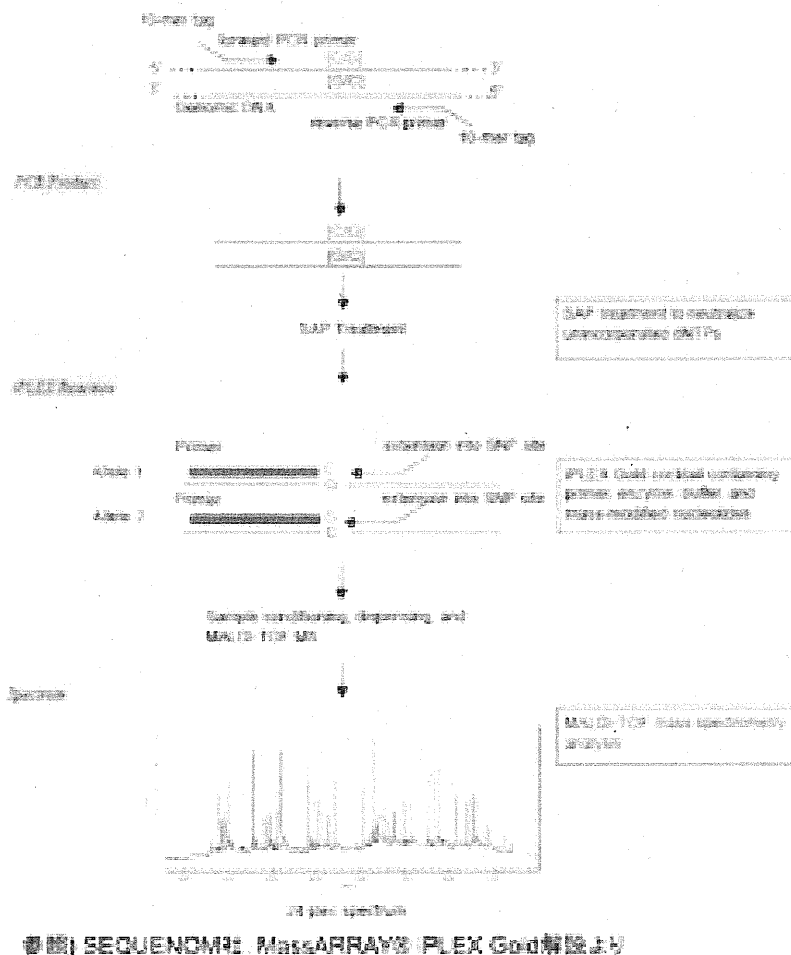


図 20 シーケノム社 マスアレイシステムを使用した塩基多型検出の原理

8. 用語解説

LNT モデル (linear non-threshold model)

放射線の線量効果関係に関して、直線 (1 次) であり閾値がないとするモデル。実際のデータへの適合性については議論もあるが、確率的影響 (がん、遺伝的影響) のリスク評価にあたっては、最も合理的なモデルとして採用されている。

吸収線量 (単位 グレイ Gy)

放射線の量を示す物理量のひとつ。放射線のエネルギーが物質にどのくらい吸収されたかを示すので、物質への影響を論ずる際には適している。物質 1kg に 1J のエネルギーが吸収されたとき、1Gy。

近交系

実験動物のうちで、兄妹交配もしくは自家受精を繰り返すことにより、集団内の各個体のゲノムがほぼ均質になった実験系統。

ゲノム再シーケンシングと新規シーケンシング

次世代シーケンシングの時代になり、特定個人や個体のゲノム配列やエクソン領域のみの配列 (エキソーム) を決定し、配列の相同性を指標に参照ゲノム配列にマッピングする再シーケンシング (genome re-sequencing) と呼ばれる手法が使われるようになった。一方、野生生物や新規のゲノムなど、参考となるゲノム配列が存在しない場合には新たに全ゲノムシーケンスを行う必要があり、これを新規シーケンシング (*de novo* sequencing) とよぶ。通常は、ゲノム DNA から作成した長さの異なる DNA 断片を対象に次世代シーケンシングを行い、アセンブラと呼ばれるプログラムを用いてゲノム配列を再構成する。こうして得られるゲノム情報の精度はもとのゲノムの特性や実験手法に大きく左右されるため研究的な要素が強く、専門的な知識と経験が必要である。

参照 (ゲノム) 配列 (Reference genome sequence)

既に全ゲノムの配列が決定され、研究者間で共通に使われている DNA 塩基配列のセットのこと。必ずしも高精度のものばかりとは限らず、やむを得ず使用する場合もある。哺乳動物の場合は、ヒトとマウスのゲノムが極めて高精度な参照配列である。

次世代型大規模ゲノム解析 (次世代型 DNA シーケンサ、新型シーケンサ)

従来の DNA 塩基配列解析装置に比較して大量のゲノム解析が可能。ヒトゲノムの 80 倍近い塩基配列を 1 週間程度で産生することが可能であるが、一度に

100塩基程度しか読み取ることができないため、読み取り精度を上げるため多重化が必要であることから、シーケンサの能力を引き出すためには十分な計算機資源と解析技術も必要である。NGS(New Generation Sequencing)とも呼ばれる。

実験動物、モデル動物

ショウジョウバエやマウスなど、その群の生物の代表として研究材料に使われてきた生物の総称。生物の普遍的な基本原理やヒトを知るための有用な実験系として利用されている。実験結果に対する遺伝的背景の違いを低減させるために、兄妹交配を何世代も繰り返して遺伝的背景にほぼ均一になった近交系も使われる。

実効線量 (単位 シーベルト Sv)

