

FREQUENCY OF SOMATIC CELL MUTATIONS AT THE GLYCOPHORIN A
LOCUS IN ERYTHROCYTES OF ATOMIC BOMB SURVIVORS

原爆被爆者の赤血球におけるグリコフォリン A 遺伝子座の
体細胞突然変異頻度

NORI NAKAMURA, Ph.D. 中村 典
MITOSHI AKIYAMA, M.D. 秋山 實利
SEISHI KYOIZUMI, Ph.D. 京泉 誠之
RICHARD G. LANGLOIS, Ph.D.
WILLIAM L. BIGBEE, Ph.D.
RONALD H. JENSEN, Ph.D.
MICHAEL A. BEAN, 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 thank Mr. Robert R. Delongchamp of Department of Statistics for his kind help in the statistical analysis of the results.

結果の統計解析に御協力いただいた統計部 Robert R. Delongchamp 研究員に深謝する。

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

本報に基づく論文は下記の雑誌に掲載された。

Science 236: 445-8, 1987

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、日米専門職員、顧問、諮問機関の要求に応えるための日英両語による公式報告記録である。業績報告書は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 OF SOMATIC CELL MUTATIONS AT THE GLYCOPHORIN A
LOCUS IN ERYTHROCYTES OF ATOMIC BOMB SURVIVORS原爆被爆者の赤血球におけるグリコフォリン A 遺伝子座の
体細胞突然変異頻度NORI NAKAMURA, Ph.D. (中村 典); MITOSHI AKIYAMA, M.D. (秋山 實利);
SEISHI KYOIZUMI, Ph.D. (京泉 誠之); RICHARD G. LANGLOIS, Ph.D.*;
WILLIAM L. BIGBEE, Ph.D.*; RONALD H. JENSEN, Ph.D.*; MICHAEL A. BEAN, M.D.Department of Radiobiology
放射線生物学部

SUMMARY

A recently developed assay was used to measure the frequency of somatic cell mutations in atomic bomb survivors at Hiroshima. In this assay the frequency of variant erythrocytes produced by erythroid precursor cells with gene expression-loss mutations at the polymorphic glycophorin A (GPA) locus was measured. Significant correlations between variant cell frequency (VF) and estimated A-bomb exposure dose were observed for three different variant cell phenotypes. The spontaneous and induced VFs obtained in this study agree well with measures of radiation-induced mutagenesis in other systems, strongly supporting a mutational origin for GPA-loss variant cells, and suggesting that the GPA system may provide a cumulative dosimeter of past radiation exposures. These results provide clear evidence for persistent elevations of specific locus mutations in A-bomb survivors. VFs for some donors differ dramatically from the calculated dose response, and these deviations appear to primarily result from statistical fluctuations in the number of mutations in the stem cell pool. Analysis of these statistical fluctuations provides an estimate of the number of long-lived hematopoietic stem cells in humans.

INTRODUCTION

The recent accident at the nuclear reactor in Chernobyl, USSR, has heightened interest in the long-term health consequences of human

要 約

最近開発された体細胞突然変異検出法を用いて、広島市の原爆被爆者について調査を行った。この調査では、赤血球前駆細胞における多形性グリコフォリン A (GPA) 遺伝子座のヌル型突然変異の結果生じた変異赤血球の頻度を測定した。3種類の異なる変異表現型に関して、変異細胞頻度と被曝線量との間に有意な相関関係が観察された。その自然変異頻度と誘発変異頻度の大きさは、ほかの系の放射線誘発突然変異の結果とよく一致しており、このことは、GPA のヌル型変異細胞が突然変異によるものであることを強く支持している。また、このことは、GPA の系が過去の放射線被曝の集積線量計として利用できるかもしれないことを示唆している。これらの結果は、原爆被爆者では、特定遺伝子座突然変異が高いまま持続しているという最も確定的な事実を示している。被爆者の中には、線量効果関係の平均値から極端にずれた変異細胞頻度を示す人もある。この理由は、恐らく主として幹細胞プールに生じた突然変異細胞数の統計学的なゆらぎに起因するようと思われる。このような統計学的なゆらぎの解析により、ヒトにおける長寿命の造血幹細胞の数が推定できる。

緒 言

最近のソ連 Chernobyl 原子力発電所の事故により電離放射線被曝者の長期にわたる健康問題や被曝者

*Lawrence Livermore National Laboratory, Biomedical Science Division
Lawrence Livermore 研究所, 生物医学部

exposure to ionizing radiation and in the development of methods for assessing DNA damage in exposed individuals. While there is clear evidence of persistent increases in cancer risk in several populations that have been exposed to radiation,¹⁻³ quantitative studies of long-term effects have been performed for the survivors of the A-bombs at Hiroshima and Nagasaki. The Life Span Study, Adult Health Study (AHS), and F₁ Mortality Study of RERF are accumulating extensive clinical and experimental data on large numbers of the survivors and their progeny.⁴ Also, the exposure history of survivors is relatively well defined, because dose estimates are available for individual survivors, and the exposure is dominated by a single acute whole-body radiation dose. While studies of chromosome aberrations in peripheral lymphocytes provide clear evidence of persistent genetic damage in somatic cells of this population,^{5,6} assays for measuring levels of other types of damage in individual survivors should be useful for the assessment of long-term health effects.

A detailed description and characterization of the GPA expression-loss assay has been reported previously.^{7,8} Briefly, GPA is an erythrocyte cell surface protein which occurs in two allelic forms, M and N, and is the product of codominantly expressed alleles on chromosome 4 with about 50% of the population being heterozygous at this locus. Pairs of monoclonal antibodies (MoAbs) specific for individual allelic forms, each conjugated with a different fluorescent dye, are used to label fixed erythrocytes from heterozygous MN donors. Flow cytometry and sorting are used to enumerate and purify rare single color cells that express one allele normally but lack the expression of the second allele presumably due to mutational events in erythroid precursor cells.

MATERIALS AND METHODS

Two different antibody combinations were used in the present study. The 1W1 assay system illustrated in Figure 1 uses one GPA-M-specific MoAb (6A7) and one MoAb (10F7) that binds equally to both GPA-M and GPA-N. This system was used to measure variant cells lacking the expression of the M allele but retaining normal expression of the N allele (hemizygous NO variants), and variants lacking expression of the M allele but expressing twice the normal amount

にみられる DNA 傷害の評価方法の開発についての関心が高まった。放射線に被曝した幾つかの集団では発癌の危険性が依然として高いという事実があり、¹⁻³ 広島、長崎の原爆被爆者については長期にわたる影響の定量的な調査が行われてきた。放影研における寿命調査、成人健康調査、F₁ 死亡率調査では、多数の被爆者及びその子孫に関して広範囲に及ぶ臨床、実験データが集積されている。⁴ また、各被爆者についての推定線量が得られており、1回の急性全身被曝がほとんどであるため、被爆者の被曝歴も比較的明確に示されている。末梢リンパ球における染色体異常の研究により、この集団の体細胞に遺伝傷害が残存するという確かな証拠が得られているが、^{5,6} 各被爆者の他の型の傷害のレベルを測定する調査も、長期にわたる健康への影響を評価する上で役立つはずである。

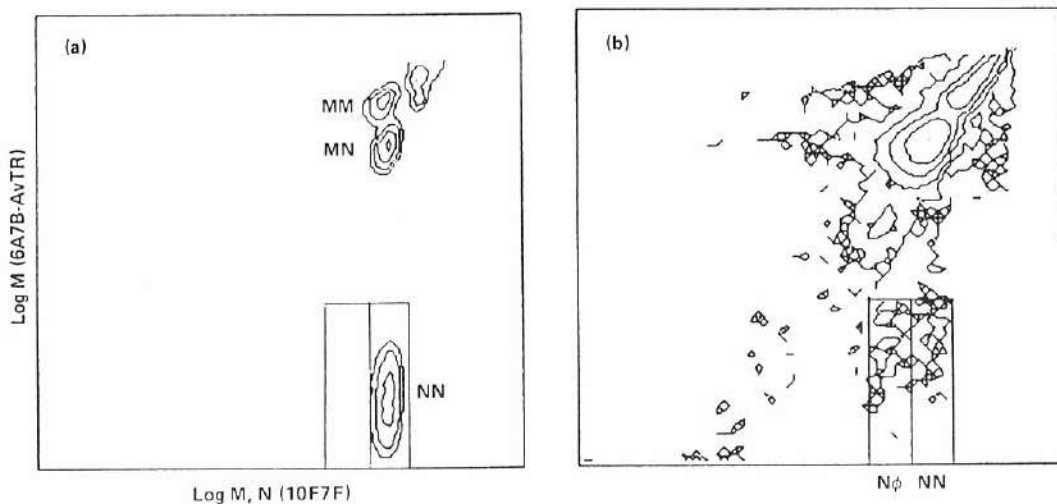
GPA ヌル型調査についての詳細な報告書が以前発表された。^{7,8} 要約すると、GPA は二つの対立遺伝子形 M 及び N として表現される赤血球細胞膜上の蛋白質で、第 4 染色体上の相互優性対立遺伝子の産物であり、集団の約 50% のヒトがこの遺伝子座の異型接合体である。個々の対立遺伝子形に特異的なモノクローナル抗体 2 種類をそれぞれ異なる蛍光物質で標識し、異型接合 MN 型対象者からの固定赤血球を染色するのに利用する。フローサイトメトリー及びソーティングにより一方の対立遺伝子は正常であるが、恐らく赤血球前駆細胞内で生じた突然変異のために他方の対立遺伝子が存在しないまれな一方の色しか示さない細胞を計数したり分離したりできる。

