

FREQUENCY AMONG JAPANESE OF HETEROZYGOTES FOR DEFICIENCY
VARIANTS OF 11 ENZYMES

11種の赤血球酵素において活性減少変異型を示した
ヘテロ接合体の日本人における頻度

CHIYOKO SATOH, Ph.D. 佐藤千代子

JAMES V. NEEL, Ph.D., M.D., Sc.D.

AKIKO YAMASHITA 山下昭子

KAZUAKI GORIKI, M.D. 郷力和明

MIKIO FUJITA, M.D. 藤田幹雄

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

ACKNOWLEDGMENT

謝 辞

We are grateful to Ms. Chiemi Kawamoto, Ms. Hiroko Arakawa and Mr. Hideo Omine for their technical work throughout this study. We thank Dr. Norio Takahashi for his help in electrophoretic examination of pyruvate kinase variants. The participation of Dr. James V. Neel was supported by US Department of Energy Contract ACO-2-76-EVO2828.

この研究中技術的作業をしていただいた川本知恵美, 荒川裕子, 大峰秀夫の各氏に謝意を表す。ピルビン酸キナーゼ変異型の電気泳動法に御援助いただいた高橋規郎研究員に深謝する。米国エネルギー省契約書 ACO-2-76-EVO 2828に基づいて James V. Neel 博士に参加していただいた。

A paper based on this report was published in the following journal:

本報告書は次の雑誌に掲載された。
Am J Hum Genet 35:656-74, 1983

RERF TECHNICAL REPORT SERIES

放射線影響報告書集

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 not intended to supplant regular journal publication.

放射線影響報告書は、日米研究職員、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もので、その経費は日米両政府の平等分担により、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運営されている。

FREQUENCY AMONG JAPANESE OF HETEROZYGOTES FOR DEFICIENCY
 VARIANTS OF 11 ENZYMES

 11種の赤血球酵素において活性減少変異型を示した
 ヘテロ接合体の日本人における頻度

 CHIYOKO SATOH, Ph.D. (佐藤千代子); JAMES V. NEEL, Ph.D., MD., Sc.D.*;
 AKIKO YAMASHITA (山下昭子); KAZUAKI GORIKI, M.D. (郷力和明);
 MIKIO FUJITA, M.D. (藤田幹雄); HOWARD B. HAMILTON, M.D.

 Department of Clinical Laboratories
 臨床検査部

SUMMARY

The 11 human enzymes chosen for this study because of relatively small coefficients of variation for mean activity have been surveyed for the frequency with which activities $\leq 66\%$ of the mean value occur. This criterion should detect almost all heterozygotes with variants lacking any activity plus a fraction of the persons with variants characterized by markedly depressed activity and/or instability. The enzymes surveyed are TPI, PGK, AK1, LDH, GAPD, GPI, PK, 6PGD, G6PD, GOT1, and HK. The number of determinations per enzyme ranged from 310 to 3,173, for a total of 26,634 determinations. Family studies have thus far been possible in 52 instances in which the initial observation of activity $\leq 66\%$ of normal was confirmed. In every instance, a parent exhibited a similar finding, giving confidence that a true genetic entity was being detected. With this approach the frequency of heterozygotes per 1,000 determinations varied from 0.0 (AK1, 6PGD) to 13.8 (PK), with an average of 2.4. For these same systems in this laboratory the frequency of "rare" electrophoretic variants is 2.3/1,000, the ratio of the latter to the former thus being 1.0 in Japanese. Experience with these deficiency phenotypes to date suggests that for selected enzymes such phenotypes can be incorporated into a program designed to detect mutational events.

要約

平均活性値に対する変動係数が比較的小さいことを考慮して選ばれた11種のヒト赤血球酵素について活性を測定し、それぞれの酵素の平均活性値の66%以下を示す検体の頻度を調べた。この判定基準によると、活性の全く無い変異型のヘテロ接合体のほとんどすべてと、活性が極度に減少したり、極度に不安定な変異型酵素をもった人の一部を検出することができる。検査した酵素は、TPI, PGK, AK1, LDH, GAPD, GPI, PK, 6PGD, G6PD, GOT1, HKであった。検査数は酵素によって310例から3,173例と異なり、総合計検査数は、26,634例であった。今までに活性が正常値の66%以下を示した52人については、家族調査を行うことができたが、その全例で活性減少が確認された。いずれの例でも子供と同様の酵素活性の減少が片親に観察され、遺伝的形質であることが明らかになった。この検査法で検出された活性減少変異型をヘテロ接合体でもつ人の頻度は、1,000検査数当たり平均2.4であるが、その値は酵素ごとに異なり0.0 (AK1, 6PGD) から13.8 (PK) にわたっていた。活性測定が行われたものと同じ酵素について、我々の研究室で得た電気泳動上のまれな変異型の頻度は、2.3/1,000である。したがって、我々の検査した日本人集団では、電気泳動上の変異型の頻度の、活性減少変異型の頻度に対する比率は1.0である。活性減少変異型について今日まで我々の得た経験に照らすと、酵素を選ぶなら活性減少変異型も、突然変異検出のためのプログラムに利用することが可能であると言えるであろう。

*Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School
 Michigan 大学医学部人類遺伝学部

INTRODUCTION

Since 1946, a variety of approaches to evaluating the potential genetic effects of the atomic bombs have been pursued at ABCC and RERF. At first, the studies were primarily morphological,¹ more recently, the emphasis has shifted to cytological² and biochemical studies.³ The biochemical studies initially relied on electrophoretic techniques, but in 1979, following a strategy developed in pilot studies at the University of Michigan,^{4,5} the biochemical studies were expanded to incorporate the use of a centrifugal fast analyzer, in a search for mutations resulting in marked loss of activity in a battery of 11 selected enzymes. The rationale for this innovation was provided by the numerous demonstrations that the human 'inborn errors' of metabolism, presumably mutationally derived, are, when appropriately studied, usually found due to marked enzyme deficiencies.⁶ More recently, there is direct evidence from *Drosophila* that the majority of spontaneous and induced mutations are accompanied by loss or inactivity of gene product,⁷⁻⁹ and similar evidence from the mouse regarding induced mutations.¹⁰⁻¹²

The data resulting from this new facet of the program should not only in time result in a substantial contribution to our understanding of the genetic effects of the A-bombs, but also to our knowledge of the frequency of a type of variation concerning which there is at present relatively little direct evidence. This communication deals with the latter aspect of these studies. Data on the results of 26,634 determinations distributed over 11 enzymes will be presented, and since there is to date no evidence in these studies for mutation resulting in a severe enzyme deficiency, the findings in the children of parents proximally exposed to the A-bombs will be combined with the findings in the children of distally or nonexposed parents.

MATERIALS AND METHODS

Sample Description

The blood samples processed for these studies were obtained from children of proximally exposed (<2,000 m) A-bomb survivors and from children of a matched group of parents, one or both of whom were distally exposed (2,500+m). These same samples were examined for electrophoretic variants of 30 different proteins (and possible mutations resulting in such variants); a more detailed description of the two groups of

緒言

ABCC-放影研は1946年以來、種々の方法で原爆による潜在的な遺伝的影響の研究を行ってきた。初期においては主に形態学的研究¹を行っていたが、近年では細胞学的研究²及び生化学的研究³の方に重点が移された。初期の生化学的研究は電気泳動法に依存していたが、Michigan大学での試験的調査^{4,5}で新しい方法が開発されたのに伴い、1979年には、選ばれた11種の酵素に著しい活性減少を引き起こすような突然変異を発見すべく、高速遠心分析機を併用するまでに拡大された。このような技術革新が行われたのは、突然変異により引き起こされると思われるヒトの先天性代謝病は、通常は、適切な研究を行うならば、顕著な酵素活性減少が原因となって発見されるということが多くの例で認められたためである。⁶最近ではショウジョウバエの研究で、自然突然変異及び誘発性突然変異のほとんどは遺伝子産物の欠損又は不活性化を伴うという直接的な証拠があり、⁷⁻⁹ マウスでも誘発性突然変異に関して同様の証拠がある。¹⁰⁻¹²

調査プログラムのこの新しい局面から得られる資料は、原爆の遺伝的影響を理解する上で将来実質的に役立つだけでなく、現在直接的な証拠が比較的乏しい変異型の頻度を知る上でも役立つであろう。本報はこれらの研究の後者の側面を論ずるもので、11種の酵素に対して行われた26,634件の検査結果について述べる。現在までの研究では、酵素活性を極度に減少させるような突然変異の証拠がないので、近距離被爆者の子供から得られた所見と遠距離被爆者又は非被爆者の子供から得られた所見とをまとめて扱う。

材料及び方法

標本

今回の研究のために使用された血液標本は、近距離(<2,000 m)原爆被爆者の子供及び、対照群である遠距離(2,500 m+)で被爆した片親又は両親をもつ子供から得られた。同じ標本を用いて、30種の蛋白質の電気泳動上の変異型(及びこのような変異型を引き起こす突然変異)も調べた。これら二つの子供の群についてはNeelら³及びSchullら¹³の論文に更に

children will be found in Neel et al.³ and Schull et al.¹³ About 40% of the sample is composed of sibling duos, trios, etc.

Technical Procedures

The procedures to be described reflect the demands of a program screening a large number of samples for genetic variants of a series of erythrocytic enzymes, as contrasted with a program characterizing in detail a single enzyme. In particular, we note that the vagaries of sample collection in a program of this type^{3,14} are not consonant with the immediate processing and analysis of samples as they are acquired.

Sample Preparation. Venous samples were mixed with formula A ACD solution in the ratio of 7:1.¹⁵ Samples were stored at 4°C for 1-4 days before centrifugation at 1,200 × g for 20 minutes. The plasma and buffy coats were then removed and the packed cells resuspended in an equal volume of 0.154 M NaCl solution. The suspension was again centrifuged for five minutes at 1,200 × g, the supernatant removed, and the washing procedure repeated once. To remove any remaining contaminating leukocytes, 1 ml of packed erythrocytes was then mixed with an equal volume of 0.154 M NaCl and the suspension applied to a 2 ml volume column composed of equal parts of α-cellulose and Sigmacell (R) type 50.¹⁵ The column was washed with 10 ml 0.154 M NaCl, effluent and washing collected, and centrifuged again for 20 minutes at 1,200 × g, to yield the final sample. Cell counts at this point with the Technicon Hemalog 8/90 usually revealed less than 100 leukocytes per 10⁶ erythrocytes. Depending on the laboratory schedule, the samples were either subjected to immediate analysis or stored in liquid nitrogen (LN₂). If immediate analysis was planned (fresh (FR) samples in Tables 4 and 5), 150 μl of packed cells were mixed with 2.85 ml of β-mercaptoethanol (0.7 mM)/EDTA (2.7 mM) stabilizing solution (pH 7.0) and the suspension frozen in a dry ice-acetone mixture, thawed in tap water, and kept on ice until just prior to analysis. If the activity analyses were planned for later, the cells were stored in 150 μl aliquots in LN₂ until use, (the nitrogen preserved (NP) samples of Tables 4 and 5), then processed as described above. In view of the findings, it should be noted that the venous blood samples were usually held for fewer days if they were being preserved in LN₂ than if they were to be

詳しく述べられている。標本の約40%は2人又は3人の同胞が占めている。

検査方法

このプログラムは一つの酵素の形質を詳しく解明するためのものではなく、一連の赤血球酵素の遺伝的変異型を発見するために多数の標本をスクリーニングするためのものなので、それに必要な検査法を行った。特に、この種のプログラムにおける標本収集のあり方^{3,14}は、標本を入手直後に処理し、分析するやり方とは異なることを注意しておきたい。

標本の調製. 静脈血標本とA処方ACD溶液とを7:1の割合で混合した。¹⁵ それを4°Cで1~4日間保存し、1,200×gで20分間遠心分離した。血漿及びパフィーコート(白血球成分)を除き、赤血球層を等量の0.154 MのNaCl溶液に再懸濁した。その懸濁液を再び1,200×gで5分間遠心分離し、上澄み液を除去し、もう一回洗浄した。残留している白血球を除去するため、赤血球層1mlを等量の0.154 MのNaClと混合し、この懸濁液をα-セルロース及びシグマセル(R)型50のそれぞれ等量から成る2mlのカラムに加えた。¹⁵ このカラムを0.154 M NaCl 10mlで洗浄し、流出液及び洗浄液を集め、再び1,200×gで20分間遠心分離し、最終標本を得た。この時点におけるTechnicon Hemalog 8/90による細胞計数では、通常赤血球10⁶個につき白血球は100個未満であった。検査の実施予定により、標本は直ちに分析されるかあるいは液体窒素(LN₂)中に保存された。直ちに分析する場合(表4及び5中の新鮮(FR)標本)には、赤血球層150 μlをβ-メルカプトエタノール(0.7 mM)/EDTA(2.7 mM)から成る安定化溶液(pH 7.0)2.85 mlと混合し、懸濁液はドライアイスとアセトンとを混合した中で凍結させ、水道水で融解し、分析の寸前まで氷の中に静置した。後日活性測定を行う場合には、細胞を150 μlずつ、使用に供するまで液体窒素中に保存しておき(表4及び5中の窒素保存(NP)標本)、上述の要領で溶血液を調製した。測定所見から見ると、通常、液体窒素中に保存した標本の方が、即時分析用の標本よりも、静脈血液標本として(4°Cでの)保存期間が短いことが注目される。

subjected to immediate analysis. Towards the latter part of this study, it was customary to store all samples in LN₂ prior to analysis.