放射線防護の目的で使われる概念的な量(防護量)のひとつ。放射線の影響は、人体の器官によって大小があるので、これを示す指数(たとえば、生殖腺は0.2、皮膚は0.01、人体全部合わせて1)を当該器官が受けた等価線量にかけたものを、人体全部にわたって総和すると、全身に対する生物学的影響を考慮した量である実効線量となる。なお、等価線量と実効線量の単位は同じである。

線量率効果

被ばくの際の線量率が異なると、総線量が同じでも、影響の程度が異なることがあり、この現象をさす。有名な例では、高線量率照射の場合、同じ総線量の低線量率照射の場合に比べて、突然変異や染色体異常の発生率が3倍ほどになる場合があることが知られている。

低線量、低線量率

UNSCEAR(国連の委員会)では、200mGy未満を低線量、0.1mGy/分未満を低線量率としており、しばしばこの定義が使われる。

等価線量 (単位 シーベルト Sv)

放射線防護の目的で使われる概念的な量(防護量)のひとつ。放射線にはさまざまな種類があり、同じ物理量(吸収線量)でも生物学的効果が異なることがあるので、これを表す指数(たとえば、X線、 γ 線の場合は標準的で、1、 α 線の場合は影響が大きく、20)を吸収線量にかけて算出する。

倍加線量

1世代に自然発生する突然変異と同数の突然変異を誘発する放射線線量。

9. 参考資料・文献

引用文献

1. A. Shiragai, M. Saitou, I. Kudo, S. Kanaiwa-Kudo, T. Matsumoto, T. Furuse, T. Yanai, K. Ichinohe, F. Sato and Y. Ohmomo: Estimation of the absorbed dose to mice in prolonged irradiation by low-dose rate gamma-rays from ¹³⁷Cs sources. *Radioisotopes* 46, 904-911 (1997).
2. ガイドライン 実験動物施設の建築および設備、日本建築学会編、アドスリー、(1996)
3. 平成 24 年度低線量放射線生物影響実験調査報告書、公益財団法人環境科学技術研究所 (2013)
4. 藤山秋佐夫 (分担執筆) : 講談社サイエンティフィック 新英語論文セミナー 21 世紀の分子生物学 (桂 勲 監修) 2012、講談社
5. 豊田敦、藤山秋佐夫 : 次世代シークエンサーのシークエンス原理 (「新型シークエンサー: 目的別解析リファレンス」、鈴木穰、菅野純夫監修)、2012 細胞工学別冊、学研メディカル秀潤社
6. Campbell, C.D. and Eichler, E.E. : Properties and rates of germline mutations in humans. *Trends in Genetics* 29, 575-584 (2013)
7. The 1000 Genomes project: Variation in genome-wide mutation rates within and between human families. *nature genetics* 43, 712-862 (2011)
8. Li, H. and Durbin, R. : Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*, Epub. (2010)
9. Russell, L.B. and Hunsicker, P.R. : The Effect of Dose Rate on the Frequency of Specific-Locus Mutations Induced in Mouse Spermatogonia is Restricted to Larger Lesions; a Retrospective Analysis of Historical Data. *Radiation Res.* 177, 555-564 (2012)
10. Lynch, M. : Evolution of the mutation rate. *Trends in Genetics* 26, 345-352 (2010)
11. Okudaira, N. et al. : Radiation Dose-Rate Effect on Mutation Induction in Spleen and Liver of *gpt* delta Mice. *Radiation Res.* 173, 138-147 (2010)
12. Shaheen et al. Metnase/SETMAR: a domesticated primate transposase that enhances DNA repair, replication, and decatenation. *Genetica* 138, 559-566 (2010)
13. Russell, W.L. : Mutation frequencies in female mice and the estimation of genetic hazards of radiation in women. *Proc. Nat. Acad. Sci* 74, 3523-3527 (1977)
14. Uehara et al. Absence of *Ku70* gene obliterates X-ray-induced *lacZ* mutagenesis of small deletions in mouse tissues. *Radiat. Res.* 170, 216-223 (2008)
15. Lieber, M. R. : The mechanisms of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 181-211 (2010)

10. 情報共有等

WEB ブラウザを構築し平成 26 年 2 月から担当者間の情報共有を行った。



謝辞

本業務を実施するにあたり、多くの方々から助言、助力をいただきました。公益財団法人環境科学技術研究所 小野哲也理事長には、本委託業務の提案時から報告書の取りまとめに至るまでの間、一方ならぬ御支援とご指導を戴きましたことに心から感謝いたします。国立遺伝学研究所生命情報研究センター比較ゲノム解析研究室の豊田 敦先生には、次世代シーケンサーの運用及びデータの取りまとめから業務の遂行に至るまで懇切丁寧な助言とご助力を賜りましたこと深く感謝いたします。また、本業務に関わった環境研及び遺伝研関連部門のメンバー及び両研究所の管理部担当課職員諸氏にも短時間での書類の取りまとめ等に多くの御支援を戴きましたこと、深く感謝いたします。

本業務は、環境研において国や青森県の支援により長年にわたって行われてきた低線量放射線照射実験及び遺伝研におけるゲノム解読とマウス遺伝学の技術と経験とが一体となって実現したものです。改めて関係諸氏に感謝すると共に、本報告が我が国における放射線に関する知識向上の一助となることを祈念します。

委託業務担当者

国立遺伝学研究所・教授 藤山秋佐夫

国立遺伝学研究所・教授・副所長・城石俊彦

国立遺伝学研究所・助教・高田豊行

国立遺伝学研究所・特任准教授・野口英樹

国立遺伝学研究所・特任研究員・会津智幸

環境科学技術研究所生物影響研究部・部長・小村潤一郎

環境科学技術研究所生物影響研究部・主任研究員・田中 聡

環境科学技術研究所生物影響研究部・研究員・小倉 啓司