材料及び方法

本研究では二組の異なった抗体の組み合わせを用いた。図 1 に示した 1W1 測定システムでは GPA-M に特異的なモノクローナル抗体 (6A7)、また GPA-M、GPA-N 双方に等しく結合するモノクローナル抗体 (10F7) を用いている。このシステムを用いて、M 対立遺伝子は表現しなくなったが、N 対立遺伝子は正常に発現している変異細胞 (半接合 NO 変異体)、並びに、M 対立遺伝子の発現はないが、N 対立遺伝子

FIGURE 1 BIVARIATE FLUORESCENCE DISTRIBUTIONS OF HUMAN ERYTHROCYTES STAINED WITH THE ANTIBODIES USED IN THE 1W1 ASSAY

図1 1W1 測定法で用いた抗体で染色したヒト赤血球の二変数蛍光分布



Erythrocytes were fixed in a solution containing sodium dodecylsulfate and formalin, and then stained with the following pair of MoAbs: 10F7F, which binds both GPA-M and GPA-N and is directly conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), and 6A7B-AvTR, which is specific for GPA-M and is conjugated with biotin plus Texas Red-avidin. Flow cytometry and sorting were performed on the Lawrence Livermore National Laboratory (LLNL) Dual Beam Flow Sorter with the following spectral conditions: FITC, excitation at 488 nm and emission at 514 nm, Texas Red, excitation at 590 nm and emission at 630 nm. Logarithmic amplification with a range of approximately three decades was used for both fluorescence signals. Narrow angle light scatter at 488 nm was also measured so that only objects with erythrocyte scatter intensity were analyzed. (a) Fluorescence distribution of a mixture of cells from MM, MN and NN donors to define the regions in the flow distributions where variant cells should occur. Hemizygous NO variants (left window) must have lost >90% of the fluorescence of normal 6A7 fluorescence but retain 1/2 ($\pm 30\%$) the normal 10F7 fluorescence. Homozygous NN variants (right window) must have lost >90% of the 6A7 fluorescence, while the 10F7 fluorescence is normal ($\pm 30\%$). (b) Fluorescence distribution of erythrocytes from a heterozygous MN donor from the exposed population. The heights of each peak in the flow distribution are indicated by contours which differ by a factor of 10 in events per channel with the lowest contour corresponding to one event per channel. Approximately 10^6 erythrocytes were measured for each assay run in a time period of 15-30 minutes. Objects producing signals in the variant windows were sorted onto slides for microscopic verification. Typically 10-50 cells were scored for each analysis. VFs were determined from the ratio of the number of sorted cells to the total number of cells analyzed after dividing by correction factors (CF) for counting errors (CF = 2.7 for the 1W1 assay, CF = 1.8 for the 2W2 assay).⁷ The VF values for the data in the figure were NO = 107×10^{-6} , and NN = 87×10^{-6} .

赤血球はドデシル硫酸ナトリウム及びホルマリンを含む溶液で固定し、以下のモノクローナル抗体で染色した: 10F7F, これはGPA-M及びGPA-N双方に反応するもので、フルオレッセンイソチオシアネート (FITC) で直接標識してある。6A7B-AvTR, これはGPA-Mに特異的に反応するもので、ビオチンとテキサスレッドアビジンで標識した。フローサイトメトリー及びソーティングは米国 Lawrence Livermore 研究所 (LLNL) の Dual Beam Flow Sorter で、下記の分光条件を用いて行った: FITC-488nmで励起, 514nmの波長の蛍光を測定, テキサスレッド-590nmで励起, 630nmの波長の蛍光を測定。約3桁の幅の対数増幅を蛍光シグナルとして用いた。赤血球散乱を示す物質のみ解析できるように、488nmで狭角光散乱も測定した。(a) 変異細胞の生じる分布領域を特定するため、MM, MN 及び NN 型対象者の細胞を混合した場合の蛍光分布、半接合 NO 変異体 (左窓) は正常 6A7 蛍光の90%以上の蛍光を失うが、正常 10F7 蛍光の1/2 ($\pm 30\%$) を維持している。同型接合 NN 変異体 (右窓) は 6A7 蛍光の90%以上を失うが、10F7 蛍光は正常 ($\pm 30\%$) である。(b) 被爆群のうち異型接合 MN 対象者の赤血球蛍光分布。フロー分布図のそれぞれの頂点は等高線によって示され、各線はチャンネル当たり10倍異なっている。最も低い等高線はチャンネル当たり1事象を示す。およそ 10^6 個の赤血球が測定され、それに要する時間は15-30分である。変異体の領域にシグナルを生じた物質はスライドガラス上に分離し顕微鏡検査を行った。一般に10-50個の細胞を一回の解析で計数した。変異細胞頻度は分離された細胞数と解析した細胞総数の比率を、測定誤差用の補正係数 (CF) で割って求めた (1W1 測定では CF=2.7, 2W2 測定では CF=1.8)。⁷ 図のデータの変異細胞頻度は、NO= 107×10^{-6} , NN= 87×10^{-6} であった。

of the N allele (homozygous NN variants). The 2W2 assay uses one GPA-N-specific MoAb (NN 3) and one GPA-M-specific MoAb (9A3) for detecting analogous variants lacking expression of the N allele (both hemizygous MO and homozygous MM variants). For both assays, VFs were based on microscopic verification of sorted variant cells after correction of counting errors as described previously. Thus, these two assays provide measurements on rare four different variant cell phenotypes (NO, NN, MO, MM). While it is not possible to use clonal growth or DNA analysis to directly confirm a mutational origin for these variant erythrocytes, previously presented evidence supports their mutational origin and suggests that hemizygous and homozygous variants may arise by different genetic mechanisms.⁷

Blood samples were obtained from MN heterozygous donors of AHS in Hiroshima and a standard donor during September 1985 - August 1986, and each sample was analyzed within two weeks of collection. One cohort of 43 donors (Exposed) was composed of A-bomb survivors with T65DR dose estimates⁹ from 14 to 884 cGy (1 cGy=1 rad). Repeat samples were obtained from 27 of these donors. A second cohort of 20 donors (Control) was composed of distally exposed survivors with T65DR dose estimates of less than 1 cGy with repeat samples on 10 donors. The standard donor, a 29-year-old Japanese volunteer, was sampled 27 times during the study to monitor the reproducibility of the assays. All samples were coded so that the donor type was not known to the investigators until completion of the measurements.

RESULTS

Response of Individual Endpoints

Figure 2 shows VFs from all measurements with both assay systems; the mean frequencies for each cohort are reported in Table 1. For three of the endpoints, NO, MO, and MM variants, consistently low VFs were observed for the standard donor and control donors. The mean frequencies for these donors range from 7.15×10^{-6} which agree well with the previously determined values of 9.21×10^{-6} for normal donors using these three endpoints.⁷ Multiple measurements on the standard donor and replicate measurements on repeat blood samples from control and exposed donors were used to determine a measurement coefficient of variation

を正常値の2倍発現している変異体(同型接合 NN 変異体)を測定した。2W2 測定システムでは GPA-N に特異的なモノクローナル抗体 (NN 3) 及び GPA-M に特異的なモノクローナル抗体 (9A3) を用いて、N 対立遺伝子を失った同様の変異細胞(半接合 MO 及び同型接合 MM 変異体)を検出した。両システムとも変異細胞頻度は、以前に報告したように分離した変異細胞の顕微鏡検査の値を測定誤差で補正して求めた。このように、これら二つの測定システムにより、四種の異なったまれな変異細胞表現型 (NO, NN, MO, MM) の測定値が得られる。クローン増殖や DNA 解析により、これら変異赤血球の突然変異の由来を直接確かめることはできないが、以前に発表した事実はこれらの細胞が突然変異により生じたことを支持するものであり、また、半接合及び同型接合変異体は異なる遺伝的機序により生ずることを示唆している。⁷

血液標本は、1985年9月から1986年8月までの間に、広島市の成人健康調査対象者で MN 異型接合型の入及び1名の標準となる人から得られ、いずれの標本も採血後2週間以内に調査を行った。第一集団は T65 改訂推定線量が 14~884 cGy (1 cGy=1 rad) の原爆被爆者43名から成る(被爆群)。これらの対象者のうち、27名から再検査用の標本を得た。第二集団は T65 改訂推定線量が 1 cGy 以下の遠距離被爆者20名により構成されており(対照群)、そのうち10名の対象者について再検査用の標本を得た。調査期間中、上述の測定システムの再現性を確認するために、標準供血者である29歳の日本人有志から、27回の採血をした。標本はすべてコード化され、血液提供者がどの群に属するか、測定終了時まで研究者に分からないようにした。

