

**CYTOGENETIC "ROGUE" CELLS:
THEIR FREQUENCY, ORIGIN, AND EVOLUTIONARY SIGNIFICANCE**
細胞遺伝学的“変性”細胞：その頻度，起源及び進化的意義

AKIO A. AWA, D.Sc. 阿波章夫
JAMES V. NEEL, Ph.D., M.D., D.Sc.



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

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

本報告に基づく論文は下記の雑誌に掲載された。

Proc Natl Acad Sci USA 83:1021-5, 1986

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 not intended to supplant regular journal publication.

放影研業績報告書は、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。

**CYTOGENETIC "ROGUE" CELLS:
THEIR FREQUENCY, ORIGIN, AND EVOLUTIONARY SIGNIFICANCE**

細胞遺伝学的“変性”細胞：その頻度，起源及び進化的意義

AKIO A. AWA, D.Sc. (阿波章夫); JAMES V. NEEL, Ph.D., M.D., D.Sc.*

Department of Genetics
遺伝学部

SUMMARY

Among 102,170 cultured lymphocytes obtained from 9,818 Hiroshima Japanese aged 9 to 37 years and scored for chromosomal abnormalities, 24 cells exhibiting an extreme degree of damage were encountered. The damage consists of multiple dicentric and even trivalent chromosomes, as well as numerous fragments, many with the appearance of "double minutes." The occurrence of these cells was not correlated with parental exposure to the atomic bomb, age, sex, year, or season. The distribution of chromosomal abnormalities by individual was nonrandom. Such cells were originally described in South American Indians, and have also been recorded in United States and United Kingdom inhabitants; this appears to be a worldwide phenomenon. Their cause remains unknown, nor is it known whether they occur in other somatic and also germ-line cells. Should the latter be the case, and should the least damaged of these cells occasionally successfully complete mitosis and meiosis, the possible role of such cells in oncogenesis and evolution must be considered.

INTRODUCTION

In 1970 we reported that in studies of lymphocytes cultured from blood samples obtained from 49 apparently normal, quite unacculturated Yanomama Indians living in South America, we observed that about 1 in 200 of the cells exhibited

要 約

広島在住の9～37歳の日本人9,818名から得た培養リンパ球102,170個について染色体異常調査を行った結果，24個の細胞に強度の染色体損傷を認めた。損傷は多数の二動原体染色体や三動原体染色体，並びに無数の染色体断片からなり，その多くは“微小断片”を保っていた。これら変異細胞の出現と，両親の原爆被爆状況，年齢，性及び検査時の季節などとの間には相関性が認められなかった。異常細胞の個体別の分布はランダムではなかった。このような変性細胞の存在は，南米原住民に関する調査によって初めて観察され，現在までに米国及び英国住民にも発見されていることから，世界的な現象であると思われる。その成因は依然として不明であり，リンパ球以外の体細胞や生殖細胞にも出現するか否かは明らかでない。もし，他の体細胞系や生殖細胞系にも出現可能であり，かつ，変性細胞の中の最も損傷度の低いものが，まれにでも有糸分裂や減数分裂を支障なく行うことが可能とすれば，これら変性細胞の発癌過程や進化に果たす役割について真剣に考慮すべきである。

緒 言

1970年に我々は，近代化されていない南米原住民Yanomama族中の正常と思われる49名から採取した血液標本の培養リンパ球について調査を行った結果，

*Consultant to RERF Department of Genetics; Department of Human Genetics, University of Michigan Medical School

放影研遺伝学部顧問; Michigan 大学医学部人類遺伝学教室

an extreme collection of chromosomal abnormalities (dicentric and trivalent) plus scattered fragments.¹ In two subsequent years, the frequency of such cells was much lower, about 1 in 5,000.² In the original observation, the frequency of damaged cells per individual was not uniform, the observations departing grossly from a Poisson distribution. In a review in 1982, Cowell³ pointed out that the 'scattered fragments' we had encountered resembled the "double minutes" seen in the cells of some patients whose malignancies have been treated with radiation or chemical agents, notable among the latter being methotrexate. However, unlike the double minutes seen following cancer chemotherapy or the treatment of cultured cells with methotrexate, these "double minutes" would all seem to have arisen in a single cell generation. Because of the decrease in these cells over a two-year period, we favored the explanation that they were a transient manifestation of a tropical viral infection, but there was no supporting evidence for this suggestion.

The exotic nature of the population in which the finding was first encountered was scarcely conducive to thinking of this as a general phenomenon. Now, however, similar findings, of very rare, complexly abnormal cells, have been reported from three other laboratories. Hsu⁴ pictures one such metaphase, encountered in a lymphocyte culture of a normal person whose spontaneous chromosome breakage frequency was otherwise low. Fox et al⁵ observed among specimens from 153 commercial and sports divers studied in the United Kingdom, from each of whom 100 cultured lymphocytes were examined, one or more such cells in the preparations from each of six men. No such cells were observed in 127 controls. Tawn et al,⁶ in a study scoring 200 cultured lymphocytes from each of 12 presumably normal young subjects from the United Kingdom (10 men, 2 women), found such cells in two of the men; when the scoring of the preparations from these two was extended to 500 cells, there were 4 such cells in one man and 5 in the other. When the two persons were restudied three months later, among 500 cells scored from each there were no such cells. We suspect that others who have encountered these cells have been inhibited in reporting them because of their bizarre and inexplicable nature.

細胞200個当たりの約1個に、無数の染色体異常(二動原体及び三動原体)と断片の散在が認められたことを報告した。¹ その後の2年間では、異常細胞の頻度はこれよりはるかに低く、約5,000当たり1個であった。² 最初の観察では、損傷細胞の個体別頻度は一様でなく、全体としてPoisson分布に従わなかった。Cowell³は1982年に考察を行い、我々が観察した“断片の散在”が、放射線又は化学薬品、特にメソトレキセートで治療を受けたある悪性腫瘍患者の細胞に見られた“微小断片”に類似していると指摘した。しかし、癌の化学治療又はメソトレキセート処理後の培養細胞に見られる微小断片とは異なり、我々が観察した“微小断片”は、すべて単一細胞世代中に発生したものである。これらの細胞が2年間で減少したことから、我々は、これらは熱帯性ウイルス感染の一過性の発現であるという説明を支持したが、それを裏付ける根拠はなかった。

