

DETECTION OF SOMATIC MUTATIONS AT THE GLYCOPHORIN-A
LOCUS IN ERYTHROCYTES OF ATOMIC BOMB SURVIVORS
USING A SINGLE BEAM FLOW SORTER

シングルビーム・フローソーターを用いた

原爆被爆者赤血球グリコフォリンA遺伝子座の体細胞突然変異の検出

SEISHI KYOIZUMI, Ph.D. 京泉誠之
NORI NAKAMURA, Ph.D. 中村 典
MASAYUKI HAKODA, M.D. 箱田雅之
AKIO A. AWA, Ph.D. 阿波章夫
MICHAEL A. BEAN, M.D.
RONALD H. JENSEN, Ph.D.
MITOSHI AKIYAMA, M.D. 秋山實利



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 wish to thank Hisayo Mochizuki for technical assistance and Michiko Takagi, Mitsue Wakasa, and Michiko Kobayashi for manuscript preparation. We are also grateful to Barbara Nesbit, William L. Bigbee, and Richard G. Langlois for their technical advice and valuable discussions.

技術的援助をいただいた望月久代氏に、また原稿を作成していただいた高木迪子、若狭光枝、小林美知子各氏に謝意を表す。技術的助言をいただき、貴重な討議を行ってくださった Barbara Nesbit, William L. Bigbee, Richard G. Langlois 各氏に対しても感謝の意を表す。

A paper based on this report was accepted for publication by:

本報告に基づく論文は下記の雑誌に受理された。

Cancer Research

RERF TECHNICAL REPORT SERIES

放射線影響研究報告書集

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をもって運営されている。

DETECTION OF SOMATIC MUTATIONS AT THE GLYCOPHORIN-A
LOCUS IN ERYTHROCYTES OF ATOMIC BOMB SURVIVORS
USING A SINGLE BEAM FLOW SORTER

シングルビーム・フローソーターを用いた

原爆被爆者赤血球グリコフォリンA遺伝子座の体細胞突然変異の検出

SEISHI KYOIZUMI, Ph.D. (京泉誠之)¹; NORI NAKAMURA, Ph.D. (中村 典)¹;
MASAYUKI HAKODA, M.D. (箱田雅之)¹; AKIO A. AWA, Ph.D. (阿波章夫)²;
MICHAEL A. BEAN, M.D.^{1,3}; RONALD H. JENSEN, Ph.D.⁴;
MITOSHI AKIYAMA, M.D. (秋山實利)¹*RERF Departments of Radiobiology¹ and Genetics²; RERF Consultant and currently Pacific Northwest
Research Foundation, Seattle³; and Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore⁴*
放影研放射線生物学部¹, 遺伝学部², 放影研顧問, 現 Seattle 市 Pacific Northwest Research
Foundation³ 及び Livermore 市 Lawrence Livermore 研究所⁴

SUMMARY

A modified method was developed for measuring the frequency of variant erythrocytes at the glycophorin A (GPA) locus using a single beam cell sorter (SBS). Fluorescein- or phycoerythrin-labeled monoclonal antibodies specific for the M or N GPA alleles were used for the SBS assay. Filter cross-talk of fluorescence emitted from these two dyes was corrected using the SBS electronic compensator. To prevent contamination of nucleated cells in the sorting windows, the nucleated cells in the fixed red blood cell sample were stained with propidium iodide before flow sorting. Blood samples were obtained from atomic bomb survivors who were heterozygous for the MN blood type, and the frequencies of the hemizygous and homozygous variants of the M or N GPA allele were measured by the SBS. For the three types of variants, hemizygotes for M and N allele ($N\phi$ and $M\phi$) and homozygotes for M allele (MM), the variant frequency measured by the SBS showed a good correlation with that previously determined by the dual beam cell sorter. Variant frequencies of the $N\phi$, $M\phi$, and MM cell types in A-bomb survivors, as determined by SBS measurements, were found to increase with radiation dose (DS86, kerma), as well as with the frequency of chromosome aberrations in lymphocytes.

要 約

Glycophorin A (GPA) 遺伝子座における赤血球変異体頻度を測定する改良法をシングルビーム・セルソーター (SBS) を用いて確立した。M 又は N GPA 対立遺伝子に特異的なフルオレセイン又はフィコエリスリン標識モノクローナル抗体を SBS に用いた。これら二つの色素から放出される蛍光のフィルタークロストークを SBS 電子補正装置により補正した。有核細胞が赤血球変異体の sorting window に混入するのを避けるため、フローソーティングの前に固定赤血球サンプル中の有核細胞を propidium iodide で染色した。異型接合 MN 型原爆被爆者から血液サンプルを得て、M 又は N GPA 対立遺伝子の半接合及び同型接合変異体の頻度を SBS で測定した。SBS で測定した M 及び N 対立遺伝子の半接合変異体 ($N\phi$ 及び $M\phi$ 変異体) 並びに M 対立遺伝子の同型接合変異体 (MM 変異体) の頻度は以前デュアルビーム・セルソーターから得た頻度と強い相関関係が認められた。SBS 測定によって得た原爆被爆者の $N\phi$, $M\phi$ 及び MM 細胞型の変異体頻度は、放射線量 (DS86 kerma) 及びリンパ球の染色体異常頻度に伴って上昇することが認められた。

INTRODUCTION

It is well known that various environmental genotoxic substances including ionizing radiation induce mutational lesions as well as induce cancer in human somatic cells. Although the role of somatic cell mutations in carcinogenesis is still unclear, recent studies of oncogenes in somatic cells have shown that gene alterations such as point mutations, rearrangement, and amplification can facilitate some steps in carcinogenesis (for a review, see Reference 1). Therefore, the detection and measurement of *in vivo* somatic cell mutation is becoming an important subject of research for the assessment of human cancer risk induced by environmental mutagens and ionizing radiation.

At present, only a few methods are available for measuring the frequency of *in vivo* mutants in human somatic cells. One of the methods is the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) mutation assay to detect peripheral T-lymphocytes which have lost the expression of a functional product of the X-linked HPRT gene.²⁻⁴ This assay has the advantage that the mutant lymphocyte clones can be grown in culture with interleukin-2 so as to obtain a detailed analysis of the DNA changes that occurred with the HPRT gene mutations.^{5,6} However, this HPRT mutation assay requires a rather large volume of blood (20 ml) and a long-term culture (two weeks). Furthermore, it appears that the frequency of HPRT-mutant T-lymphocytes induced by genotoxic exposure found in the blood decreases during the many years after exposure, as suggested by an earlier study of A-bomb survivors.⁷

Recently, a flow cytometric assay for detecting mutant erythrocytes lacking the surface protein GPA was developed and appears to have some advantages over the HPRT assay.⁸ Since the GPA mutation assay requires only a small volume of blood (less than 1 ml) and a short time (less than two days) for the measurement of mutant frequency, it is well suited for monitoring genotoxic exposure in large populations. In addition, mutants at the GPA locus (mapped to chromosome 4q) are not likely to be selected against *in vivo* because individuals totally lacking GPA on their erythrocytes show no clinical symptoms nor is the life span or function of the erythrocytes affected.⁹ Moreover, this method can measure the frequency of erythrocytes of homozygous GPA phenotype, probably induced

緒言

電離放射線を含む様々な環境の遺伝子毒性物質がヒト体細胞において癌のみならず突然変異傷害をも誘発することはよく知られている。発癌における体細胞突然変異の役割は依然明らかにされていないが、体細胞の発癌遺伝子に関する最近の研究によると、点突然変異、再構成及び増幅などの遺伝子の変化は発癌を誘導することが明らかになった(総説として参考文献1参照)。したがって、生体内体細胞突然変異の検出及び測定が、環境突然変異原物質及び電離放射線により誘発されるヒトの癌リスクの評価研究の重要テーマになってきている。

目下のところ、ヒト体細胞における生体内変異体の頻度測定方法は数少ない。そのうちの一つは、X染色体連鎖 hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) 遺伝子の機能的産物の発現を失った末梢血Tリンパ球を検出する HPRT 突然変異測定法である。²⁻⁴ この測定法は、突然変異リンパ球クローンをインターロイキン2 (IL-2) で培養して増殖させ、HPRT 遺伝子突然変異に伴って生じた DNA 変化を詳細に解析できるという利点がある。^{5,6} しかし、この HPRT 突然変異測定法はかなり多量の血液 (20 ml) と長期の培養 (2週間) とを必要とする。更に、原爆被爆者の先般の調査⁷ で示唆されたように、遺伝子毒性物質への曝露による血液中の HPRT 変異 Tリンパ球の頻度は、被爆後何十年も経過するうちに低下したように思われる。