結 果

個々の指標別反応

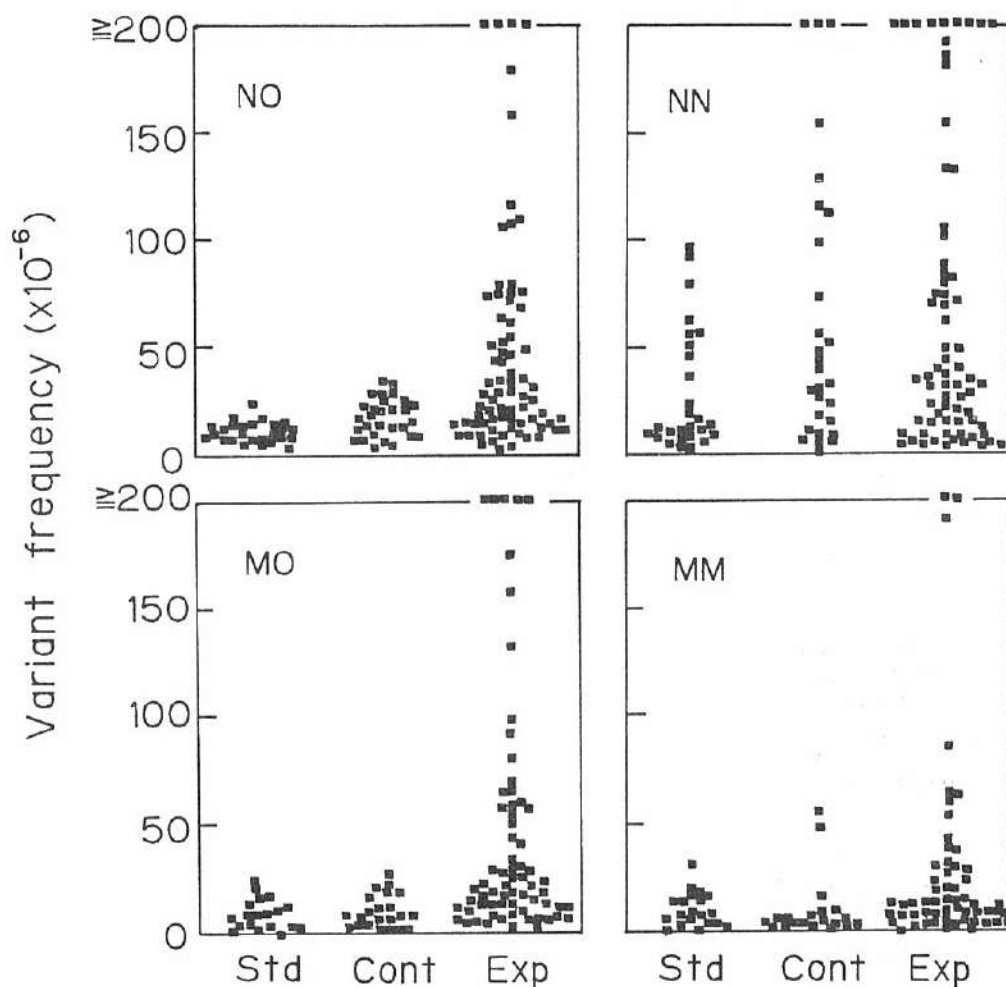
図2には二つの測定システムを用いて行った全部のデータから得られた変異細胞頻度が示してある。各集団の平均頻度は表1に示した。三種の指標 NO, MO, MM 変異体についてみると、標準対象者及び対照群の変異細胞頻度は、一貫して低かった。これら三種の指標を用いた平均変異細胞頻度は $7 \sim 15 \times 10^{-6}$ で、これは以前健康人について得られた値 $9 \sim 21 \times 10^{-6}$ とほぼ一致するものである。⁷ 変動係数 (CV) を求めるため、標準対象者に対して複数の測定を行い、また対照群及び被爆群から繰り返して得られた標本に

(CV). This was found to be about 60%, which is comparable to the previous estimates.

対して複数の測定を行った。その結果、係数は約60%で、前回の推定値と同様であった。

FIGURE 2 VARIANT CELL FREQUENCIES (VFs) IN ALL BLOOD SAMPLES FROM THE STANDARD DONOR AND THE TWO COHORTS – CONTROL AND EXPOSED

図2 標準対象者、対照群、及び被爆群のすべての血液標本の変異細胞頻度 (VF)



The 1W1 assay was used for measurements of NO and NN variants; the 2W2 assay was used for MO and MM variants. VFs greater than 200×10^{-6} are plotted at the top of each panel and include values from $225-1,312 \times 10^{-6}$.

1W1 測定法は、NO 及び NN 変異体測定に、2W2 測定法は MO 及び MM 変異体測定に用いた。 200×10^{-6} 以上の変異細胞頻度は、各図の最上部に表示しており、 $225 \sim 1,312 \times 10^{-6}$ の値が含まれている。

TABLE 1 SUMMARY OF THE FREQUENCY OF DIFFERENT VARIANT CELL TYPES IN THE THREE DONOR POPULATIONS

表1 三種の調査群における異なる変異細胞型頻度の要約

ID	Group	VF ($\times 10^{-6}$)		T65DR		P*
		MEAN	MEDIAN	MEAN	MEDIAN	
NO	Standard	8.7	7.0	-	-	0.001
	Control	15.2	13.5	0	0	
	Exposed	77.9	25.0	240	180	
MO	Standard	7.3	4.0	-	-	<0.001
	Control	9.2	8.0	0	0	
	Exposed	63.1	20.0	236	174	
NN	Standard	28.1	11.0	-	-	0.433
	Control	64.0	54.5	0	0	
	Exposed	69.2	38.0	240	180	
MM	Standard	8.8	6.0	-	-	0.004
	Control	8.5	3.0	0	0	
	Exposed	31.9	7.0	236	174	

* Probabilities based on Mann-Whitney nonparametric test that VF of control group is higher or equal than that of exposed group.

対照群の変異細胞頻度が被爆群のそれより高いか若しくは等しいかを比較する Mann-Whitney ノンパラメトリックテストに基づく確率。

VFs for the fourth endpoint, homozygous NN variants, vary considerably among multiple measurements on the standard donor and among individuals in the control cohort. A possible explanation for this variability is the sensitivity of the 1W1 assay to altered glycosylation of GPA.^{7,10-12} This alteration may be due to genetic or physiological factors in vivo or degradation of GPA during cell storage or fixation. Our observation of greater variability in the frequency of NN variants than of MM variants and of significant differences in NN frequency for multiple fixations on the same blood samples (data not shown) are consistent with this interpretation.

For the exposed donors, VFs for the NO, MO, and MM variants vary widely from control levels to a high value of $1,312 \times 10^{-6}$. The non-parametric, Mann-Whitney test¹³ was used to confirm that the difference between the control and exposed donors was highly significant for all three endpoints (Table 1). The mean frequencies of NO and MO variants were similar for the exposed donors suggesting that radiation-induced loss of GPA expression may occur at comparable frequency for both the M and N alleles. The mean frequency of MM variants was also elevated in the exposed donors suggesting that radiation exposure may induce events that lead to homozygosity (e.g., chromosome missegregation or mitotic recombination).⁷ This

第四の指標、すなわち、同型接合 NN 変異体の頻度は、同一の標準対象者に関する複数の測定間でも、対照群の個人の間でも大きく異なっている。それは恐らく 1W1 測定システムが GPA の糖鎖の変化に敏感なためであろう。^{7,10-12} この変化は生体内の遺伝的若しくは生理学的要因、あるいは細胞の保存や固定の際の GPA 分解に起因しているかもしれない。MM 変異体よりも NN 変異体の頻度のばらつきが大きいことや、同一血液標本を複数に分けて固定した場合に、NN 頻度に有意な差異を認めたこと（データは示していない）は、この説明と矛盾しない。

被爆群の NO, MO, MM 変異体変異細胞頻度は、対照群と同様の値から $1,312 \times 10^{-6}$ の高値まで広く分布している。ノンパラメトリック Mann-Whitney テスト¹³ を用いて解析したところ、対照者と被爆者間にみられる差異は三種の指標に関して高度に有意であった（表 1）。NO 及び MO 変異体の平均頻度は被爆群で似た値を示しており、このことは放射線誘発による GPA 欠損が M, N 対立遺伝子に同様の頻度で起こることを示唆している。MM 変異体の平均頻度もまた被爆群で高くなっており放射線被曝により同型接合性を生じるような変化が誘発されることを意味している（染色体分離異常や体細胞組み換えなど）。⁷ しかし、この同型接合変異頻度は半接合

elevation in homozygous variants, however, appears to be smaller than the elevation in hemizygous gene-loss variants. While data on the role of ionizing radiation in inducing events that lead to homozygosity is still limited, there are reports on X-ray-induced mitotic recombination in yeast,¹⁴ in *Drosophila*^{15,16} and on possible missegregation events induced in human cells by in vitro exposure to ionizing radiation.¹⁷