上記の所見が最初に得られた集団の特異な性格からみて、これが一般的現象であるとは考えにくい。しかし現在までに、極めてまれで、複雑な異常細胞に関する同様の所見が、他の三つの研究所から報告されている。Hsu⁴は、通常では自然染色体切断頻度が低いはずの健常者培養リンパ球中の1個にこの中期分裂像を認めている。Foxら⁵は、英国の潜水業者及びアマチュアダイバー153名について、1名当たり100個の培養リンパ球を検査し、そのうち6名の標本から、異常細胞をそれぞれ1個以上検出した。対照者127名には、この異常細胞は観察されなかった。Tawnら⁶は、英国の正常と思われる若齢者12名(男性10名、女性2名)から、それぞれ200個の培養リンパ球を観察し、男性2名に異常細胞を検出した。これら2名の標本の観察を500細胞にまで拡大すると、1名に4個の異常細胞が検出され、もう1名には同細胞が5個検出された。この2名を3か月後に再検査したときには、それぞれ500個の観察細胞中に、異常細胞は認められなかった。このような細胞を検出したその他の研究者は、それらが奇妙で、説明不可能なものであるため、それらを報告することを止められたのではないと思われる。

In this communication, we report on the occurrence of this phenomenon in still another (Japanese) population. The presence of such cells in normal Japanese has already been briefly alluded to by Awa et al,⁷ who observed among 24,414 cells cultured from adults with no known clastogenic experience, 5 cells "containing more than five exchange aberrations of unidentifiable nature" (~1 per 5,000 cells). Here we will describe observations on the frequency of these cells in preparations from 9,818 children of proximally and distally exposed survivors of the A-bomb, examined in the course of studies of the cytogenetic effects of the weapon.

MATERIAL AND METHODS

The population studied is about evenly divided between the children of a group of "proximally exposed" survivors of the A-bombing of Hiroshima (within 2,000 m of the hypocenter) and the children of a group of distally exposed survivors (2,500+m from the hypocenter). The proximally exposed survivors received from 1 rem of radiation up to the maximum consistent with survival; the distally exposed parents received essentially no radiation at the time of the bombing. These children were being studied in a search for evidence of transmitted chromosomal damage^{8,9}; the findings to be described were an incidental observation which, as we will see, is unrelated to the radiation history of the parents.

Venous blood samples were obtained in the usual fashion, with 0.1 ml of a 1,000 IU/ml solution of sodium heparin per 2-3 ml of blood as anti-coagulant. For culture, 2 ml of whole blood was combined with 10 ml of MEM (Eagle's medium plus 0.3 g/liter of glutamine) and 2 ml of heat-inactivated fetal bovine serum. Just prior to the initiation of incubation, 0.1 ml of phytohemagglutinin (PHA, Wellcome Co.) was added to the preparation. At 50 hours of incubation, 0.1 ml of a colchicine solution (0.4 µg/ml) was added to the preparation and incubation continued for another 2 hours. Cells were harvested and treated with a hypotonic solution (a mixture of one part 1% sodium citrate solution and one part 0.075 M KCl solution), then fixed with a methanol-acetic acid mixture; the preparation was flame-dried and stained with standard Giemsa solution (2%, pH 7.4-7.5). Usually 10 well-spread metaphases were scored from each subject,

本報で我々は、別の(日本人)集団におけるこの現象の発生について報告する。正常な日本人にこのような細胞が存在することは、阿波ら⁷によって既に略述されている。彼らは、染色体異常誘発歴のない成人培養細胞24,414個を調べ、"識別不能の交換型異常を5個以上含む細胞"を5個検出した(5,000細胞当たり約1個)。本報では、原爆の細胞遺伝学的影響に関する調査の過程で、近距離及び遠距離被爆者の子供9,818名の標本に認めたこれらの異常細胞の頻度について観察した結果を述べる。

材料及び方法

調査対象集団は、広島近距離被爆群(爆心地から2,000 m以内)の子供と遠距離被爆群(爆心地から2,500 m以遠)の子供ほぼ同数ずつで構成されている。近距離被爆者は、1 rem から生存のための最大許容限界までの放射線量を受けている。遠距離被爆者の被曝線量は基本的にゼロである。これらの子供に対する染色体損傷の遺伝性の証拠について調査したが、^{8,9} 本報告の所見は偶発的に観察された結果であり、後述するように、両親の放射線被曝歴とは無関係のものである。

静脈血標本は通常の方法で採取し、血液2~3 ml 当たり0.1 ml の1,000 IU/ml ヘパリン・ナトリウム溶液を抗凝固剤として添加した。培養用には全血2 ml に対しMEM(Eagle 培地にグルタミン0.3 g/l を添加)10 ml と熱不活性化牛胎仔血清2 ml を加えた。培養の開始直前に、0.1 ml のフィトヘマグルチニン(PHA, Wellcome 社)を標本に添加した。培養後50時間目に、コルヒチン液(0.4 µg/ml)0.1 ml を標本に添加し、更に2時間培養を続けた。細胞を採取し、低張液(1%クエン酸ナトリウム液と0.075 M KCl 液との1:1混合液)で処理した後、メタノール・酢酸混合液で固定した。標本は火焰乾燥法によって作成し標準ギムザ液(2%, pH 7.4~7.5)で染色した。対象者1名当たり、通常は良質の中期分裂像10個を観察

(see Awa et al⁹ for further discussion of methods).

RESULTS

Over an 18-year period a total of 102,170 cells derived from 9,818 persons have been examined (Table 1). Twenty-four of these cells have exhibited the extreme degree of chromosomal damage pictured in Figure 1. We have termed these rogue cells. The findings characteristic of the remaining cells in these preparations have been (in part) described by Awa et al⁹; there are no intergradations between these highly abnormal cells and cells exhibiting what might be termed the usual chromosomal damage (as well as numerical aberrations) encountered in persons not exposed to a clastogenic agent. Although it is difficult to be precise, there appear to be about 46 centromeric regions in each of these abnormal cells, i.e., they are essentially diploid. The number of (paired) fragments is difficult to score accurately but we estimate that it ranges from 2 to more than 10 per cell. The damage exhibited by the average rogue cell in the present series is at least as great as that encountered in Amerindians by Bloom et al¹ or as pictured by Fox et al.⁵

した(方法の詳細については阿波ら⁹を参照)。

結 果

18年間の観察により9,818名から合計102,170個の細胞を検査した(表1)。このうち24個の細胞は、図1に示すような重度の染色体損傷を示している。我々はこれらを“変性”細胞と命名した。これらの標本のうちの残りの細胞に見られた所見の一部が阿波ら⁹によって述べられている。このような極めて異常な細胞と、染色体異常誘発因子に暴露されていない人に見られる、通常の染色体損傷(並びに数的異常)と呼ばれる現象を示す細胞との間には、相互移行は認められなかった。正確に言うことは困難であるが、これらの各異常細胞には約46個の動原体があると思われる。すなわち、本質的には二倍体である。(対をなす)断片の数を正確に算定することは困難であるが、細胞1個当たり2から10以上であると推定している。本研究における平均的変性細胞の損傷度は、少なくとも、Bloomら¹がアメリカ原住民に観察した損傷、又はFoxら⁵が報告した損傷を示す図とは同程度のものである。