最近、表面蛋白 GPA を欠損した変異赤血球を検出するフローサイトメトリー測定法が開発されたが、HPRT 測定法よりも優れているように思われる。⁸ GPA 突然変異測定法は、変異体頻度を測定するにはごく少量の血液 (1 ml 以下) と短期間 (2日以下) しか必要としないので、大規模な集団の遺伝子毒性物質への曝露を調べるのに適している。更に、赤血球に GPA が全く欠損している人は臨床的症状を示さないし、赤血球の寿命や機能は何ら影響を受けないので、GPA 遺伝子座 (染色体4qに位置する) の変異体は生体内で選択されるとは考えられない。⁹ 更に、この方法によって、ヒトの癌の発生において重要な遺伝的現象と考えられている体細胞組み換えにより

by somatic recombination, which is believed to be an important genetic event in the development of some human tumors (for a review, see Reference 10). Since GPA molecules are first expressed at the erythroblast stage,^{11,12} a mutational lesion detected in mature erythrocytes should have occurred in early erythroid precursor cells at some stage, including at the pluripotent stem cell stage.⁸

In our previous report, the flow cytometric GPA assay was used to measure the frequency of variant erythrocytes among A-bomb survivors from Hiroshima.¹³ It was found that the frequency of variant erythrocytes is significantly elevated in the exposed donors even 40 years after a single exposure to A-bomb radiation, suggesting that the GPA system may provide a lifetime cumulative dosimeter of past radiation exposure. Those data were obtained using a dual beam cell sorter (DBS).⁸ In the present report we will describe a modified method suitable for use with an SBS which is widely available in many laboratories.

MATERIALS AND METHODS

Blood Sample

Blood samples were obtained from 68 A-bomb survivors participating in the RERF Adult Health Study in Hiroshima and from four standard healthy donors. These donors were confirmed to be MN heterozygotes by a hemagglutination test using rabbit typing sera (Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ). The exposure dose for each survivor was estimated by the recently developed DS86 system which is based on improved calculations of the yield of neutrons and gamma rays from the bomb and shielding effects.¹⁴ One cohort of 43 donors was composed of proximally exposed survivors with DS86 dose estimates (total kerma) ranging from 0.11-5.02 Gy. The second cohort consisted of 21 distally exposed survivors having assigned doses of less than 0.005 Gy. They serve as age- and sex-matched controls to the proximally exposed survivors. The standard healthy donors were sampled three or more times during this study to examine the reproducibility of the assay.

GPA variant frequencies for 54 of the donors examined in this study had also been measured by means of a DBS at Lawrence Livermore National Laboratory (LLNL), as reported previously.¹³ The frequency of peripheral blood lymphocytes bearing chromosome aberrations for 34 of the donors also had been measured in a previous study.¹⁵

誘発される同型接合 GPA 表現型赤血球の頻度を測定できる(総説として参考文献10参照)。GPA 分子はまず赤芽球段階で表現するので、^{11,12} 成熟赤血球で検出された突然変異は、多分化能幹細胞を含む初期の赤血球系前駆細胞のあるステージで生じたはずである。⁸

前報では、フローサイトメトリー-GPA 測定法を用いて広島原爆被爆者の変異赤血球頻度を測定した。¹³ 原爆放射線に1回被曝して40年経過した現在でさえも、被爆者においては変異赤血球頻度は有意に上昇していることが認められたが、このことは、GPA システムが過去の放射線被曝の生涯にわたる集積線量の dosimeter として利用できる可能性があることを示唆している。これらのデータはデュアルビームセルソータ(DBS)を用いて得られた。⁸ 本報においては、多くの研究所で広く利用されているSBSを用いるための改良法を記述する。

材料及び方法

血液サンプル

広島放影研成人健康調査対象者である68名の原爆被爆者と標準集団として健康な供血者4名から血液サンプルを得た。これらの供血者は、ウサギタイプング血清(Ortho Diagnostic Systems, Raritan, New Jersey 州)を用いた血球凝集テストによりMN異型接合体と確認された。原子爆弾の中性子及びガンマ線の収量の算定方法を改良し、遮蔽効果を考慮に入れて最近確立されたDS86線量推定方式により、各被爆者の被曝線量を推定した。¹⁴ 第一の集団は、DS86推定線量(総kerma)が0.11~5.02Gyの近距離被爆者43名からなる。第二の集団はDS86推定線量が0.005Gy以下の遠距離被爆者21名からなる。後者の集団は年齢及び性をマッチさせた近距離被爆者の対照者である。本調査期間中、上述の測定法の再現性を調べるために、健康な標準供血者から3回以上採血した。

本研究の対象者である供血者のうち54名のGPA変異体頻度は、前報¹³で報告したように米国Lawrence Livermore研究所(LLNL)のDBSを用いて測定してある。また34名の供血者の染色体異常をもつ末梢血リンパ球の頻度も、以前の調査で測定した。¹⁵

Monoclonal Antibodies, Cell Fixation, and Staining

The preparation and characterization of the monoclonal antibodies (MonAb) to GPA have been described previously.¹⁶⁻¹⁸ The following four MonAbs were used for this study: the GPA (M)-specific MonAbs 6A7 (γ 1) and 9A3 (γ 1); the GPA (N)-specific MonAb NN3 (μ); and the GPA-specific MonAb 10F7 (γ 1) that binds equally well to both the M and N types of GPA. These MonAbs were labeled with appropriate fluorescent dyes according to methods described previously,¹⁸ with a modification for adapting the assay to SBS. In brief, MonAbs 10F7 and 9A3 were directly conjugated with fluorescein (-F suffix on the antibody name), and MonAbs 6A7 and NN3 were conjugated with biotin, allowing labeling with streptavidin-conjugated phycoerythrin (-B-AvPE), which was substituted for the Texas Red (TR)-avidin used at LLNL.¹⁸ Phycoerythrin (PE)-streptavidin was obtained from Becton Deckinon Immunocytometry Systems (BD, Mountain View, Calif).

Blood samples were fixed with formalin or dimethylsuberimidate (DMS, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) to block antibody-induced agglutination of erythrocytes, as described previously.¹⁸ Briefly, formalin-fixed spherical erythrocytes were produced by diluting blood in a solution containing sodiumdodecylsulphate, followed by fixation with formalin. Formalin erythrocyte spheres were used for staining with MonAbs 6A7-B and 10F7-F, but this method cannot be used with the MonAb NN3, as binding of NN3 to GPA is abolished by formalin fixation. Another fixation method using DMS, which can cross-link proteins of erythrocytes, was used after removing the buffy coat and plasma proteins. All four MonAbs were able to bind GPA on DMS-fixed erythrocytes.

Fixed erythrocytes (5×10^6) were suspended in phosphate-buffered saline (pH 7.2) containing 5 mg/ml bovine serum albumin, 0.01% Nonidet P-40, and 1.5 mM NaN_3 ,⁸ and incubated for one hour with a mixture of the primary MonAbs (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ each). After washing twice, cells were incubated for one hour with PE-streptavidin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Before flow cytometry, propidium iodide (PI, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) was added at a final concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to gate out the contaminating nucleated cells from the sorting windows, as described in the Results section.

