

**A CONSIDERATION OF TWO BIOCHEMICAL APPROACHES TO  
MONITORING HUMAN POPULATIONS FOR A CHANGE IN  
GERM CELL MUTATION RATES**

人間集団における生殖細胞の突然変異率の変化を監視する  
ための二つの生化学的方法に関する考察

JAMES V. NEEL, Ph.D., M.D., Sc.D.  
HARVEY MOHRENWEISER, Ph.D.  
CHIYOKO SATOH, Ph.D. 佐藤千代子  
HOWARD B. HAMILTON, M.D.



**RADIATION EFFECTS RESEARCH FOUNDATION**  
財団法人 放射線影響研究所

A cooperative Japan - United States Research Organization  
日米共同研究機関

Presented at the Conference on  
the Detection of Genetic Damage Caused by Environmental Factors  
Oslo, 11-13 May 1977.

1977年5月11-13日, Oslo における環境因子による遺伝学的障害の探知  
に関する会議において発表

RERF TECHNICAL REPORT SERIES

放影研業績報告書集

The RERF Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, and advisory groups. The Technical Report Series is in no way intended to supplant regular journal publication.

放影研業績報告書は、日米専門職員、顧問、諮問機関の要求に応えるための日英両語による公式報告記録である。業績報告書は決して通例の誌上発表論文に代わるものではない。

---

*The Radiation Effects Research Foundation (formerly ABCC) was established in April 1975 as a private nonprofit Japanese Foundation, supported equally by the Government of Japan through the Ministry of Health and Welfare, and the Government of the United States through the National Academy of Sciences under contract with the Department of Energy.*

放射線影響研究所(元ABCC)は、昭和50年4月1日に公益法人として発足した。その経費は日米両政府の平等分担とし、日本は厚生省の補助金、米国はエネルギー省との契約に基づく米国学士院の補助金とをもって充てる。



## A CONSIDERATION OF TWO BIOCHEMICAL APPROACHES TO MONITORING HUMAN POPULATIONS FOR A CHANGE IN GERM CELL MUTATION RATES

人間集団における生殖細胞の突然変異率の変化を監視する  
ための二つの生化学的方法に関する考察

JAMES V. NEEL, Ph.D., M.D., Sc.D.<sup>1†</sup>; HARVEY MOHRENWEISER, Ph.D.<sup>1</sup>;  
CHIYOKO SATOH, Ph.D. (佐藤千代子)<sup>2</sup>; HOWARD B. HAMILTON, M.D.<sup>2</sup>

*Department of Human Genetics, University of Michigan School of Medicine<sup>1</sup> and  
RERF Department of Clinical Laboratories<sup>2</sup>*

Michigan 大学医学部人類遺伝学教室<sup>1</sup> および放射影研臨床検査部<sup>2</sup>

### SUMMARY

This report presents two different strategies for monitoring increased mutation rates resulting from exposure to an environmental mutagen, both of which are based on the detection of biochemical variants of polypeptides. Using the first strategy, one monitors a defined population continuously for the rate at which children with such a variant are born to normal parents. An increase in this rate implies increasing exposure to a mutagen. With the second strategy, one contrasts the findings in the children born to a control group or groups with the findings in the children born to an exposed group, however this is defined. An example of each strategy is included. The alternatives to mutation which must be considered when a child with a variant is found to have nonaffected parents are considered. The numbers of individuals necessary to detect an increase of a specified magnitude are discussed.

### INTRODUCTION

This presentation will assume that there is no need here to justify an intense interest in the possibility of monitoring human populations for mutation rates. Rather, we will consider whether such monitoring is feasible at the present time.

### 要約

本報告では、突然変異を誘発する環境要因のもとで、増大する突然変異率を監視するための二種類の方法を示した。いずれもポリペプチドの生化学的変異体を発見することを基盤とするものである。第一の方法では、固定人口集団において、正常な両親からこのような変異体を有する子供が生まれる率を連続的に観察する。この率が増加すれば、突然変異誘発要因への被曝が増加していることを示唆する。第二の方法では、定義を基に設定した被曝群に生まれた子供における所見と対照群に生まれた子供の所見とを比較する。それぞれの方法の実例を示した。変異体を有する子供の両親にこの変異体が認められない場合に、突然変異のほかに考えるべきことも考察した。特定の大きさの増加を探知するに必要な対象例数についても述べた。

### 緒言

ヒトの集団において、突然変異率を監視し追跡(モニター)できる可能性について強い関心のある理由をここであらためて説明する必要はないと思う。むしろ、現時点ではそのような監視を行うことが実際

<sup>†</sup>Senior Consultant in Genetics, RERF 放射影研遺伝学顧問

The word "feasible" is a relative term. What is not feasible with a small effort may often be feasible with a larger effort. It is inevitable that under these circumstances we are drawn into "cost-benefit" analysis. Before we proceed to consider two protocols for monitoring human populations, and become involved in discussion of "cost," it might be well to say just a few words about "benefit".

Opinions among geneticists concerning the mutagenic effects of current and future exposures to a variety of environmental contaminants vary widely, but it is the more pessimistic opinions that tend to be heard. Whereas the earlier concerns were primarily directed towards the intrusion of ionizing radiation into our lives, more recently in the U.S. the emphasis has been on the possible impact of chemical mutagens.<sup>1</sup> It must be admitted that there is room for considerable uncertainty concerning the nature of the problem, and this uncertainty has created a great deal of concern in the minds of informed lay persons, concern which understandably often finds expression in resistance to developments which virtually promise to increase future exposures to potential mutagens.

It is important at this juncture to recognize that there is no such thing as a "free lunch" in nature — if we introduce mutagens at any level of exposure into the environment, the result, as the matter is understood today, will be an increase in mutation rates. The question is whether with industrialization we have increased mutation rates by 1% (which most geneticists would find tolerable) or by 100% (which would disturb most geneticists).

Elsewhere we have presented calculations, under carefully stated assumptions, of the magnitude of the program required to detect a 50% increase in mutation rates (see below).<sup>2</sup> It is a very large program by current standards. To detect as little as a 10% increase requires an almost inconceivably large program. Now, there are two possible outcomes to a monitoring program. Either, at some stated statistical level, we detect no increase, or we do detect an increase. In the case of the latter, the question of the appropriate governmental response has yet to be addressed. In the case of the former, the alarmist can maintain that a program resulting in the exclusion of an increase of 50% or greater really does not meet the public need, which is to say, he might not be

に可能であるかどうかを考えてみたい。「可能性」という言葉は相対的なものである。わずかな努力のみでは可能性がなくても、大きな努力を払えば可能になる場合も多々ある。こういった場合には、「必要とする経費と得られる利益」との関係进行分析しなければならない。ヒトの集団の突然変異率を監視するために二つの研究計画書について考察を開始し、「必要とする経費」について議論する前に、「得られる利益」について少し述べたい。

現在および将来にわたり、各種の環境汚染物がもたらす突然変異誘発の効果については、遺伝学者個々の意見には大きな差異があるが、悲観的な意見が概して一般大衆の耳に入りがちである。初期の関心は主として電離放射線のわれわれの生命への影響に向けられていたが、最近米国では、化学的な突然変異誘発原の影響に重点がおかれている。<sup>1</sup> 問題の性質については、かなりの不確定要素があり、この不確定要素が一般大衆中の有識者の心に多大の不安をもたらしていることは認めなければならない。この不安は、将来、潜在的な突然変異誘発原への被曝が間違いなく増加すると考えられる事態に対して、しばしば抵抗運動の形で表現されることも理解できる。

この際、自然界には「無料の食事」というものは存在しないことを知ることが肝要である。すなわち、もし、環境に突然変異誘発原を導入するならば、それがどんな程度であっても現在の知識では、その結果として突然変異率が増加することになる。問題は、産業化によって生じる突然変異率の増加が、ほとんどの遺伝学者が許容できると考える1%程度のものであるか、それともほとんどの学者に不安を抱かせる100%になるかということである。

別の報告で、我々は、慎重な想定のもとに、突然変異率の50%の増大を探知するのに必要な研究計画の規模を計算で求めた(下記参照)。<sup>2</sup> それは、現在の基準からみれば、きわめて大規模な研究計画である。わずか10%の増加を探知するためには、ほとんど想像も及ばないほどの大規模な研究プログラムを必要とする。さて、この監視プログラムを実施した場合、二つの結果が考えられる。ある特定の統計学的水準において、突然変異率の増加が認められない場合と認められる場合とのいずれかである。後者の場合に対する政府の妥当な対策の問題についてはここでは言及しない。前者の場合、心配性の人、50%またはそれ以上の増加がある場合に限って除外するような研究プログラムは、実際には一般の要求をみとさないと言主張できる。つまり、その種の人、現状

satisfied with any program which it is feasible to mount at this time. Thus at present the "benefit" from the "cost" of a monitoring program is not nearly so clearcut and non-controversial as in many other undertakings. In the final analysis the necessary judgements will be reached by the political rather than the scientific process.

In what follows, we will briefly present two different approaches to the monitoring problem. These are both illustrated by studies now in progress, out of which will presumably emerge the experience on which future, improved programs will be based. The technology in this field is evolving very rapidly. An approach which may be appropriate for one country may, for logistical and sociological reasons, not be appropriate for another. Thus, we present these two protocols as preliminary proposals, certain to undergo modification in the future, and with no thought that they should be taken as the models.