TABLE 1 FREQUENCY OF OCCURRENCE OF ROGUE CELLS IN 102,170 ARRESTED METAPHASE PREPARATIONS OBSERVED FROM HIROSHIMA JAPANESE AGED 9 TO 37

表1 9～37歳の広島在住の日本人から得た102,170個の中期分裂像における変性細胞の発生頻度

Sex	No. of cases	No. of cells examined	No. of rogue cells	Rate per cell	No. of carriers	Rate per person
Males	4732	49420	16	0.33×10^{-3}	16	3.38×10^{-3}
Females	5086	52750	8	0.15×10^{-3}	8	1.57×10^{-3}
Total	9818	102170	24	0.23×10^{-3}	24	2.44×10^{-3}

In the original series, among the 24 persons exhibiting these cells, only one such abnormal cell was observed among the 10 cells scored per individual (Table 2). (Early in the series, sometimes more than 10 cells from one individual were “routinely” scored.) Following the observation of a rogue cell, additional cells were, where possible, scored in those persons exhibiting the finding, up to the total number indicated in parentheses in column 5 of Table 2. In six

本シリーズの本体部分の研究によれば、変性細胞を示す24例において、最初の10細胞中にこの異常細胞は1個しか観察されなかった(表2)。(本研究の初期には、1名当たり10個以上の細胞が“通常”観察の対象であった。)変性細胞が観察された場合、変性細胞保有例について可能な限り観察細胞数を増加した(表2第5欄の括弧内にその総数を示した)。表2から分かるように、6例にはその他にも変性細胞

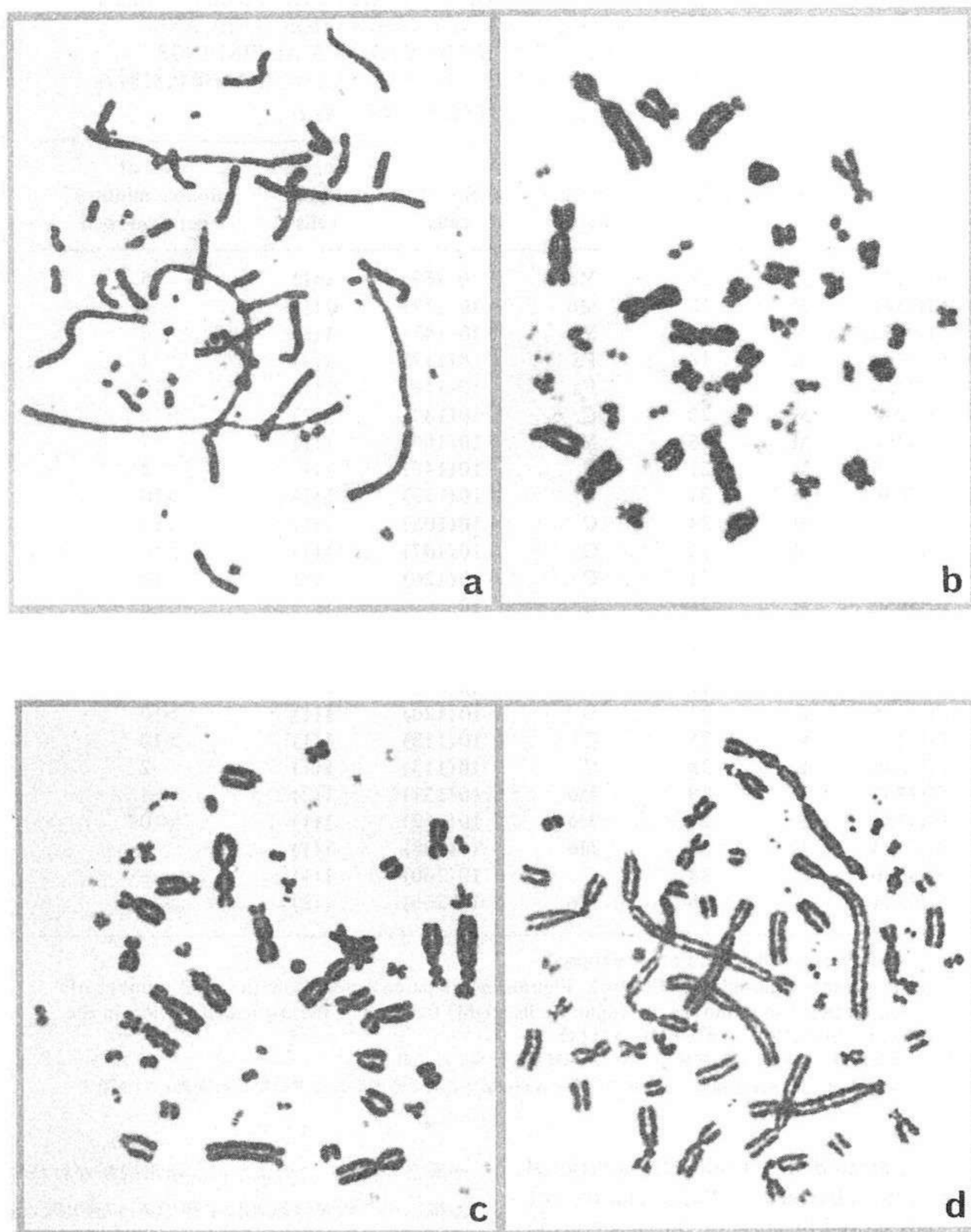


Figure 1. Photomicrographs of arrested metaphases demonstrating rogue cells. Source of specimens as follows: a. FH3158 (male, aged 19), b. FH6231 (male, aged 31), c. and d. FH9824 (female, aged 15).

図1. 変性細胞を示す中期分裂像の顕微鏡写真. 標本の出所は次のとおり: a. FH 3158 (男性, 19歳), b. FH 6231 (男性, 31歳), c. 及びd. FH 9824 (女性, 15歳).