モノクローナル抗体、細胞固定及び染色

GPA に対するモノクローナル抗体 (MonAb) の作成及びその性質については以前に記述した。¹⁶⁻¹⁸ 本研究では、GPA (M) に特異的なモノクローナル抗体 6A7 (γ 1) 及び 9A3 (γ 1), GPA (N) に特異的なモノクローナル抗体 NN3 (μ) 並びに GPA-M, GPA-N 双方に等しく結合する GPA 特異的なモノクローナル抗体 10F7 (γ 1) の四つのモノクローナル抗体を用いた。これらのモノクローナル抗体は、SBS に使用できるように改良を加え、以前報告した方法¹⁸ に従って適切な蛍光色素で結合した。要約すると、モノクローナル抗体 10F7 及び 9A3 をフルオレセインで直接標識 (抗体名の後ろに -F を付ける) し、モノクローナル抗体 6A7 及び NN3 をビオチンを結合させ、Lawrence Livermore 研究所で使用されている Texas Red (TR)-アビジンの代わりにストレプトアビジン結合フィコエリスリン (-B-AvPE) で標識した。¹⁸ フィコエリスリン (PE)-ストレプトアビジンは Becton Deckinon Immunocytometry Systems (BD, California 州 Mountain View) から購入した。

血液サンプルは、以前記述したように¹⁸ ホルマリン又はスベリミジン酸ジメチルエステル (DMS, Missouri 州 St. Louis 市, Sigma Chemical 社) で固定し、抗体による赤血球凝集を阻止した。要約すれば、ドデシル硫酸ナトリウムを含む溶液中で血液を希釈した後、ホルマリンで固定することによりホルマリン固定球状赤血球を作成した。モノクローナル抗体 6A7-B 及び 10F7-F での染色にはホルマリン固定球状赤血球を用いたが、ホルマリン固定によって NN3 と GPA の結合が壊されるので、モノクローナル抗体 NN3 にはこの方法は使えない。パフィーコート及び血漿蛋白質を除去した後に、赤血球の蛋白質を架橋することのできる DMS による別の固定法を用いた。四つのモノクローナル抗体はすべて DMS 固定赤血球上の GPA に結合する。

固定赤血球 (5×10^6) を 5 mg/ml ウシ血清アルブミン、0.01% Nonidet P-40 及び 1.5 mM NaN_3 を含むリン酸緩衝食塩水 (pH 7.2) に浮遊させ、⁸ 1 次モノクローナル抗体 (各 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を混合したもので 1 時間インキュベートした。2 回洗浄した後に細胞を PE ストレプトアビジン (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 1 時間インキュベートした。「結果」の項に記述するように、有核細胞が sorting window に混入するのを避けるために、フローサイトメトリーを行う前に propidium iodide (PI, Missouri 州 St. Louis 市, Sigma Chemical 社) を最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加した。

Flow Cytometry and Cell Sorting

Flow cytometry and sorting were performed on a FACStar (BD) single beam flow sorter equipped with an argon ion laser (2W). Both fluorescent dyes, fluorescein (F) and PE, were excited with a 300-mW laser beam at 488 nm, and fluorescence was detected through a 530-nm band pass filter for F and a 585-nm band pass filter for PE. The spectral overlap of F and PE fluorescence was electronically compensated using a standard erythrocyte mixture, as described in the Results section. Measurements of erythrocyte fluorescence were standardized with plastic microspheres labeled with F or PE (CaliBRITE beads purchased from BD). Linear amplification was used for precise intensity measurements, and logarithmic amplification with a range of four decades was used to display results from mutation analysis. Forward light scatter was also measured and was used to set the threshold to remove small debris. Flow speed for sorting of erythrocytes was approximately 1,000 cells/sec.

Cells with specific fluorescence intensities of hemizygous and homozygous variants were sorted simultaneously from each sample onto glass slides, and the number of erythrocytes showing F and PE fluorescence patterns specific for variant phenotypes was determined under a fluorescence microscope (Nikon, Tokyo) as described previously.⁸

RESULTS

Characterization of Assay Systems using SBS

Flow cytometric detection of variant erythrocytes was described in detail in a previous report.⁸ Three types of assays, namely, the one-way assay (1W1) and the two versions of the two-way assays (2W1 and 2W2), were developed using the DBS. In the present study, two of these assays, 1W1 and 2W2, were adapted for the SBS which uses F and PE as fluorescent dyes for two-color flow analysis.

The 1W1 assay uses formalin-fixed erythrocytes stained with MonAb 6A7-B-AvPE specific for GPA (M) and with MonAb 10F7-F that binds equally well to both GPA (M) and GPA (N). With the 1W1 assay, two variant cell types, hemizygous N ϕ and homozygous NN cells, can be detected simultaneously among erythrocytes from MN heterozygous donors. N ϕ cells, which have lost the expression of the M allele, lack 6A7-B-AvPE fluorescence and retain half the normal 10F7-F fluorescence; whereas NN cells, which have lost the expression of the M

フローサイトメトリー及びセルソーティング

アルゴンイオンレーザー (2W) を装備した FACStar (BD) シングルビームフローソーター上でフローサイトメトリー及びソーティングを行った。フルオレセイン (F) 及び PE の両蛍光色素を 300 mW レーザービームを用いて 488 nm で励起させ、フルオレセインは 530 nm バンドパスフィルターにより、PE は 585 nm バンドパスフィルターにより蛍光を検出した。「結果」の項に記述するように、標準赤血球混合物を用いてフルオレセイン及びフィコエリスリン蛍光のスペクトルの重なりを電気的に補正した。赤血球の蛍光の測定値をフルオレセイン又は PE で標識したプラスチック製マイクロスフェアー (BD から購入した CalibrITE ビーズ) で標準化した。正確な強度測定には直線的増幅を用い、突然変異の解析は $10^1 \sim 10^4$ の対数増幅を用いた。前方光散乱も測定し、それを用いて小碎片を除去する閾値を設定した。赤血球をソーティングするためのフロースピードは約 1,000 細胞/秒であった。

以前に記述したように、⁸ 半接合変異体及び同型接合変異体に相当する蛍光強度をもつ細胞を各サンプルから同時にガラススライド上にソーティングし、変異表現型に特異な F 及び PE 蛍光パターンを示す赤血球数を蛍光顕微鏡 (Nikon) 下で算定した。

結 果

SBS を用いた測定システムの特性

フローサイトメトリーによる変異赤血球検出法は既に詳述されている。⁸ DBS を用いて 3 通りの測定法、すなわち one-way 測定法 (1W1) 及び 2 種類の two-way 測定法 (2W1 及び 2W2) が開発されている。本研究では、F 及び PE を蛍光色素として用いる 2 色フロー解析を用いて、これらの測定法のうち 1W1 及び 2W2 の二つを SBS に応用した。

1W1 測定法では、GPA (M) に特異的なモノクローナル抗体 6A7-B-AvPE、及び GPA (M) にも GPA (N) にも双方に等しく反応するモノクローナル抗体 10F7-F で染色したホルマリン固定赤血球を用いる。1W1 測定法を用いると、二つの変異細胞型である半接合 N ϕ 細胞及び同型接合 NN 細胞を MN 異型接合型対象者の赤血球から同時に検出できる。M 対立遺伝子が表現しなくなった N ϕ 細胞は、6A7-B-AvPE による蛍光は消失し、正常な 10F7-F の蛍光は 1/2 となる。一方、M 対立遺伝子は表現しなくなったが異型

allele but express twice the normal amount of the N allele as MN heterozygous erythrocytes, display normal 10F7-F fluorescence.

The 2W2 assay uses DMS-fixed erythrocytes labeled with MonAb 9A3-F specific for GPA (M) and MonAb NN3-B-AvPE specific for GPA (N). With this assay, hemizygous M ϕ cells and homozygous MM cells from MN heterozygous donors can be measured simultaneously. M ϕ and MM variant cells lack expression of GPA (N), but express GPA (M) at a level equivalent to or twice as great as normal MN heterozygous cells, respectively.

The relative fluorescence intensities of normal MM, MN, and NN erythrocytes stained with the four MonAbs were measured by SBS and the results are summarized in Table 1. The results from the single stained samples illustrate the spectral overlap of the F and PE fluorescence. Thus, the fluorescence detector for PE responds to a small amount of F fluorescence leaked from the band pass filter for PE fluorescence, and vice versa. The fluorescence intensity of the doubly stained cells is nearly equal to the sum of the intensities of the two singly stained cells which also demonstrates the filter cross-talk.