Dose Response

T65DR estimates of total dose (gamma rays and neutrons) for each exposed donor were used to determine the relationship between radiation exposure and the observed GPA-loss VFs. A median test provided by Brown and Mood¹⁸ showed that there is an increasing trend in the median VF with increasing dose. This gives probability levels that the slope is less than or equal to zero, of 0.034, <0.001, and 0.002 for NO, MO, and MM, respectively (NN is not significant). Since dose-dependent increase of VF was suggested, the trend was estimated by assuming a linear model ($VS=a+bD$) as the data set is too small to allow a rigorous test of the shape of the dose-response curve (i.e., linear vs quadratic models). Also a mean hemizygous VF was calculated for each individual using results from replicate blood samples to simplify the analysis and reduce the effects of measurement errors. Mean values included both NO and MO VFs since both endpoints showed similar spontaneous and induced frequencies. Figure 3a shows the hemizygous VFs for the control and exposed donors. The fit parameters obtained were; $a=23 \times 10^{-6}$, $b=0.17 \times 10^{-6}/\text{cGy}$, correlation $r=0.33$. Although many points cluster around the linear regression line, some individual values by dose differ greatly from the calculated fit. A linear fit to these data neglecting the four values on the top and the four highest dose values yielded similar fit parameters ($a=10 \times 10^{-6}$, $b=0.15 \times 10^{-6}/\text{cGy}$, $r=0.76$) showing that the fit is not dominated by outlying values. These outlying values will be discussed below. Previous studies of chromosome aberrations in A-bomb survivors also showed considerable scatter for the frequencies of individual donors, but a clear dose-response was observed when average frequencies were calculated for groups of donors in different dose intervals.⁶ Figure 3b shows a similar analysis where the exposed donors were divided into four dose groups with the mean VF and dose plotted for each group.

ヌル型変異頻度よりも低いようである。電離放射線の同型接合体誘発に関するデータはまだ少ないが、イースト菌¹⁴ やショウジョウバエ^{15,16} におけるX線誘発体細胞組み換えに関する報告、及びヒト細胞に試験管内で電離放射線を照射した場合の恐らく染色体分離異常と思われる現象¹⁷ についての報告がなされている。

線量反応

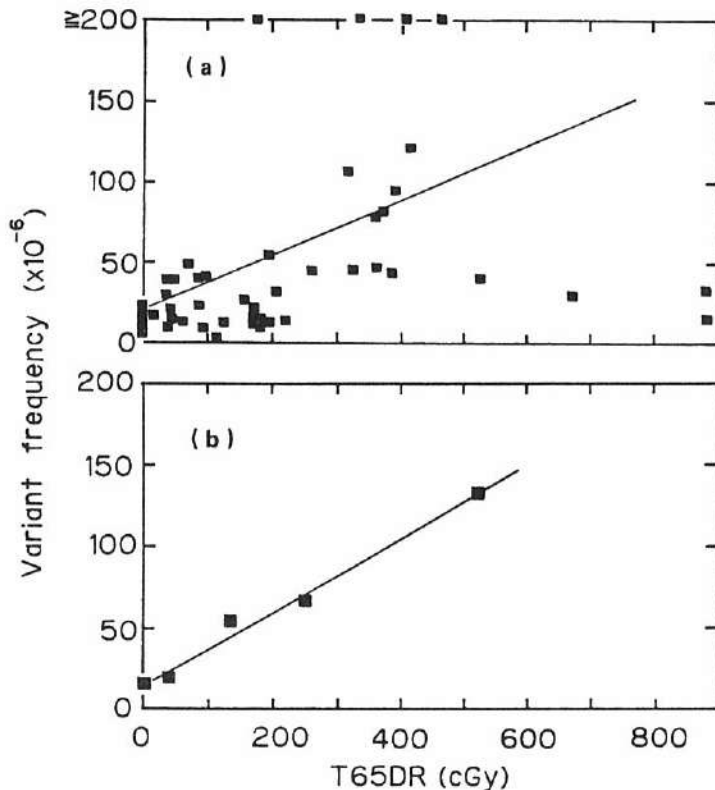
各被爆対象者について、T65 改訂推定線量の総線量（ガンマ線及び中性子線）を用いて、放射線被曝と観察した GPA のヌル型変異細胞頻度との関連を調べた。Brown 及び Mood¹⁸ による中央値テストにより、線量の増加とともに変異細胞頻度の中央値も増加傾向を示すことが分かった。これにより、それぞれの勾配が 0 以下または 0 に等しい確率レベルは、NO では 0.034, MO では 0.001 未満, MM では 0.002 (NN は有意でない) である。変異細胞頻度は線量に依存して増加することが示唆されたので線形モデル ($VF=a+bD$) を想定してこの増加傾向を調べた。このモデルを用いたのはデータが少なすぎるため、線量反応曲線の形状を厳密に検討することができないからである（すなわち、線形モデル対二次関数モデル）。また解析を簡潔化し測定時の誤差による影響を小さくするため、複数回の測定結果に基づいて各個人の半接合変異細胞頻度の平均値を求めた。NO 及び MO 変異細胞頻度とも同様の自然変異頻度及び誘発変異頻度を示したので、平均変異頻度として、NO 及び MO 変異細胞頻度両方を含めた。図 3a に対照群及び被爆群の半接合変異細胞頻度を示した。算出した適合パラメーターは $a=23 \times 10^{-6}$, $b=0.17 \times 10^{-6}/\text{cGy}$ であり、相関係数は $r=0.33$ であった。線形回帰直線周辺に多くの値が集まっているが、個人によっては線量に基づいて算出した適合値とかなり違うものがある。図の上端の 4 点と最高線量値の 4 点を除いても類似の適合パラメーター ($a=10 \times 10^{-6}$, $b=0.15 \times 10^{-6}/\text{cGy}$, $r=0.76$) が得られるので、この適合は極端に偏った値 (outlying value) に影響されているのではないことを示している。これらの outlying value については後に述べる。原爆被爆者の染色体異常に関して以前行われた研究でも、個々人の変異頻度はかなり散在していたが、線量区間ごとにブールした平均頻度は明確な線量反応を示している。⁶ そこで図 3b には被爆者を四つの線量群に分け各群の平均変異細胞頻度及び線量をプロットした。線形回帰直線の適合

The linear regression line gives fit parameters, $a=15 \times 10^{-6}$, $b=0.22 \times 10^{-6}/\text{cGy}$, $r=0.99$. The grouped data fit remarkably well with a linear regression.

パラメーターは、 $a=15 \times 10^{-6}$, $b=0.22 \times 10^{-6}/\text{cGy}$, $r=0.99$ となった。この線量別にまとめたデータは得られた線形回帰直線と大変よく適合している。

FIGURE 3 PLOTS OF HEMIZYGOUS VARIANT FREQUENCY (VF) vs T65DR DOSE FOR EACH OF THE CONTROL AND EXPOSED DONORS

図3 対照群及び被爆群の、半接合変異体頻度と T65 改訂推定線量の関係



Mean values of all NO and MO measurements were used for the VF values for each donor. Panel (a) Individual VFs for all control and exposed donors. VFs greater than 200 are plotted at the top of the panel. These VFs are 336, 330, 244, and 668×10^{-6} (from low to high dose). The line corresponds to a linear regression on these data (see text). (b) VFs of pooled groups of control and exposed donors. Exposed donors were ranked by dose and divided into four groups each containing 10 or 11 donors (dose intervals; 14-62, 69-174, 180-359, and 361-884 cGy). Control donors made up a fifth, zero-dose group. Each point corresponds to the mean hemizygous VF and the mean dose for each group. The line corresponds to a linear regression on these data (see text).

各人についての NO 及び MO の全測定値の平均値を、個人の変異細胞頻度値として用いた。図(a)は対照群及び被爆群全員の個人別変異細胞頻度である。頻度が200以上のものは図の最上部に表示した。それらの値は336, 330, 244, 668×10^{-6} (低線量から高線量へ向けて)である。直線はこれらのデータの線形回帰を示す(本文参照)。 (b) 対照群及び被爆群のプールした変異細胞頻度。被爆群は線量別に分類し、10~11名ずつの4集団に分けた(線量間隔; 14~62, 69~174, 180~359, 361~884 cGy)。対照群の対象者は第五集団のゼロ線量集団を形成。それぞれの点は、集団ごとの平均半接合変異細胞頻度及び平均線量を表す。直線は、このデータの線形回帰を示している(本文参照)。

DISCUSSION

Comparison with Other Radiation Effects

Before comparing the results with other studies of radiation-induced mutagenesis, several systematic errors in the dosimetry should be considered. The T65DR dose estimates used in this study are currently being replaced by revised estimates (DS86) based on improved calculations of the yield of neutrons and gamma rays from the bomb,¹⁹ and more precise calculations of shielding effects. While final DS86 estimates are not available for these donors, interim estimates (I86) for 13 exposed donors are about 30% smaller than the T65DR estimate. Second, recent estimates suggest marrow doses are only 77%-87% of the free-in-air doses for gamma rays.²⁰ Third, neutrons from the Hiroshima bomb would increase effective dose to the marrow due to their high relative biological effectiveness (RBE).²¹ However, the neutron effect should be relatively small; current estimates suggest that neutrons contribute less than 10% of the total Hiroshima dose.¹⁹ Thus, the T65DR dose is probably within a factor of two of the true marrow dose.