Biochemical Procedures. Our procedures in general followed the recommendations of Beutler¹⁵ and the International Committee for Standardization in Hematology (ICSH).¹⁶ A 36-cuvette centrifugal fast analyzer (Aminco Rotochem II a/36) was used for determining the activities of the 11 enzymes and hemoglobin (Hb) concentration, the former at a light source wavelength of 340 nm and the latter at 540 nm. Determinations were made at 30°C. The analyzer programs were basically those developed for a miniature centrifugal fast analyzer in the Michigan program.⁴ The 11 enzymes were:

この研究の後半においては、分析前に標本をすべて液体窒素中に保存することが慣例となった。

生化学的方法。我々が用いた方法はおおむね Beutler¹⁵ 及び国際標準血液学委員会 (ICSH)¹⁶ の推奨するところに従った。36キュベットの高速遠心分析機 (Aminco Rotochem II a/36) を用いて、11種の酵素の活性及びヘモグロビン (Hb) 濃度を測定したが、光源波長は前者の測定には340 nmを、後者の測定には540 nmを用いた。測定はそれぞれ30°Cで行った。遠心分析機にセットされた測定プログラムは、基本的には Michigan プログラムで小型高速遠心分析機のために開発されたものである。⁴ 11種の酵素は以下のとおりである。

1) triose phosphate isomerase (TPI) トリオースホスフェートイソメラーゼ (TPI)	EC 5.3.1.1
2) phosphoglycerate kinase (PGK) ホスホグリセレートキナーゼ (PGK)	EC 2.7.2.3
3) adenylate kinase 1 (AK1) アデニレートキナーゼ1 (AK1)	EC 2.7.4.3
4) lactate dehydrogenase (LDH) 乳酸脱水素酵素 (LDH)	EC 1.1.1.27
5) glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPD) グリセルアルデヒド-燐酸脱水素酵素 (GAPD)	EC 1.2.1.12
6) glucose phosphate isomerase (GPI) グルコース-燐酸イソメラーゼ (GPI)	EC 5.3.1.9
7) pyruvate kinase (PK) ピルビン酸キナーゼ (PK)	EC 2.7.1.40
8) 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 (6PGD)	EC 1.1.1.44
9) glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) グルコース-6-燐酸脱水素酵素 (G6PD)	EC 1.1.1.49
10) glutamate-oxaloacetate transaminase 1 (GOT1) グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ1 (GOT1)	EC 2.6.1.1
11) hexokinase (HK) ヘキソキナーゼ (HK)	EC 2.7.1.1

LDH is a tetramer, 80% of whose activity is contributed by the B subunit. Any variant detected would involve that unit; because of the nature of the enzyme, an estimate of variant frequency is minimal. For the GOT1 assay, pyridoxal phosphate was always added to the sample, in a concentration of 0.02 mM.

LDH は四量体で、その活性の80%はBサブユニットに由来する。検出される変異型はいずれもBサブユニットの変異型であると思われる。酵素にこのような特質があるため変異型の頻度の推定値は最小の値である。GOT1 アッセイにおいては常に濃度0.02 mMのピリドキサル燐酸を標本に添加した。

A 1:20 dilution of the above-described hemolysate was used for the estimation of Hb and all enzyme activity measurements except TPI and GAPD. For the latter two, 1:800 and 1:200 dilutions were employed, respectively. For the Hb determination, 10 μ l of hemolysate was diluted with 90 μ l of water and 400 μ l of the ferricyanide-cyanide reagent of Matsubara.¹⁷ The volume of hemolysate used in the enzyme assays varied between 5 μ l and 30 μ l. Each assay entailed between 10 and 30 readings in the course of the determination. All determinations were in duplicate unless otherwise noted. Enzyme preparations and substrates were purchased from Boehringer Mannheim and other chemicals were of analytical or reagent grade.

Hb standards against which the results of all routine enzyme determinations are to be adjusted were prepared from time to time from a mixture of one part of packed erythrocytes thrice-washed with 0.154 M NaCl solution and three parts of the β -mercaptoethanol-EDTA stabilizing solution. This mixture was frozen and thawed and then freed of cell debris by centrifugation for one hour at 49,000 \times g. The Hb concentration of the mixture was determined at 540 nm with the cyanmethemoglobin method recommended by ICSH,¹⁸ employing the ferricyanide-cyanide reagent of Matsubara¹⁷ and a Gilford 250 spectrophotometer. The hemolysates, averaging approximately 7 g Hb/100 ml, were stored in aliquots of 0.5 ml in LN₂ until used. Enzyme activities were converted to international units (IU) per gram of Hb standard.

Sources of Extraneous Variation. The extent to which random and/or technical factors might influence the results was investigated in five different ways.

1. As noted earlier, determinations were in duplicate. The coefficient of variation (CV, standard deviation expressed as percentage of mean) for duplicate determinations (same rotor) of the 11 enzymes in 22 persons varied from 0.58 ± 0.52 for LDH to 1.59 ± 0.96 for HK.

TPI と GAPD 以外のすべての酵素活性の測定とヘモグロビンの測定には、上述の20倍に希釈した溶血液を用いた。TPIについては800倍に希釈したものを、GAPDについては200倍に希釈したものを、ヘモグロビンの測定の場合は、溶血液10 μ lを90 μ lの水と松原¹⁷のフェリシアニド-シアン化物試薬400 μ lで希釈した。酵素アッセイに用いた溶血液の量は最少5 μ lから最大30 μ lまでであった。各アッセイにおける測定回数は10~30回であった。特に書いてない場合は、測定はすべて2回ずつ行った。酵素及び基質はBoehringer Mannheimから購入し、その他の化学薬品の純度は分析用又は試薬用のものを用いた。

通常検査として行われるすべての酵素活性測定の結果を補正する基準となるヘモグロビン標準液は、0.154 M NaCl 溶液で3回洗浄した赤血球層1部に対し β -メルカプトエタノール-EDTA 安定化溶液3部の混合液から随時作成した。この混合液を凍結した後、融解し、49,000 \times gで1時間遠心分離して細胞片を除去した。混合液のヘモグロビン濃度は、国際標準血液学委員会が推奨するシアンメトヘモグロビン法¹⁸に基づき、松原¹⁷のフェリシアニド-シアン化物試薬及びGilford 250分光光度計を用いて540nmで測定した。平均約7g Hb/100 mlの溶血液は、0.5 ml ずつ分注して、使用するまで液体窒素中に保存した。酵素活性は標準ヘモグロビン1g 当たりの国際単位 (IU) に変換した。

外因性の変動。 5通りの方法で、無作為ないし技法上の要因がどの程度結果に影響を及ぼすかを調べた。

1. 既述のように、測定は2回行った。11種の酵素について22人分を2回測定(同じローターによる)したときの変動係数(CV, 標準偏差を平均値に対する百分率として表した値)はLDHの 0.58 ± 0.52 からHKの 1.59 ± 0.96 までの差異が見られた。

2. Machine reproducibility was determined for Hb and each of the 11 enzymes by four runs, each involving 10 separate determinations of the same enzyme per cuvette head, all four runs on the same day. The results, shown in Table 1, are considered excellent, except for GAPD.

2. ヘモグロビンと11種の酵素それぞれについて、4回測定を行い、機械の再現性を測定した。4回の測定はすべて同じ日に行い、1回の測定には、1キュベットヘッドにつき同一標本を10個のキュベットに分注し同一酵素について測定した。結果を表1に示すが、GAPD以外は優れたものと思われる。

TABLE 1 ANALYSIS OF THE WITHIN (n=10) AND BETWEEN RUN VARIATIONS FOR ENZYME ACTIVITY FOR THE 11 ENZYMES INCLUDED IN THIS STUDY

表1 この研究で用いた11種の酵素の活性の同一測定時(n=10)及び測定間の変動解析

System		Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Mean of 4 runs
TPI	Mean	27648	27431	27483	27694	27564
	IU/1 SD	240	222	270	211	128
PGK	Mean	3134	3137	3094	3114	3120
	IU/1 SD	18	28	22	16	20
AK1	Mean	2122	2092	2139	2106	2115
	IU/1 SD	18	26	28	12	20
LDH	Mean	1671	1633	1685	1654	1661
	IU/1 SD	8	8	14	10	22
GAPD	Mean	1616	1585	1758	1708	1667
	IU/1 SD	217	111	110	84	80
GPI	Mean	448	449	458	456	453
	IU/1 SD	3	8	2	4	5
PK	Mean	123.7	121.6	122.0	119.8	121.8
	IU/1 SD	1.3	1.0	0.9	0.9	1.6
6PGD	Mean	78.9	78.3	76.8	77.2	77.8
	IU/1 SD	0.3	0.4	0.2	0.3	1.0
G6PD	Mean	52.4	51.3	49.2	49.7	50.7
	IU/1 SD	0.4	0.3	0.9	0.5	1.5
GOT1	Mean	64.7	63.3	63.5	64.9	64.1
	IU/1 SD	1.4	1.5	1.1	1.0	0.8
HK	Mean	11.5	11.8	11.9	11.8	11.7
	IU/1 SD	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2
Hb	Mean	1.332	1.334	1.334	1.326	1.332
	g/100 ml SD	0.003	0.006	0.003	0.004	0.004

For each enzyme, all determinations are based on the same blood samples. For details see text.

各々の酵素につき、測定はすべて同一血液標本を用いて行った。詳しくは本文参照のこと。

3. Laboratory day-to-day differences were studied by determining in duplicate the activities of the 11 enzymes in 22 persons on two separate occasions within a 3-day interval, the hemolysates for the two sets of determinations being prepared from different NP samples. Reagents were freshly prepared for each occasion. The results, shown in Table 2, were within acceptable limits.

3. 11種の酵素22人分について、その活性を3日間以内の間隔をおいて、2回に分けて測定することによって、実験の日差変動を調べた。2セットの測定で用いる溶血液は異なる窒素保存標本から作成した。試薬は測定ごとに新しく作成した。結果を表2に示すが、許容範囲内であった。

TABLE 2 RESULTS OF DETERMINING THE ACTIVITIES OF THE 11 ENZYMES OF THIS STUDY IN 22 PERSONS ON TWO SEPARATE OCCASIONS

表2 この研究で用いた11種の酵素について22人分を2回測定した結果

Enzyme	Run 1		Run 2		Run 2/Run 1 × 100
	Mean	SD	Mean	SD	
	IU/g Hb	IU/g Hb	IU/g Hb	IU/g Hb	
TPI	2331.40	193.12	2303.85	179.68	99%
PGK	272.62	10.45	266.78	12.18	98
AK1	207.70	12.69	193.44	11.64	93
LDH	177.77	16.75	173.13	16.65	97
GAPD	168.97	22.75	165.65	22.32	98
GPI	55.00	5.65	54.65	5.98	99
PK	9.82	1.16	9.71	1.41	99
6PGD	6.04	0.43	6.04	0.41	100
G6PD	6.47	0.58	6.55	0.53	101
GOT1	4.66	0.56	4.57	0.62	98
HK	0.944	0.078	0.986	0.069	104

Hemolysates for analysis and the reagents were freshly prepared each day. All determinations were in duplicate.