接合 MN 赤血球と同じように N 対立遺伝子を正常値の 2 倍表現している NN 細胞は正常な 10F7-F 蛍光を示している。

2W2 測定法では、GPA (M) に特異的なモノクローナル抗体 9A3-F 及び GPA (N) に特異的なモノクローナル抗体 NN3-B-AvPE で標識した DMS 固定赤血球を用いる。この測定法を用いると、MN 異型接合型対象者の半接合 M ϕ 細胞及び同型接合 MM 細胞を同時に測定できる。M ϕ 及び MM 変異細胞は GPA (N) の表現はないが、それぞれ正常な MN 異型接合細胞と同量又は 2 倍の量の GPA (M) を表現する。

四つのモノクローナル抗体で染色した正常な MM, MN 及び NN 赤血球の相対蛍光強度を SBS で測定し、その結果を表 1 に要約した。単一染色サンプルの結果は、F 及び PE 蛍光のスペクトルの重なりを示している。したがって、PE 蛍光では PE 蛍光検出器がバンドパスフィルターから漏出した F 蛍光に反応し、F 蛍光に関しては F 蛍光検出器がバンドパスフィルターから漏出した PE 蛍光に反応する。二重染色細胞の蛍光強度は、フィルタークロストークも示す二つの単一染色細胞の蛍光強度とほぼ等しい。

TABLE 1 RELATIVE FLUORESCENCE INTENSITIES OF DIFFERENT MN BLOOD TYPES IN THE 1W1 AND 2W2 MUTATION ASSAYS

表 1 1W1 及び 2W2 突然変異測定法における異なる MN 血液型赤血球の相対蛍光強度

Antibody	Fluorescence intensity ^a					
	Green fluorescence (530 nm)			Orange fluorescence (585 nm)		
	MM	MN	NN	MM	MN	NN
1W1 assay:						
6A7-B-AvPE	6	3	1	625	325	2
10F7-F	73	88	79	19	22	22
Both	81	80	81	630	325	20
2W2 assay:						
NN3-B-AvPE	1	3	7	17	351	746
9A3-F	211	104	1	47	24	1
Both	189	96	8	68	434	782

^a Fluorescence intensity expressed as a percent of intensity of F- or PE-labeled microspheres.

F 又は PE 標識マイクロスフェアの蛍光強度の百分率として表されている。

Figure 1 also shows the effects of filter cross-talk and displays the effectiveness of electronic compensation. As shown in Figure 1B, the PE fluorescence intensity of doubly stained NN cells is greatly increased compared to that stained by PE alone (Figure 1A). The same is true for MM cells in the 2W2 assay and this is due to filter cross-talk. Since this increment in the PE fluorescence of these homozygous cells caused by such an optical artifact lowers the resolution power for the detection of rare variant cells, the cross talk was electronically corrected using a compensator (Figure 1C). Fluorescence window positions for sorting variant erythrocytes were defined using the corrected contour of the control cell mixtures. The following are the ranges of fluorescence intensities that define variant windows (normalized to a value of one for the intensity of a single allele with each MonAb): for the N ϕ variant, Y = 0-0.03, X = 0.7-1.3; for the NN variant, Y = 0-0.03, X = 1.3-2.6; for the M ϕ variant, Y = 0-0.06, X = 0.7-1.3; and for the MM variant, Y = 0-0.06, X = 1.3-2.6. The window positions were nearly identical for all assays, but the upper limits in the Y axis for the window were slightly adjusted for each lot of antibody conjugates which differed in their resolution of normal MN cells and variant cells.

Detection of Variant Cells by SBS

For detection of N ϕ and NN variant cells, erythrocytes from heterozygous MN donors were stained with a pair of MonAb, and between 10^5 and 10^6 cells were analyzed by the SBS for each sample. All cells appearing in the two variant windows were sorted onto glass slides to determine if they were the erythrocytes having F green fluorescence and no PE orange fluorescence. Figure 2A shows the result from a 1W1 assay of 5×10^5 erythrocytes from a standard donor. The contour plot represents several hundred events near and in the area of the windows for N ϕ and NN cells. Microscopic examination of the sorted cells revealed that these events were mainly due to contamination of the erythrocytes by white blood cells (WBC) which were nonspecifically stained with MonAb 10F7-F. Since WBC contamination of the sorted cells interferes with counting of the variant erythrocytes under fluorescent microscope, it was necessary to remove the WBC from the window area of the variant cells. Labeling the WBC DNA with propidium iodide (PI) was found to move the WBC in the contour plot up above the peak PE fluorescence intensity

図1もフィルタークロストーク効果を示すとともに電子補正の有効性を示している。図1-Bに示すように、二重染色した NN 細胞の PE 蛍光強度は PE のみで染色した NN 細胞の PE 蛍光強度 (図1-A) と比べて大幅に増加する。2W2 測定法を用いた場合の MM 細胞においても同様であり、これはフィルタークロストークに起因する。このような光学的アーティファクトにより生じたこれらの同型接合細胞の PE 蛍光の増加はまれな変異細胞を検出する際の分解能を低下させるので補正装置を用いてクロストークを電気的に補正した (図1 C)。混合対照細胞の補正等高線図を用いて、変異赤血球をソーティングするための蛍光ウィンドウの位置を設定した。以下は変異体ウィンドウの蛍光強度範囲である (各モノクローナル抗体について一つの対立遺伝子についての蛍光強度を 1 として標準化した)。例えば、N ϕ 変異体の場合は Y = 0-0.03, X = 0.7-1.3, NN 変異体の場合は Y = 0-0.03, X = 1.3-2.6, M ϕ 変異体の場合は Y = 0-0.06, X = 0.7-1.3, 及び MM 変異体の場合は Y = 0-0.06, X = 1.3-2.6 である。ウィンドウの位置はどの測定でもほぼ一致していたが、正常 MN 細胞及び変異細胞の分解能が異なる標識抗体の各ロットについてウィンドウの Y 軸の上限をわずかに調整した。

SBS による変異細胞の検出

N ϕ 及び NN 変異細胞の検出には、異型接合 MN 型対象者の赤血球を一組のモノクローナル抗体で染色し、各サンプルごとに $10^5 \sim 10^6$ 細胞を SBS で解析した。二つの変異体ウィンドウに現れたすべての細胞をガラススライド上に分取し、細胞が緑色の F 蛍光をもつがオレンジ色の PE 蛍光を全くもたない赤血球であるかどうかを決定した。図2 Aは、標準となる対象者の 5×10^5 赤血球の 1W1 測定の結果を示している。等高線図は、N ϕ 及び NN 細胞のウィンドウ付近に数百のイベントを示している。分取された細胞の顕微鏡検査により、これらのイベントの主な原因はモノクローナル抗体 10F7-F で非特異的に染色された白血球 (WBC) が赤血球に混入するためであることが判明した。白血球の混入により蛍光顕微鏡下の変異赤血球の測定が妨げられるので、変異細胞のウィンドウ部分から白血球を除去することが必要となった。白血球 DNA を propidium iodide (PI) で標識すると、等高線プロットの白血球が正常な MN 赤血球のピーク PE 蛍光強度以上に移動することがわかったが、図2 Bに示されるように赤血球の蛍光強度は