A comparison of our results with the results from previous studies of radiation-induced specific locus mutations provides support for a mutational origin for GPA-loss variants. Induction of somatic cell mutations in cultured human and rodent cells exposed to ionizing radiation in vitro has been extensively documented at the HPRT,²²⁻³⁰ TK,^{31,32} and HLA¹⁷ loci. These data can be fit to a linear model with spontaneous frequencies of $a = 3-30 \times 10^{-6}$, and induced frequencies of $b = 0.06-0.4 \times 10^{-6}/\text{cGy}$. Elevated frequencies of somatic cell mutations at the HPRT locus after in vivo exposure to radiation in mice³³ are also consistent with linear parameters of similar magnitude ($a = 1.5 \times 10^{-6}$, and $b = 0.2 \times 10^{-6}/\text{cGy}$). Finally, results for heritable mutations in mouse germ cells by specific locus method are also compatible with linear parameters of $a = 5-8 \times 10^{-6}$ and $b = 0.2-0.6 \times 10^{-6}/\text{cGy}$.³⁴ Thus, the similarity in the values of the linear fit parameters obtained from the GPA assays and those obtained from these specific locus mutagenesis assays strongly supports a mutational origin for GPA-variant erythrocytes.

Increases in GPA-loss variants can also be compared with increases in other indicators of

考 察

その他の放射線影響との比較

以上の結果をその他の放射線誘発突然変異研究と比較する前に、線量測定における幾つかの系統的誤差について考慮しなければならない。本研究で使用した T65 改訂推定線量は現在、原爆からの中性子線及びガンマ線の出力に関する改良された計算¹⁹と、遮蔽影響に関するより精確な計算とに基づく改訂線量 (DS86) に代わりつつある。本調査対象者の最終的な DS86 推定値はまだ得られていないが、13名の被爆者の暫定推定線量値 (I86) は T65 改訂推定線量に比べ約30%低い。次に、最近の評価では、ガンマ線に関しては骨髄線量は空中線量の77%から87%にすぎないことが示唆されている。²⁰ 第三に、広島原爆から放出された中性子線は、その生物学的効果比 (RBE) が高いので骨髄効果線量を増加させるであろう。²¹ もっとも、この中性子線効果は比較的小さいと考えられる。なぜなら、現在の評価によれば、中性子線は広島総線量の10%以下にすぎないからである。¹⁹ このように T65 改訂推定線量は恐らく、真の骨髄線量の2倍以内であろう。

我々の得た結果と、放射線誘発特定遺伝子座突然変異についての過去の研究成果との比較から、GPAのヌル型変異体が突然変異によるものであることが支持される。ヒト及びマウスの培養細胞を用いて試験管内で電離放射線を照射した場合の体細胞突然変異の誘発に関する多くの報告が HPRT,²²⁻³⁰ TK,^{31,32} HLA¹⁷ 遺伝子座についてなされている。これらのデータに線形モデルをあてはめると自然変異頻度 $a = 3-30 \times 10^{-6}$ 、誘発変異頻度 $b = 0.06-0.4 \times 10^{-6}/\text{cGy}$ となる。マウスに電離放射線を照射した後、HPRT 遺伝子座に生じる体細胞突然変異の頻度上昇も、³³ 同程度の線形パラメーター ($a = 1.5 \times 10^{-6}$, $b = 0.2 \times 10^{-6}/\text{cGy}$) で表される。最後に、特定遺伝子座法によるマウス生殖細胞の遺伝的突然変異の結果もまた、線形パラメーター $a = 5-8 \times 10^{-6}$, $b = 0.2-0.6 \times 10^{-6}/\text{cGy}$ で与えられる。³⁴ このように GPA 法で得た線形適合パラメーターの値と特定遺伝子座突然変異測定法で得た値とが類似しているということは、GPA 変異赤血球が突然変異によるものであることを強く支持するものである。

GPA ヌル型変異体の増加を、広島被爆者に認めら

genetic damage and health risk in Hiroshima survivors. Since other studies generally report results for pools of donors in different dose intervals, comparisons can best be made using ratios of values for high dose pools (mean T65DR dose around 400 cGy) to values for low dose pools (T65DR dose of less than 1 cGy). The mean frequency of hemizygous GPA variants increased about 11-fold in the highest dose pool compared with the control pool (Figure 3b). This increase is very similar to a 15-fold increase in the frequency of exchange-type chromosome aberrations reported for high dose Hiroshima survivors.^{5,6}

Increased risk for malignancy in exposed individuals has been seen most clearly for leukemia. While the relative risk of cancer varies with age at exposure and time since exposure, cumulative values for Hiroshima and Nagasaki survivors from 1950-82 show a relative risk for total leukemia mortality of about 13-fold for those exposed to an average of 400 cGy^{3,35} and 4-fold for the breast cancer.³⁵ Overall there is about a 2-fold increase in mortality from all cancers (excluding leukemia) for those exposed to high doses.^{3,35} Studies for the possible genetic effect of radiation (untoward pregnancy outcome, F₁ mortality, and F₁ sex chromosome aneuploidy) could not show any statistically significant dose relationships but "the observed effect is in the direction suggested by the hypothesis that genetic damage resulted from the exposure."³⁶ The estimated average doubling dose (156 rem) suggests about 6-fold increase of risk for the survivors who received 400 cGy. Thus, while risks differ for each of the health outcomes, increases in health risks are generally similar in magnitude to increases in the frequencies of GPA-loss variants and chromosome aberrations.

Mechanisms for Persistence and Individual Fluctuations

Since we see a highly significant difference of VF between exposed and control donors over 40 years after radiation exposure, it is of interest to consider possible mechanisms for the persistence of this effect and for the wide fluctuations in VF among different donors with similar exposures. It seems probable that radiation-induced mutational lesions that are stably integrated in hemopoietic stem cells are responsible for the elevated VF values in exposed

れる遺伝的傷害及び健康上の危険度に関するほかの指標の増加と比較することも可能である。これらの研究は、通常異なる線量区間ごとに対象者をまとめた結果を報告しているので、高線量プールの値(平均 T65 改訂推定線量は 400 cGy 前後)の、低線量プールの値(T65 改訂推定線量は 1 cGy 以下)に対する比率を用いれば、最もよく比較できる。半接合 GPA 変異体の平均頻度は、最高線量プールが対照群プールと比べて約11倍の増加を示している(図3b)。この増加の程度は、広島の高線量被爆者に認められた交換型染色体異常頻度の15倍の増加と酷似している。^{5,6}

被爆者における悪性腫瘍の危険度の増加が最も明確に認められるのは白血病においてである。癌の相対危険度は、被爆時年齢及び被爆からの経過時間に応じて変化するが、広島及び長崎の被爆者の1950年から1982年までの集積値では、総白血病死亡の相対危険度は、平均 400 cGy を被曝した人では約13倍、^{3,35} 乳癌については約 4 倍³⁵である。全体として、高線量被爆者については、全癌で約 2 倍の(ただし、白血病は除く)死亡率増加が認められる。^{3,35} 放射線によって起こるかもしれない遺伝的影響(妊娠終結異常、F₁ の死亡率、及び F₁ の性染色体異数性)の調査からは、統計学的に有意な線量関係は示されなかったが、「観察された影響は、遺伝的障害が放射線被曝によって起こるという仮説を唆する方向と一致していた。」³⁶ 推定平均倍加線量(156 rem)から、被曝線量が 400 cGy の被爆者の危険度が約 6 倍増加していることが示唆される。このように危険度は健康に及ぼす影響の種類によって異なるが、その大きさは一般に、GPA ヌル型変異体及び染色体異常頻度の増大とよく似ている。

持続性とゆらぎの機序

我々は被爆後40年以上たった今日、被爆者及びその対照群における変異細胞頻度が有意に異なることを観察してきたので、この変異細胞頻度の持続性や、ほぼ同じ線量に被曝した異なる対象者の変異細胞頻度に見られるゆらぎの機序について検討してみたい。被爆者の変異細胞頻度が高いのは、造血幹細胞に生じた放射線誘発突然変異性傷害が原因であろうと考えら

donors. It seems unlikely that nongenetic mechanisms for loss of one allelic form of GPA would persist over this time interval, particularly since erythrocytes are continuously replenished every 120 days.³⁷ Reports of elevated chromosome aberrations in erythroid precursor cells³⁸ or in bone marrow cells³⁹ from A-bomb survivors also suggest long-term persistence of genetic lesions in stem cells. The quantitative agreement in linear-fit parameters derived from studies of short-term in vitro experiments and those obtained in this study of persistent effects in A-bomb survivors suggests that mutant stem cells contribute to the erythrocyte pool over a long time period with no selective advantage or disadvantage relative to non-GPA-mutant stem cells. This result contrasts with an apparent in vivo selective disadvantage of HPRT-deficient lymphocytes observed in heterozygous mothers of Lesch-Nyhan boys.^{40,41} A recent report that the HPRT-deficient mutant frequency in T-lymphocytes of exposed A-bomb survivors is increased less than twofold over controls⁴² also suggests a selective disadvantage for lymphocytes with this mutant phenotype.