解析に用いた溶血液及び試薬は毎日新しく調製した。1人1回の測定につきすべて2本ずつ検体を測定した。

4. The effect of holding 19 whole blood samples at 4°C for some days prior to processing is shown in Table 3. Means are based on duplicate determinations on the same rotor of each enzyme sample. Not unexpectedly, over a 7-day period there was in general a loss of enzyme activity, especially marked in

4. 19人分の全血液標本を調製前に4°Cで数日間保存した影響を表3に示す。平均値は、それぞれの酵素活性を19人について同一ローターでそれぞれ2回測定した値に基づく。予想に反せず、7日間で酵素活性は概して減少し、特にHKとGOT1についてはそれが著しかった。

TABLE 3 EFFECT ON ACTIVITY (IU/gHb) FOR NINE ENZYMES OF STORAGE OF WHOLE BLOOD AT 4°C BEFORE PROCESSING AND EFFECT OF HOLDING ERYTHROCYTES IN LIQUID NITROGEN BEFORE PROCESSING (n=19)

表3 調製前に全血を4°Cで保存したこと及び赤血球のみを液体窒素中に保存したこと(n=19)の、9種の酵素の活性(IU/gHb)に与える効果

Enzyme		4°C				In Liquid Nitrogen			
		Day 1	Day 3	Day 5	Day 8	Month 1	Month 3	Month 6	Month 15
PGK	Mean	248.54	235.37	230.49	232.42	259.82	258.78	259.57	246.67
	SD	13.37	9.57	11.89	12.06	9.96	11.02	11.02	9.92
AK1	Mean	151.73	168.69	166.77	163.32	188.92	196.66	204.11	192.81
	SD	20.72	14.81	12.98	14.99	16.87	15.71	16.32	14.12
LDH	Mean	163.01	153.45	148.24	145.75	175.66	167.05	174.18	152.47
	SD	8.05	7.00	8.19	9.01	8.36	8.32	8.20	7.34
GPI	Mean	49.32	45.47	45.59	45.01	51.23	50.11	51.61	48.82
	SD	4.03	3.36	3.57	4.12	4.12	3.74	3.74	3.60
PK	Mean	6.26	6.86	6.74	6.24	7.02	8.51	8.53	7.77
	SD	1.04	1.38	1.37	0.95	1.15	1.34	1.40	1.31
6PGD	Mean	5.57	5.33	5.23	4.82	5.68	5.66	5.86	5.56
	SD	0.65	0.60	0.66	0.57	0.59	0.54	0.61	0.57
G6PD	Mean	5.30	5.64	5.26	5.26	5.54	5.72	5.79	5.82
	SD	0.65	0.60	0.65	0.71	0.57	0.63	0.57	0.45
GOT1	Mean	4.33	4.14	3.44	3.14	4.21	4.14	4.35	4.51
	SD	0.56	0.59	0.66	0.61	0.59	0.52	0.45	0.49
HK	Mean	0.854	0.755	0.739	0.570	0.759	0.860	0.883	0.908
	SD	0.103	0.104	0.117	0.087	0.082	0.085	0.094	0.090

the case of HK and GOT1. However, AK1 showed higher values with storage over this time span. These findings resulted in the decision to hold no samples more than four days before processing. We also show in Table 3 the enzyme activities of these 19 persons on the basis of samples processed the day they were drawn and then studied after either 1, 3, 6, or 15 months of storage in LN₂. There was no change with storage, with the possible exceptions of PGK and LDH. It will be noted when the results are presented later that the values obtained from FR samples tend to be lower than those obtained from LN₂ samples. This fact, due to the somewhat shorter average holding period for samples being processed for temporary storage in LN₂ before study, became apparent early in the program and, given the way abnormality is defined, necessitated separate standards for the two types of processing.

しかし、この間、AK1はこの保存期間中より高い活性値を示した。これらの結果に鑑みて、赤血球層の分離、洗浄の前に4日間以上標本を保存しないことが決定された。表3にはまた、採血当日に赤血球層を分離、洗浄し、液体窒素中に1, 3, 6又は15か月間保存した後に測定したこれら19人の酵素活性も表示した。PGK及びLDHを除けば、保存による変化は認められなかった。本論文の後半に記した測定結果を見ると、新鮮標本の活性値は液体窒素保存標本の活性値よりも低い傾向にあることが注目されよう。活性測定前に、一時的に液体窒素中に保存した標本においては、全血液のままで保存した期間が新鮮標本よりも平均して幾分短かったためにこのような結果となったのだということは、プログラムの初期の段階で明らかになり、異常を定義する際、2通りの検体調製法のそれぞれに別の基準が必要となった。

5. Finally, month-to-month variation of a systematic nature (i.e., drift in the procedures) has been considered. This includes the effect of changing reagents as a particular lot is exhausted, and is the largest source of non-biological variation in the study. Although a preliminary decision as to the occurrence of a variant was made on the basis of the daily mean, a final decision was based on cumulative findings, so that this nonbiological variation is incorporated into the calculation of the mean and standard deviation used in defining abnormality.

Operating Rules. The foregoing suggests that under proper circumstances technical factors should not be a major source of error in the detection of variants as we will define them. However, in order to minimize the contribution of technical error or extraneous biological factors to observed variations, and hence to ensure the more accurate detection of genetic variation, a set of operating rules was adopted.

1. If the results of the duplicate determinations did not agree within 5%, that determination was repeated.

2. When for any single sample the activity values of four or more of the enzymes were 20% above or below the values for that day, the results of all the determinations on this sample were discarded, on the suspicion of hematologic abnormality or sample deterioration.

3. Daily means and standard deviations were calculated for each type of enzyme determination, to monitor the procedures. Any single value found to be 35% above or below the daily mean was excluded from the calculation and the mean recalculated, but the variant value was of course retained in the data.

4. If the daily mean for any single set of enzyme determinations was above or below

5. 最後に、系統的性質をもつ月差変動（つまり検査方法の変化）を考慮した。これには特定のロットの試薬を使い終わり、試薬を取り替えたための影響が含まれるが、これはこの研究において非生物学的変動要因としては最大のものである。変異型であるか否かは、日ごとの平均値に基づいて予備決定をしたが、最終決定は累積平均値に基づいて行ったので、この非生物学的変動は、異常の定義に用いた平均値と標準偏差にも含まれている。

作業規則。 以上の実験結果及び考慮から、適切な条件下では、実験技術上の要因は、我々の定義による変異型の発見においては主要な誤差源ではないことが示唆される。しかしながら、観察された変動に対する実験技術上の要因又は外因性の生物学的要因の寄与を最小限にし、遺伝的変異をより正確に検出するために、作業規則を設けた。

1. 2回の測定結果が5%の範囲内で一致しなかった場合は、測定を繰り返した。

2. どの標本についても、4種以上の酵素の活性値がその日の平均値を20%上回るか又は下回る場合は、血液学上の異常又は標本の変質が疑われるので、その標本の測定結果はすべて廃棄した。

3. 酵素活性測定の種類（液体窒素保存標本、新鮮標本）別に、日平均値及び標準偏差を計算して、検査方法をチェックした。日平均値を35%上回るか又は下回る値はすべて計算から除外し、日平均値を計算し直したが、当然その異常値はデータとして残しておいた。

4. 活性測定を行った酵素のうちどの一つでも日平均値が1標準偏差以上累積平均値を上回るか又は下回る場合は、コントロールされない技法上

the cumulative mean by one standard deviation, determinations on that enzyme system for that day were discarded, on the grounds of uncontrolled technical factors.

Definition of a Deficiency Variant

General Considerations. The primary objective of this study was to provide an estimate of the frequency of heterozygotes for variants characterized by apparent absence of enzyme activity, for a series of human erythrocytic enzymes selected on the basis of suitability for such studies (i.e., selected with no reference to the probable frequency of heterozygotes). Variants characterized by no activity may either be characterized by the presence of mutationally altered, inactive enzyme protein or by no protein at all. The latter are classically termed 'nulls,' but in practice it is often impossible to be certain one is dealing with a null (i.e., that no enzyme protein is present), and to avoid confusion we do not use the term. While, as noted above, the occurrence of such activity variants in human populations is well documented by case studies of persons with biochemical disorders or by chance findings in family studies, survey-type information on the frequency is still quite scant. Unfortunately, a truly rigorous estimate of their frequency in humans is not possible at present, but an approximation is feasible. On the assumptions that the activity measured is due to the gene products of alleles of a single locus and that there is no biochemical compensation, an individual heterozygous for a variant devoid of activity should exhibit 50% of the normal activity for the enzyme in question. The most favorable opportunity for detecting such variants is provided by enzymes with a CV <11%. On the assumption that the same CV (of <11%) should apply to the heterozygote, then essentially all individuals with two 'normal' alleles should exhibit values $\geq 67\%$ of the mean for such homozygotes, and heterozygotes for no-activity variants should exhibit values $\leq 66\%$ of normal. As shown in Table 4, 6 of the 11 enzymes under study clearly meet these specifications as regards the CV (TPI, PGK, AK1, LDH, GPI, and 6PGD), while two more are sufficiently close to the desired criteria (GAPD and G6PD) that, considering the conservative nature of the criteria, we will define a variant on the basis of a 66% cutoff point. Three enzymes (GOT1, HK, and PK) present a problem, to be discussed later.

の要因が考えられるので、その酵素のその日の測定値は廃棄した。

活性減少変異型の定義

一般的考察. この研究の主な目的は、この種の研究に好都合であるという理由で選択された(すなわち、ヘテロ接合体の頻度を考慮せずに選択された)一連のヒト赤血球酵素を用いて、明らかな酵素活性欠損という特徴をもつ変異型のヘテロ接合体の推定頻度を算出することであった。酵素活性の欠損という特徴をもつ変異型は、突然変異で変化した不活性な酵素蛋白質の存在が認められるものか、あるいは蛋白質が全く認められないものかのいずれかである。後者は以前から“null”と命名されているが、実際はそれがnull(つまり、酵素蛋白質が存在しない)であると確信することはしばしば不可能なので、混乱を避けるため、“null”という語は用いない。上述のように、ヒト集団におけるこの種の酵素活性変異型の存在に関する資料は、生化学的な異常をもつ人の症例研究や、家族調査で偶然発見されたものから十分得られるが、頻度に関して集団調査の形で得られた情報は依然乏しい。残念ながら、今のところヒトにおけるそれら変異型の頻度を真に正確に推定することはできないが、近以値を得ることはできる。測定した酵素活性は一つの遺伝子座の対立遺伝子の遺伝子産物によるものであり、生化学的補償がないと仮定すると、酵素活性欠損変異型に対しヘテロ接合体である人は、問題の酵素の正常活性値の50%を示すはずである。変動係数が11%未満の酵素はこの種の変異型を検出するのに最適である。同じ変動係数(11%未満)をヘテロ接合体に適用し得ると仮定すれば、“正常な”対立遺伝子を二つもつ人は、本質的にはすべての人が、この種(正常型)のホモ接合体である人の示す平均活性値の67%以上の値を示すはずであり、活性のない変異型に関してヘテロ接合体である人は正常値の66%以下を示すはずである。表4に示すように、研究対象である11種の酵素のうち6種類(TPI, PGK, AK1, LDH, GPI及び6PGD)は変動係数に関して明らかに上述の条件を満たす。また、他の2種の酵素(GAPD及びG6PD)は、望ましい基準値に十分近似しているので、基準値が控え目であることを考えて、66%を境界点として変異型を定義することにする。3種の酵素(GOT1, HK及びPK)には問題が残るので後に論ずる。

TABLE 4 ACTIVITY LEVELS (IU/gHb) FOR THE 11 ENZYMES, WITH REFERENCE TO MANNER OF PROCESSING, PERIOD OF STUDY, ENZYME PHENOTYPE, AND, FOR SEX-LINKED SYSTEMS, SEX