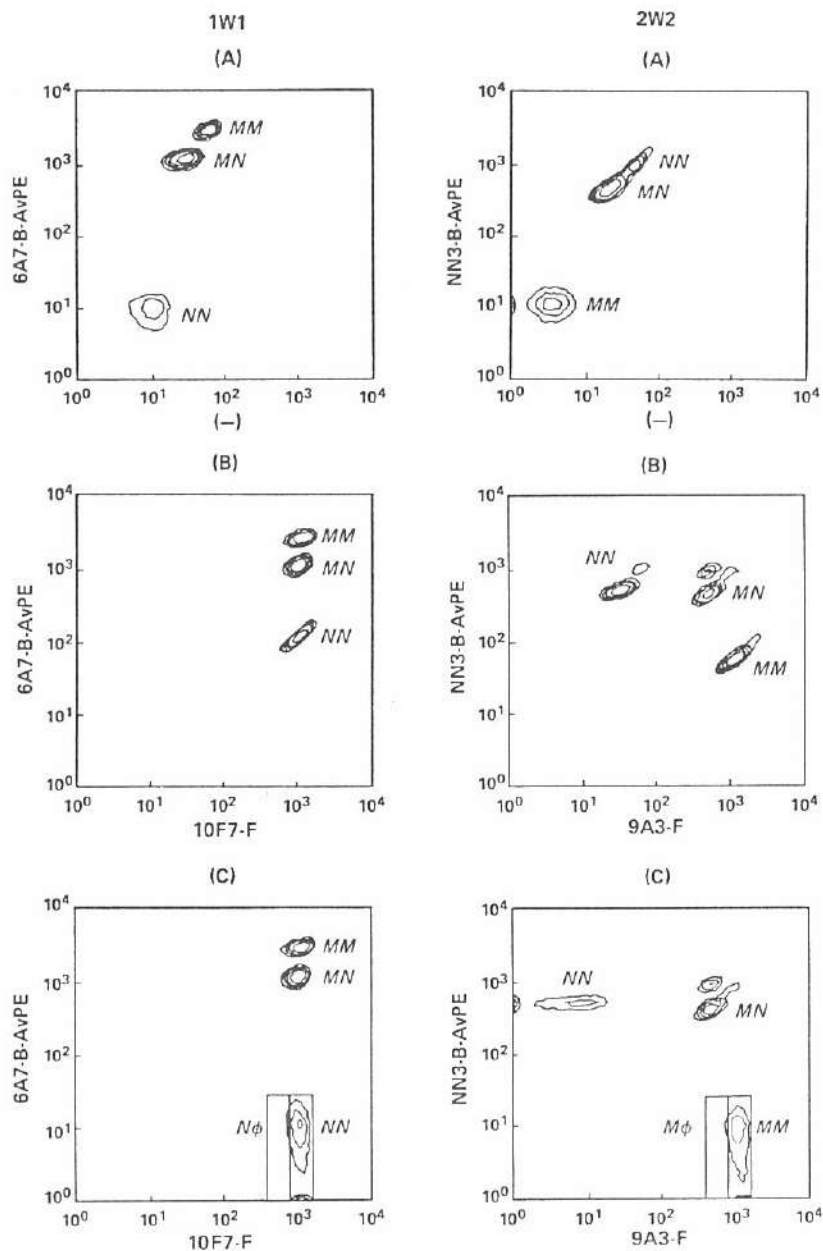


Figure 1. Fluorescence distribution of fixed erythrocytes from MM, MN, and NN individuals singly or doubly stained with anti-GPA MonAbs used for the 1W1 and 2W2 assay systems. Ordinates plot the logarithm of PE fluorescence intensity and abscissae plot the logarithm of F fluorescence intensity. A. Contour plot singly stained with PE-labeled MonAb without fluorescence compensation. B. Doubly stained with PE- and F-labeled MonAbs without compensation. C. Doubly stained with compensation for both PE and F fluorescence cross-talks. Compensated contour plot were used to define the positions of the variant cell windows for the 1W1 and 2W2 assays, respectively.

図1. 1W1及び2W2測定システムに使用された抗GPAモノクローナル抗体で、単独又は二重染色したMM、MN及びNN型対象者の固定赤血球の蛍光分布。縦軸はPE蛍光強度対数表示及び横軸はF蛍光強度の対数表示。A. 蛍光補正を行わずPE標識モノクローナル抗体で単独染色した場合の等高線プロット。B. 補正を行わずPE標識及びF標識モノクローナル抗体で二重染色した。C. 二重染色しPE蛍光及びF蛍光のクロストークの補正を行った。1W1及び2W2測定法それぞれの変異細胞ウィンドウの位置を設定するために補正等高線プロットを用いた。

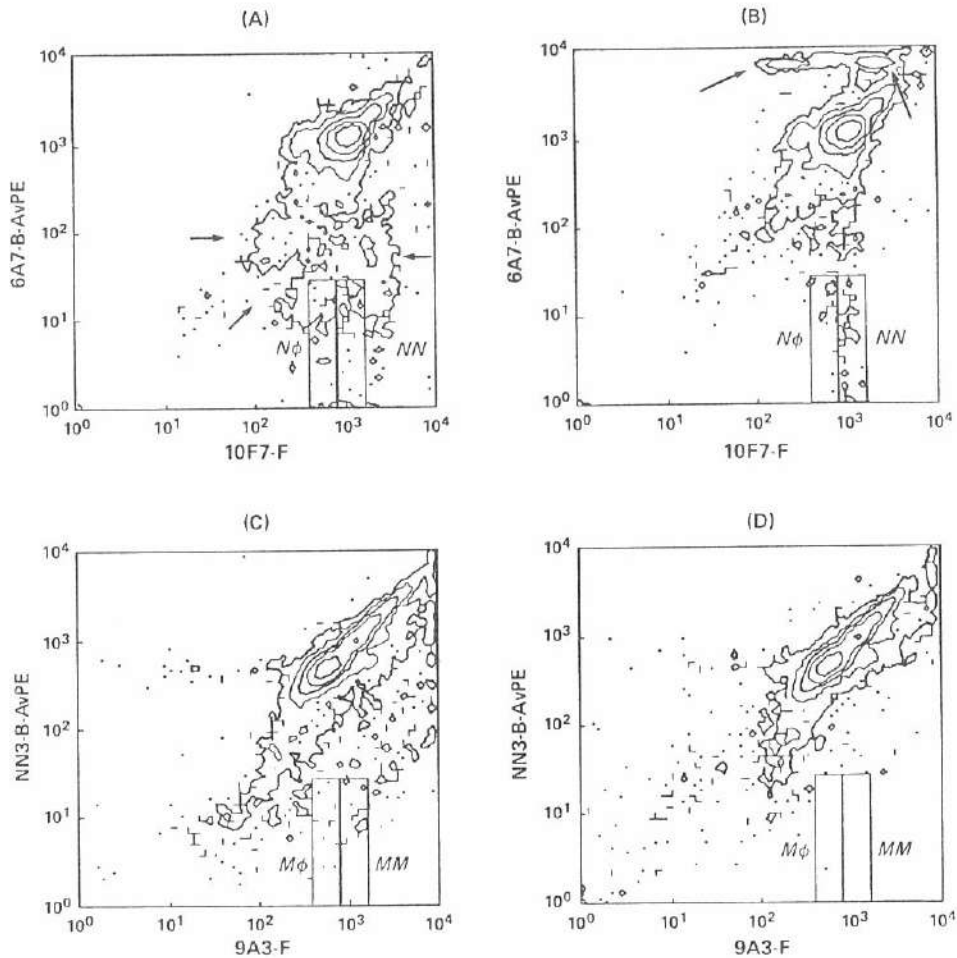


Figure 2. Flow distributions obtained from analysis of about 5×10^5 cells from normal MN donors using 1W1 (A,B) and 2W2 (C,D) assay systems with (B,D) or without (A,C) PI staining. Contours differ by a factor of 10 in events per channel with the lowest contour representing one event per channel. The windows labeled $N\phi$ and $M\phi$ correspond to hemizygous variants, while windows labeled NN and MM correspond to homozygous variants. The arrows indicate clusters of white blood cells.

図2. PI染色を行った場合(B,D)又はPI染色を行わなかった場合(A,C)の1W1(A,B)及び2W2(C,D)測定システムによる正常なMN型対象者の約 5×10^5 細胞の解析から得たフロー分布。等高線はチャンネル当たり10倍ずつ異なり、最も低い等高線はチャンネル当たり1イベントを示す。 $N\phi$ 及び $M\phi$ 標識ウィンドウは半接合変異体に対応し、NN及びMM標識ウィンドウは同型接合変異体に対応する。矢印は白血球群を示す。

of normal MN erythrocytes, while the intensity of the erythrocytes did not change, as shown in Figure 2B. Sorting confirmed that the WBC contamination in the sorted sample disappeared almost completely after PI staining, and the frequency of $N\phi$ or NN variants as enumerated microscopically remained constant with or without PI staining. Figures 2C and D show the results of a 2W2 assay of 5×10^5 MN type erythrocytes stained without or with PI, respec-

変化しなかった。分取されたサンプルの白血球混入は、PI染色後ほぼ完全に消失したことがソーティングにより確認されたが、顕微鏡で算定した $N\phi$ 又はNN変異体の頻度はPI染色をした場合でもしなかった場合でも一定していた。図2C及び2Dは、PI染色しなかった場合とPI染色した場合の2W2測定による 5×10^5 MN型赤血球の結果を示している。分取された細胞における白血球の混入は1W1測定と比べ

tively. Contamination of WBC in the sorted cells was not as frequent in the 2W2 assay as compared to 1W1 assay, probably because more WBC were removed by extensive washing of blood samples before DMS fixation. Flow sorting of samples stained with PI in addition to MonAbs revealed that 20%-100% of the events occurring in the variant windows correspond to erythrocytes with a variant cell phenotype. Other objects contaminating the sorted samples were missed normal erythrocytes and fluorescent debris, but these objects could be microscopically differentiated from variant erythrocytes by their fluorescent staining pattern and/or morphology.