TABLE 2 A LISTING OF HIROSHIMA SUBJECTS EXHIBITING ROGUE CELLS CLASSIFIED BY SEX, AGE AT TIME OF EXAMINATION (ATE), AND PARENTAL EXPOSURE STATUS, WITH CYTOLOGICAL FINDINGS

表2 細胞学的所見に基づく性、検査時年齢 (ATE) 及び両親の被爆状況別の分類による広島の変性細胞保有例一覧表

Case no.	Sex	ATE	Exposure status	No. of cells	No. of rogue cells	No. of "double minutes" per rogue cell
FH0145	M	18	Mo	30 (69)	1(1)	5
FH0541	M	18	Mo	10 (37)	1(1)	4
FH0632	M	20	Mo	10 (47)	1(2)	4
FH2748	M	18	Fa	10(117)	1(1)	4
FH3158	M	19	Fa	10(114)	1(1)	>10
FH3212	M	20	C	10(132)	1(2)	>10
FH3460	M	26	Mo	10(109)	1(1)	>7
FH3585	M	27	C	10(140)	1(1)	2
FH5030	M	31	C	10(153)	1(1)	>10
FH5839	M	24	C	10(105)	1(1)	>10
FH5951	M	33	C	10(107)	1(2)	>10
FH6231	M	31	C	10(126)	1(3)	>10
FH6654	M	28	C	10	1	6
FH7500	M	35	C	10	1	>10
FH8278	M	16	Fa	10	1	3
FH8540	M	15	C	10	1	4
FH2995	F	23	C	10(120)	1(1)	>10
FH3185	F	25	C	10(118)	1(1)	>10
FH3546	F	28	C	10(113)	1(1)	2
FH3767	F	29	Mo	10(131)	1(2)	>4
FH4583	F	26	Mo	10(112)	1(1)	>10
FH5753	F	30	Mo	10(108)	1(1)	7
FH8590*	F	33	C	10(200)	1(1)	3
FH9824	F	15	Mo	10(200)	1(2)	>10

Mo: Mother exposed. Fa: Father exposed.

B: Both parents exposed. C: Control. Figures in the parentheses show the total number of cells scored (left) and number of "rogue" cells (right) for each of the rogue-cell carriers in the extended observation. *45, x/46, x, r(x)

Mo: 母親被爆. Fa: 父親被爆. B: 両親被爆. C: 対照者.

括弧内の数字は、観察細胞総数 (左) 並びに拡大観察における各変性細胞保有者の変性細胞数 (右) を示す。

persons, as indicated in Table 2, additional rogue cells were observed. Thus, among the additional cells scored because of the observation of a single rogue cell among the 10 routinely scored, there were 7 rogue cells among 2,138 cells. This frequency is clearly higher than the originally observed frequency ($\chi^2 = 65.1$, $df = 1$, $P < 0.001$) and indicates a nonrandom distribution of the phenomenon among individuals. This confirms the experience of Bloom et al¹ and Tawn et al.⁶

EPIDEMIOLOGIC ANALYSES

The data can be considered from a number of epidemiologic standpoints, as follows:

が観察された。このように、通常観察が行われた10個の細胞のうち変性細胞は1個であったので、追加観察細胞2,138個中の7個が変性細胞であった。これは、最初の観察頻度 ($\chi^2 = 65.1$, $df = 1$, $P < 0.001$) より明らかに高く、変性細胞が対象者中に非ランダムに分布していることを示す。この所見は、Bloomら¹及びTawnら⁶の報告と一致している。

疫学的解析

得られたデータは、以下に記述するように幾つかの疫学的観点から検討した。

Sex. The series from which individuals exhibiting these cells is drawn is approximately evenly divided as to sex (4,732 M : 5,086 F); there is a borderline preponderance of males among those exhibiting this finding; 16 M : 8 F ($\chi^2 = 3.30$, $df = 1$, $0.05 < P < 0.10$).

Age. The mean age of persons exhibiting rogue cells is 24.5 ± 6.2 years ($M \pm \sigma$); the mean age of persons without such cells is 23.4 ± 6.3 years. This observation, in conjunction with the earlier observation cited in the Introduction,⁷ would seem to exclude an age effect.

Exposure of Parents to A-bombs. For the total sample, one or both parents of the child had been proximally exposed to the A-bomb in 4,700 cases, and distally exposed (beyond the zone of significant radiation release) in 5,094 cases. For the children exhibiting these cells, the corresponding figures are 11 and 13 ($\chi^2 = 0.06$, $df = 1$, $0.80 < P < 0.90$).

Secular Trend. We have searched for a secular trend in two ways. Table 3 presents the findings with reference to year of study. The data of Table 3 have been grouped by year of study in such a way as to yield four samples of approximately equal size. The result is shown in Table 4. There is no evidence of heterogeneity by year. A second approach is to examine the interval in the series between individuals exhibiting positive findings. This can be accomplished from Table 2 because the samples were numbered consecutively as acquired. The results are plotted in Figure 2. There is no evidence for a grouping; the data conform to expectation based on a Poisson process ($\chi^2 = 2.65$, $df = 2$, $0.20 < P < 0.30$).

Season. The possibility of a seasonal effect has been examined by grouping the positive findings by month of sampling as follows: December-February, March-May, June-August, and September-November. The results are 5, 10, 4, and 5, respectively. This does not differ from the distribution for the total sample, for which the corresponding figures are 2,449, 2,773, 2,232, and 2,364 ($\chi^2 = 2.20$, $df = 3$, $0.50 < P < 0.7$).

Storage Effect. The blood samples were usually processed immediately upon collection, except those collected at the "Thursday night clinic" (the only night clinic). After they had been

性別. 変性細胞に関する本研究シリーズ対象者の性比はほぼ等分(男性4,732名:女性5,086名)されるが,変性細胞保有者間では男性の方がわずかに優位を示した.すなわち,男性16名:女性8名であった($\chi^2 = 3.30$, $df = 1$, $0.05 < P < 0.10$).

年齢. 変性細胞保有者の平均年齢は 24.5 ± 6.2 歳($M \pm \sigma$)であり,同細胞をもたない者の平均年齢は 23.4 ± 6.3 歳である.この観察結果は,緒言に引用した初期の観察結果⁷とともに,年齢の影響を否定するものと思われる.

両親の原爆被爆状況. 対象集団全体で見ると,片親又は両親が近距離被爆者である子供は4,700名,遠距離被爆者(有意放射線量地域以遠での被爆)の子供は5,094名であった.変性細胞を有する子供の場 合,上述に対応する人数は,それぞれ11名と13名であった($\chi^2 = 0.06$, $df = 1$, $0.80 < P < 0.90$).

年次的推移. 二つの方法で年次的推移を求めた.表3は,観察所見を研究年度別に示したものである.表3のデータは研究年度別に分類し,ほぼ同じ大きさの群が四つ得られるようにした.その結果を表4に示す.年度別には差異はない.第二の方法は,本シリーズで各陽性対象者の観察時期の間隔を調べることである.表2では,このような対象者に対して観察順に番号を付与してあるので,同表からその間隔を調べることができる.その結果は図2に示した.区分しなければならぬ差は認められない.このデータは,Poisson過程に基づく推定($\chi^2 = 2.65$, $df = 2$, $0.20 < P < 0.30$)と一致する.