#### **PROTOCOL ONE CONTINUOUS MONITORING BASED ON PLACENTAL CORD BLOOD SAMPLES**

Both of the protocols which we present stem from the conviction that recent technical developments enable geneticists to carry the study of mutation to the level of protein phenotypes. The first, the effort which we have recently initiated at the University of Michigan, is designed to provide base line data on the mutation rate of the loci encoding for some 25 proteins present in erythrocytes or blood serum. It is not at present a monitoring effort per se, since it is on far too small a scale, but clearly the experience gained in this study could be of great value in designing a monitoring program aimed to detect changing mutation rates. Furthermore, in addition to contributing useful data on the design of a more comprehensive effort, the data to be accumulated on spontaneous rates will be basic to estimating how large a monitoring program is required to detect an increase at some specified level.

##### **Sampling and Sample Processing**

The present protocol calls for the collection of placental cord blood samples from all infants delivered at the University of Michigan Hospital and venous blood samples from both their parents. The Obstetric Service of the University Hospital is relatively small, encompassing some

のもとで実施可能ないかなる研究プログラムでも満足しないかもしれない。したがって、現在のところ、監視プログラムでは、「経費」から「得られる利益」は、他の多くの調査における場合ほど明快で異論のないものではない。最終的には、必要な判定は科学的な過程からではなく、むしろ政治的過程によってなされるであろう。

次に、監視調査に対する二種類の取り組み方を略述したい。これらはいずれも現在進行中の調査に明示されており、これらから得られる経験は、おそらく将来における改善された研究プログラムの基礎となるであろう。この分野における技術は急速に進歩している。ある国では適当であると思われる方法でも、他の国では、運営上および社会状態から適当でないかも知れない。したがって、我々はこれらの二つの研究計画書を予備的な案として示し、将来修正されるであろうと考えるものであり、模範とすべきであるとは考えていない。

##### **研究計画 I**

##### **臍帯血液標本に基づく継続監視調査**

ここで述べる二つの研究プログラムは、いずれも最近の技術開発によって、遺伝学者が突然変異の調査を、蛋白質の表現型の水準において実施可能であるという確信に基づいて立案されたものである。第1のプログラムは、最近 Michigan 大学で着手したもので、赤血球または血清中の25種の蛋白質をコードする遺伝子座位における突然変異率の基準(ベースライン)が得られるように計画されている。それは規模があまりにも小さいので、現在のところ、監視調査といえるほどのものではない。しかし、本調査から得られた経験は、明らかに突然変異率の変化を発見するための監視プログラムを立案するためにはきわめて有用と考えられる。より広範な調査を立案する上で有用な資料を提供するだけでなく、さらに自然突然変異発生率について集積される資料は、ある特定の水準において突然変異率の増加を感知するのにどの程度の大きさのプログラムが必要であるかを推定する基礎にもなる。

##### **調査集団の抽出および処理**

この研究計画書によると、Michigan 大学病院で分娩されたすべての乳児の臍帯血液標本、ならびにその両親の静脈血液標本の収集が必要である。同大学病

TABLE 1. ANALYSIS OF RESULTS

表1 結果の分析

An analysis of results of the attempt to collect blood samples from placenta of new born infant plus mother plus father during the period July 1976 - February 1977 at Women's Hospital, The University of Michigan.

試験的な新生児の臍帯ならびに母親および父親からの採血の結果：1976年7月-1977年2月，Michigan 大学病院産婦人科。

Successes . . . . .	545 (65%)
Failures	
Refusal by one or both parents . . . . .	125
Father unavailable . . . . .	106
"System failure" . . . . .	86
Miscellaneous other reasons for failure . . . . .	6
Reason for failure unknown . . . . .	15
	338 (35%)
Total . . . . .	883

1500 deliveries annually, with a disproportionate representation of high-risk pregnancies, including unmarried juveniles. We limit our program to samples for which informed consent for the use of their blood for research purposes has been obtained from both the parents, and from the parents on behalf of their child. During the first 7 months of the program we have completed the trio of samples in 65% of deliveries. An analysis of the causes of failure is given in Table 1. Note the role played by "father unavailable," so characteristic of the young unmarried mother. Note, also, the refusal rate of 15%, probably higher in an academic town like Ann Arbor than in most American cities. We believe that under more favorable circumstances, the collection rate could be 80%, a belief we propose to test in the near future with the extension of the study to several other obstetric services.

Cells and plasma from complete trios are processed into 1 cc aliquots for storage at -80C and in liquid N<sub>2</sub>. The child's specimen stored at -80C is analyzed first. In the event a variant is discovered when the sample is processed, the full battery of tests is applied to both the parental samples. With the observed average variant rate (exclusive of polymorphisms) of approximately 2/1000 tests and a battery of 25 systems, about 1 in 20 children will be found to have at least one variant. Thus in 19 out of 20 instances, the collection and processing of parental blood will have been unnecessary. Nevertheless, we feel this

院産婦人科は、年間約1,500件の出産を扱っている比較的小規模なものであり、未婚の未成年者などを含む危険率の高い妊娠例の割合が非常に高い。本研究プログラムの対象者は、血液を研究目的に利用することについては両親の同意を得、またその子供については両親の同意の得られたものに限定した。研究プログラムの最初の7か月間に、分娩例の65%についてこの3者から標本が得られた。表1は、標本入手に失敗した原因を分析したものである。この中で若い未婚の母親に特有な「父親連絡不能」の項の数に注目したい。また拒否率の15%も注目し値する。これは、Ann Arborのような学園都市では米国の他の多くの都市よりもおそらく高いと思われる。よりよい状況のもとでは採血率を80%にまでする可能性があり、近い将来調査範囲を他のいくつかの産科病院にまで拡大してその可能性を調べたいと考えている。

三者の血液が完全にそろったなら、その血球および血漿を、1ccずつの量に分けて、-80℃の冷凍庫および液体窒素中で貯蔵する。まず、-80℃に貯蔵された子供の標本から検査を行う。検査の結果変異体が発見された場合は、両親の標本についてもすべての検査を行う。今までに観察された変異体の出現率(多型性変異体を除く)は約1,000検査当たり2件であり、25種の蛋白質を検査するならば、子供20人当たり1人に少なくとも一つの変異体が認められることになる。したがって、20例中19例では、両親の血液の採取および処理は不必要であったことになる。

approach is less time consuming than attempting to contact the parents 1 or 2 months after delivery in the event the child is found to have a variant, and the approach certainly results in a higher proportion of successful family studies than would delaying the collection of parental blood samples until the presence of a variant in a child was established. Furthermore, with the rate at which additional systems suitable for this type of study are becoming available, and given the labor involved in processing the samples, we believe we have in storage an important resource against future developments.

### Laboratory Strategy

The backbone of the effort to detect variants of these proteins is currently electrophoresis, utilizing starch gel or acrylamide as the supporting medium. Recently, we have been relying increasingly on polyacrylamide gels in view of the many techniques which increase the resolving ability of electrophoresis using such gels.<sup>3,4</sup> Several of these techniques, including the utilization of acrylamide gels of differing pore size and electrophoresis with several buffer systems, have been employed to detect variant protein species not previously demonstrable.<sup>5-7</sup> Table 2 lists the proteins which are currently being studied or for which methods for electrophoretic analysis are currently being developed in our laboratory. Additionally we will soon be initiating for these purposes an effort to utilize those enzymes of the leukocyte not present in the erythrocyte. The erythrocyte and plasma proteins generally include those with which our laboratory has had extensive experience by virtue of its studies of Amerindians.

In order for a variant enzyme to be detectable with electrophoretic techniques, the structural alteration must result in a net charge change and the altered protein must retain functional properties. An unknown percentage of amino acid substitutions will result in loss of function, and it is to be expected on theoretical grounds that about two thirds of the substitutions involve no net charge change. Thus most of the amino acid substitutions are not detected by electrophoresis. Also most genetic deletions will result in loss of functional protein. Accordingly, electrophoresis probably detects less than one quarter of specific locus mutations.