表4 調製方法, 研究時期, 酵素の表現型, 伴性遺伝の酵素については性別による11種の酵素の活性レベル (IU/gHb)

System	Electro-phoretic phenotype	Period I ¹⁾					Skewness ³⁾	Period II ²⁾					Skewness ³⁾
		Determinations	Mean ± SD	CV	Putative variants	Determinations		Mean ± SD	CV	Putative variants			
TPI	NR	1	0	-	-	-	-	310	2234 ± 217	9.7	1	*** (minus)	
PGK	FR	1-Male	313	252.9 ± 18.7	7.4	0	***	85	252.8 ± 13.8	5.5	0	*	
	FR	1-Female	346	255.3 ± 15.1	5.9	0	*	84	257.6 ± 15.9	6.2	0	**	
	NP	1-Male	246	258.2 ± 23.5	9.1	3	-	693	259.8 ± 15.0	5.8	0	***	
	NP	1-Female	285	264.3 ± 16.9	6.4	0	***	811	266.6 ± 15.6	5.9	0	***	
AK1	FR	1	632	175.3 ± 18.7	10.7	0	**	175	185.8 ± 18.0	9.7	0	-	
	NP	1	506	202.7 ± 18.9	9.3	0	-	1550	202.4 ± 16.9	8.4	0	***	
LDH	FR	N	883	160.0 ± 10.0	6.2	0	*	175	163.7 ± 11.4	7.0	0	***	
	NP	N	496	167.7 ± 11.5	6.9	1	-	1580	170.5 ± 12.8	7.5	1	***	
GAPD	FR		484	170.9 ± 19.6	11.5	3	***	0	-	-	-	-	
	NP		145	165.1 ± 18.4	11.2	0	***	0	-	-	-	-	
GPI ⁴⁾	FRA	1	276	45.9 ± 4.1	9.0	1	-	206	48.8 ± 4.7	9.6	1	** (minus)	
	FRB	1	459	34.0 ± 3.2	9.3	2	***						
	NP	1	491	34.8 ± 3.3	9.6	1	-						
PK	FR		776	7.2 ± 1.4	19.9	12	***	1611	51.5 ± 4.6	8.8	3	-	
	FR		776	7.2 ± 1.4	19.9	12	***	190	8.7 ± 1.4	16.0	3	-	
	NP		516	9.1 ± 1.8	19.3	13	***	1587	9.3 ± 1.7	17.8	25	***	
6PGD	FR	A	708	5.7 ± 0.4	7.6	0	-	166	5.8 ± 0.6	10.1	0	-	
	FR	AC	152	5.3 ± 0.4	8.2	0	-	26	5.2 ± 0.5	9.1	0	-	
	FR	C	13	4.9 ± 0.5	9.8	0	-	3	4.5 ± 0.4	8.3	0	-	
	NP	A	395	6.0 ± 0.4	7.3	0	***	1286	6.0 ± 0.5	8.4	0	***	
	NP	AC	100	5.6 ± 0.4	7.1	0	**	296	5.6 ± 0.5	8.4	0	***	
	NP	C	1	4.7		0		14	5.4 ± 0.6	11.6	0	**	
G6PD	FR	Male	355	5.3 ± 0.7	12.6	1	**	16	5.9 ± 0.8	13.6	0	-	
	FR	Female	380	5.3 ± 0.7	12.4	1	-	19	5.8 ± 0.6	10.0	0	-	
	NP	Male	70	5.8 ± 0.9	15.6	0	-	110	6.1 ± 0.6	9.5	0	-	
	NP	Female	99	5.8 ± 0.8	13.9	0	-	106	6.3 ± 0.7	11.2	1	-	

Continued 続く

TABLE 4 (Continue 続き)

System	Electro- phoretic phenotype	Period I ¹⁾					Skewness ³⁾	Period II ²⁾					Skewness ³⁾
		Determinations	Mean \pm SD	CV	Putative variants	Determinations		Mean \pm SD	CV	Putative variants			
GOT1	FR	1	839	4.0 \pm 0.7	16.5	8	***	201	4.6 \pm 0.7	15.6	3	**	
	FR	1-2	28	3.0 \pm 0.6	21.1	0	***	6	3.3 \pm 0.4	10.6	0		
	NP	1	512	4.4 \pm 0.7	16.7	8	**	1501	4.6 \pm 0.7	14.5	2	***	
	NP	1-2	8	3.7 \pm 0.5	13.6	0		50	3.7 \pm 0.5	13.1	0	-	
HK	FR	N	827	0.77 \pm 0.11	14.0	1	***	192	0.78 \pm 0.12	15.5	0	-	
	NP	N	492	0.88 \pm 0.11	12.9	0	***	1634	0.91 \pm 0.15	16.8	1	***	

Putative enzyme deficiency variants were identified by the criteria described in text. Results do not include the findings on individuals with rare electrophoretic variants.

酵素活性減少変異型と思われるものは本文に述べた基準で判断した。結果にはまれな電気泳動上の変異型をもつ人の所見は含まれていない。

1) Period I: An initial, 16-month period. 第I期: 最初の16か月間

2) Period II: A second, 15-month period. 第II期: 第I期に続く15か月間

3) Skewness: Skewness tests not performed when $n < 10$ 歪み: $n \leq 10$ の場合は歪みの検定はしなかった。

- nonsignificant 有意ではない。

* $0.01 < p < 0.05$

** $0.001 < p < 0.01$

*** $p < 0.001$

4) As described in the text, GPI data for FR-samples of Period I were further subdivided into FRA and FRB based on the lot number of substrate (fructose-6-phosphate) employed in the assay.

本文で述べたように、第I期の新鮮標本のGPIのデータはアッセイに用いた基質(フラクトース-6-燐酸)のロット番号に基づいて更に新鮮標本Aと新鮮標本Bに分類した。

In addition to heterozygotes for no-activity variants, however, one can anticipate in a survey in which the above cutoff point is observed, also detecting some fraction of a class of alleles characterized by reduced activity or marked instability of the associated gene product in erythrocytes. The smaller the CV, the less the 'contamination' of the estimate by such alleles. But in the case of an enzyme with a CV of 11%, for example, our criteria would result in the inclusion, with the variants characterized by no activity, of most variants characterized by 1%-5% enzyme activity, about 50% of those with 30% activity, and even a small proportion with 50% activity. Some progress in sorting out those various types of alleles should result from repeated determinations on the individual in question and extensive family studies. Because of the mixed spectrum of variants which this approach detects, we refer simply to the variants identified in this study as enzyme deficiency or low activity variants. The emphasis in this paper is on an attempt to estimate the frequency of alleles with major effects; any treatment of the quantitative genetics of enzyme activity will be deferred until later.

The Special Cases of PK, HK, and GOT1. In the pilot studies at Ann Arbor, PK levels in adults displayed a CV of 14.5 and GOT1, 15.2.⁴ Despite this undesirably large CV, it was decided to retain PK in the enzyme battery because of its central position in the glycolytic cycle. In our studies in Japan, in general, the enzyme CV values are slightly smaller than at Ann Arbor, perhaps because of the additional step in sample preparation of removing the leukocytes with column filtration. For PK, however, the CV for the unadjusted data (19.6) was greater in Japanese. Inherited anemia due to PK deficiency, first described by Valentine et al¹⁹ in Caucasoids, has now been abundantly documented in Japanese.²⁰ The early genetic studies, of Caucasoids, showed that the anemia caused by PK deficiency was due to homozygosity for an allele which in the heterozygous state depresses PK levels. Family and biochemical studies in Japanese have already suggested the existence of at least seven different PK alleles associated with anemia.²¹ Studies of the parents of patients presumed homozygous for a mutant allele or doubly heterozygous for two different mutant alleles revealed that only 10 of 19

しかしながら、上記の境界点の値が観察される場合には、酵素活性のない変異型のヘテロ接合体に加えて、活性の減少や赤血球中の関連遺伝子産物が著しく不安定であるという特徴をもつ対立遺伝子群の一部が検出されることも期待される。変動係数が小さければ小さいほど、この種の対立遺伝子が(活性のない変異型の頻度の)推定値に'混入'して行くことは少なくなる。しかしながら、例えば変動係数が11%である酵素の場合、我々の基準では、活性の欠損という特徴をもつ変異型に加えて、酵素活性が1%~5%である変異型の大部分、30%の活性を示す変異型の約50%、並びに少数の50%の活性を示す変異型も含まれることになる。本人に対する測定を繰り返す、また、広範な家族調査を行うことにより、これらの種々のタイプの対立遺伝子をえり分ける上で、幾らか進歩がみられるであろう。この方法で検出される変異型の種類は複雑なので、本研究で検出された変異型については、酵素活性減少型ないしは低活性変異型であると言うにとどめる。本論文における重点は、重要な影響をもつ対立遺伝子の頻度を推定することであり、酵素活性を量的遺伝学の立場から取り扱うのは後に譲る。

特殊な場合—PK, HK 及び GOT1. Ann Arbor での試験的調査では、成人の PK レベルの変動係数は14.5であり、GOT1 の場合は15.2であった。⁴ このように大きな変動係数は望ましくないが、PK は解糖サイクルの中心に位置するものなので測定する酵素のうちに残しておくことにした。我々が日本で行った研究では概して Ann Arbor での研究よりも酵素(活性)の変動係数がわずかに低かった。これはおそらく、標本を作成する際にカラムを通過させることにより白血球を除去するという手続きが加わったためであろう。しかしながら、PK に関しては、補正していないデータによる変動係数(19.6)は日本人の方が大きかった。白人の PK 活性減少による遺伝性貧血については、Valentine ら¹⁹ が最初に報告したが、現在では日本人の同疾患に関する資料も数多くある。²⁰ 白人に関する初期の遺伝学的研究において、PK 活性欠乏から起こる貧血は、ヘテロ接合の状態では PK レベルを低下させるような対立遺伝子が、ホモ接合になっているためであることが示された。日本人の家族調査及び生化学的研究で、貧血を伴う PK 対立遺伝子が少なくとも七つあることが既に示唆されている。²¹ 1 種の変異型対立遺伝子に対してホモ接合を示すか、

had PK activities $\leq 67\%$ of normal.^{21,22} In Japan most individuals with anemia due to PK deficiency retain appreciable PK activity, often accompanied by electrophoretically abnormal enzyme. This led Miwa²⁰ to write: "Hence, it has become increasingly apparent that most, if not all, of the PK deficiency is caused by structural gene mutation, and not by decreased synthesis of normal enzyme protein molecules." The interesting genetic possibilities raised by that finding will be discussed after the presentation of the data on PK. In this study, the same cutoff point will be used for PK as for the other enzymes ($\leq 66\%$ of normal), and later the consequences of this convention will be considered.

In the Japanese data the CV for GOT1 (16.5) is also somewhat higher than in Ann Arbor adults (15.2), but now there is not a background of hematologic information suggesting a plausible explanation. For HK, not run in Ann Arbor, there is also an undesirably large CV. However, both GOT1 and HK exhibit marked positive skewness in the distribution of enzyme values, a fact which would decrease the number of persons falling below the 66% cutoff point. At any rate, we will observe for these enzymes the same convention as for PK, and return later to their suitability for a study of this type.

The Sex-linked Traits G6PD and PGK. For sex-linked traits, the demonstration of a deficiency variant in males should be unequivocal; for females, the previous criteria should apply. However, with our criteria the hemizygous state in males permits, as will be seen, the detection of low activity variants which would not regularly be detected for autosomal traits. Care must thus be exercised in comparing variant frequencies for sex-linked traits with those for autosomal traits.