季節. 陽性所見例を,サンプル抽出の月別に12-2月,3-5月,6-8月及び9-11月とグループ分けして季節的影響の可能性を調べた結果,それぞれ5,10,4及び5件となった.これは,集団全体における分布〔上記に対応する数は,2,449,2,773,2,232及び2,364($\chi^2 = 2.20$, $df = 3$, $0.50 < P < 0.70$)〕と差異は認められない.

保存の影響. 血液標本は,“木曜日の夜間診察”(唯一の夜間外来)で採取されたもの以外は,通常,採取直後に処理した.木曜日の夜間診察時に得た

TABLE 3 DISTRIBUTION OF POSITIVE FINDINGS BY
YEAR OF EXAMINATION

表3 陽性所見の検査年度別分布

Year	Subjects examined			Subjects with rogue cells
	Males	Females	Total	
1967	26	32	58	1
1968				
1969	154	148	302	2
1970	232	242	474	
1971	355	340	695	
1972	118	109	227	
1973	193	231	424	
1974	115	149	264	
1975	98	129	227	1
1976	253	294	547	4
1977	290	275	565	4
1978	299	372	671	1
1979	462	500	962	1
1980	423	548	971	4
1981	499	554	1053	2
1982	577	582	1159	3
1983	489	416	905	
1984	149	165	314	1
Total	4732	5086	9818	24

TABLE 4 AN ANALYSIS OF THE CORRELATION BETWEEN YEAR OF BLOOD
COLLECTION AND THE FREQUENCY OF CARRIERS OF ROGUE CELLS.
NUMBERS IN PARENTHESES INDICATE EXPECTATION IF THE PERSONS
EXHIBITING ROGUE CELLS WERE RANDOMLY DISTRIBUTED IN TIME

表4 採血年度と変性細胞保有者頻度との相関関係の解析。括弧内の数字は、
変性細胞保有者が経時的にランダムに分布する場合の期待値を示す

	Year of analysis				Σ
	1967-73	1974-78	1979-81	1982-84	
Normal	2177	2264	2979	2374	9794
Affected	3(5.32)	10(5.55)	7(7.29)	4(5.80)	24
Total	2180	2274	2986	2378	9818
	$\chi^2 = 5.156$	df = 3	0.10 < P < 0.20		

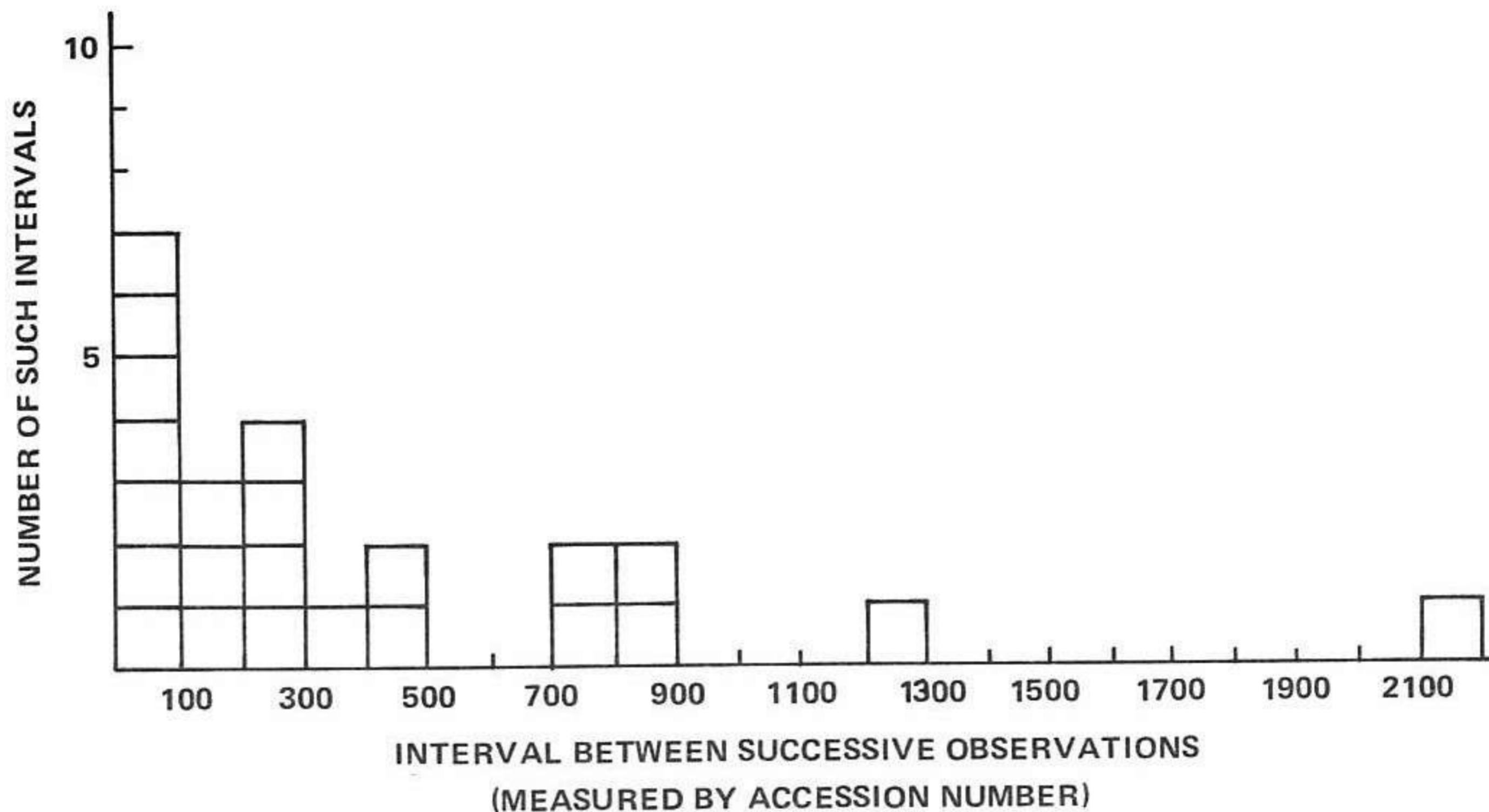


Figure 2. Interval between encountering individuals exhibiting one or more rogue cells, as measured by consecutively assigned sample accession numbers.