The extensive lists of metabolic errors associated with loss of enzyme activity which have been

しかし、この方法は、子供に変異体が認められた場合、分娩から1か月または2か月後に両親と連絡を取るという方法よりも時間の浪費が少なく、また、この方法によれば、子供の変異体の存在が確立されるまで両親の血液標本の採集を遅らせた場合よりも、家族調査の成功率は確実に高くなると思われる。その上、この種の調査に適する他の蛋白質が発見される速度を考え、さらに標本処理に要する労力を考え合わせるならば、我々の方法は将来の技術開発にそなえて重要な資料源を保有していることになると思う。

### 実験法

蛋白質変異体が発見する方法の主体をなすものは、現在では、澱粉ゲルまたはアクリルアミドを支持体とする電気泳動法である。最近では、ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動の分解能を増大させる多くの技法が開発されているので、<sup>3,4</sup> 我々はますますこのゲルに依存するようになっていく。網目構造の大きさ(ポアサイズ)の異なるアクリルアミドゲルを利用したり、数種の緩衝液を用いる電気泳動法などによって、今までに発見されていなかった蛋白質変異体が発見されている。<sup>5-7</sup> 表2は、現在我々の検査室で研究中または電気泳動検査法を開発中の蛋白質を示している。さらに、これらの目的のために、赤血球には存在せず白血球中だけに存在する酵素を用いる検査も遠からず開始する予定である。検査の対象となっている赤血球および血漿蛋白質に関しては、おおむね、我々の研究室では、アメリカンディアンに関する調査を行った際に広範な経験を得ている。

電気泳動法で変異型酵素が発見されるためには分子全体としての電荷の変化をもたらすような構造上の変化が必要であり、変化した蛋白質も機能的な特性を保持する必要がある。現在のところ、考えられるアミノ酸置換のうち何%が、蛋白質の機能を消失するような結果をもたらすかは不明である。さらに、理論的にはアミノ酸置換の約3分の2は、分子全体の電荷量に変化をもたらさないと考えられる。したがって、アミノ酸置換の大部分は、電気泳動法によっては発見できないことになる。同様に、遺伝的欠損の大部分は機能を持った蛋白質が消失することになるであろう。したがって、電気泳動法によってある特定の座位における突然変異が探知される率は、4分の1未満であると思われる。

他の研究者<sup>8-10</sup> がまとめた酵素活性の消失に伴う代謝誤差についての広範なリストは、活性の消失をも

TABLE 2. PARTIAL LIST OF PROTEINS

表2 蛋白質の一部リスト

A partial list of proteins of the erythrocyte and blood serum which can now be satisfactorily screened for electrophoretic variants. Relatively little has thus far been done with the proteins of the leukocyte; this appears to be an important field for investigation. Proteins indicated by a (1) are not present in sufficient quantities in cord blood for reliable studies; those indicated by a (2) are currently included in the program for screening cord bloods described in the text.

現在、電気泳動法を用いて変異体発見の可能な赤血球および血清中の蛋白質の一部の表。非常に重要な分野である白血球の蛋白質については、これまでほとんど研究が行われていない。(1)の蛋白質は、信頼のおける調査を実施するに十分な臍帯血液量が得られない。(2)の蛋白質は、現在、本文で述べた臍帯血液スクリーニング・プログラムに含まれているものである。

## BLOOD SERUM

Albumin  
 $\alpha_1$ -Antitrypsin  
 Ceruloplasmin (2)  
 Haptoglobin (1)  
 Pseudocholinesterase  
 Transferrins (2)  
 Group specific component (2)

## ERYTHROCYTE

Acid phosphatase (2)  
 Adenosine deaminase (2)  
 Adenylate kinase  
 Aldolase  
 Carbonic anhydrase I (1)  
 Carbonic anhydrase II (1)  
 Catalase  
 Diaphorase  
 Diphosphoglycerate mutase  
 Enolase  
 Esterase A (2)  
 Esterase D (2)  
 Galactose-1-phosphate uridyl transferase (2)  
 Glucose-6-phosphate dehydrogenase (2)

## ERYTHROCYTE (Continued)

Glutamate dehydrogenase  
 Glutamic pyruvate transaminase  
 Glutathione reductase  
 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
 Glyoxalate (2)  
 Hemoglobin A (2)  
 Hemoglobin A<sub>2</sub> (2)  
 Hexokinase (2)  
 Isocitrate dehydrogenase (2)  
 Lactate dehydrogenase (2)  
 Malic dehydrogenase (2)  
 Nucleoside phosphorylase (2)  
 Peptidase A (2)  
 Peptidase B (2)  
 6-Phosphoglucose dehydrogenase (2)  
 Phosphoglucomutase 1 (2)  
 Phosphoglucomutase 2 (2)  
 Phosphohexose isomerase (2)  
 Pyruvate kinase  
 Triose phosphate isomerase (2)  
 Glutamic oxalacetic transaminase (2)

compiled by other investigators are indicative of the range and prevalence of mutations resulting in loss of activity.<sup>8-10</sup> These reports plus the studies of the first degree relatives of persons with various deficiency states involving such enzymes as glucose phosphate isomerase, pyruvate kinase, and iduronidase indicate that the heterozygous individual is distinguishable from the normal population.<sup>11-14</sup> In none of the reports quoted above could the variant enzyme be detected by electrophoresis in the heterozygous individual, which is as expected if the protein did not retain enzymatic activity. This type of genetic damage is often observed in the offspring of irradiation-treated mice, a finding paralleling the earlier interpretation on other grounds that most of the X-ray induced mutations of the mouse are due to gene inactivations or small deletions.<sup>15-19</sup>

たらず突然変異の範囲および頻度を示している。これらの報告ならびに、グルコース燐酸イソメラーゼ,<sup>11,12</sup> 焦性ブドウ酸キナーゼ,<sup>13</sup> イドロニダーゼ<sup>14</sup>などの酵素活性が、種々の程度に欠乏している者の第1親等についての調査の結果は、異型接合の者が正常な群から識別できることを示している。上記の報告のいずれにおいても電気泳動によっては異型接合の者に変異酵素を発見することはできなかった。これは蛋白質に酵素活性がない場合は予想されることである。この種の遺伝的損傷は、電離放射線を照射されたマウスの子孫にしばしば認められるが、<sup>15-18</sup>この所見は、マウスにおけるX線誘発性突然変異のほとんどが、遺伝子の不活性化または小規模な欠失によるものであるとした他の調査で得られた初期の解釈<sup>19</sup>と類似している。



TABLE 3 LIST OF ERYTHROCYTE ENZYMES

表3 赤血球酵素のリスト

A list of erythrocyte enzymes which should be amenable to the search for mutants which when heterozygous result in half-normal levels of enzyme activity.

異種接合体である場合に酵素活性が半正常値になる突然変異体の探求に使用できる赤血球酵素の一覧表

Adenylate kinase	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
Pyruvate kinase	Glutathione peroxidase
Triose phosphate isomerase	Lactate dehydrogenase
Phosphoglucokinase	Glutathione reductase
Phosphoglucose isomerase	

The erythrocyte enzymes we are currently studying for genetically-controlled deficiencies in activity are listed in Table 3. These enzymes were chosen because they have levels of activity which are readily detectable by conventional methods, because the enzyme protein is almost exclusively the product of a single locus, and because our preliminary estimates suggest a between-individual coefficient of variation of less than 15%. If individuals with a "null" allele at any of these loci have a level of enzyme activity of approximately 50% of normal, they should be quite distinct from the normal population in enzyme activity. Genetic diseases associated with enzyme deficiencies have been reported for each of these enzymes.<sup>8</sup> The frequencies of these diseases are still very poorly defined, but even if they are as rare as  $10^{-6}$ , heterozygote frequencies should approximate  $2 \times 10^{-3}$ .

A technique which is often capable of distinguishing between proteins with similar catalytic capabilities but small structural differences is heat stability. Many examples of electrophoretic alterations being associated with changes in the heat stability of a protein have been noted.<sup>20-22</sup> Genetic variants which cannot be detected by electrophoretic analysis may be demonstrated by differences in heat stability profiles.<sup>23-25</sup> Studies utilizing heat stability as the detection method have an advantage over electrophoresis in that alterations of heat stability do not require that the mutational event results in a net charge change. Our initial efforts in utilizing heat stability as a method for detecting variant enzymes will involve those listed in Table 3. Variants of many of these enzymes have been reported to exhibit altered heat stability profiles.

酵素活性の欠乏が遺伝的に支配されているのではないかと考えて現在我々が調査している赤血球酵素は表3に示した。これらの酵素を選んだ理由は、現行の方法で容易に探知できるだけの活性があり、その酵素蛋白質がほとんど単一の遺伝子座位からできたものであり、また、我々の行った予備試験での推定によれば個人間の変異係数が15%以下であったためである。これらの座位のいずれかに「零」の対立遺伝子を有し、その酵素活性が正常値の約50%である人がおれば、これらの人の酵素活性は正常な集団の活性値とはかなり明白に異なるはずである。これらの酵素のそれぞれには酵素欠失に伴う遺伝的疾患が報告されている。<sup>8</sup> これらの疾患の頻度は依然としてほとんど解明されていないが、たとえ頻度が $10^{-6}$ という低いものであっても、その異型接合の頻度は約 $2 \times 10^{-3}$ となるはずである。

触媒能が同様であっても構造上わずかな差のある蛋白質を識別することが可能な方法として、熱安定性試験がある。電気泳動上異なった移動度を示す蛋白質がその熱安定性においても変化している例は数多く報告<sup>20-22</sup>されている。電気泳動法によっては発見されない遺伝的変異体が、熱安定性曲線の相違によって認められることもある。<sup>23-25</sup> 突然変異によって分子全体の電荷の変化がなくても熱安定性は変化し得るという点で熱安定性に基づく調査は電気泳動法より優れている。著者らは熱安定性を利用して酵素変異体を検索する予定であり、その場合まず最初は、表3に示した酵素を対象とする。これらの酵素の多くの変異体は、熱安定曲線に変化を示すことが報告されている。

The instrumentation to be utilized for the studies based upon kinetic measurement of enzyme activity is the Miniature Centrifugal Fast Analyzer developed by Oak Ridge National Laboratory.<sup>26</sup> Enzyme assays with this instrumentation usually require hemolysate from less than 1  $\mu$ l of packed cells. This analyzer has excellent operating characteristics and the coefficient of variation for within-sample repeatability is less than 2% for most of the nine erythrocyte enzymes currently being examined. An additional asset of this instrumentation is the availability of programs for its PDP8E computer, facilitating data acquisition and manipulation, including the calculation of  $K_m$ ,  $K_i$ , and  $V_{max}$ .