The efficiency of detection of variant cells in the assay system was examined by adding a small number of normal NN or MM cells to MN cells at an approximate frequency of 10^{-4} before staining. Cell staining and flow sorting were performed on samples with or without added homozygous cells. The efficiency of recovery of the added cells was then calculated by the difference between these measurements. As shown in Table 2, the average efficiency of the recovery was approximately 100% in both the 1W1 and 2W2 assays, indicating that the variant frequency obtained from sorted erythrocytes did not require correction for recovery efficiency as was reported for the DBS.⁸

Variant Cell Frequencies in Normal Individuals and A-bomb Survivors

Figure 3 summarizes the frequencies of variant cells in four standard healthy MN donors and 21 distally exposed A-bomb survivors whose DS86 dose estimates were less than 0.005 Gy (control donors). The standard healthy donors were sampled three or more times. For these donors hemizygous $N\phi$ and $M\phi$ cells and homozygous MM cells occurred at mean frequencies of 18×10^{-6} , 11×10^{-6} , and 11×10^{-6} , respectively, and standard deviations of these frequencies for each donor are less than 15×10^{-6} . In contrast, the frequency of homozygous NN variants varied considerably among multiple measurements on each of the standard healthy donors, indicating that the reproducibility of the measurement for NN variant cells is quite low in comparison with that for the other three types of measurement. The same kinds of results were obtained from the control donors, including the large deviation in NN variant frequency. These frequencies are in agreement with those obtained

て2W2測定の方が頻度が少ない。これは恐らくDMS固定以前に血液サンプルの頻回にわたる洗浄により白血球が除去されたためであろう。変異体ウィンドウに生ずるイベントの20%~100%は変異体表現型を有する赤血球に対応することが、モノクローナル抗体とPI染色されたサンプルのフローソーティングにより明らかになった。分取されたサンプルに混入する他の物体は誤って分取された正常な赤血球及び蛍光碎片であったが、顕微鏡を用いて蛍光染色パターン又は形態によりこれらの物体を変異赤血球から区別することができた。

染色前に約 10^{-4} の頻度で少数の正常なNN又はMM細胞をMN細胞に加えて、前述の測定システムにおける変異細胞の検出効率を調べた。同型接合細胞を加えた場合又は加えなかった場合についてサンプルの細胞染色及びフローソーティングを行った。次にこれらの測定値の差により添加細胞の回収効率を算出した。表2に示すように、1W1及び2W2両測定法において平均回収効率はほぼ100%であり、分取された赤血球から得られた変異体頻度はDBSの場合、報告されたように回収効率による補正を必要としないことを示している。⁸

健常人及び原爆被爆者における変異体頻度

図3は、標準としての健康MN型供血者4名及びDS86推定線量が0.005 Gy以下の遠距離被爆者(対照供血者)21名の頻度を要約したものである。標準としての健康供血者を3回以上サンプリングした。これらの供血者に関しては、半接合 $N\phi$ 細胞及び $M\phi$ 細胞並びに同型接合MM細胞の頻度はそれぞれ平均 18×10^{-6} 、 11×10^{-6} 及び 11×10^{-6} で、各供血者のこれらの頻度の標準偏差は 15×10^{-6} 以下である。これとは対照的に、同型接合NN変異体頻度は、標準となる健康な各供血者の複数の測定間で大きく異なったが、これはNN変異細胞測定の再現性が他の3種類の測定の再現性と比べてかなり低いことを示している。NN変異体頻度の大きな偏差を含む同じような結果が対照供血者から得られた。これらの頻度はDBS測定により得られた頻度と一致している。^{8, 13} NN頻度が

TABLE 2 RECOVERY OF NN OR MM CELLS ADDED TO MN CELLS
IN THE 1W1 AND 2W2 MUTATION ASSAYS

表2 1W1及び2W2突然変異測定法におけるMN細胞に加えられた
NN又はMM細胞の回収

1W1 Assay				
Experiment	No. of NN cells added/ 10^{6a}	No. of sorted NN cells/ 10^6	Recovery of added NN cells	
			No. of NN cells recovered/ 10^{6b}	%
1	-	42	-	-
	147	130	88	60
2	-	10	-	-
	133	171	161	121
3	-	40	-	-
	98	153	113	115
4	-	48	-	-
	78	113	65	83
5	-	8	-	-
	79	111	103	130
			Average	102

2W2 Assay				
Experiment	No. of MM cells added/ 10^{6a}	No. of sorted MM cells/ 10^6	Recovery of added MM cells	
			No. of MM cells recovered/ 10^{6b}	%
1	-	10	-	-
	100	104	94	94
2	-	8	-	-
	99	102	94	95
3	-	16	-	-
	100	108	92	92
4	-	36	-	-
	117	150	114	97
5	-	4	-	-
	101	108	104	103
			Average	96

^aErythrocytes enumerated by Coulter counter.

Coulter 計数器で計数された赤血球

^bDifference in the frequency of sorted cells between samples with and
without added homozygous cells.

同型接合細胞を加えた標本と加えない標本の分離細胞頻度の差

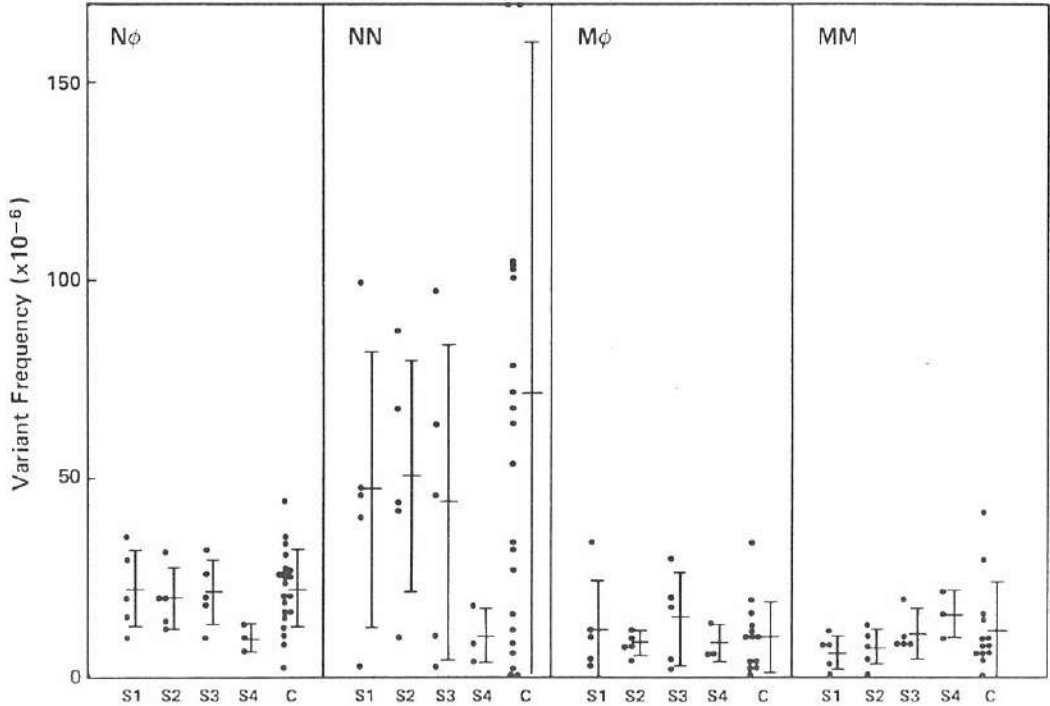


Figure 3. Hemizygous ($N\phi$ and $M\phi$) and homozygous (NN and MM) variant cell frequencies for four normal standard donors (S1-S4) and control A-bomb survivors (C). Each point for standard donors represents the result of a determination on a separate blood sample from the same individual. Each point for control survivors corresponds to one test of each donor. The bars represent the mean \pm standard deviation.