Implementation of These Definitions

In practice, any value $\leq 66\%$ of the daily mean for that enzyme was considered a potential variant. The final decision concerning a variant, however, was in relation to the cumulative mean. Some month-to-month drift in enzyme values was encountered. This drift, a well-known problem in enzyme activity studies, was much

又は、異なる二つの変異型対立遺伝子のそれぞれについて二重にヘテロ接合を示すと思われる患者の両親についての研究によると、19人中10人のみが正常値の67%以下のPK活性を示した。^{21,22} 日本ではPK活性減少による貧血患者の大部分はかなり高いPK活性を維持しており、しばしば電気泳動上異常な酵素を伴う。このことからMiwa²⁰は「したがって、すべてと言わないまでも、ほとんどのPK活性減少は構造遺伝子の突然変異によって起こるのであり正常な酵素蛋白質分子の合成減少によるのではないことがますます明瞭になった。」と述べている。この所見によって得られた興味深い遺伝的可能性については、PKのデータを提示してから論ずる。この研究では、PKにも他の酵素と同じ境界点(正常値の66%以下)を用いる。この基準を用いた結果については後で考察する。

日本人のデータではGOT1の変動係数(16.5)もAnn Arborでの成人のデータ(15.2)より幾分高いが、今のところ納得のいく説明ができるような血液学上の資料による裏付けがない。HKはAnn Arborでは測定されていないが、これも変動係数が大きく、望ましいデータではない。しかしながら、GOT1、HKいずれも、酵素活性値の分布において顕著な正の歪みを示した。このことから、66%の境界点以下に該当する人数が減少するであろう。ともかく、これらの酵素にPKと同一の基準を適用し、その後これらの酵素がこの種の研究に適しているかどうかという論点に戻る。

伴性形質のG6PD及びPGK。伴性形質に関しては、男性の活性減少変異型は明白に証明されるはずである。女性については従来の基準が適用される。しかしながら、後述のように、我々の基準では、男性のヘミ接合状態において、常染色体形質の場合には通常検出できないと思われる低活性変異型が検出できる。したがって、伴性形質の変異型頻度と常染色体形質の変異型頻度を比較する際には注意しなければならない。

定義の適用

実際は、ある酵素の日平均の66%以下の値を示すものはすべて変異型である可能性がある。しかしながら、変異型かどうかは累積平均との関係によって最終的な決定が下された。酵素活性値には月差変動がある程度見られた。この変動は酵素活性の研究においてはよく

more pronounced for some enzymes (GPI, PK, GOT1) than others. A major cause is changing reagents. This problem was especially acute for GPI. By inspection, to compensate in part for drift, we decided to divide the data into two periods, an initial, 16-month period and a second, 15-month period (Table 4). For GPI, a change of substrate during the first period had such a marked effect on the mean that this period was further subdivided. Since our definition of a deficiency variant is relative, such drift introduces noise into the definition. On the other hand, it will be shown that the CV values in this study are in general less than those reported by Beutler¹⁵; norms from other laboratories undoubtedly also contend with drift. We note in passing that CV values computed on a monthly basis, in general, average several percentage points less than those computed for the cumulative means. The use of the cumulative mean thus is a conservative step in the search for variants.

Family Studies

Preference was given in the selection of subjects to children both of whose parents were still alive at the time of last record. Whenever the presence of a variant in a child was confirmed, an effort was made to analyze samples from both parents and as many siblings as possible, not only with respect to the enzyme in question but for all the enzymes under study.

RESULTS

Deficiency Variants

The findings are shown in Table 4. For GOT1 and 6PGD, where well-known electrophoretic variants occur in polymorphic proportions, the results are presented separately for the various phenotypes, and the decision regarding an activity variant made with reference to the mean and standard deviation of that electrophoretic type. Findings are not presented for the rare electrophoretic phenotypes encountered. For the sex-linked traits (G6PD and PGK) results were tabulated separately for sex, on the concern that sex differences might have to be considered in the definition of a variant. The presumptive cause of the difference between the results from FR and NP samples has already been discussed. The effectiveness of the steps we have taken to reduce the contribution of

知られた問題であるが、ある種の酵素 (GPI, PK, GOT1) については他のどの酵素よりも顕著であった。試薬を変えることがその主な理由である。この問題は GPI について特に深刻であった。データの検討に基づき、変動を部分的にでも補うために、データを第 I 期の 16 か月間とそれに続く第 II 期の 15 か月間に分けることにした (表 4)。GPI については、第 I 期における基質の変化が平均値に著しい影響を及ぼしたので、この期間を更に分けた。我々の活性減少変異型の定義は相対的なものであるので、このような変動があると定義が不明確になる。一方、この研究における変動係数は大概 Beutler¹⁵ が報告しているものよりも低いことがわかる。他の研究所から得られた正常値も明らかに変動を含んでいる。ちなみに、月ごとに計算された変動係数の平均値は概して、累積平均で計算された値より数%低いことに気付く。このように、累積平均値を使用することは、変異型を検出する上で控え目な方法である。

家族調査

最後に記録した時点で両親とも存命であった子供を優先的に対象者に選んだ。子供に変異型の存在が確認される度に、両親及びできるだけ多数の同胞の標本を変異型の検出された酵素だけでなく、本研究が対象としているすべての酵素に関して、分析するようにした。

結果

活性減少変異型

結果を表 4 に示す。GOT1 及び 6PGD にはよく知られた電気泳動上の変異型が多型の頻度で存在するので、結果を表現型別に示した。電気泳動上の表現型別に、その平均値と標準偏差を考慮して、活性変異型かどうかを決定した。検出されたまれな電気泳動上の表現型についての結果は示さない。伴性形質である G6PD 及び PGK については、性による差異を考慮して変異型を定義すべきであると考えたので、結果を性別に集計した。新鮮標本及び窒素保存標本から得られた結果が異なることについて、考えられる理由は既に論じた。観察された変動に対する外因性の非生物学的要因の寄与を減ずるために、我々が採用した作業規則等が有効であったことは、前に述べたように、

extraneous, nonbiological factors to the observed variances is illustrated by the fact that, as noted, for 10 of the 11 enzymes under study, the CV values are less than those reported by Beutler,¹⁵ obtained with essentially the same methodology. The one exception is PK, for which there may be at least a partial explanation, namely, a relatively high frequency among Japanese of carriers of PK-deficiency alleles. Because of the relatively poor reproducibility of GAPD (Table 1) and the high ratio of false positives to confirmed variants, the study of this system was discontinued after the first six months.

Table 5 presents the total number of putative variants and the results of the appropriate follow-up studies. "False Positives" are those which, following the initial low value, on repeat determinations on a new sample consistently exhibited values greater than 66% of the appropriate mean. Some of these repeat values remained low, however, and, as will be shown, occasionally identify additional genetic variants. Family studies were conducted only on variants confirmed by a newly obtained sample. In all 52 instances in which a putative variant was confirmed by a repeat observation and family studies were then possible, a similar finding was encountered in one parent or the other. This is even the case for the three enzymes, GOT1, HK, and PK, with relatively large CV values. Because the standard deviations for the various means are inflated both by laboratory drift in the means and by the inclusion of putative variants in the calculation, our estimation of variant frequencies is somewhat conservative. This is desirable in the context of a study of mutation rates. On the basis of this experience, the prevalence of deficiency variants is computed for each system on the assumption that among the variants not yet confirmed, the ratio of false positive to confirmed will for each system be as shown in Table 5.

The precise findings vary greatly from locus to locus. No confirmed variants of AK1 and 6PGD were encountered, whereas the estimated prevalence of PK variants was 13.8/1000 determinations. The two confirmed G6PD variants were encountered in unrelated females, whereas the three PGK variants were in a set of male siblings. The enzyme levels in the hemizygotes in the three families concerned are such that we would not expect to detect

研究対象である11種の酵素のうち10種の変動係数が、本質的に我々と同じ方法を用いた Beutler¹⁵ が報告した値よりも低いという事実によって実証されている。唯一の例外はPKであるが、日本人ではPKの活性減少を示す対立遺伝子の保因者の頻度が比較的高いことが、少なくともそれを部分的に説明すると思われる。GAPDの再現性が比較的低いこと(表1)、及び間違いの変異型(1回は低活性を示したが、後に正常値を示したものの)の確認された変異型に対する割合が高いことのために、この酵素の研究は最初の6か月で打ち切った。

表5に変異型と思われるものの合計と、適切な追跡研究の結果を示す。「間違いの変異型」とは、最初の測定値は低いが、新しい標本について再測定したときには、しかるべき平均値の66%より大きい値を一貫して示すものである。しかしながら、これら再測定した値の中には低いレベルに留まるものもあり、後述するように、それらもまた遺伝的変異型であると思われることがしばしばある。新しく得た標本で確認された変異型についてのみ家族調査を行った。(新しい標本についての)再測定の結果、変異型が確認された上、家族調査が可能であった全52例において、低活性変異型が片親に見つかった。変動係数が比較的大きい3種の酵素のGOT1、HK及びPKにもこれと同じことが言える。種々の平均値に対する標準偏差は、同一実験室内での平均の変動によって、また平均値の計算を行うときに変異型と思われるものを含めることによって大きくなっているため、我々が推定した変異型の頻度は幾分控えめである。これは突然変異率を研究する上で好ましいことである。この経験に基づいて各酵素の活性減少変異型の頻度を計算するが、それにはいまだ確認されていない変異型においても、各々の酵素において確認された変異型に対する間違いの変異型の割合は表5に示すようになるだろうという仮定がある。

変異型に関する細かい所見は遺伝子座によって大きく異なる。AK1及び6PGDには変異型が確認されなかったが、PK変異型の頻度は1,000例につき13.8と推定された。確認された2個のG6PDの変異型は血縁関係のない女性に発見されたが、3個のPGK変異型は3人の男性の同胞に発見された。この3家族のヘミ接合体の酵素レベルというものは、もし常染色体上に存在する対立遺伝子の場合にはその産物の活性がその程度に高ければ、活性変異型の対立遺伝子で

TABLE 5 NUMBER OF DETERMINATIONS AND PUTATIVE VARIANTS DURING PERIODS I AND II AND OUTCOME OF FAMILY STUDIES

表5 測定件数及び第I期、第II期で変異型と思われたもの、及び家族調査の結果

System		Determinations	Putative variants	False positive	Not yet confirmed	Confirmed		Activity variants per 1000	Electrophoretic variants per 1000					
						Family studies			This sample	Total ¹⁾				
						Positive	Impossible							
TPI	FR	0	310	0		1		3.2	0	0.36				
	NP	310		1										
PGK	M FR	412	2929	0		3		1.0	0	0				
	F FR	441		0										
	M NP	964		3										
	F NP	1112		0										
AK1	FR	807	2863	0				0	0	0				
	NP	2056		0										
LDH	FR	1058	3134	0		2		0.6	0	0.16				
	NP	2076		2										
GAPD	FR	484	629	3	2	1		1.6	-	-				
	NP	145		0										
GPI	FR	947	3064	4	1	3		2.3	6.85	5.03				
	NP	2117		4										
PK	FR	966	3069	15	3	10	1	13.8	-	-				
	NP	2103		38							6	6	21	5
6PGD	FR	1068	3162	0				0	0.63	0.49				
	NP	2094		0										
G6PD	M FR	372	1156	1	1	1		1.7	2.60	2.91				
	F FR	399		1										
	M NP	180		0										
	F NP	205		1										
GOT1	FR	1083	3173	11	6	4	1	1.9	8.19	5.33				
	NP	2090		10							6			
HK	FR	1019	3145	1	1			0.3	-	-				
	NP	2126		1										
Total	FR	9056		36	14	5	15	2						
	NP	17578		60							12	6	37	5
	Combined	26634		96							26	11	52	7

1) Frequencies were calculated based on the total of 6,169 children from Hiroshima examined by starch gel electrophoresis.³

頻度は、広島の子供合計6,169人に澱粉ゲル電気泳動法を行った結果に基づいて計算した。³

2) Unweighted average of system frequencies.

各々の酵素における頻度の非加重平均。

with regularity autosomal alleles characterized by such levels. The unweighted average of the 11 different frequencies of carriers of deficiency variants given in Table 5 is 2.4/1000 determinations.