One of the practical problems in a study of this type is the occurrence in a particular system of a specific electrophoretic variant in relatively high frequency — say 3-5/1000 determinations. If all such variants are truly identical, then the probability is very, very high that they all have descended from a common ancestor rather than that some of them arose in the preceding generation from a mutational event. Detailed family studies of each variant are not apt to be rewarding with respect to mutation. If, on the other hand, this electrophoretic class shelters a variety of variants due to different amino acid substitutions resulting in the same change in the net charge of the molecule, then the probability that any one variant arose in the preceding generation from a mutation is greater (but still small), and family studies should be pursued vigorously. Recent studies on electrophoretic variants in *Drosophila* and *Colias* have revealed the feasibility of demonstrating heterogeneity in electrophoretic classes by a combination of electrophoretic techniques and the study of physical and kinetic properties.<sup>6,7,27,28</sup> It is our plan to devote considerable effort to the search for heterogeneity in electrophoretic classes; we expect the Miniature Fast Analyzer to be especially useful in this context.

#### Data Storage and Retrieval

In any program designed to detect a difference in mutation rate between two groups of — say 50%, the volume of the determinations to be processed will by our current standards be enormous (see following section on Sample Size). It is imperative that data storage and retrieval be made as efficient as possible. In our operation this challenge is under the supervision of Dr. Charles Sing and Mr. Ronald Griffith. The

酵素活性の測定に基づく調査に使用される分析機器としては、Oak Ridge National Laboratory によって開発された Miniature Centrifugal Fast Analyzer (小型遠心式高速化学分析装置)<sup>26</sup> がある。この分析機を用いれば、普通 1  $\mu$ l 以下の遠沈赤血球から調製した溶血液で酵素活性の測定ができる。なおこの分析機は、優れた作業特性を備えており、現在対象となっている 9 種類の赤血球酵素の大部分において同一標本での反復検査の変動係数は、2%未満である。さらに、この分析機のもつ別の利点は PDP8E コンピューター用のプログラムがあることであり、これにより  $K_m$ ,  $K_i$ ,  $V_{max}$  の計算など、資料の入手および処理が容易に行える。

この種の調査における実際的な問題の一つは、特定の酵素に特殊な電気泳動変異体が比較的高い頻度で発生していることであり、それは 1,000 測定当たり 3-5 に及ぶことである。このような変異体のすべてがほんとうに同一のものであれば、その一部が先の世代での突然変異によって発生したものではなく、むしろそのすべてが同一の先祖から受け継がれた可能性がきわめて高いことになる。各変異体について詳細な家族調査を行っても、突然変異に関しては得るものはあまりないと思われる。これに反して、この電気泳動上は同一種と見られる変異体の中に、実は異なった変異体、すなわち、アミノ酸置換は異なっても分子全体の電荷の変化は全く同じになるような種類の変異体を隠しているとすれば、いずれかの変異体が突然変異によって前の世代で生じた可能性はより大きくなり(しかし、依然としてまだ小さいが)、家族調査も積極的に実施すべきである。ショウジョウバエおよび *Colias* チョウに認められた電気泳動上の変異体に関する最近の研究によれば、電気泳動の技法とともに物理的特性および反応速度論的特性を調べることによって、電気泳動上は同一種と考えられる変異体の中に異質性が認められる可能性が明らかになった。<sup>6,7,27,28</sup> 我々は、電気泳動上同一クラスと目される蛋白質間における異質性について調べるのに相当な努力を傾注するつもりである。この面で Miniature Fast Analyzer は特に威力を発揮するものと期待している。

#### 資料の保管および検索

二つの群間における突然変異率の差、たとえば 50%、を探知するように企画されている研究プログラムでは、実施される測定量は、我々の現在の基準からすれば膨大なものとなる(次の調査集団の規模に関する項を参照)。資料の保管および検索はできる限り効果的に行えるようにすることが肝要である。今回の調査では、これらの作業は Dr. Charles Sing および Mr. Ronald Griffith の指導のもとで実施さ

laboratories supporting this project interface through terminals with the Departmental DEC 11/70 computer. The on-line time-sharing capabilities of this machine permits multiple members of the laboratory team simultaneous access to the data base.

Identifying information concerning each sample is entered into the computer shortly after sample collection. As laboratory determinations become available, they are fed directly from the laboratory books into the computer. All data initially go into "temporary storage". After verification of the results against the laboratory records, plus any further studies necessary to remove ambiguities in the findings, the data are transferred into "permanent storage". The programming permits one at any moment either to review all the information on a given individual or group of individuals as it exists at any point in time, or to retrieve all of the data on any particular system. We hope in the future to place the Miniature Fast Analyzer and other suitable equipment "on-line" with our current computer configuration. While much of this is standard, current computer strategy, the fact is that it has not often been applied to the management of laboratory data of this type. In our case, it not only eliminates the laborious hand transcription, collation, and coding of the data which has characterized past operations, but also provides a vastly more flexible retrieval of the data according to specific needs than was previously possible.

#### Some Considerations of Sample Size

A protocol of this sort if implemented on a sufficient scale and extended over a sufficient time span could detect secular changes in mutation rates. The degree of implementation necessary depends on the baseline rate of mutation of this type (still very poorly defined), the magnitude of the change one would not wish to see go undetected, and the time span on which one is satisfied to operate. No two statisticians will proceed in quite the same way with their calculations of the number of observations necessary to achieve the stated objectives. On the assumption that the initial detectable mutation rate was  $0.5 \times 10^{-5}$ /gene/generation, we have previously calculated that to demonstrate a 50% increase in mutation rate with the confidence implied by an  $\alpha$  value of 0.05 and a  $\beta$  value of 0.20 would require two samples of approximately 300,000 persons each typed for

れている。この研究課題のもとで作業に携わっている各研究室は、当教室のDEC 11/70コンピューターと端末装置を通じて連結している。このコンピューターの on-line time-sharing 機構によって、研究班員が幾人も同時に基礎資料を利用することができる。

各検体に関する身元確認の資料は、検体採取後すぐコンピューターに入れる。研究室では、測定値が得られしだいそのつど実験記録簿からコンピューターへ直接データを入れる。最初には、資料はすべて「暫定貯蔵」に入る。研究室の記録と照合して結果が確認され、不明瞭な所見を解明するのに必要な検査を実施した後、その資料は「永久貯蔵」に入れる。我々のプログラミングでは、いかなる時点での特定の個人または集団に関するすべての資料を検討することも、特定の蛋白質に関するすべての資料を検索することもできる。将来は Miniature Fast Analyzer ならびにその他の適当な機器を現在のコンピューターと "on-line" で結合したいと考えている。これらのことの多くは現在のコンピューター利用法では標準的なことであるが、この種の研究室資料の管理にはまだあまり用いられていないというのが実情である。この方法により当研究室では、過去における研究の特徴であった厄介な手書きによる転記、照合、およびコーディングを省くことができるのみならず、特定の資料の検索は以前よりもはるかに容易に得られる。

#### 調査集団の規模に関する若干の考察

この種の研究計画が十分な規模と相当な長期間にわたって実施されていれば、長年にわたっておこる突然変異率の変化を探知することができよう。その必要な実施範囲は、現在のところまだ非常に不明確なこの種の突然変異率の基準値、見逃がしたくない変化の大きさ、ならびに作業に必要な十分な期間にかかっている。先述の目的達成に必要な観察数の算定を統計学者にやらせた場合、二人として全く同じ方法を採用するものはいない。最初の探知可能な突然変異率が  $0.5 \times 10^{-5}$  /遺伝子/世代であったとの仮定のもとで、 $\alpha$  の値 0.05、 $\beta$  の値 0.20 の信頼度とするならば、突然変異率に 50% の増加を探知するには、一群約 300,000 人の二つの集団で約 20 種の蛋白質の型決定を行うことが必要であると以前に我々は算定

some 20 different proteins.<sup>2</sup> If one is content to operate on a 5-year cycle, this requires the analysis of 60,000 samples per year plus the necessary follow-up studies. Based on the standards of prior biomedical research, this requires a most unusual effort and organization. Clearly an undertaking of this magnitude requires the most serious consideration. But while it may be dismissed as a larger undertaking than the circumstances warrant, it is already clear that it cannot be discounted on technical grounds alone.

#### PROTOCOL TWO DISCONTINUOUS MONITORING, INVOLVING PERIODIC CONTRASTS OF HIGH-RISK AND LOW-RISK GROUPS

An alternative approach to continuous monitoring is, whenever a group suspect for an increased mutation rate emerges, to contrast the rates in such a group with the rates in a suitable control group. This constitutes a sort of 'worst case' analysis, from which one can presumably extrapolate to the more usual circumstance.