図3. 4名の標準健常対象者(S1~S4)及び対照原爆被爆者(C)の半接合($N\phi$ 及び $M\phi$)及び同型接合(NN 及び MM)変異体頻度。標準対象者の各点は同一対象者の別々の血液標本の測定の結果を示す。対照被爆者の各点は各対象者の1回の測定に対応する。棒線は平均値 \pm 標準偏差を示す。

by the DBS measurements.^{8,13} Although the exact reasons for variability in NN frequency are not known as yet, it is thought that the 1W1 assay is sensitive to alterations in glycosylation of GPA molecules occurring either *in vivo* or during sample preparations.^{8,13}

Variant cell frequencies of 54 A-bomb survivors [15 controls (<0.005 Gy) and 39 exposed (>0.11 Gy)] were measured by both the SBS and DBS. Table 3 shows the correlation of variant cell frequencies between the two types of cell sorter assays. Although blood samples were taken at different times for the SBS vs the DBS, $N\phi$, $M\phi$, and MM variant frequencies were significantly correlated between the SBS and DBS. On the other hand, the correlation of NN variant frequency was found not to be significant, probably due to the low reproducibility of measurement in either assay, as discussed above.

変動する正確な理由は今だ不明であるが、1W1測定法が生体内あるいはサンプル作成中のいずれかに生ずるGPA分子の糖鎖形成の変化に対して感受性が高いと考えられた。^{8,13}

54名の原爆被爆者〔対照者15名(<0.005 Gy)及び被曝者39名(>0.11 Gy)〕の変異体頻度をSBS及びDBS両方で測定した。表3は、2種類のセルソーター測定間の変異体頻度の相関関係を示している。血液サンプルはSBS対DBSで異なる時期に採取したが、 $N\phi$ 、 $M\phi$ 及び MM 変異体頻度はSBS及びDBS間で有意な相関関係が得られた。他方、 NN 変異体頻度の相関関係は上述のようにいずれの測定法でも測定の再現性が低いために、有意ではなかった。

TABLE 3 CORRELATION BETWEEN VARIANT CELL FREQUENCIES
MEASURED BY SBS AND DBS

表3 SBS 及び DBS で測定した変異体頻度の相関関係

Variant cell type	No. of sample	Correlation coefficient (r)	P-value
N ϕ	54	0.954	<0.001
NN	54	0.212	>0.1
M ϕ	33	0.828	<0.001
MM	33	0.726	<0.001

Figure 4 shows the relationship between the DS86 dose estimates (total kerma dose of gamma rays and neutrons) and variant cell frequencies of the N ϕ , M ϕ , and MM cell types. The trend was estimated by assuming a linear model ($y=a+bx$) and significant linear correlations were obtained for all three types of variant cells. The fit parameters obtained were $a=33 \times 10^{-6}$, $b=0.63 \times 10^{-4}/\text{Gy}$ for N ϕ ; $a=20 \times 10^{-6}$, $b=0.32 \times 10^{-4}/\text{Gy}$ for M ϕ ; and $a=15 \times 10^{-6}$, $b=0.14 \times 10^{-4}/\text{Gy}$ for MM. As shown in the upper panel of Figure 4, two donors had exceptionally high N ϕ variant frequencies (more than 1×10^{-3}), and these extreme values greatly affected the linear fit parameters. Eliminating these two values, the calculation of linear fit for N ϕ variant frequency gave parameters of $a=27 \times 10^{-6}$, $b=0.34 \times 10^{-4}/\text{Gy}$, closer to the parameters for M ϕ frequency.

The correlation of erythrocyte variants with the frequency of lymphocytes bearing chromosome aberrations was examined for 34 A-bomb survivors. Both stable and unstable aberrations were included in the analysis and significant linear correlations were obtained between aberration frequency and each of the variant erythrocyte frequencies of N ϕ , M ϕ , and MM (Table 4). Figure 5 shows the linear regression line for M ϕ variant frequency vs chromosome aberration frequency with fit parameters of $a=11 \times 10^{-6}$ and $b=3.2 \times 10^{-4}$.

図4は、DS86推定線量(ガンマ線及び中性子の総カーマ線量)とN ϕ 、M ϕ 及びMM細胞の変異細胞頻度の関係を示している。直線モデル($y = a + bx$)を仮定して傾向を推定すると3種類の変異細胞に有意な直線的相関関係を得た。得られた適合パラメーターは、N ϕ の場合 $a = 33 \times 10^{-6}$, $b = 0.63 \times 10^{-4}/\text{Gy}$, M ϕ の場合 $a = 20 \times 10^{-6}$, $b = 0.32 \times 10^{-4}/\text{Gy}$ 及び MMの場合 $a = 15 \times 10^{-6}$, $b = 0.14 \times 10^{-4}/\text{Gy}$ であった。図4の上のパネルに示すように、2名の供血者のN ϕ 変異体頻度は非常に高く(1×10^{-3} 以上)、これらの極端な値は線形適合パラメーターに大きな影響を及ぼした。これらの二つの値を消去してN ϕ 変異体頻度の線形適合を算定すると、パラメーターは $a = 27 \times 10^{-6}$, $b = 0.34 \times 10^{-4}/\text{Gy}$ となり、M ϕ 頻度のパラメーターに近似していた。

34名の原爆被爆者について赤血球変異体と染色体異常をもつリンパ球の頻度との相関関係を調べた。解析には安定型及び不安定型異常の両方を対象とし、異常頻度とN ϕ 、M ϕ 及びMMの各変異赤血球頻度との間に有意な直線的相関関係を得た(表4)。図5は、M ϕ 変異体頻度対染色体異常頻度の直線回帰線を示しており、適合パラメーターは $a = 11 \times 10^{-6}$ 及び $b = 3.2 \times 10^{-4}$ であった。

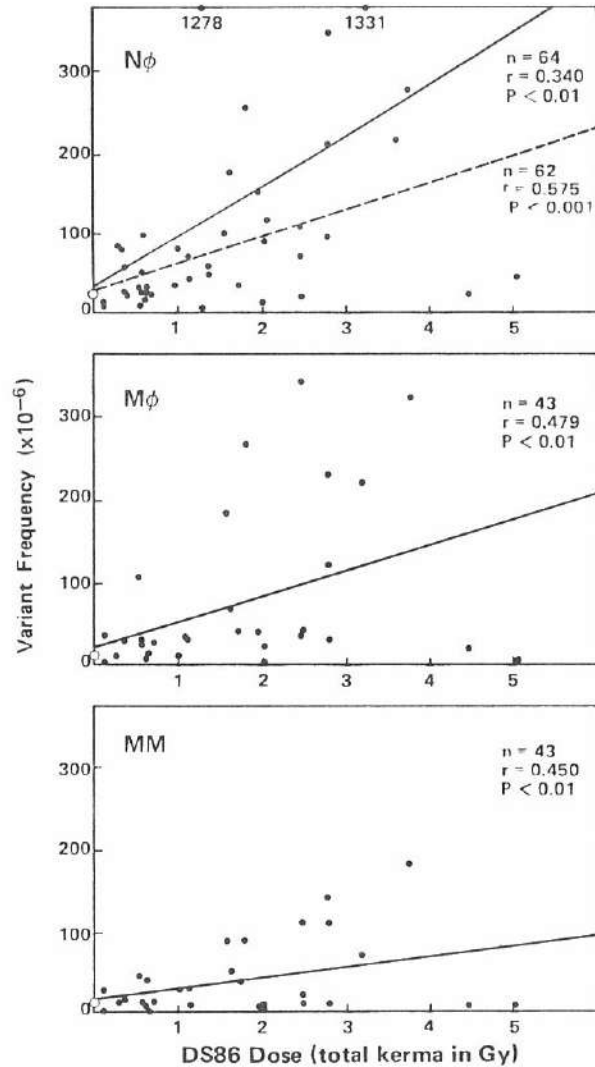


Figure 4. Dose response of the variant cell frequencies ($N\phi$, $M\phi$, and MM) for A-bomb survivors. The solid line corresponds to a linear regression calculated from all data for each variant, and the dashed line in the upper panel represents a linear fit omitting the two extreme values of exceptionally high $N\phi$ frequencies plotted at the top of panel. Open circles (\circ) indicate the mean value of variant frequencies for the control donors (see Figure 3), and r indicates the correlation coefficient.