The detailed results of the family studies, where these were possible, are shown in Table 6. The results of studies characterizing many of these variants in further detail will be presented elsewhere. In Table 6 the electrophoretic phenotype of the proband is shown where appropriate. The position of the proband and parents in terms of percent normality and standard deviations has been calculated with reference to whether the sample was FR or NP, and with reference to period I or period II. Each of the G6PD variants was inherited from the father; from his activity level we must conclude preponderant Lyonization of the normal sex-chromosome in his daughter. Likewise, the low PGK value in the mother with three affected sons suggests preponderant Lyonization of her normal X. Among the parents who, on the hypothesis of autosomal co-dominant inheritance, should be the noncarrier parent, there were 40 with values below the mean (2 with values $\leq 66\%$ of the mean), 3 with values at the mean, and 4 with values above the mean (2 presumed noncarrier parents were deceased). This significant departure from equality ($p < 0.001$) suggests that the contribution of a low activity background by the presumed nonheterozygous parent facilitated, in some cases, the detection of the variant. In addition, this tendency is so striking with respect to PK and GOT1, already characterized by undesirably large CV values, that one suspects a recessive-type inheritance in some instances (i.e., low \times low \rightarrow very low). On the basis of this study, these two systems are not felt to be appropriate to the search for enzyme mutations.

It is of interest to compare the average activity level of the carrier parents with that of their proband child. For the non-sex-linked enzymes with relatively small CV values, for which variants were encountered (TPI, LDH, GAPD and GPI), the mean percent value and its standard deviation in probandi was 50.5 ± 6.0 and in their carrier parents, 51.1 ± 6.4 . For GOT1, the activity was 49.0 ± 8.3 in four probands and 46.3 ± 13.3 in their carrier parents. For PK, the value in 31 probands was 58.8 ± 5.7 , whereas in the

あると常には認識されないくらいの高さであった。表5に示す11種の酵素における活性減少変異型の保因者の頻度は各々異なっているが、これらの頻度の非加重平均は1,000例につき2.4である。

家族調査が可能であったものについてはその詳細な結果を表6に示す。これらの変異型の特徴を更に詳しく究明した研究の結果は別途に示す。表6には発端者の電気泳動上の表現型が適宜示されている。新鮮標本であるか窒素保存標本であるか、また第I期と第II期のいずれに属するかということも考慮しつつ、発端者及び両親の活性値が正常値の何%であるか及び標準偏差の単位でどれぐらいの差があるかを計算した。G6PDの変異型のいずれもが父親からの遺伝であった。父親の活性レベルから考えると、その娘の正常な性染色体はLyonizationの結果著しく不活性化されていると結論せねばならない。同様に、変異型を有する息子を3人もつ母親のPGK値が低いことから、その母親の正常なX染色体はLyonizationの結果著しく不活性化されていると示唆される。常染色体性共(相互)優性の遺伝形式であると考えられるならば、保因者ではないと考えられる両親のうち、その活性値が平均値以下のものは40人(平均値の66%以下は2人)、平均値と等しいものは3人、平均値以上は4人(保因者ではないと思われる2人は死亡していた)であった。このように平均値より高い活性を示す者と低い活性を示す者が同数であるべきにもかかわらず、実際には有意に($p < 0.001$)それを逸脱していることから、ヘテロ接合ではないと思われる片親が、正常値ではあるが低い活性を示したことが寄与して、変異型の検出が促進された場合もあるのではないかと示唆される。加えて、この傾向は、既に変動係数が異常に大きいとされているPK及びGOT1に関して非常に顕著であるので、劣性遺伝(つまり、低活性 \times 低活性 \rightarrow 非常に低活性)が疑われる場合もある。この研究に基づいて言えば、これらの二つの酵素は酵素の突然変異を検索するのに適当とは思えない。

保因者である両親の活性レベルの平均値と、発端者であるその子供のそれとを比較することは興味深い。変異型が発見された酵素で変動係数が比較的小さい非伴性遺伝形式の酵素(TPI, LDH, GAPD及びGPI)においては、その活性値の正常平均値に対する百分率を計算し、発端者についての平均値と標準偏差を求めると 50.5 ± 6.0 、保因者であるその親では 51.1 ± 6.4 であった。GOT1の活性値は、発端者4人では 49.0 ± 8.3 、保因者であるその親では 46.3 ± 13.3 であった。PKについては、発端者31人の値は $58.8 \pm$

TABLE 6 RESULTS OF FAMILY STUDIES OF THE INDIVIDUALS EXHIBITING CONFIRMED ACTIVITY VARIANTS

表6 活性変異型と確認された人の家族調査の結果

Enzyme	Pheno- type	MF No.	Propositus			Mother			Father			Comments	
			Sex	Activity (IU/g Hb)	% normal	SD below mean	Activity (IU/g Hb)	% normal	Departure from mean (SD)	Activity (IU/g Hb)	% normal		Departure from mean (SD)
TPI	1		F	819.1	37	6.5	1915.3	86	-1.5	916.2	41	-6.1	
PGK	1		M	99.6	39	6.7	126.0	49	-5.6	240.5	93	-0.8	1)
	1		M	92.2	36	7.1	126.0	49	-5.6	240.5	93	-0.8	
	1		M	96.9	38	6.9	126.0	49	-5.6	240.5	93	-0.8	
LDH	N		M	89.5	53	6.8	164.8	97	-0.4	83.8	49	-6.8	
	N		F	97.5	57	5.7	162.6	95	-0.6	90.9	53	-6.2	
GAPD	ND		F	85.9	50	4.3	129.7	76	-2.1	80.5	47	-4.6	
GPI	1		F	25.5	56	5.0	25.0	54	-5.1	45.9	100	0	2)
	1		F	19.0	56	4.7	33.1	97	-0.3	19.0	56	-4.7	
	1		F	26.4	51	5.5	33.1	97	-0.3	19.0	56	-4.7	
	1		F	16.9	49	5.4	43.2	124	+2.5	21.6	64	-3.9	
	1		M	23.6	48	5.4	46.4	90	-1.1	24.4	47	-5.9	
	1		M	22.9	44	6.2	41.6	81	-2.2	23.2	45	-6.2	
PK	N		M	4.1	57	2.2	11.1	153	+2.8	4.6	63	-1.9	
	N		M	4.4	61	2.0	7.0	97	-0.1	4.8	66	-1.7	
	N		M	4.5	63	1.9	8.0	92	-0.5	5.2	56	-2.4	
	N		M	4.4	61	2.0	7.2	77	-1.2	5.8	62	-2.0	
	N		M	4.6	64	1.9	6.1	66	-1.9	4.8	52	-2.6	
	N		M	4.5	62	1.9	9.1	100	0	5.7	63	-1.9	
	N		F	3.9	54	2.4	4.1	45	-2.8	7.6	82	-1.0	
	ND		M	4.7	65	1.8	4.5	48	-2.8	8.1	87	-0.7	
	ND		M	5.1	56	2.2	6.1	66	-1.9	8.5	91	-0.5	
	N		M	5.8	63	1.8	8.3	89	-0.6	5.4	58	-2.3	
	ND		M	4.6	51	2.5	7.2	79	-1.1	4.6	50	-2.5	
	ND		M	5.9	65	1.8	9.3	100	0	6.2	66	-1.8	
	ND		M	5.6	64	2.2	7.5	81	-1.1	5.8	62	-2.1	
	ND		M	5.2	60	2.5	7.8	84	-0.9	5.6	60	-2.2	
	ND		M	5.5	59	2.2	8.2	88	-0.6	5.0	54	-2.5	
	N		M	6.0	64	1.9	dead	-	-	5.6	60	-2.2	
	ND		M	5.4	58	2.3	10.5	113	+0.7	6.1	66	-1.9	
	N		M	5.0	54	2.5	6.6	71	-1.6	6.1	66	-1.9	
	N		M	5.5	59	2.2	4.8	52	-2.6	6.5	70	-1.6	
	ND		M	5.2	56	2.4	5.8	62	-2.1	8.4	90	-0.5	
	ND		F	5.6	60	2.2	7.7	83	-0.9	3.9	42	-3.2	
	ND		M	5.6	60	2.2	5.5	59	-2.2	7.2	77	-1.2	
	ND		F	5.1	55	2.5	8.4	90	-0.5	5.9	63	-2.0	
	ND		M	4.4	47	2.9	9.4	101	+0.1	5.0	54	-2.5	
	ND		F	6.0	65	1.9	7.7	83	-0.9	6.1	66	-1.9	
	ND		M	5.7	61	2.1	8.8	95	-0.3	5.3	57	-2.4	
	N		M	5.4	58	2.3	6.1	66	-1.9	6.9	74	-1.4	
N		M	5.6	60	2.2	7.3	78	-1.2	5.5	59	-2.2		
ND		M	6.1	66	1.9	7.4	80	-1.1	4.4	47	-2.9		
ND		M	3.6	39	3.4	3.9	42	-3.2	8.8	95	-0.3		
ND		M	5.3	57	2.4	7.8	84	-0.9	5.5	59	-2.2		
G6PD	N/V		F	2.7	51	3.7	5.2	98	-0.1	2.7	51	-3.7	3)
	N/V		F	3.5	55	4.0	6.1	96	-0.3	3.2	52	-4.8	
GOT	1		F	2.7	61	2.4	3.0	65	-2.3	dead	-	-	
	1		M	2.1	48	3.3	3.5	76	-1.6	2.1	46	-3.6	
	1		F	1.9	44	3.6	3.0	65	-2.3	1.6	35	-4.3	
HK	1		M	2.0	43	3.7	1.8	39	-4.0	3.7	80	-1.3	
	N		F	0.46	51	3.0	0.80	88	0.7	0.40	44	-3.4	

See next page for Footnotes. 注は次頁を参照.

The designation of position with reference to the mean is specific to the period of study.
平均値に対してどういう値を示しているかという計算は、測定が行われた期間の平均値に基づいて行った。

1) Three persons having PGK variants are male siblings.

PGK をもつ3人は男性の同胞である。

2) [redacted] and [redacted] are female siblings.

[redacted] と [redacted] は女性の同胞である。

3) Two propositi are unrelated females. Each of them showed an anodally migrating variant band with normal band of G6PD. Activities were compared with that of normal. Each of their fathers is a hemizygote of G6PD variant.

発症者の2人は血縁関係のない女性である。いずれも、陽極側に移動する変異型バンドと正常型の G6PD バンドを示した。活性を正常活性と比較した。その2人の父親はいずれも G6PD 変異型のヘミ接合体である。

In the "phenotype" column, ND, N, and N/V indicate, respectively, that electrophoretic analysis for the variant was not done, that the phenotype was normal, or that bands of normal and variant mobility were observed.

表現型の欄で、ND はその変異型に電気泳動法による分析を行わなかったこと、N は表現型が正常であったこと、N/V は正常な移動度を示すバンドと移動度に変異のあるバンドが見られたことを表す。

carrier parents it was 57.8 ± 7.4 . Assuming a mixture of no-activity and low-activity variants in the variants being detected, the latter data can be interpreted as confirming the suggestion of Miwa²⁰ that true nulls are relatively less common among detected PK variants, but the data are consistent with the possibility that the absolute frequency of nulls is increased at this locus.

Routine electrophoretic studies are performed in this laboratory on eight of these enzymes (Table 5). Among the 19 confirmed variant samples for which routine electrophoretic studies were performed, only 2 were also characterized by electrophoretic abnormality (the two G6PD variants). PK and HK are not routinely analyzed electrophoretically in this laboratory, but 13 of the 31 PK activity variants and one HK activity variant have been subjected to polyacrylamide gel electrophoresis and starch gel electrophoresis, respectively, with no finding of abnormality. This failure to detect electrophoretic abnormality is to be expected, since true enzyme-deficiency variants of course exhibit no enzyme activity, electrophoretically normal or otherwise, and the low activity variants detected by these criteria, if also characterized by an abnormal electrophoretic mobility, should not usually exhibit sufficient activity on starch gel electrophoresis to create a recognizably abnormal enzyme band.