The most important opportunity for this approach to date has undoubtedly been the situation existing in the wake of the atomic bombs at Hiroshima and Nagasaki. Shortly after World War II an extensive study was undertaken of the children born to parents exposed to a greater or lesser extent to the radiation spectrum of the A-bombs, as well as the children born to a suitable control group. This study employed what we may term the morphological approach, involving such potential indicators of an increased mutation rate in the parents as the frequency of congenital defects, birth weight, infant and childhood death rates, physical growth and development, and the sex ratio. In 1954, after an extensive analysis, the detailed examinations of infants at birth and 9 months later were discontinued but data continued to be collected on two indices, namely, the survival and the sex-ratio of the children born to the survivors of the bombs and to the controls, and these continuing studies have been the subject of several reports.<sup>29-32</sup> A great deal of very laborious investigation can be summarized with the statement that although clear-cut results of the parental exposure have not been established, there are very borderline findings with respect to the sex-ratio and survival which are compatible with the findings in experimental systems.

している。<sup>2</sup> 5年周期の調査を実施するのであれば、このためには1年当たり60,000人の対象者の検査と必要な追跡調査を行わなければならない。以前の生物医学的研究の基準から考えると、並々ならぬ努力とそのため組織機構が必要となる。この規模の調査の実施には非常に慎重な考慮を必要とすることは明白である。しかし、反面、周囲の状況から判断して必要以上に大規模な調査であるとしてかたづけられるかもしれないが、技術的な面のみから不要なものであるとすることはできないのは明らかである。

#### 研究計画 II

危険率の高い群と低い群を定期的に比較対照する断続的観察調査

連続観察調査に対応する別な手段としては、突然変異率の増加が疑われるような集団があったときにはいつでも、その突然変異率を、対照群として適当な群の突然変異率と対比する方法がある。この方法は、一種の「最悪例」分析であって、これからおそらくより通常の状態へと外挿することができると思われる。

今日までこの方法を実施するのに最も重要な機会は、まぎれもなく広島および長崎の原子爆弾投下後にもたらされた状態である。第2次世界大戦後まもなく、原爆放射線に大量または微量に被曝した者から生まれた子供、および対応する対照群の子供について広範な調査が行われた。この調査では、先天性奇形の頻度、出生時体重、乳児および小児の死亡率、身体の成長および発育、ならびに男女比など、両親における突然変異率の増加の潜在的指標に関する方法で、われわれが形態学的アプローチと称するものを採用した。1954年には、広範な分析<sup>29</sup>の結果、出生時および出生9か月後の乳児についての詳細な検診を中断したが、二つの指標、すなわち、原爆被爆者および対照者に生まれた子供の生存状態および性比については資料収集を継続した。これらの継続調査をもとにいくつかの報告<sup>29-32</sup>がなされている。非常な努力を払って行われたこの調査については、次のようにまとめて説明できる。すなわち、両親の被曝の影響はまだ明白に確立されていないが、性比および生存率についての所見は、全くボーダーライン上にあり、これは実験から得られた所見と一致するものである。

The study on survival has involved the establishment of two cohorts of children, one born to what are termed 'proximally exposed' parents, whose mean conjoint exposure to whole-body radiation has been estimated at 115 rem, and one born to 'distally exposed' parents, whose mean conjoint exposure is estimated at less than 1 rem. Each cohort is comprised of some 17,000 children. Periodically (on a 5-year cycle) the survival of each child in the cohort is determined.

This population is clearly one of great interest, with the results of the studies not only of immediate pertinence to those concerned but to a variety of scientific and governmental groups. Surely it is the responsibility of the scientific community to ensure that the maximum useful information can be extracted from this unfortunate experience, the discussion being reopened from time to time as the techniques available to the study of the problem evolve. This thought led to the initiation in 1967 of cytogenetic studies on the two groups of children.<sup>33-35</sup>

Although the desirability of such studies had been recognized when the first follow-up studies were initiated in 1946, the necessary techniques were of course not at hand. More recently, under the auspices of RERF, an effort has been launched to extend the study of the potential genetic effects of the bombs to the biochemical level. This effort has been preceded by a 3-year pilot study which has demonstrated that the rare protein variants on which one would base the quest for mutational events, have about the same frequency in Japanese as in Caucasian populations, a frequency whose magnitude makes a study of this type feasible.<sup>36-40</sup> The new study should be regarded as additive to our previous studies in Japan, the ultimate objective being a synthesis of all these studies.

The proteins being investigated for evidences of mutational events and the techniques by which they are being and will be scrutinized are essentially similar to those included in the description of Protocol One. This is scarcely surprising in view of the close working relationship between the group at the University of Michigan and the group in Hiroshima and Nagasaki.

Although the battery of indicators of mutation is thus far quite similar in the two undertakings, the practical problems are quite different.

生存に関する調査では、二つの小児対象者群が作られた。すなわち、一つは、いわゆる「近距離被爆者」である両親から生まれた子供で、両親の全身被曝線量の和の平均値が115 remの群、もう一つは「遠距離被爆者」である両親の子供で、両親の全身被曝線量の和の平均値が1 rem未満と推定されている者の群である。各群は約17,000人の子供からなる。定期的に(5年周期で)各々の子供の生存状態が調べられている。

この対象集団は、明らかに重要な集団であり、調査の結果は当事者に直接関係があるばかりでなく、各種の学術団体、政府機関にも関心のあるものである。この不幸な経験から有用な資料をできるだけ多く入手し、また、この問題の調査に利用できる技法が開発されるに伴って時宜を得て討議が再開されるようにすることは、明らかに科学界の責任である。この考えに基づいて、1967年に二つの小児群について細胞遺伝学的調査<sup>33-35</sup>が開始されることになった。

1946年に最初の追跡調査が開始された時点で、このような調査の望ましいことは認められていたが、当時は必要とする技術が開発されていなかった。最近放影研において、原爆の潜在的な遺伝的影響に関する調査を生化学的水準にまで拡大する努力が開始されている。この調査に先立って3年間の試験調査が行われ、突然変異探求の基礎となるまれな蛋白質変異体の頻度は、日本人においても白人集団とほぼ同じであり、頻度の大きさがこの程度あればこの種の調査を実施することは可能であることが判明した。<sup>36-40</sup> この新しい調査は、従来、我々が日本で行ってきた調査の続編と考えるべきものであり、究極の目標はこれらすべての調査を統合することである。

突然変異の有無を調査すべき蛋白質も、用いられる技法も、研究計画Iの項で述べたものと現在も、将来も事実上同様のものである。このことは、Michigan大学研究班と広島・長崎研究班との密接な作業関係からみれば、何ら驚くにはあたらない。

突然変異の指標として用いられるものは、二つの調査においてこれまではほとんど同じのものであったが、

Whereas in programs of the first type the potential study population is quite large, in programs of the second type, as in Japan, the study population will usually be quite limited. It is of the utmost importance that maximum participation be achieved, and that the data be collected in such a fashion that the results of various studies can be combined. In Japan there are of course some losses from the cohorts through death. A much more important source of loss is emigration from Hiroshima and Nagasaki. Japan now has a relatively high internal mobility, and the oldest children of survivors conceived since the bombs are now entering their 30's and so are well into the job market. It has not seemed feasible to pursue these children beyond the confines of the two cities (although we do attempt to contact them when they return on festival occasions!). Finally, these 'children' are now independent adults, not all of whom wish to participate in a study which reminds them of a very traumatic event in their family history.

A further set of practical difficulties arises when a variant is encountered, which, with a battery of 25 protein indicators and the variant frequencies in Japan (2/1000 determinations, exclusive of polymorphisms), is the case for approximately 1 in each 20 subjects. We are finding that for almost one-quarter of persons with a variant, one or both parents are deceased, which of course in any strict sense invalidates the use of the family in a mutational context. Furthermore, if both parents are alive, they may not wish to participate in such a study.

It is still too early for reliable figures concerning sample attrition, but it is clear it will be relatively heavy. While the situation in Japan perhaps presents a rather extreme example of sample attrition, a similar problem will arise whenever and wherever an attempt is made to contact the children born to a cohort of particular interest. Under these circumstances, consideration must be given to maximizing the information to be gained from each sample through an increase in the number of systems studied — but this places added stresses on the laboratory (to be discussed later). Furthermore, most of these populations of unusual interest will fortunately be relatively small. It will be highly desirable to be able to pool the results of different studies, a goal that immediately raises questions of standardization.