Although the VFs of most donors are consistent with a linear dose response, the values for some exposed donors differ dramatically from those predicted by the linear fit in Figure 3a. While the limited precision of this assay (pooled CV=60%) might explain the scatter at low doses, it is unlikely that measurement errors are responsible for the large deviations consistently observed in some donors. Analyses of replicate blood samples from some of these exceptional donors (Table 2) illustrate the size and reproducibility of these deviations from the expected values. These exceptional donors appear to fall into two categories. For moderate-dose donors (170-500 cGy) large fluctuations in VFs were seen among donors with similar exposures and between alleles in individual donors, while for high-dose donors (>500 cGy) uniformly low VFs were observed (Table 2 and Figure 3a).

Because measurements of MO and NO variants provide two biochemically equivalent but genetically independent endpoints, a comparison between MO and NO frequencies for each donor should differentiate between the two explanations to be mentioned below for VFs that differ from the calculated dose response. One explanation is that the exposure history of

れる。また、特に、赤血球は、絶えず120日おきに補充されている³⁷ので、GPAの一方の対立遺伝子喪失が遺伝的機序以外の理由で40年以上持続するとは考えられない。原爆被爆者の赤血球前駆細胞、³⁸あるいは骨髄細胞³⁹に見られる染色体異常頻度の増加についての報告も、幹細胞に遺伝的傷害が長期にわたって持続していることを示唆している。短期間の試験管内実験研究と、原爆被爆者に持続して存在する影響の研究とから得られた線形適合パラメーターが互いに量的に一致していることは、突然変異幹細胞が、非GPA突然変異幹細胞と比べて長い間、特に有利でもなく、不利でもなく、赤血球プールに寄与していることを示している。この結果は、Lesch-Nyhan症少年の異型接合体である母親に認められるHPRT欠損リンパ球の生体内選択的不利性と比べて対照的である。^{40,41}また、最近報告された原爆被爆者のTリンパ球におけるHPRT欠損突然変異頻度が、対照群の2倍以下であるという事実も、⁴²この突然変異表現型をもったリンパ球が選択的に淘汰を受けている可能性を示唆している。

ほとんどの対象者の変異細胞頻度は線形線量反応と一致しているにもかかわらず、被爆対象者の中には、図3aの線形適合で推定されている値と著しく異なるものもある。低線量における値のばらつきは、この測定法の精度が低いこと（プールした場合 CV=60%）によるものかもしれないが、一部の対象者に一貫して認められる極端なずれの原因が測定誤差にあるとは考えられない。こういった例外的な対象者のうち何名かについては反復して測定を行ったが（表2）、期待値からのずれの大きさ及び再現性が明らかであろう。これら例外的対象者は二群に分類されるように思われる。中線量被爆者（170-500 cGy）については、対象者間及び同一対象者の対立遺伝子間に、変異細胞頻度の大きなゆらぎがみられる。他方、高線量被爆者（>500 cGy）については、一定して変異細胞頻度は低い（表2及び図3a）。

MO及びNO変異体測定は生化学的には同じだが、遺伝学的に独立した2種の指標を調査するわけであるから、各対象者のMO及びNO頻度を比較すれば、算出した線量反応からずれた変異細胞頻度に関する以下に述べる二つの解釈のどちらが正しいかがわかるはずである。一つの説明として、各対象

individual donors differs from the T65DR dose estimates (e.g., errors in T65DR or therapeutic/occupational genotoxic exposures), or that individual donors differ in their susceptibility to DNA damage (e.g., differences in repair capability).⁴³ In this case an individual's MO and NO frequencies should be equal but differ from the expected value. While this explanation is compatible with low VFs for both alleles in high-dose donors, it seems unlikely, for example, for the four donors with VFs greater than 200×10^{-6} (Figure 3a) because it cannot account for the large discrepancies between alleles for these donors (Table 2). Thus, while errors in dosimetry or differences in susceptibility may be responsible for some deviations from the expected VF calculated from T65DR, this explanation does not satisfactorily account for the large deviations for several donors.

者の被曝歴が T65 改訂推定線量と異なるか (T65 改訂推定線量の誤差, 治療用又は職業上の遺伝毒性物質への被曝など), 又は, DNA 損傷に対する感受性 (修復能力の差異など) に対象者間で差異のあることが挙げられる。⁴³ この場合, 個人の MO 及び NO 頻度は等しくて期待値からずれるはずである。この説明は, 高線量被曝者の両対立遺伝子の変異細胞頻度が低いという事実に矛盾しないが, 例えば 200×10^{-6} 以上の頻度をもつ 4 名の対象者 (図 3a) の対立遺伝子間にみられる大きな違い (表 2) を説明できない。したがって, T65 改訂推定線量を用いて求めた変異細胞頻度の期待値からのずれの幾つかは, 線量推定における誤差あるいは, 感受性における差異によるものかもしれないが, この説明では数名の対象者にみられた NO と MO 頻度の大きな違いをうまく説明できない。

TABLE 2 SUMMARY OF REPLICATE ANALYSES ON SELECTED EXCEPTIONAL DONORS

表 2 例外的な調査対象者の反復解析の要約

Donor No.	T65DR Dose	Observed VF ($\times 10^{-6}$)*		Expected VF ($\times 10^{-6}$)#
		NO	MO	
72	173	478	42	53
		882	60	
26	336	115	875	80
		21	307	
77	388	16	175	100
		13	175	
29	463	1312	251	117
		1045	65	
60	672	34	44	163
		13	22	
30	884	17	-	209
		14	15	

*For each donor, the top rows are results from the initial blood sample, while the second rows are results from a replicate blood sample. The following are the time intervals between the two samples for each donor (from top to bottom): 3, 6, 1, 7, 1, and 8 months.

各対象者ともに, 1 列目は第 1 回目の測定の結果, 2 列目には反復測定の結果が示されている。各対象者の 2 回の標本採取間の間隔は上から 3, 6, 1, 7, 1, 8 か月である。

#Expected VF values calculated from the T65DR dose using the linear fit parameters in Figure 3b.

図 3b の線形適合パラメーターを用いて, T65 改訂推定線量から算出した変異細胞頻度の期待値。

A second explanation is that large deviations from the expected values result from statistical fluctuations, such as Poisson uncertainty in the number of mutations produced in stem cells of reduced pool or uncertainty in the number of mutant stem cells that are contributing to the erythrocyte pool at any given time. In this case MO and NO frequencies would not be correlated for a given donor, and if the expression fluctuates predominantly then both frequencies could vary with time. The results for some moderate-dose donors show large and reproducible differences between NO and MO frequencies that are consistent with Poisson fluctuations in the mutant induction in a limited stem-cell pool. Time-dependent expression fluctuations appear to be less important, as results from initial and replicate blood samples were highly correlated ($r=0.87$, $p<0.001$, typical sampling interval 2-3 months). Even exceptional VFs persisted for up to eight months (Table 2). Poisson fluctuations alone, however, do not explain the consistently low VFs seen for both alleles in high-dose donors.

One additional factor, radiation-induced stem-cell kill, may clarify the response of the GPA assay for all exposure groups. It has been shown in mice that the survival of hematopoietic stem cells decreases exponentially with radiation dose,⁴⁴ so that high-dose exposures could severely reduce the number of surviving stem cells in the A-bomb survivors. The following model illustrates how stem-cell kill can affect inducibility of mutations in erythroid precursor cells and produce the deviations that we observed from expected values for moderate- and high-dose donors. To be consistent with our observations, this model requires a stem-cell pool size in the range 10^6 - 10^7 for a normal individual. To complete the model, a D_0 (dose reducing survival by 1/e) of 100 cGy observed in mice⁴⁴ was used to estimate stem-cell kill in humans, and the fit parameters from Figure 3b were used to estimate induced mutation frequencies.