Depressed Activity Variants

We have sought to identify a class of variants showing lesser degrees of activity impairment than those just described. Two different approaches have been pursued. Both parents were examined with reference to all 26 persons with unconfirmed activity levels <66% of normal (the false positives of Table 5). Two persons (MF [redacted] and MF [redacted]) whose GOT1

5.7, 保因者であるその親では 57.8 ± 7.4 であった。検出された変異型に無活性及び低活性の変異型が共に観察されると仮定すると、後者のデータは、検出された PK 変異型のうち真の null は比較的まれであるという Miwa の示唆²⁰ を裏付けると考えられるが、同時にこのデータは、null の絶対頻度はこの遺伝子座で増加しているという可能性を支持するものである。

我々の研究室では、これらの酵素のうち8種(表5)について電気泳動法による検査を通常検査として行っている。活性減少変異型であると確認され、電気泳動法による通常検査も行われた19標本のうち、2標本(2個の G6PD 変異型)のみに電気泳動上の異常という特徴も見られた。我々の研究室では、PK 及び HK を通常検査として電気泳動法で分析することはないが、31個の PK 活性変異型のうち13個にはポリアクリルアミドゲル電気泳動法を、1個の HK 活性変異型には澱粉ゲル電気泳動法を行った。しかし、これによって異常は発見できなかった。このように、電気泳動上の異常が発見できないことは予想されることである。なぜなら、真の酵素欠損変異型は電気泳動的に正常であろうとなかろうと、当然酵素活性を示すはずはないし、もし、低活性変異型という基準に基づいて検出された低活性変異型に、更に電気泳動上異常な移動を示すという特徴があれば、通常その変異型が澱粉ゲル電気泳動において、明らかに異常とわかる酵素バンドを形成する程の活性を示すことはないからである。

活性のやや低い変異型

今述べた変異型よりも活性減少の程度が小さい変異型の集団を発見しようと試みた。異なる二つの方法を用いた。活性レベルが正常値の66%未満であることが、新しい標本で立証されなかった(表5中の間違いの変異型)26人について、その両親の検査を行った。2回目の測定で GOT1 値が正常の67%より大きかった

values were greater than 67% of normal on the second examination (80% and 70%, respectively) were found to have abnormal parents, the father of the former with 45% of normal activity and the mother of the latter with 48%. A third individual (MF [redacted]) whose original GPI value of 63% of normal (GPI type I) was followed by a second determination of 82%, was found to have a thermolabile variant of this enzyme, as did her mother.²³

The second approach involved family studies of 15 of the 35 persons in whom particular enzyme activities were 2.5 standard deviations below the mean, but greater than 66% of normal. This may be considered an effort to evaluate the frequency of false negatives. Three of these 15 proved to be heterozygous for genetic variants. The first individual (MF [redacted]) presented with a confirmed AK1 value 67% of normal, just above the cutoff point. Her mother exhibited 66% of normal activity. Both these values were >4 standard deviations below the AK1 mean. In our parallel study of thermolabile variants,²⁴ the AK1 of these two individuals exhibited significantly decreased thermostability. Thus the variant is most likely a rapidly degraded and thermolabile isozyme. The second individual (MF [redacted]) exhibited a confirmed AK1 value of 73% of normal, 2.5 standard deviations below the mean. The value for her father was 54%. Here, too, abnormal thermolability could be demonstrated. Finally, one individual (MF [redacted]) with a GPI value of 77% (2.6 SD below the mean) exhibited abnormal thermolability, as did her father, with an initial GPI value 86% of normal. It is an arbitrary decision whether these four individuals with abnormally thermolabile enzymes be scored as activity variants in this paper or thermolability variants in a forthcoming report; we will pursue the latter course. Although these findings provide evidence for an additional class of activity variants beyond those whose occurrence is scored in Table 5, the manner of their ascertainment is not such as to provide a reasonable estimate of their frequency. It does not, however, appear that the data are seriously biased by false negatives. We will not utilize the data of this section for normative purposes, other than to include the variants associated with abnormal thermolability in a subsequent paper.

2人(それぞれ80%及び70%, MF番号 [redacted] 及び [redacted])の親は活性値が異常であるとわかった。前者の父親の活性値は正常活性値の45%, 後者の母親は同48%であった。3番目の対象者(MF [redacted])は、最初のGPI値が正常値の63%(GPIの表現型は1)で、2回目の測定では82%であったがその母親と同様、この酵素の熱不安定型の変異型をもっているとわかった。²³

第2番目の方法として、特定の酵素の活性値が平均値より2.5標準偏差低く、正常値の66%よりは大きい35人のうちの15人の家族調査を行った。これは“偽陰性”の頻度を推定しようとする試みと考えてよい。これらの15人のうち3人は、変異型遺伝子に対してヘテロ接合であるとわかった。1人目(MF [redacted])は、AK1値が正常値の67%で、境界点よりやや高いことが新しい検体で確認された。その母親の値は正常活性値の66%であった。これらの値はいずれもAK1の平均値より4標準偏差以上低かった。我々が平行して行った熱不安定性変異型の研究²⁴では、両者のAK1の熱安定性は有意な減少を示した。以上のことから、この変異型は、急速に変性する熱不安定性アイソザイムだと思われる。2人目(MF [redacted])は、AK1値が正常値の73%で平均より2.5標準偏差低いことが新しい標準で確認された。その父親のAK1値は54%であった。これについても異常な熱不安定性を証明することができた。最後に、ある人(MF [redacted])はGPI値が77%(平均より2.6標準偏差低い)で、GPIが正常値の86%である父親と同様、異常な熱不安定性を示した。異常な熱不安定性の酵素を示すこれらの4人を、本論文の中で活性変異型とするか、将来の論文の中で熱不安定性変異型とするかは自由であるが、我々は後者を選ぶ。これらの結果は、表5に発現頻度を示した変異型以外に、更に別のタイプの活性変異型が存在する証拠となるものであるが、この確認方法ではその頻度について納得のいく推定値は得られない。しかしながら、データが偽陰性によってひどくゆがめられているとは思えない。将来の論文で異常な熱不安定性を示す変異型を述べるため以外には、この章のデータを元来の目的である活性減少変異型として用いることはない。

DISCUSSION

The foregoing data establish that under the conditions and conventions which have been described, it is possible, in the setting of a survey such as this, to identify a class of persons with low enzyme activities which, from the manner in which the trait segregates in families, must be predominantly the result of codominant inheritance. Mohrenweiser,⁵ under slightly different circumstances, has presented similar findings. The existence of such variants has of course been very well documented in the genetic literature for some time, largely on the basis of studies of inherited biochemical disorders, but the advent of such technical innovations as the centrifugal fast analyzer has greatly facilitated surveys such as the present one, on representative enzymes selected without reference to their disease potential.

It would thus appear that for selected enzymes (except PK, HK, and GOT1 in Japanese) this methodology adds a new parameter to the evaluation of the genetic effects of the A-bombs, and this approach has been incorporated into the ongoing biochemical studies for their duration. On the other hand, on any reasonable projection, the numbers to become available cannot be expected by themselves to provide decisive insights, and must be considered as one more additive component to a body of data, none of whose components considered separately is apt to yield a statistically decisive finding.¹³ Establishing the mutational origin of any specific isolated deficiency variant (i.e., a loss of activity) will, however, even with a variety of special studies, be inherently more difficult than establishing a similar origin for an isolated electrophoretic variant, but, should more isolated deficiency variants be encountered in the children of parents exposed to a known mutagen than in suitable controls, this can be considered as presumptive evidence for an increased mutation rate.

As is apparent from Table 4, most of the distributions exhibit positive skewness.²⁵ This displacement of the mean to the right of the mode, of course, is reflected in an increase in the standard deviation; especially for enzymes with large CV values, a criterion for abnormality of $\leq 66\%$ normal enzyme activity is more conservative than one based upon an enzyme

考 察

以上のデータは、今までに述べた条件や基準に基づき、このような研究方法を採れば、その形質の家族内における分離形式からみて、主に共(相互)優性遺伝の結果と断定できる低い酵素活性を示す一群の人々を発見することが可能であることを立証している。条件は少し異なるが、Mohrenweiser⁵は同様の結果を発表している。当然のことながら、このような変異型が存在することは、主として遺伝性の生化学的異常に起因する疾病の研究に関して遺伝学の文献に詳しく述べられていたが、高速遠心分析機のような技法上の改革により、本報に述べたような、疾病の可能性に関係なく選択された代表的な酵素に関する研究が非常に容易になった。

選択された酵素(日本人の場合には、PK, HK 及び GOT1 を除く)について言えば、この方法は、原爆の遺伝的影響を評価する上に新しいパラメーターを一つ加えるものであり、この方法は現在進行中の、遺伝生化学調査が行われている間は、その調査に加えられている。一方、いかなる合理的な計画に基づいても、この方法で得られるデータ数だけでは決定的な判定を行うには十分ではないと予測される。この方法で得られるデータは、データ全体に加えられる一要素に過ぎず、全データを構成する部分的なデータのいずれの部分も統計的に決定的な所見を与えるには至らないと考えるべきである。¹³しかしながら、検出された活性減少変異型のどの一つについても、それが突然変異に由来するものかどうかを立証することは、たとえ種々の研究を行ったとしても、電気泳動上の変異型について、突然変異由来か否かを究明することよりも本質的に困難であろう。しかし、活性減少変異型が、コントロール群よりも、突然変異原に被曝した両親の子供の方に多く検出されるとすれば、これは、突然変異率の上昇を証明する証拠と考えられる。

表4から明らかのように、ほとんどの分布は正への歪みを示す。²⁵平均がこのように最頻値の右へずれていることは当然のことながら標準偏差の増加に反映されている。特に、変動係数が大きい酵素については、正常酵素活性の66%以下が異常であるという基準は、平均より34%高い酵素活性を異常とする基準よりも

activity 34% above the mean. However, given the primary orientation of this program towards the detection of mutations resulting in greatly reduced enzyme activity, it seems best to retain such a conservative approach.

Data are available on the frequency of deficiency variants of two additional enzymes in the Hiroshima population. Hamilton et al²⁶ encountered 10 individuals with approximately half-normal values of whole blood catalase among 10,679 persons tested. These persons were presumed heterozygotes for the allele which in the homozygous condition results in acatalasemia.²⁷ Since reports of this latter entity thus far have been largely restricted to Japanese, with a few other Mongoloids, and since surveys reveal a 10-fold variation in the frequency of heterozygotes in various Japanese populations, the Hiroshima carrier frequency of 0.9/1000 cannot be extrapolated to other populations. The other preliminary data stem from immunochemical quantitative analyses of the amount of erythrocyte carbonic anhydrase I and II (CA I and CA II) in the Hiroshima population.²⁸ Among 3,170 individuals, 14 had CA I values 2.0 standard deviations below the mean. Family studies on eight of the individuals revealed the condition to be inherited; the other six individuals are not yet studied. On the other hand, there was only 1 outlier in 3,170 assays for CA II; the genetic nature was confirmed by a family study.