図2. 連続的に付与された標本アクセス番号から測定した1個以上の変性細胞保有者が観察された時期の間隔。

mixed with the culture medium, these Thursday night samples were refrigerated for 36-40 hours before processing. Analyzing the data, we found that 22 (92%) of the 24 samples exhibiting rogue cells were collected on a Thursday night. On the other hand, analysis of all the samples for time of collection reveals that 4,390 (45%) of 9,818 were collected on Thursdays ($\chi^2 = 21.5$, $df = 1$, $P < 0.001$). This "epidemiologic clue" is difficult to evaluate. A small scale experiment, involving refrigerating blood samples for an additional 24 hours, yielded no increase in minor chromosomal aberrations over the laboratory standard in 4,179 scored cells, nor were any rogue cells observed. While a storage effect may be implicated, it can scarcely be regarded as causative per se, but at most as triggering this phenomenon in sensitive cells.

DISCUSSION

It now seems clear that the rogue cell phenomenon is widespread, having been recorded in North and South America, England, and Japan. It is possible we have missed others, passing references to such cells in the voluminous literature of human cytogenetics. The data strongly suggest that the phenomenon is non-randomly distributed among individuals, in whom it peaks and then declines.

標本は、培地と混合した後、培養を開始する前に36~40時間冷蔵した。データを解析してみると、変性細胞を有する24標本のうち22標本(92%)が木曜日の夜間外来患者から採取したものであることが分かった。一方、全標本の採取時間を調べたところ、9,818標本中4,390標本(45%)が木曜日に採取したものであった($\chi^2 = 21.5$, $df = 1$, $P < 0.001$)。この“疫学的手掛かり”を評価することは難しい。24時間の血液標本冷蔵を含む小規模実験では、4,179個の観察細胞に、通常の観察基準を超える小規模の染色体異常の増加は見られず、変性細胞の増加もまた観察されなかった。保存の影響はあるかもしれないが、保存自体が異常の原因になるとはほとんど考えられず、せいぜい感受性の高い細胞において、このような現象の誘因になるものと考えられる。

考 察

変性細胞は南北アメリカ、英国及び日本で記録されているので、これが現在では一般的な現象であることは明瞭であると思われる。しかし、人類細胞遺伝学の膨大な文献の中で、変性細胞に関する記述を我々が見落としている可能性はある。このようなデータは、この現象が各個体に非ランダムに分布し、個体内で頂点に達した後、減少することを強く示唆している。

The cause of these extraordinary cells remains completely mysterious. Somewhat comparable cells have been produced experimentally by temporary extreme folic acid and/or thymine deficiency,¹⁰⁻¹² but the aberrant karyotypes result from multiple chromatid rather than chromosome breaks. It seems beyond consideration that the cells we are describing could be primarily artifacts of the culture technique. None of the epidemiologic clues available to us - effect of sex, age at examination, or year or season of examination - are helpful. The biological significance of the "Thursday night clinic" effect mentioned above is obscure. Although specific culture conditions might to some extent trigger or intensify the phenomenon, given the experience and standardization of cytogenetic procedures in the various laboratories in which the phenomenon has been encountered, it is difficult to attribute the nonrandomness of the finding solely to variations in the way individual samples are processed. The cells which have been described and pictured thus far could very seldom complete a cell division without severe aneuploidy in the daughter cells. Accordingly, it seems almost certain the chromosomal events leading to the findings occurred in the interval following the last successful cell division. The striking difference between these cells and the other cells of the same person suggests the action of some highly localized factor. Among the possible explanations are the following:

1. Hsu⁴ suggested "a defective DNA synthesis system, probably as the result of a mutation." We have difficulty visualizing a single mutation with such an instantaneously deleterious effect, even if it occurs in a cell which is already heterozygous for this mutation, so that the defective cell is homozygous deficient. Furthermore, the response to PHA is normal and DNA appears to have been synthesized in at least the usual amount in these cells.

2. A second formal explanation could be, as we suggested earlier,¹ the effect of a virus whose action was limited to a relatively few cells, but such localization of what is obviously a very disruptive influence in a viral infection is difficult to visualize.

3. One can speculate on an etiologic role for some highly localized clastogenic agent, such as

このような異常細胞の原因は全く不明のままである。葉酸若しくはチミン量を一時的に極度に飢餓状態にすることにより、変性細胞に幾らか匹敵する細胞を実験的に産生することはできるが、¹⁰⁻¹² 異常核型は、染色体切断よりも、むしろ多発的な染色分体の損傷から生じる。これら変性細胞が、培養法に起因する第一義的な人為的産物であるとは到底考えられない。性、検査時年齢、検査の年度又は季節の影響などの各種疫学的手掛かりのどれもが、その誘因であるとは思われない。上述の"木曜日の夜間診察"の影響の生物学的意義は不明確である。異常細胞を観察した各研究室における経験と細胞遺伝学的技法の標準化から考えて、特定の培養条件が異常をある程度誘発したか若しくはそれを助長する推進力を与えたかもしれないが、このような所見の非ランダム性を、各標本の処理法の差のみに帰することは困難である。現在までに報告され写真で示されている細胞では、娘細胞に重度の異数性をもたらすことなしに細胞分裂を完了し得ることはほとんどない。したがって、細胞異常に至る染色体変化が、最後の正常細胞分裂後の期間に起こったことはほぼ間違いないと思われる。同一人物の変性細胞とその他の細胞との間に認められる顕著な差異は、何らかの極めて極在的な因子の作用を示唆する。これを説明するものとして、次に示す可能性が考えられる。

1. Hsu⁴ は「恐らく突然変異の結果、DNA 合成システムに欠陥が生じた」と示唆した。即効的な有害影響を示す突然変異に対して、既にヘテロ接合の状態にある細胞に起こる場合であったとしても、そのような単一突然変異を想定することは困難であることから、この欠陥細胞はホモ接合型の欠損を示すものと思われる。更にこれらの細胞においては、PHA に対する反応性は正常であり、少なくとも正常量の DNA が合成されるものと思われる。

2. 第二の正式な説明としては、我々が以前に示唆したように、¹ 比較的少数の細胞に限定的に作用するウイルスの影響が考えられるが、ウイルス感染の過程で明らかに極めて破壊的な影響をもたらす極在性を認めることも困難である。

3. α 粒子を放出する放射性物質のリンパ節沈着の

the deposition in a lymph node of an alpha-particle-emitting radioactive element. The difficulty with this suggestion is, again, the apparent absence of cells exhibiting intermediate levels of damage between this extreme picture and the 'usual' damaged cell, with, for example, a dicentric and a fragment, or several chromatid breaks. Furthermore, such cells were not observed in chromosome studies of workers with a significant body burden of plutonium.¹³