実際上の問題点はかなり異なっている。研究計画Ⅰに記されたタイプの研究では、潜在的な調査集団はかなり大きい、研究計画Ⅱに記されたタイプの研究では、日本の場合のように、調査集団は普通まったく限定されたものになる。最も重要なことは、最大限の参加率が得られることであり、また各調査の結果が合計できるような形で資料収集が行われることである。日本でも、死亡による対象者群の損失が若干であるのは当然のことである。しかし、それよりも、広島市、長崎市からの対象者の転出による損失の方がはるかに重大である。現在、日本では国内移動率が比較的高く、原爆以後に被爆者から生まれた子供の最年長者は現在30歳代に達し、就職してかなり年月が経過している。両市の圏外へでかけてまでこれらの者を追跡することは実施不可能と思われる(祝祭日などに対象者が帰郷する際に、連絡しようとしてはいるのだが)。最後に、これらのいわゆる「子供」は、いまは独立した一個の成人であり、その全員が、それぞれの家庭の歴史に非常に深い傷痕をつくったできごとを思い出させる調査に参加することを望んでいるわけではない。

一つの変異体が発見されると、調査実施の上で困難な問題がさらに生じる。25種の蛋白質を指標とし日本における変異体出現頻度(多型現象を除いて、1,000件の検査当たり2例)を用いれば、変異体は対象者20人に約1人の割合で発見されることになる。変異体の発見された者のほとんど4分の1において、両親の一方または双方が死亡していることを我々は知った。これにより、当然、突然変異の問題に家族を用いることが厳密な意味で不可能となる。その上、たとえ両親が生存していても、この種の調査に参加したがない場合もある。

調査集団の損失について信頼性のある数字を示すには時機尚早であるが、相当大きいことは明らかである。日本におけるこの調査の場合は、おそらく、調査集団の損失率が相当極端な例となると思われるが、特別に興味のある対象者から生まれた子供に接触をもとうとする場合は、いつ、いかなる場所においても必ず、同様の問題に遭遇するものである。これらの状況のもとでは、調査する蛋白質の種類を増加することによって、各標本から得られる資料の量を最大限にすることに考慮を払わなければならないが、これは研究室に、さらに負担を課することになる(このことについては後述する)。しかし、特に興味の対象であるこれらの集団のほとんどは、さいわいに比較的小規模である。別々の調査結果をプールできるようにすることが大いに望まれるが、その目標を達成するには直ちに標準化の問題が出てくる。

**Some Considerations of the Power of the Study**  
 Since (it is to be hoped) the cohort of children born to proximally exposed survivors of the A-bombs will constitute the largest identifiable sample of humans whose parents have been exposed to a well defined mutagen in the world's history, we may inquire as to what might be demonstrated with such a sample.<sup>41</sup> We have made three assumptions: 1) as before, the detectable spontaneous mutation rate is  $0.5 \times 10^{-5}$  / locus/generation; 2) the average conjoint parental dose is 115 rem of atomic radiation; and 3) it will be possible to study 10,000 children (and their parents when necessary) from each cohort. Under these conditions, if 115 rem is the doubling dose for mutation of the type this study will detect, there are 12 chances in 100 of obtaining a between-group difference using an  $\alpha=0.05$  test. This probability increases to 35% if the doubling dose is 57 rem and to 59% if it is 38 rem. It is clear that on these assumptions, even this extensive study may well fail to yield a significant result. The probability of significance is of course increased if the spontaneous rate is higher and decreased if it is lower.

#### STUDIES ON SOMATIC CELL MUTATION RATES

It is clear that studies on germinal mutation rates in man will need to be laborious and extensive if they are to serve a monitoring function. Studies on *in vivo* somatic cell mutation rates in control and exposed subjects offer an appealing short-cut, since now for any enzyme system each person offers, as in a blood sample, the possibility of a million or more locus tests, rather than the number defined by his or her reproductive performance. It is to be hoped that efforts to develop such tests will proceed vigorously. Our failure in this presentation to devote more time to this development (which we are pursuing on a small scale) stems solely from limitations of time. However, at some stage in developing our monitoring strategy, before reliance for guidance could be placed on an *in vivo* somatic cell approach, there must be one study that simultaneously measures, on a large scale, somatic and germinal mutation rates, so that we can establish the necessary conversion factor. A mutation in a germ cell must pass a transmission test which one in a somatic cell need not. Once the implications of somatic cell mutation rates for future generations have been established, then monitoring through observations on somatic

#### 調査の検定力に関する若干の考察

近距離の原爆被爆者に生まれた子供たちという対象者群は、その両親が明確な突然変異誘発要因に被曝している世界史上最大の人間集団であるのだが(今後これ以上のものがあってはならないと願っている)、そのような集団にどのような所見が認められるであろうか。<sup>41</sup> そこで次の三つの条件を設定した: 1) 従来どおり、探知可能の自然突然変異率は  $0.5 \times 10^{-5}$  / 座位 / 世代, 2) 両親の平均合計原爆放射線量は 115 rem, 3) 各々の対象者群から 10,000 人の子供(必要な場合は、その両親も)を調査できる。このような条件のもとで、115 rem が、この調査で発見される型の突然変異に対して倍加線量となる場合は、 $\alpha=0.05$  検定を用いるとすれば群間に差が認められる確率は 100 のうち 12 である。この確率は、倍加線量が 57 rem であれば 35% に、38 rem であれば 59% に増加する。これらの仮定のもとで、この大規模な調査においても有意な結果が得られないことも十分にありうることは明らかである。有意性の確率は、もちろん自然発生率が高い場合は増加し、低い場合は減少する。

#### 体細胞突然変異率に関する調査

人間の生殖細胞の突然変異率に関する調査が、監視機能を持つためには、その調査は、困難で大規模なものになることは明白である。被爆者群と対照者群の体細胞突然変異率を調査する方が魅力的な近道となると考えられる。その理由は現在では、各被検者から得られる酵素系については、血液標本で得られるのと同様に 100 万以上もの座位についての検査が実施できる可能性があり、これは各自の生殖能力によって規定されるような数ではないからである。このような検査を開発する努力は精力的に続けられることが望ましい。我々が小規模ながら実施しているこの開発について、本報告でもっと多くの時間をかけて説明できないのは、ひとえに時間的制約によるためである。しかし、我々の監視法開発のある段階では、生体内の体細胞による研究法を信頼する前に、体細胞および生殖細胞の突然変異率を同時にしかも大規模に測定して、必要な変換係数を得るための一つの調査がなされなければならない。生殖細胞における突然変異は、子供に遺伝するか否かという障壁を乗り越えなければならないが体細胞の場合にはこれは必要ではない。いちど後世のための体細胞突然変異率の意義が確立されたならば、体細胞突然変異率の

cell rates can be expected largely to replace germ cell monitoring.

### SOME DECISIONS WHICH A MONITORING PROGRAM BASED ON BIOCHEMICAL VARIANTS MUST FACE

We have presented in bare outline two different programs designed to serve as prototypes for a particular approach to monitoring. It is obvious that a variety of technical and philosophical problems remain to be solved. Some of these have already been alluded to. Let us briefly consider some of the issues more commonly raised in discussions of monitoring programs.<sup>2,42,43</sup>

#### The Problem of Discrepancies Between Stated and True Parentage

Any study of mutation of this type must deal with discrepancies between stated and actual parentage. Such discrepancies may arise not only from what is usually termed 'non-paternity' (a poor expression) but also, in a program using cord blood samples, from mislabelling of samples in the delivery room, and, in a study of an identified cohort, from the presence of adopted children whose status is not revealed by the parents. We propose to investigate the accuracy of parental assignment in all instances of apparent mutation, through the use of stored samples.

Let us assume that it will be possible to bring to bear the standard battery of genetic tests on the detection of what we will call "parentage discrepancies" and that this battery can detect 90% of such discrepancies. Then if "parentage discrepancies" characterize 5% of the children under study, and if for any system the frequency of the electrophoretic class of which the putative mutant is a member is  $10^{-3}$ , then the probability that the presence of a variant in a child of normal parents may be attributed to an undetected "parentage discrepancy" is  $10^{-1} \times 5 \times 10^{-2} \times 10^{-3} = .5 \times 10^{-5}$ . If this is also the frequency of spontaneous mutation, then half of all the apparent mutations in the control sample would be the result of these discrepancies. While a 'dilution' of the mutation rate of this magnitude is disappointing, allowance can be made for it in any analysis. Incidentally, it seems generally to have been overlooked that the same problem arises in the study of mutation resulting in "sentinel phenotypes" (i.e., dominantly-inherited syndromes), in which it has not been customary to conduct parentage checks.

観察をもって生殖細胞突然変異率の観察に代えることが期待される。

生化学上の変異体に基づく監視プログラムで直面しなければならない決定事項

本報告では、監視法開発のための原型となるように考案された2種類の研究計画の概要を示した。解決すべき技術的および原理的な問題がまだいろいろ残っていることは明らかである。これらのうちのいくつかについては、すでに言及した。監視プログラムにおいて、よく提起されている問題のいくつかについて一考したい。<sup>2,42,43</sup>

報告された親子と真実の親子との間の相違の問題

この種の突然変異に関する調査では、報告された親子関係と真実の親子関係との間の相違の問題について対処しなければならない。このような相違には、適当な表現ではないがいわゆる「嫡出でない子」の場合だけでなく、臍帯血液標本を用いる調査では、分娩室での血液標本への氏名の誤記によるものから、身元調査されたはずの対象者群中において両親が養子縁組の関係にある事実を隠している場合なども含まれる。見かけ上突然変異だと思われるようなすべての例についてその親子関係が正確か否かを保存されている標本を用いて、調査する予定である。

「両親の相違」を発見するために、一連の標準的な遺伝学的検査法を使うことが可能であり、その発見率が90%であると仮定しよう。次に、もし「両親の相違」が調査対象者の5%に認められ、また、いずれの蛋白質系においても、突然変異によると推定される変異体と同一移動度を示すような電気泳動上の変異体全体の出現頻度が $10^{-3}$ であるとするならば、正常な両親の間の子供に認められる変異体のうち、「両親の相違」が発見出来ないものに起因している確率は、 $10^{-1} \times 5 \times 10^{-2} \times 10^{-3} = .5 \times 10^{-5}$ となる。これが自然突然変異の頻度と同じであるならば、対照者中の突然変異と思われるものの半数は、これら両親の相違の結果ということになる。これ程の大きさの突然変異率の「希釈」のあることは残念であるが、いかなる形の解析法でも、これを考慮して行うことはできる。ついながら、通常両親について照合が行われていない「前哨表現型」(すなわち、優性遺伝症候群)の原因をなす突然変異の調査にも同じ問題が生じることが、一般に見落とされているように思われる。



If mutation rates are more like  $10^{-6}$ /locus/generation, then there is a real danger that a purported study of mutation is in fact one of undetected errors in the assignment of parentage and confusion in the labelling of samples. With respect to the latter, one would wish to reexamine all the samples from the parents of children born on the same day as an apparent mutant, to check on labelling error. With respect to the former, in addition to striving to increase the power of the exclusion tests, we believe we can also begin to develop probability functions for the chance the alleged father will have a particular genetic constitution — given the genetic findings in the mother and child. This is a type of *Vaterschaftsbestimmungs*. The extreme case is represented by the situation in which the child and father both possess a particular rare variant. This is of course not proof of paternity but it certainly is circumstantial evidence.