We used this model to predict numerical estimates of stem-cell kill and mutation induction at three radiation exposures. A low-dose exposure of 50 cGy would produce minimal cell kill and an induced VF of about 10×10^{-6} . The average number of mutant stem cells would be 10-100/donor, which is large enough that Poisson fluctuations would be relatively small. An

第二の説明は、期待値からの大きなずれが、統計的なゆらぎ、すなわち、幹細胞のプールが減少したところに生じた突然変異の数の Poisson 不確定性、若しくは赤血球プールに寄与する突然変異幹細胞の数が時間と共に変化する不確定性に起因するという考え方である。この場合、特定の対象者の MO 及び NO 頻度は相関関係を示さないであろうし、遺伝子表現が主に変動するのであれば、両頻度ともに時間の経過に伴って変化していくであろう。中線量被爆者における測定結果によれば、NO 及び MO 頻度間に大きな再現性のある差異があるが、この差異は、限られた数の幹細胞プールに生じる突然変異は Poisson のゆらぎに一致して起こると考えれば矛盾がない。時間に依存した遺伝子発現のゆらぎはそれほど重要ではないようである。というのは、第 1 回目の測定と 2 回目の測定の結果とが、高い相関関係を示したからである ($r=0.87$, $p<0.001$, 通常の標本採取の間隔は 2~3 か月間)。例外的な変異細胞頻度でさえ 8 か月近くも持続している(表 2)。ところが、Poisson, ゆらぎのみでは、高線量被爆者の両対立遺伝子に一貫して認められる低変異細胞頻度を説明できない。

もう一つの因子である放射線誘発幹細胞死を考える。と全被爆群における GPA 測定の反応が明確になるであろう。生存は造血幹細胞の放射線量に応じて指数関数的に減少していくことが、マウスによる実験で示されている。⁴⁴ この結果から高線量を受けた原爆被爆者では生存幹細胞数がかなり減少したと考えられる。以下のモデルは、幹細胞死が赤血球前駆細胞における突然変異誘発性にいかに影響し、中/高線量被爆者の期待値からのずれがどのようにして生じるのかを示すものである。我々の観察と一致させるためには、このモデルでは健常人では $10^6 \sim 10^7$ の大きさの幹細胞プールを考えることが必要である。モデルを完成させるため、マウスにおける D_0 (生存率を 1/e 減少させる線量)⁴⁴ の 100 cGy を、ヒトの幹細胞死の評価に用い、図 3b の適合パラメーターを突然変異誘発頻度を評価するために用いた。

三種類のレベルの放射線量を被曝した際の幹細胞死と突然変異誘発の推定に、このモデルを使用した。50 cGy の低線量を被曝した場合には、細胞死はほとんど起こらない。そして誘発変異細胞頻度は約 10×10^{-6} となる。突然変異幹細胞の平均数は一人当たり 10~100 と十分大きいので、Poisson のゆらぎの影響は比較的小さい。400 cGy の被曝では幹細胞プール

exposure to 400 cGy would reduce the stem-cell pool size by two orders of magnitude thus 10^4 - 10^5 cells per individual would have survived. At a calculated VF of 100×10^{-6} for this dose, the mean number of mutations per donor would be 1-10 and the statistical fluctuations among donors (and between alleles) would be expected. Additionally, the magnitude of these statistical fluctuations would be large because each additional mutation in a stem-cell pool of this size would increase the VF by 10 - 100×10^{-6} . Finally, for an exposure of 800 cGy, the stem-cell pool would be reduced to about 10^2 - 10^3 per individual, so that even with an expected VF of 200×10^{-6} , no GPA mutations would be produced in most individuals. Because of their small number of surviving stem cells, most individuals would have normal background VF while a few would have extremely high VF.

In fact, detailed examination of individuals' records revealed that, one donor (T65DR, 882 cGy) out of the four high dose outliers was found to have shown chromosome aberration frequency of 45% in peripheral lymphocytes. She had been reported to have had acute symptoms as fever and purpura, strongly supporting that the low VF of GPA mutation is probably due to the extensive loss of stem cells. For the rest three individuals, the frequency of chromosome aberration is relatively low (7%-10%) and it is not clear whether the low VFs are due to extensive stem-cell kill or the currently estimated doses are overestimated. Among the four high VF outliers, two (T65DR; 336 and 463 cGy) are also shown to have chromosome aberration frequency of more than 40%, suggesting a severe destruction of hematopoietic stem-cell pool and rare mutant inductions. Although the exact number of ultimate stem cells is not clear in experimental animals or in humans,⁴⁵ present results suggest the number of such hematopoietic progenitor cells persisting over 40 years may be in the order of 10^6 in health individuals.

Ultimately, the utility of the GPA assay for determining the exposure history or health risk of individual donors is dependent on the precision with which rare mutational lesions are stably recorded in a finite number of stem cells. This analysis of data from A-bomb survivors shows that in individuals who received large acute radiation exposures, VFs can differ

の大きさは約 1/100 に減少し、一人当たり 10^4 ~ 10^5 の細胞が生存するであろう。この線量について計算された変異細胞頻度 100×10^{-6} では、対象者一人当たりの平均突然変異数は 1~10で、対象者間（及び対立遺伝子間）の統計学的ゆらぎが予想される。その上、幹細胞プールがこの程度の大きさでしかないと一つ突然変異が生じただけで変異細胞頻度を 10 ~ 100×10^{-6} も増大させるので、こうした統計学的ゆらぎも大きくなる。最後に、800 cGy の被曝では、幹細胞プールが一人当たり、約 10^2 ~ 10^3 まで減少するため、たとえ期待される変異細胞頻度が 200×10^{-6} であっても、ほとんどのヒトで GPA 突然変異は起こらないであろう。生存幹細胞数が少ないということは、ほとんどの人は正常の変異細胞頻度を示し、少数の人が極めて高い変異細胞頻度を示すのではないかと考えられる。

実際、個人の記録を詳細に検討すると、4 名の高線量被曝者のうちの 1 名 (T65 改訂推定線量, 882 cGy) は、末梢血リンパ球の染色体異常頻度が 45% であることが分かっている。この被曝者 (女性) は、発熱及び紫斑などの急性症状を示したと記録されており、GPA 突然変異の変異細胞頻度が低いのは、恐らく幹細胞の多大な欠損に起因することを強く示唆している。他の 3 名については、染色体異常頻度は比較的 low (7%~10%)、変異細胞頻度が低いのは、多数の幹細胞の死に起因するものなのか、現在推定されている線量が過大に評価されているためなのかは明瞭でない。変異細胞頻度が極めて高い 4 名のうち、2 名 (T65 改訂推定線量, 336 cGy, 463 cGy) は 40% 以上の染色体異常頻度を示しており、造血幹細胞プールが著しく破壊され、まれな突然変異が誘発されたことを示唆している。究極の幹細胞の正確な数は、実験用動物及びヒトの場合ともに明らかではないが、⁴⁵ 本調査結果からは 40 年以上も持続する造血前駆細胞数は、健常者では 10^6 の桁であろうと示唆される。

究極的には、GPA 測定を、各対象者の被曝歴や健康に及ぼす危険度を決定するために用いることができるかどうかは、どれだけ多くの幹細胞にまれな突然変異傷害が、安定的に存在しているかどうかで決まる。原爆被曝者から得られたデータに関する本解析は、急性放射線を大量に受けた対象者では、変異

substantially from expected values presumably due to statistical recording fluctuations because of a small number of surviving stem cells at the genesis of variant cells. Our model suggests that statistical fluctuations should be less significant for low-dose or chronic exposures because of minimal perturbation of the normal stem-cell pool size. These fluctuations should also be less significant for assays performed a short time after exposure since the target pool could contain short-lived erythroid precursors as well as stem cells. While the current number of low-dose donors is too small to test these predictions, it should be possible to directly determine the significance of statistical factors for different exposure conditions by a systematic study of the correlation between NO and MO frequencies in exposed donors.