4. A fourth possible explanation stems from the fact that interchange between sister chromatids and between homologous chromosomes is a normal phenomenon of somatic cells. The average normal lymphocyte manifests some 6.7 ± 1.35 sister chromatid exchanges per cell cycle in this laboratory. Furthermore, studies on chromosomal behavior in patients with retinoblastoma, using restriction fragment length polymorphisms on chromosome 13, suggest the occurrence of somatic cell crossing-over between homologues,¹⁴ comparable to the well-known phenomenon of somatic cell crossing-over in *Drosophila*.¹⁵ The complexity of the rearrangements is such as might result from a malfunctioning of the poorly understood process responsible for both sister chromatid exchange and somatic cell crossing-over, such as a failure in the usual specificity of DNA ligase action. Schimke et al¹⁶ have recently reviewed the evidence that a breakdown in the "replication control" of DNA, either spontaneously or induced by some extraneous agent, such as hydroxyurea, results in over-replication of DNA and thus a variety of chromosomal aberrations, ranging from small duplications to complex chromosomal rearrangements and minute chromosomes. It is tempting to view the phenomenon we are describing as the extreme in the spectrum of effects associated with this breakdown, but we are troubled in pursuing this explanation (as was true for the other explanations) by the absence of cells exhibiting intermediate levels of damage, and also by the wavelike nature of the phenomenon in the absence of epidemiologic clues. In this connection, the strong mitotic influence exerted by PHA might exaggerate the basic phenomenon involved but, given the other features of our findings, can scarcely be the responsible agent, per se.

The frequency of this phenomenon in the lymphoid lineage at the time of a "wave" cannot

ように、何らかの極めて極在的な染色体異常誘発因子が原因となる可能性も推測される。この推論の問題点は、重度の異常を示す細胞と、二動原体及び断片又は幾つかの染色分体切断をもつような"通常"の損傷を有する細胞との間の中間型の損傷細胞が認められないことである。更に、プルトニウムによる有意線量の被曝労働者の染色体研究¹³においても、このような中間型の損傷細胞は観察されてはいない。

4. 第四の説明の根拠は、姉妹染色分体間並びに相同染色体間の相互交換は、体細胞の正常な現象であるという事実である。当研究室においては、平均的正常リンパ球中の姉妹染色分体交換頻度は、1細胞周期当たり約 6.7 ± 1.35 個である。更に、染色体No. 13に対する制限断片の長さの多型(RFLP)を用いた網膜芽腫患者の染色体の動態に関する研究によれば、相同染色体間の体細胞交差の発生はショウジョウバエにおける体細胞交差¹⁵という周知の現象に匹敵することを示唆するものである。¹⁴ このような再配列の複雑さは、ほとんど知られていないが、姉妹染色分体交換や体細胞交差双方の原因となる過程の機能不全、例えばDNAリガーゼ作用の特異性の不全などの結果生じる可能性がある。最近、Schimkeら¹⁶は、自然発生又はヒドロキシ尿素などの作用による外来因子で誘発されたDNAの"複製調節"の障害が、DNAの過剰複製をもたらし、ひいては小規模の重複から複雑な染色体再配列や、微小染色体に至る種々の染色体異常を引き起こすという観察結果について検討を行った。本報で我々が述べている現象が、この障害に関連した一連の影響の極端な例であると考え誘惑に駆られるが、中間型の損傷を示す細胞がないこと、また、この現象の発生が疫学的手掛かりがないままに波状的であることから、(他の説明の場合と同様)この説明を支持することも困難である。これに関連してPHAが有糸分裂に与える強い影響はこの基礎的現象を増大させるかもしれないが、我々の所見のその他の事例から考えると、これ自体が原因である可能性はほとんどない。

波状に生じた時点でのリンパ系におけるこの現象の

be estimated with any accuracy at present. There must be a rather low probability that even the least striking of these cells can successfully complete the mitotic process, certainly less than 1%. Thus, if these cells are responding to the normal mitotic stimulus (and not simply accumulating), then in persons in whom the rogue cell phenomenon is peaking the frequency of origin of such cells should be substantially higher than one in several hundred cells observed by various investigators.

Whether this phenomenon occurs in other types of somatic cells, and its long-range consequences, can only at present be the subject of speculation. Malignant cells of different types often manifest complex and somewhat specific patterns of chromosomal rearrangement. The possibility must be considered that the small fraction of these rogue cells which survive their first mitotic division may in some instances by virtue of rearrangement-activated oncogenes become the basis for a malignant clone of cells.

It is not yet established whether the phenomenon occurs in germ cells, although the reports of rare children with multiple chromosomal abnormalities¹⁷ may suggest this to be the case. If it is a phenomenon of the germ line, one could visualize in the population of damaged cells a spectrum of severity, with some of the least damaged cells able to navigate meiosis successfully. If the resulting gamete possessed an unbalanced chromosomal composition, the result would be a grossly defective child; some of these might survive to term. In the rare case of gametes which emerge from this event with a balanced genome, the result could be the type of chromosomal reorganization which figures so largely in evolutionary speculation. Given that the phenomenon occurs in bursts, it is difficult to estimate an 'average' frequency of germ cells resulting from this event, but were the event of the same order of frequency in the spermatogonia as may be the case for somatic cells in the present series and should even 10^{-2} of these (the less damaged) successfully complete meiosis and emerge with a balanced genome, this would constitute a frequency to be reckoned with in evolutionary thought.

Schimke et al¹⁶ have recently expressed similar thoughts concerning a role of a breakdown in the "replication control" of DNA in carcino-

頻度は、現在のところ正確に推定することはできない。これらの細胞のうち、最も異常度の低いものでも有糸分裂を支障なく行う確率はかなり低いはずであり、確実に1%未満である。したがって、このような細胞が(単に蓄積するのではなく)正常な有糸分裂の刺激に反応するものであれば、変性細胞現象がピークに達している人においては、そのような細胞の発生頻度は、他の多くの研究者によって観察されている数百細胞当たり1個という頻度よりも相当高いはずである。

この現象が他の種類の体細胞に起こるのかどうかという点並びにその長期的影響は、現在のところ推測の域を出ない。悪性細胞は、種類が異なるとしばしば複雑で、それぞれに特有な染色体再配列パターンを示す。最初の有糸分裂から生き残った少数の変性細胞が、ある場合には、再配列によって活性化された発癌遺伝子により、悪性細胞クローンの基礎になるという可能性も考慮すべきである。

この現象が生殖細胞に起こるかどうかはまだ究明されていないが、複合染色体異常を有するまれな子供についての報告¹⁷がこれを示唆するかもしれない。これが生殖細胞系の現象であれば、損傷細胞集団において損傷度の範囲が認められる。ただし、損傷度の最も低い細胞の幾つかは減数分裂を支障なく行う可能性がある。その結果による配偶子の染色体構造が不均衡であれば、子供は肉眼で分かる欠陥児となるであろう(このような子供の一部は出生まで生き残るかもしれない)。均衡のとれたゲノムをもち、このような現象から生き残ったまれな配偶子においては、進化論的立場からみて極めて顕著な染色体再構成が行われることになるかもしれない。この現象が一挙に起これば、その結果生ずる生殖細胞の'平均的'頻度を推定することは困難であるが、しかしこの現象が、本研究シリーズにおける体細胞の場合と同じような頻度で精原細胞に起こったとすれば、また、これらの細胞(損傷度の低いもの)のうち1/100レベルの確率でも減数分裂を支障なく行い、均衡のとれたゲノムをもつとすれば、このような頻度は進化論的考察の対象となろう。

Schimke ら¹⁶は最近、発癌及び進化におけるDNAの

genesis and evolution. It would be of extreme interest to establish whether the phenomenon we are describing is in fact the extreme in the spectrum of effects to be associated with this breakdown.