Despite strict observance of the doctrine of informed consent in such studies, it is clear these studies may result in very sensitive unanticipated by-products. Clearly the precautions to preserve anonymity of participation must be extreme.

#### Fewer Observations on More People or More Observations on Fewer People?

A dilemma already emerging in these studies is the optimum number of observations to undertake on each participant in the study. Given the expenditure of effort in obtaining a specimen and preparing it for analysis, it is obviously desirable to extract as much information as possible from that sample. On the other hand, every additional system which must be maintained at the requisite level of technical excellence imposes an added burden on the laboratory, and, depending on the size of the operation, there is surely a trade-off which maximizes return on effort. Where, however, sample size is clearly limited, and the sample is of exceptional interest, as in the previously-described situation in Japan, there seems no alternative to a vigorous effort to increase the number of observations per sample.

#### Detection vs Characterization

There is inherent in monitoring studies a genuine scientific conflict of interest. The monitoring function must place maximum emphasis on the efficient detection of variants in subjects and their parents. The precise characterization of the variants, and their comparison with one

突然変異率が  $10^{-6}$  /座位/世代の値に近似している場合は、計画されている突然変異に関する調査は、実際には、真実の両親ではないこと、および標本に氏名を記入する際の混乱などを発見し得ないために生じる誤りを調べていることになる危険がある。後者については、氏名誤記の有無を調べるため突然変異があると思われる者と同じ日に生まれた者の両親から標本を入手して再検査したいと考える。また前者については、除外検定力を増強するよう努力するとともに、母親および子供の遺伝学上の所見を基に、父親といわれている人に特定の遺伝性体質がみられる機会の確率関数を求めることもできると思う。これは、一種の父親であることの確認ということになる。極端な例は、子供と父親の双方に特別にまれな変異体が見られる場合である。これはもちろん、父親であることの証拠ではないが、確かに状況証拠にはなる。

この種の調査への同意表明の制度を厳守しても、結果的には個人にとって機密性のきわめて高い予期しない副産物が得られることもあることは明らかである。参加者の匿名を守るよう、極力注意を払う必要がある。

大規模な集団について少数の観察を行うべきか、小規模な集団について多くの観察を行うべきか

これらの調査ですでに生じているジレンマは、各調査対象者について行う観察の最適の回数にある。標本の入手および分析のための準備に相当の努力が傾注されているので、その標本からできる限り多くの資料を抽出しようとするのは、当然必要である。反面、必要な優秀な技術水準は維持されなければならないので、蛋白質系を一つ追加するごとに研究室に負担がかかる。そしてプログラムの規模に応じて、傾注した努力に対して得られる利益が最大となる点にも限界がある。しかし、前記の日本における状態のように、集団の規模が明らかに限られており、また調査集団に特に深い関心が寄せられている場合は、各集団における観察回数を増加させるために精力的に努力する以外にはないと思われる。

#### 発見と特質の究明との関係

監視調査には、本来、純然たる科学的な興味との対立がある。監視を目的とするならば、対象者およびその両親から、最も効果的に変異体を発見することに最大の重点を置かなければならない。変異体の特質をくわしく究明し、相互比較を行い、さらに他集団

another, and with the variants present in other populations (so dear to the heart of the biochemical and population geneticist) is really not essential to monitoring. On the other hand, herein lies much of the scientific interest. As a practical matter, to maintain the interest and enthusiasm of competent scientists in the program, some compromise must be struck between these two functions. This compromise will not be easily reached.

#### Assessing the Impact of Mutants of this Type

Concern over a possible increase in mutation rates stems from the belief that such an increase would be detrimental to human health. But to reach any cost-benefit analysis, one must be able to quantify the issue. In this connection, it must be admitted that whereas the biochemical approach appears to be the most precise available, genetically speaking, the health significance of this kind of mutation is far less clear than that of the dominant syndromes whose frequency in the population is maintained by mutation: for example, multiple neurofibromatosis, retinoblastoma, aniridia, Marfan's syndrome. It is an article of faith that in time we will understand the biomedical significance of these enzyme mutants much better than at present. As indicated earlier, already some of them, accompanied by severely decreased levels of enzyme activity, have been implicated in human disease. Furthermore, it is a reasonable working hypothesis that a doubling in the mutation rate leading to enzymatic variants would be accompanied by a doubling in the rate leading to more serious entities.

#### Cost of Monitoring Programs of this Type

Sooner or later in discussions of this type we come to questions of cost. Both of the programs we have described are in the developmental stage, so that unit costs are highly speculative. However, it is clear that a program which seeks to follow up a high-risk group will, relatively speaking, be far more expensive than a program dealing with consecutive births. This is because of the extra effort in locating the members of the study population. But it will also be more informative per person studied. We hope that within another year we will have initial cost estimates for the cord blood program. However, in considering these costs, which will seem high to some, we must consider the costs of not monitoring. Rather than be faced with uncertainty concerning the genetic impact of industrialization

に認められた変異体との比較を行うことは、(遺伝生化学者および集団遺伝学者にとってはきわめて重大なことであるが) 実のところ監視調査自体にとっては不可欠なものではない。ところが、これに反し、ここにこそ学術的興味の多くが存在する。実際問題として、有能な科学者の研究プログラムに対する興味と熱意を維持するためには、この両者の間に妥協点をみいだす必要がある。しかし、この妥協は容易に得られるものではない。

#### この種の突然変異体の影響に関する評価

突然変異率の増加についての関心は、率の増加が人間の健康に有害であるという考えに由来する。しかし、必要とする経費と得られる利益の解析をするには、これに対し量的な判断を下さなければならない。これに関連して、生化学的アプローチは遺伝学的に比べて最も正確である可能性があるが、この種の突然変異のもつ健康に対する意義はあまり明らかではなく、人口集団中における頻度が突然変異によって維持されている優性症候群、例えば、多発性神経線維腫症、網膜芽腫、無虹彩、Marfan 症候群などの場合よりはるかにあいまいであることを認める必要がある。時の経過と共にこれらの酵素突然変異体の生物医学的意義が現在よりもはるかによく理解されるようになるかと信じている。先に述べたように、酵素活性の極度の減少をもたらす酵素突然変異体のいくつかは、すでに人間の疾患と深い関連をもっている。その上、酵素変異体の原因となる突然変異率が倍加すれば、より重篤な疾患の発生率も倍加すると考えるのは妥当な作業仮説である。

#### この種の監視プログラムに要する経費

遅かれ早かれ、この種の調査に関して検討するならば経費の問題に直面することになる。ここで述べた二つのプログラムは、いずれも開発段階にあるので、単価はまだ推論の域を出ない。しかし、危険率の高い群を追跡する研究プログラムでは、相対的に比べて連続的な出生を扱う研究プログラムよりはるかに経費がかかることは明らかである。これは、調査集団中の各対象者の所在追求に余分の努力を払う必要があるためである。しかし、このような調査方法から得られる対象者当たりの資料は多い。ここ一年以内には臍帯血液調査プログラムのための最初の経費見積りを提示できると思う。ただし、この費用は、人によっては高いと思われるかも知れないが、監視調査をしなかった場合と比較して考えてみなければならぬ。産業化とそれに伴う汚染の遺伝学的影響

and its attendant pollution, surely it is worth a considerable expenditure to have the facts at our disposal when the need arises to make critical decisions concerning the directions of our society.

#### Organization of a Collaborative Study

Finally, let us point out the obvious, that a monitoring program of this type eminently lends itself to an international collaborative effort. The problem is clearly so large that it should not be entrusted to any one laboratory or any one country. Perhaps we can begin to explore how such a collaborative effort could be organized.