細胞生成の際生存幹細胞が少ないために恐らくは統計学的ゆらぎによって、変異細胞頻度が期待値とは著しく異なることを示している。我々のモデルでは、低線量あるいは慢性被曝の場合には正常幹細胞プールの大きさがほとんど変わらないため、統計学的なゆらぎはあまり重要ではないことを示唆している。また、被曝直後に行われる測定の場合には、標的となるプールには幹細胞と同様に短命の赤血球前駆細胞も含まれるため、こうしたゆらぎの重要性は少ない。本調査に含まれる低線量被曝者数は少ないため、これらの予測を確認することはできないが、被曝者の NO 及び MO 頻度の相関関係を系統的に調査すれば、異なる被曝条件における統計因子の重要性を直接確認できるはずである。

REFERENCES

参考文献

1. DARBY SC, NAKASHIMA E, KATO H: A parallel analysis of cancer mortality among atomic bomb survivors and patients with ankylosing spondylitis given X-ray therapy. JNCI 75:1-21, 1985 (RERF TR 4-84)
2. MOLE RH: Ionizing radiation as a carcinogen: Practical questions and academic pursuits. Br J Radiol 48:157-69, 1975
3. KATO H, SCHULL WJ: Studies of the mortality of A-bomb survivors. 7. Mortality, 1950-78: Part 1. Cancer mortality. Radiat Res 90:395-432, 1982 (RERF TR 12-80)
4. HAMILTON HB: Data resources for the major cohort studies: The Adult Health Study. In *Atomic Bomb Survivor Data: Utilization and Analysis*. Ed by R.L. Prentice and D.J. Thompson. Siam, Philadelphia, 1984. pp 18-31
5. 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)
6. AWA AA: Radiation-induced chromosome aberrations in A-bomb survivors - A key to biological dosimetry. In *Atomic Bomb Survivor Data: Utilization and Analysis*. Ed by R.L. Prentice and D.J. Thompson. Siam, Philadelphia, 1984. pp 99-111
7. LANGLOIS RG, BIGBEE WL, JENSEN RH: Measurements of the frequency of human erythrocytes with gene expression loss phenotypes at the glycophorin A locus. Human Genetics (in press)
8. JENSEN RH, LANGLOIS RG, BIGBEE WI: Determination of somatic mutations in human erythrocytes. In *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis*. New York, Alan R. Liss, Inc., 1986. pp 177-84

9. MILTON RC, SHOHOJI T: Tentative 1965 radiation dose estimation for atomic bomb survivors. ABCC TR 1-68
10. BIGBEE WL, VANDERLAAN M, FONG SS, JENSEN RH: Monoclonal antibodies specific for the M- and N-forms of human glycophorin A. *Mol Immunol* 20:1353-62, 1983
11. BIGBEE WL, LANGLOIS RG, VANDERLAAN M, JENSEN RH: Binding specificities of eight monoclonal antibodies to human glycophorin A - Studies with M_{cm} and M_{ken} (UK) variant human erythrocytes and M- and M_{nv}-type chimpanzee erythrocytes. *J Immunol* 133:3149-55, 1984
12. LANGLOIS RG, BIGBEE WL, JENSEN RH: Flow cytometric characterization of normal and variant cells with monoclonal antibodies specific for glycophorin A. *J Immunol* 134:4009-17, 1985
13. SIEGEL SH: Nonparametric statistics for the behavioral sciences. In *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. New York, McGraw-Hill Book Company, Inc., 1956. pp 116-27, 271-7
14. KUNZ BA, HAYNES RH: Phenomenology and genetic control of mitotic recombination in yeast. *Ann Rev Genet* 15:57-89, 1981
15. BECKER, HJ: Über Röntgenmosaikflecken und Defektmutationen am Auge von *Drosophila* und die Entwicklungsphysiologie des Auges. *Z. Induktive Abstammungs-Vererbungslehre* 88:333-73, 1957
16. GRAF U, WURGLER FE, KATZ AJ, FREI H, JUON H, HALL CB, KALE PG: Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen* 6:153-88, 1984
17. KAVATHAS P, BACH FH, DeMARS R: Gamma-ray-induced loss of expression of HLA and glyoxalase I alleles in lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4251-5, 1980
18. BROWN GW, MOOD AM: On median tests for linear hypothesis. *Proc 2nd Berkley Symposium Math. Stat. Prob.* Ed by Jersey Neyman. 1951. pp 159-66
19. LOEWE WE, MENDELSON E: Revised dose estimates at Hiroshima and Nagasaki. *Health Phys* 41:663-6, 1981
20. KERR GD, ECKERMAN KF, TANG JS, RYMAN JC, CRISTY M: Session IV: Shielding and organ dosimetry. In *Second US-Japan Joint Workshop for Reassessment of Atomic Bomb Radiation Dosimetry in Hiroshima and Nagasaki*. Proceedings of a workshop held at Hiroshima, Japan, 8-9 November 1983, Radiation Effects Research Foundation, 1984. pp 79-82
21. STRAUME TJ: A radiobiological basis for setting neutron radiation safety standards. *Health Phys* 49:883-96, 1985
22. VIJAYALAXMI, EVANS HJ: Measurement of spontaneous and X-irradiation-induced 6-thioguanine-resistant human blood lymphocytes using a T-cell cloning technique. *Mutat Res* 125:87-94, 1984
23. SANDERSON BJ, DEMPSEY JL, MORLEY AA: Mutations in human lymphocytes: Effect of X- and UV-radiation. *Mutat Res* 140:223-7, 1984
24. GOULD MN: Radiation-induced specific locus mutations in human mammary epithelial cells. *Int J Radiat Biol* 47:387-91, 1985
25. THACKER J, COX R: Mutation induction and inactivation in mammalian cells exposed to ionizing radiation. *Nature* 258:429-31, 1975
26. COX R, MASSON WK: X-ray-induced mutation to 6-thioguanine resistance in cultured human diploid fibroblasts. *Mutat Res* 37:125-36, 1976
27. LIBER HL, LEMOTTE P, LITTLE JB: Toxicity and mutagenicity of X-rays and 125-I¹²⁵Urd or 3-H TdR incorporated in the DNA of human lymphoblast cells. *Mutat Res* 111:387-404, 1983

28. HSIE AW, O'NEILL JP, COUCH DB, SANSEBASTIAN JR, BRIMER PA, MACHANOFF R, FUSCOE JC, RIDDLE JC, LI AP, FORBES NL, HSIE MH: Quantitative analysis of radiation- and chemical-induced lethality and mutagenesis in Chinese hamster ovary cells. *Radiat Res* 76:471-92, 1978
29. THACKER J, STLETCH A, STEPHENS MA: The induction of thioguanine-resistant mutants of Chinese hamster cells by gamma-rays. *Mutat Res* 42:313-26, 1977
30. KNAAP AGAC, SIMONS JWIM: A mutational assay system for L5178Y mouse lymphoma cells, using hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase (HGPRT)-deficiency as marker. The occurrence of a long expression time for mutations induced by X-rays and EMS. *Mutat Res* 30:97-110, 1975
31. EVANS HH, MENCL J, HORNG MF, RICANAT M, SANCHEZ C, HOZIER J: Locus specificity in the mutability of L5178Y mouse lymphoma cells: The role of multilocus lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4379-383, 1986
32. GROSOVSKY A, LITTLE JB: Evidence for linear response for the induction of mutations in human cells by X-ray exposures below 10 rads. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:2092-95, 1985
33. DEMPSEY JL, MORLEY AA: Measurement of in vivo mutant frequency in lymphocytes in the mouse. *Environ Mutagen* 8:385-91, 1986
34. SEARLE AG: Mutation induction in mice. *Adv Radiat Biol* 4:131-207, 1974
35. PRESTON DL, KATO H, KOPECKY KJ, FUJITA S: Life Span Study Report 10, Part I: Cancer mortality among A-bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950-82. RERF TR 1-86
36. SCHULL WJ, OTAKE M, NEEL JV: Genetic effects of the atomic bombs: A reappraisal. *Science* 213:1220-7, 1981 (RERF TR 7-81)
37. WINTROBE MW, LEE GR, BOGGS DR, BITHELL TC, FOERSTER J, ATHENS JW, LUKENS JN: Clinical hematology. In *Clinical Hematology*, Eighth Ed. Philadelphia, Lea and Febiger, Inc. 1981. pp171-5
38. AMENOMORI T, HONDA T, MATSUO T, OTAKE M, HAZAMA R, TOMONAGA Y, TOMONAGA M, ICHIMARU M: Proliferation, differentiation and possible radiation-induced chromosome abnormalities in circulating hemopoietic stem cells. RERF TR 22-85
39. KAMADA N, KURAMOTO A, KATSUKI T, HINUMA Y: Chromosome aberration in B lymphocytes of atomic bomb survivors. *Blood* 53:1140-7, 1979
40. STRAUSS GH, ALLEN EF, ALBETINI RJ: An enumerative assay of purine analogue resistant lymphocytes in women heterozygous for the Lesch-Nyhan mutation. *Biochem Genet* 18:529-47, 1980
41. DEMPSEY JL, MORLEY AA, SESHADRI RS, EMMERSON BT, GORDON R, BHAGAT CI: Detection of the carrier state for an X-linked disorder, the Lesch-Nyhan syndrome, by the use of lymphocyte cloning. *Hum Genet* 64:288-90, 1983
42. HAKODA M, AKIYAMA M, TATSUGAWA K, AWA AA, YAMAKIDO M: Mutant 6-TG resistant T-lymphocytes in the peripheral blood of A-bomb survivors: (I) Measurement of their frequency. *J Radiat Res* 27:89, 1986 (Abstract)
43. SETLOW RB: Variations in DNA repair among people. In *Epidemiology and Quantitation of Environmental Risk in Humans from Radiation and Other Agents*. Ed by A. Castellani. New York, Plenum Press, 1984. pp205-12
44. MCCULLOCH EA, TILL JE: The sensitivity of cells from normal mouse bone marrow to gamma radiation in vitro and in vivo. *Radiat Res* 16:822-32, 1962
45. HELLMAN S, BOTNICK LE, HANNON EC, VIGNEULLE RM: Proliferative capacity of murine hemopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:490-94, 1978