How general the rogue cell phenomenon is throughout the animal and plant kingdom remains to be determined. No other species has been subjected to the amount of karyotyping of presumably normal cells as the human species. A phenomenon of this rarity could easily have escaped attention in even such genetically well-studied organisms as *Drosophila* and the mouse. Burdensome though the undertaking would be, it would be of great interest to generate comparable data from the mouse. Although the nature of the mouse karyotype has posed difficulties for classical cytogenetics, the phenomenon under discussion should be readily recognizable.

The appearance of numerous "double minutes" in cells, in vivo or in vitro, which have not been subjected to a clastogen is commonly interpreted as the result of cumulative amplification of specific chromosomal segments in response to some noxious agent. In this instance, these double minutes have come into existence in a single generation, in a cell whose exposure to a noxious agent can scarcely be as different from all the rest of the cells as this interpretation would imply. A considerable fraction must be the type of fragment which results at the time of formation of a dicentric. Whether in addition some are the consequence of an abortive replication procedure remains to be determined. Studies of DNA content should be helpful in deciding this question.

"複製調節" 障害の役割に関して、同様の考えを述べている。本報で述べている現象が、実際にこの障害と関連する一連の影響の極端な例であるかどうかを究明することは、極めて興味深い試みである。

この変性細胞現象が、動物界及び植物界を通じてどの程度普遍的なものであるかはまだ分かっていない。これまでに、ヒトと同程度の正常と思われる細胞の核型分析を受けた種は他にない。このようにまれな現象は、ショウジョウバエやマウスのように遺伝学的によく研究されている生物においても、容易に見落とされてきた可能性がある。困難な仕事であるとしても、マウスから比較可能なデータを得ることは極めて興味深いことである。古典的な細胞遺伝学によるマウスの核型分析には困難な問題があるが、本報にみられるような現象は容易に識別されるはずである。

体内又は試験管内において、染色体異常誘発因子に暴露していない細胞中に大量の"微小断片"が発生するのは、一般的には、特定の染色体部分は何らかの有害因子に反応し、累積的に増幅した結果であると解釈されている。この場合、微小断片は本解釈が示唆するように、その他すべての細胞の場合とほぼ同じように一細胞世代中の有害因子への暴露によって発生している。その大部分は、二動原体の形成時に生ずる断片と同類のはずである。更に、そのうちの幾つかが不完全複製の過程によるものかどうかはまだ明らかでない。この問題を解決するには、DNA量に関する研究が役立つはずである。

REFERENCES

参考文献

1. BLOOM AD, NEEL JV, CHOI KW, IIDA S, CHAGNON NA: Chromosome aberrations among the Yanomama Indians. *Proc Natl Acad Sci USA* 66:920-7, 1970
2. BLOOM AD, NEEL JV, TSUCHIMOTO T, MEILINGER K: Chromosomal breakage in leukocytes of South American Indians. *Cytogenet Cell Genet* 12:175-86, 1973
3. COWELL JK: Double minutes and homogeneously staining regions: Gene amplification in mammalian cells. *Ann Rev Genet* 16:21-59, 1982
4. HSU TC: Genetic instability in the human population: A working hypothesis. *Hereditas* 98:1-9, 1983
5. FOX DP, ROBERTSON FW, BROWN T, WHITEHEAD AR, DOUGLAS JDM: Chromosome aberrations in divers. *Undersea Biomed Res* 11:193-204, 1984
6. TAWN EJ, CARTMEL CL, PYTA EMT: Cells with multiple chromosome aberrations in control individuals. *Mutat Res* 144:247-50, 1985
7. AWA AA, SOFUNI T, HONDA T, ITOH M, NERIISHI S, OTAKE M: Relationship between the radiation dose and chromosome aberrations in atomic bomb survivors of Hiroshima and Nagasaki. *J Radiat Res* 19:126-40, 1978 (RERF TR 12-77)
8. AWA AA, BLOOM AD, YOSHIDA MC, NERIISHI S, ARCHER PG: Cytogenetic study of the offspring of atomic bomb survivors. *Nature* 218:367-8, 1968 (ABCC TR 6-68)
9. AWA AA, HONDA T, OHTAKI K, NAKANO M, OTAKE M, HAMILTON HB: Cytogenetic study of the children of A-bomb survivors: A further report. *Jpn J Hum Genet* 23:290, 1978
10. GLOVER TW: In *Cytogenetics of the Mammalian X Chromosome, Part B*, ed by A.A. Sandberg. New York, Alan R. Liss Inc., 1983. pp415-30
11. AYUSAWA D, SHIMIZU K, KOYAMA H, TAKEISHI K, SENO T: Accumulation of DNA strand breaks during thymineless death in thymidylate synthase-negative mutants of mouse FM3A cells. *J Biol Chem* 258:12448-54, 1983
12. HORI T, AYUSAWA D, SHIMIZU K, KOYAMA H, SENO T: Chromosome breakage induced by thymidylate stress in thymidylate synthase-negative mutants of mouse FM3A cells. *Cancer Res* 44:703-9, 1984
13. TAWN EJ, HALL JW, SCHOFIELD GB: Chromosome studies in plutonium workers. *Int J Radiat Biol* 47:599-610, 1985
14. CAVENEE WK, DRYJA TP, PHILLIPS RA, BENEDICT WF, GODBOUT R, GALLIE BL, MURPHREE AL, STRONG LC, WHITE RL: Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305:779-84, 1983
15. STERN C: Somatic crossing-over and segregation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 21:625-730, 1936
16. SCHIMKE RT, SHERWOOD SW, HILL AB: In *Evolutionary Perspectives and the New Genetics*, ed by H. Gershowitz. New York, Alan R. Liss Inc., 1985. (in press)
17. PAI GS, THOMAS GH, MAHONEY W, MIGEON BR: Complex chromosome rearrangements. Report of a new case and literature review. *Clin Genet* 18:599-610, 1980