に対する不安を抱いて暮すよりは、社会の進むべき方向について重大な決定をくださなければならなくなったとき、それに必要な資料を用意しておくために、相当な費用をかけて備えることは価値があるはずである。

#### 共同研究の編制

最後に、この種の監視プログラムは、明らかに国際的な共同研究に非常に適している。取り扱う問題はきわめて大きく、一研究所あるいは一国家だけに委ねられるべきものではない。どのようにしてこの種の共同研究を組織していくかについて検討を開始してよい時機にきていると思う。

## REFERENCES

### 参考文献

1. COMMITTEE 17: Environmental mutagenic hazards. *Science* 187:503-14, 1975
2. NEEL JV: The detection of increased mutation rates in human populations. *Perspect Biol Med* 14:522-37, 1971
3. LATNER AL: Isoelectric focusing in liquid and gels as applied to clinical chemistry. *Adv Clin Chem* 17:193-250, 1975
4. LEABACK DH: Electrophoresis in protein analysis. *Chem Brit* 10:376-84, 1974
5. COYNE JA: Lack of genic similarity between two sibling species of *Drosophila* as revealed by varied techniques. *Genetics* 84:593-609, 1976
6. JOHNSON GB: Hidden alleles at the  $\alpha$ -glycerophosphate dehydrogenase locus in *Colias* butterflies. *Genetics* 83:149-67, 1976
7. SINGH RS, LEWONTIN RC, FELTON AA: Genetic heterogeneity within electrophoretic "alleles" of xanthine dehydrogenase in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 84:609-29, 1976
8. GRIMES AJ, DE GRUCHY GC: Red-cell metabolism. Hereditary enzymopathies. In *Blood and Its Disorders*. Ed by Hardesty RM and Weatherall DJ. London, Blackwell, 1974. pp 473-525
9. RAIVIO KO, SEEGMILLER JE: Genetic Diseases of metabolism. *Annu Rev Biochem* 41:543-76, 1972
10. KIRKMAN HN: Enzyme defects. *Prog Med Genet* 8:125-68, 1972
11. VANBIERVLIET JPGM, XLUG A, BARTSTRA HA, ROTTEVEEL JJ, DEVAAN GAM, STAAL GEJ: A new variant of glucose-phosphate isomerase deficiency. *Humangenetik* 30:35-40, 1975
12. VIVES-CORRONS JL, ROXMAN C, KAHN A, CARRERA A, TRIGINER J: Glucose phosphate isomerase deficiency with hereditary hemolytic anemia in a Spanish family. *Humangenetik* 29:291-7, 1975
13. KAHN A, VIVES-CORRON JL, MARIE J, GALAND C, BOIVIN P: A Spanish family with erythrocyte pyruvate kinase deficiency. Contribution of various immunological methods in the study of the mutant enzyme. *Clin Chim Acta* 75:71-80, 1977

14. DULANEY JT, MILUNSKY A, MOSER HW: Detection of the carrier state of Hurler's syndrome by assay of  $\alpha$ -L-Iduronidase in leukocytes. *Clin Chim Acta* 99:305-10, 1976
15. GLUECKSOHN-WAELSCH S, SCHIFFMAN MB, THORNDIKE J, CORI CF: Complementation studies of lethal alleles in the mouse causing deficiencies of glucose-6-phosphatase, tyrosine aminotransferase, and serine dehydratase. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:825-9, 1974
16. ERICKSON RP, EICHER EM, GLUECKSOHN-WAELSCH S: Demonstration in mouse of X-ray induced deletions for a known enzyme structural locus. *Nature* 248:416-8, 1974
17. RUSSELL LB, RUSSELL WL, POPP RA, VAUGHAN C, JACOBSON KB: Radiation-induced mutations at mouse hemoglobin loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:2843-6, 1976
18. MAYS J, McANINCH J, FEUERS R, BURKHART J, MOHRENWEISER H, CASCLANO D: Enzyme activity as a genetic marker to detect induced microlesions in mammals. The 8th Environmental Mutagen Society Meeting, Colorado Springs, Colorado, 1977 (Abstract)
19. RUSSELL LB: Definition of functional units in a small chromosomal segment of the mouse and its use in interpreting the nature of radiation-induced mutations. *Mutat Res* 11:107-23, 1971
20. KOZAK LP, JENSEN JT: Genetic and developmental control of multiple forms of L-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 249:7775-81, 1974
21. SIEGENBEEK VON HEUKELOM LH, BOOM A, BARTSTRA HA, STAAL GEJ: Characterization of adenosine deaminase isozymes from normal human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 72:109-15, 1976
22. VANBIERVIET JPGM, VAN MILLIGEN-BOERSMA L, STAAL GEJ: A new variant of glucose-phosphate isomerase deficiency (GPI-Utrecht). *Clin Chim Acta* 65:157-65, 1975
23. THORIG GEW, SCHOONE AA, SCHARLOO W: Variation between electrophoretically identical alleles at the alcohol dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Genet* 13:721-31, 1975
24. SINGH RS, HUBBY JL, LEWONTIN RC: Molecular heterosis for heat-sensitive enzyme alleles. *Proc Natl Acad Sci USA* 71:1808-10, 1974
25. SINGH RS, HUBBY JL, THROCKMORTON LH: The study of genic variation by electrophoretic and heat denaturation techniques of the octanal dehydrogenase locus in members of the *Drosophila virilis* group. *Genetics* 80:637-50, 1975
26. BURTIS CA, JOHNSON WF, MAILEN JC, OVERTON JB, TIFFANY TO, WATSKY MB: Development of an analytical system around a miniature fast analyzer. *Clin Chem* 19:895-903, 1973
27. BERNSTEIN SC, THROCKMORTON LH, HUBBY JL: Still more genetic variation in natural populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3928-31, 1973
28. McDOWELL RE, PRAKASH S: Allelic heterogeneity within allozymes separated by electrophoresis in *Drosophila pseudobscura*. *Proc Natl Acad Sci USA* 73:4150-3, 1976
29. NEEL JV, SCHULL WJ: The Effect of Exposure to the Atomic Bombs on Pregnancy Termination in Hiroshima and Nagasaki. NAS-NRC Publication No. 461, 1956. pp xvi and 241
30. NEEL JV: Changing Perspectives on the Genetic Effects of Radiation. Springfield, C.C. Thomas, 1963. pp viii and 97
31. SCHULL WJ, NEEL JV, HASHIZUME A: Some further observations on the sex ratio among infants born to survivors of the atomic bombings of Hiroshima and Nagasaki. *Am J Hum Genet* 18:328-38, 1966 (ABCC TR 13-65)

32. NEEL JV, KATO H, SCHULL WJ: Mortality in the children of atomic bomb survivors and controls. *Genetics* 76:311-26, 1974
33. AWA AA, BLOOM AD, YOSHIDA MC, NERIISHI S, ARCHER PG: A cytogenetic survey of the offspring of atomic bomb survivors. *Nature* 218:367-8, 1968 (ABCC TR 6-68)
34. AWA AA, NERIISHI S, HONDA T, SOFUNI T, HAMILTON HB: A cytogenetic survey of the offspring of A-bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *Excerpta Medical International Congress Series No. 297, 4th International Conference on Birth Defects, Vienna, Austria, 2-8 September 1973.* p 92
35. AWA AA: Review of thirty years of study of Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivors. II. Biological effects B. Genetic effects: 2. Cytogenetic study. *J Radiat Res (Tokyo)* 16 (Suppl): 78-81, 1975
36. FERRELL RE, UEDA N, SATOH C, TANIS RJ, NEEL JV, HAMILTON HB, INAMIZU T, BABA K: The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. I. Albumin, ceruloplasmin, haptoglobin, and transferrin. *Ann Hum Genet* 40:407-18, 1977 (RERF TR 3-76)
37. UEDA N, SATOH C, TANIS RJ, FERRELL RE, KISHIMOTO S, NEEL JV, HAMILTON HB, BABA K: The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. II. Carbonic anhydrase I and II, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase, nucleoside phosphorylase, triose phosphate isomerase, hemoglobin A and hemoglobin A<sub>2</sub>. *Ann Hum Genet* 41:43-52, 1977 (RERF TR 4-76)
38. SATOH C, FERRELL RE, TANIS RJ, UEDA N, KISHIMOTO S, NEEL JV, HAMILTON HB, BABA K: The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. III. Phosphoglucomutase-1, phosphoglucomutase-2, 6-phosphogluconate dehydrogenase, adenylate kinase, and adenosine deaminase. *Ann Hum Genet* 41:169-84, 1977 (RERF TR 5-76)
39. TANIS RJ, UEDA N, SATOH C, FERRELL RE, KISHIMOTO S, NEEL JV, HAMILTON HB, OHNO N: The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. IV. Acid phosphatase, NADP-isocitrate dehydrogenase, peptidase A, peptidase B and phosphohexose isomerase. *Ann Hum Genet* 41:419-28, 1978 (RERF TR 6-76)
40. NEEL JV, UEDA N, SATOH C, FERRELL RE, TANIS RJ, HAMILTON HB: The frequency in Japanese of genetic variants of 22 proteins. V. Summary and comparison with data on Caucasians from the British Isles. *Ann Hum Genet* 41:429-40, 1978 (RERF TR 7-76)
41. RERF: Research plan for RERF studies of the potential genetic effects of atomic radiation, Hiroshima and Nagasaki. RERF RP 4-75
42. NEEL JV: Developments in monitoring human populations for mutation rates. *Mutat Res* 26:319-28, 1974
43. NEEL JV: Monitoring for genetic effects in man. In *Report of Study Group on Environmental Monitoring: Analytical Studies for the U.S. Environmental Protection Agency.* NAS-NRC Report, Appendix A., 1977. pp 133-48