The frequency of individuals with enzyme deficiencies as here defined in a survey in the US of nine enzymes of newborn infants, of 2.4/1000 enzyme determinations (95% confidence intervals = 1.4 and 4.0),^{5,29} was very similar to the findings in Japan. (Because of the inclusion of siblings in this material, these errors are approximate.) However, almost half of the variants encountered in the US involved TPI in blacks, in whom such variants achieve polymorphic frequencies. Blacks comprised 10% of the US series. When the findings in non-Caucasians are excluded from consideration and the comparison limited to the eight enzymes in common in the two series (TPI, AK1, G6PD, GOT1, GPI, LDH, PGK, and PK), the frequencies are for US Caucasoids 1.6/1000 determinations (95% confidence intervals = 0.7 and 3.2)²⁹ and for Japanese 2.5/1000 determinations

控え目である。しかしながら、このプログラムが、酵素活性の極度の減少に至る突然変異の検出を主な目標とするならば、このような控え目な方法を用い続けるのが最善であろう。

広島集団については、更に2種の酵素の活性減少変異型の頻度のデータが利用可能である。Hamilton²⁶は、10,679人を検査し、全血カタラーゼ活性が正常値の約半分しかない人を10人発見した。これらの人々はホモ接合の状態では無カタラーゼ血症を惹起する対立遺伝子のヘテロ接合体であると推定された。²⁷ 無カタラーゼ血症に関するこれまでの報告は、他のモンゴロイド集団のものも少しはあるが、主に日本人に限定されており、また研究の結果ヘテロ接合体の頻度は種々の日本人集団間で10倍も違いがあるので、0.9/1,000という広島での保因者頻度をもって他の集団について推定することはできない。他の予備的なデータは広島集団における赤血球炭酸脱水酵素I及びII(CA I及びCA II)の免疫化学的定量分析から得たものである。²⁸ 3,170人のうち14人のCA I値は平均より2.0標準偏差低かった。そのうちの8人の家族調査により、同じ程度の活性低下が遺伝することがわかった。残りの6人についてはいまだ家族調査が済んでいない。他方、CA IIに関するアッセイでは3,170人のうち1人だけが異常値を示し、その遺伝的特性を家族調査で確認した。

新生児の9種の酵素について米国で研究したところ、ここに定義した酵素活性減少を示す者の頻度は酵素測定1,000件当たり2.4(95%信頼区間=1.4から4.0)^{5,29}で、日本での結果に非常に近似していた(日本人集団の対象者の中には同胞も含まれているので、この誤差は近似値である)。しかしながら、米国で発見された変異型の半数近くは黒人のTPIであり、黒人の場合はこのような変異型は多型性の頻度を示す。黒人は米国の集団の10%を占めていた。非白人から得た結果を除外し、日米両国における研究に共通の8種の酵素(TPI, AK1, G6PD, GOT1, GPI, LDH, PGK及びPK)に限って比較すると、頻度は、米国の白人では測定した1,000件当たり1.6(95%信頼区間=0.7から3.2)²⁹で、日本人では1,000件当たり2.5(95%信頼区間=1.9から3.2)で

(95% confidence intervals = 1.9 and 3.3). However, the higher frequencies in Japanese are primarily due to the frequency of depressed levels of PK; we have already expressed reservations concerning the interpretation of some of the depressed levels as the result of simple heterozygosity for enzyme deficiency variants.

Both the studies of Miwa et al²¹ and Ishida et al²² quoted earlier and our own suggest an unusually high frequency of PK variants in Japanese. Since in only half the instances of PK hemolytic anemia studied by Miwa et al did a parent show enzyme activity levels $\leq 66\%$ of normal, then on the assumption that all variants involve alleles at the same locus and that allele interaction resulting in PK anemia has no unusual features, the total carrier frequency for alleles which when homozygous or doubly heterozygous result in PK hemolytic anemia, can be estimated from our data to be 27.6/1000 persons. Furthermore, given the frequency of individuals apparently heterozygous for PK alleles associated with very little enzyme activity but the persistence of considerable PK activity in many persons with PK anemia, we are led, after allowance for the fact that the latter have a preponderance of relatively young red cells, to suggest that homozygosity for alleles associated with no gene product may be an in utero lethal.

The frequency of individuals heterozygous for variants associated with no detectable activity in a survey of 20 autosomal loci in a *Drosophila melanogaster* population was 2.5/1000 determinations in a North Carolina population,³⁰ and 2.3/1000 in a London population.³¹ For the nine autosomal loci in this series, the frequency was 2.6/1000. Since our figure may be somewhat inflated by the inclusion in our series of some individuals with alleles associated with low activity levels, the agreement between the two series is striking. Given the apparently lesser opportunities for natural selection in man, as measured by the lower variances of survival to adulthood and of fertility of adults, as well as other differences in population structure, the similarity in these two figures raises some currently unresolvable questions concerning the regulation of the frequency of alleles of this type in populations.

あった。しかしながら、日本人の方が頻度が高いのは主に活性レベルの低いPKの頻度が高いことによるものである。酵素活性減少変異型に対して、単一のヘテロ接合の結果として活性が減少すると理解する際、制限を与えていることについては既に述べた。

先に引用した Miwa ら²¹及び Ishida ら²²の研究、そして我々自身の研究で、日本人にはPK変異型の頻度が異常に高いことが示唆される。Miwa らの研究によるPK溶血性貧血のうち、両親の酵素活性レベルが正常値の66%以下であるものは半数に過ぎなかったので、また変異型はすべて同一遺伝子座の対立遺伝子であり、PK貧血を引き起こす対立遺伝子の相互作用は異常な特徴をもたないと仮定した場合、ホモ接合で、あるいは二重ヘテロ接合になるとPK溶血性貧血を引き起こすような対立遺伝子の総保因者頻度は、我々のデータから1,000人につき27.6人と推定される。更に、極めて低い酵素活性を示すようなPK対立遺伝子が明らかにヘテロ接合である人の出現頻度を考慮し、更に多数のPK貧血患者では、PK活性値が、かなり高い状態を持続することを考えると、PK貧血の患者には比較的若い赤血球が多いという事実を考慮しても、遺伝子産物のない対立遺伝子がホモ接合になれば胎内致死になるだろうという示唆が得られる。

キイロショウジョウバエ集団における20個の常染色体遺伝子座の研究において、活性が検出されない変異型のヘテロ接合体の出現頻度は、ノースカロライナの集団では2.5/1000,³⁰ ロンドンでは2.3/1000であった。³¹ 本研究の9種の常染色体遺伝子座におけるヘテロ接合体の頻度は2.6/1000であった。我々の数値には、低いながらも活性のある酵素を作る対立遺伝子をもつ人も含まれているため、幾分高めであるかもしれないので、(ショウジョウバエとヒトの)二つの研究で結果が一致したことは驚くべきことである。人口構成のその他の違いだけでなく、成人に達するまでの生存率並びに、成人の生殖力における相違が小さいことでわかるように、ヒトの方が自然淘汰の機会が明らかに少ないことを考えると、これら二つの値の類似性から、この種の対立遺伝子の頻度が集団内においてどのように規制されているのかという、現在では解決不可能な問題が提起される。

REFERENCES

参考文献

1. NEEL JV, SCHULL WJ: *The Effect of Exposure to the Atomic Bombs on Pregnancy Termination in Hiroshima and Nagasaki*. Washington, D.C., National Academy of Sciences-National Research Council Publ 461, 1956
2. AWA AA, HONDA T, NERIISHI S, HAMILTON HB: Cytogenetic study of the children of A-bomb survivors. — An interim report. *Jpn J Hum Genet* 26:130, 1981
3. NEEL JV, SATOH C, HAMILTON HB, OTAKE M, GORIKI K, KAGEOKA T, FUJITA M, NERIISHI S, ASAKAWA J: Search for mutations affecting protein structure in children of atomic bomb survivors: Preliminary report. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4221-5, 1980 (RERF TR 5-80)
4. FIELEK S, MOHRENWEISER HW: Erythrocyte enzyme deficiencies assessed with a miniature centrifugal analyzer. *Clin Chem* 25:384-8, 1979
5. MOHRENWEISER HW: Frequency of enzyme deficiency variants in erythrocytes of newborn infants. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:5046-50, 1981
6. STANBURY JB, WYNGAARDEN JB, FREDRICKSON DS (eds): *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, ed 4. New York, McGraw-Hill, 1978
7. MUKAI T, COCKERHAM CC: Spontaneous mutation rates at enzyme loci in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:2514-7, 1977
8. VOELKER RA, SCHAFFER HE, MUKAI T: Spontaneous allozyme mutations in *Drosophila melanogaster*: Rate of occurrence and nature of mutants. *Genetics* 94:961-8, 1980
9. RACINE RR, LANGLEY CH, VOELKER RA: Enzyme mutants induced by low-dose-rate γ -irradiation in *Drosophila*: Frequency and characterization. *Environ Mutagen* 2:167-77, 1980
10. SOARES ER: TEM-induced gene mutation at enzyme loci in the mouse. *Environ Mutagen* 1:19-25, 1979
11. JOHNSON FM, ROBERTS GT, SHARMA RK, CHASALOW F, ZWEIDINGER R, MORGAN A, HENDREN RW, LEWIS SE: The detection of mutants in mice by electrophoresis: Results of a model induction experiment with procarbazine. *Genetics* 97:113-24, 1981
12. JOHNSON FM, LEWIS SE: Electrophoretically detected germinal mutations induced in the mouse by ethylnitrosourea. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3138-41, 1981
13. SCHULL WJ, OTAKE M, NEEL JV: Genetic effects of the atomic bombs: A reappraisal. *Science* 213:1220-7, 1981 (RERF TR 7-81)
14. NEEL JV, MOHRENWEISER HW, SATOH C, HAMILTON HB: A consideration of two biochemical approaches to monitoring human populations for a change in germ cell mutation rates. In *Genetic Damage in Man Caused by Environmental Agents*, ed by Berg K. New York, Academic Press, 1979. pp29-47 (RERF TR 4-77)
15. BEUTLER E: *Red Cell Metabolism, a Manual of Biochemical Methods*, ed 2. New York, Grune & Stratton, 1975
16. BEUTLER E, BLUME KG, KAPLAN JC, LÖHR GW, RAMOT B, VALENTINE WN: International Committee for Standardization in Haematology: Recommended methods for red-cell enzyme analysis. *Br J Haematol* 35 (Suppl):331-40, 1977

17. MATSUBARA T, OKUZONO H: A new reagent for the NiCN method, in *16th Int Cong Hemat (Kyoto)*, 1976. p368
18. International Committee for Standardization in Haematology: Recommendations for haemoglobinometry in human blood. *Br J Haematol* 13:71, 1967
19. VALENTINE WN, TANAKA KR, MIWA S: A specific erythrocyte glycolytic enzyme defect (pyruvate kinase) in three subjects with congenital non-spherocytic hemolytic anemia. *Trans Assoc Am Physicians* 74:100-10, 1961
20. MIWA S: Clinical and biochemical studies on mutant red cell enzymes mainly associated with hemolytic anemia. *Jpn J Hum Genet* 25:83-92, 1980
21. MIWA S, FUJII H, TAKEGAWA S, NAKATSUJI T, YAMATO K, ISHIDA Y, NINOMIYA N: Seven pyruvate kinase variants characterized by the ICSH recommended methods. *Br J Haematol* 45:575-83, 1980
22. ISHIDA Y, MIWA S, FUJII H, FUJINAMI N, TAKEGAWA S, YAMATO K: Thirteen cases of pyruvate kinase deficiency found in Japan. *Am J Hematol* 10:239-50, 1981
23. SATOH C, YAMASHITA A, KAWAMOTO C, ASAKAWA J, OMINE H: Studies on the genetic activity variants of erythrocyte glucose phosphate isomerase (GPI) I. Seven deficient variants and one thermolabile variant. Manuscript in preparation
24. SATOH C, NEEL JV, MIURA A, UENO C, ARAKAWA H, OMINE H, GORIKI K, FUJITA M: Inherited thermostability variants of seven enzymes in a Japanese population. *Ann Hum Genet* 49:11-22, 1985 (RERF TR 18-84)
25. FISHER RA: *Statistical Methods for Research Workers*, ed 13-revised, Edinburgh & London, Oliver and Boyd, 1963
26. HAMILTON HB, NEEL JV, KOBARA TY, OZAKI K: The frequency in Japan of carriers of the rare "recessive" gene causing acatalasemia. *J Clin Invest* 40:2199-208, 1961 (ABCC TR 9-61)
27. TAKAHARA S, HAMILTON HB, NEEL JV, KOBARA TY, OGURA Y, NISHIMURA ET: Hypo-catalasemia: A new genetic carrier state. *J Clin Invest* 39:610-19, 1960 (ABCC TR 5-59)
28. GORIKI K: Inherited human red blood cell carbonic anhydrase deficiency in Japanese. Manuscript in preparation
29. MOHRENWEISER HW: Biochemical approaches to monitoring human populations for germinal mutation rates. II. Enzyme deficiency variants as a component of the estimated genetic risk, in *Utilization of Mammalian Specific Locus Studies in Hazard Evaluation and Estimation of Genetically Altered Risk*, ed by DeSerres F. New York, Plenum Press, in press
30. VOELKER RA, LANGLEY CH, LEIGH BROWN AJ, OHNISHI S, DICKSON B, MONTGOMERY E, SMITH SC: Enzyme null alleles in natural populations of *Drosophila melanogaster*: Frequencies in a North Carolina population. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:1091-5, 1980
31. LANGLEY CH, VOELKER RA, LEIGH BROWN AJ, OHNISHI S, DICKSON B, MONTGOMERY, E: Null allele frequencies at isozyme loci in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 99:151-6, 1981