図4. 原爆被爆者の変異体頻度 ($N\phi$, $M\phi$ 及び MM) の線量反応。実線は各変異体の全データから算出した直線回帰を示し、上のパネルの破線はパネルの上部でプロットされた異常に高い $N\phi$ 頻度の二つの極端な値を除外した回帰直線を示す。白丸 (\circ) は対照群の変異体頻度の平均値を示し (図3 参照)、 r は相関係数を示す。

TABLE 4 CORRELATION BETWEEN FREQUENCY OF
ERYTHROCYTE GPA VARIANTS AND FREQUENCY OF
LYMPHOCYTE CHROMOSOME ABERRATIONS

表4 赤血球 GPA 変異体頻度とリンパ球染色体
異常頻度の相関関係

Variant cell type	No. of sample	Correlation coefficient (r)	P-value
N ϕ	34	0.416	<0.05
M ϕ	28	0.631	<0.001
MM	28	0.528	<0.01

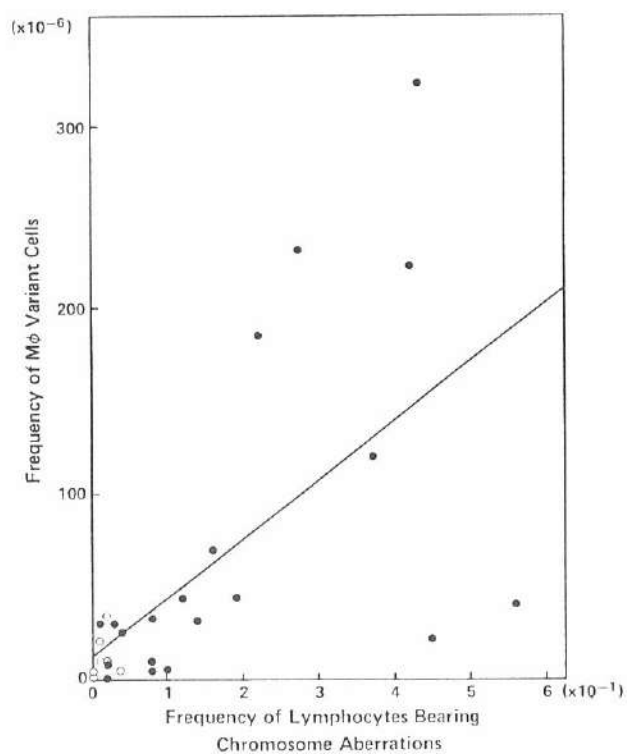


Figure 5. Relationship of the frequency between M ϕ variant cells and chromosome aberrations in A-bomb survivors including control (\circ) and exposed donors (\bullet).

図5. 対照群(\circ)及び被曝群(\bullet)を含む原爆被爆者におけるM ϕ 変異細胞及び染色体異常の頻度の関係

DISCUSSION

In this report, we describe a flow cytometric method using an SBS for enumerating mutant erythrocytes arising *in vivo*. The fundamental difference between using a DBS or an SBS in GPA assaying is the choice of fluorescent dyes used for labeling antibodies, as necessitated by the difference in optical systems of the two cell sorters. This difference required some modifications of flow cytometry in order to adapt the mutation assay to the SBS. The GPA mutation assay using the DBS employs F and TR, which are excited at different wave lengths (488 nm and 590 nm) by two separate laser beams, and the emitted fluorescence is detected through 514-nm and 630-nm narrow band emission filters, respectively, and thus no filter cross talk occurs.^{8,18} In the assay with the SBS, F and PE are both excited by a single laser beam (488 nm), and the emitted fluorescence is separated with a dichroic mirror through two different band pass filters (530 nm and 585 nm) to be quantified by photomultiplier tubes. However, the fluorescence spectrum from the two dyes cannot be completely separated by this filter system, resulting in less resolution power with the SBS for the detection of variant cells. Hence, it is essential to correct the cross talk by the use of electronic compensators with which commercial SBS are generally equipped.

Nucleated cell contamination in the sorting windows for the 1W1 assay is thought to be caused by nonspecific binding of F-labeled 10F7 MonAb to formalin-fixed WBC. Since formalin-fixed WBC have a range of forward and side scatter similar to the formalin-fixed erythrocytes, it is difficult to discriminate between WBC and erythrocyte populations by gating in dual scatter histogram. While this contamination was not observed in the 1W1 assay using DBS analysis,⁸ when formalin spheres stained with 6A7-B-AvPE and 10F7-F are analyzed via the DBS using only one of the two lasers (488 nm), WBC contamination in the variant windows is also observed (unpublished observation by Kyoizumi et al), indicating that the fluorescent avidin is responsible for the contamination. It is possible that the relative intensity of nonspecific staining of WBC with TR-avidin is much greater than with PE-streptavidin, thus moving the WBC far from the position of the sorting windows in the flow histogram of the 1W1 assay employing the DBS.

The recovery efficiencies of variant cells using SBS are much better than those for the DBS, which can

考 察

本報では、生体内に生じる変異赤血球の算定に SBS を用いるフローサイトメトリー法について述べる。GPA 測定法における DBS と SBS の基本的な相違は、二つのセルソーターの光学系の違いがもたらす抗体標識に用いる蛍光色素の選択である。この相違のため、突然変異測定法を SBS に応用するにはフローサイトメトリーに幾つかの改良を行わなければならなかった。DBS を用いる GPA 突然変異測定法では F 及び TR を使用する。この両色素を別々な二つのレーザービームの異なる波長 (488 nm 及び 590 nm) で励起し、それぞれ 514 nm 及び 630 nm のバンドパスフィルターを通して蛍光を検出するので、フィルタークロストークは起こらない。^{8,18} SBS を用いた測定法では、F 及び PE は共に単一レーザービーム (488 nm) で励起され、放出蛍光は光電子増倍管により定量化するために二つの異なるバンドパスフィルター (530 nm 及び 585 nm) を通し dichroic ミラーで分離する。しかし、このフィルター系では二つの色素の蛍光スペクトルを完全に分離することはできず、その結果、SBS による変異細胞検出の分解能は低下する。したがって、市販の SBS が通常装備している電子補正装置を用いてクロストークを補正することが必要である。

1W1 測定法のソーティングウィンドウへの有核細胞混入は、F 標識 10F7 モノクローナル抗体がホルマリン固定の白血球に非特異的に結合することにより起こると考えられる。ホルマリン固定白血球はホルマリン固定赤血球と同一の前方及び測方散乱を示すので、両散乱ヒストグラムでゲートをかけても白血球集団と赤血球集団を区別しにくい。この混入は DBS 解析を用いた 1W1 測定法では観察されなかったが、⁸ 6A7-B-AvPE 及び 10F7-F で染色したホルマリン固定白血球を二つのレーザーのうち一つだけ (488 nm) を用いた DBS によって解析すると、変異体ウィンドウにも白血球混入が観察される (卓泉らによる未発表観察) が、このことは蛍光アビジンが混入の原因であることを示している。TR アビジンで白血球を非特異的に染色した場合の相対強度は PE ストレプトアビジンで染色した場合よりもずっと大きいので、DBS を用いた 1W1 測定法のフローヒストグラムにおいて白血球はソーティングウィンドウから離れている可能性がある。

SBS を用いた変異体の回収率は DBS を用いた場合よりもかなり良好であるが、これもまた蛍光色素の

also be attributed to the differences in fluorescent dyes. The mean recovery efficiencies using DBS analysis were approximately 270% for the 1W1 assay and 180% for the 2W2 assay,⁸ while the means for SBS analysis were approximately 100% for both of the assays. Thus, the observed variant frequencies in DBS analysis must be divided by a correction factor, 2.7 for 1W1 or 1.8 for 2W2, to obtain the exact variant frequencies. The major factor affecting the recovery efficiency is thought to be due to the difference in antibody-induced aggregation of normal vs variant cells. Normal cells are more susceptible to aggregation than variant cells because variant cells bind only one MonAb and normal cells bind both. Since aggregates of normal cells are counted as single events, the observed recovery efficiency can thus be larger than 100%. The main difference in recovery efficiency between the SBS and the DBS probably is due to the differential aggregation effect of the secondary fluorescent avidin. Supporting this hypothesis is the fact that by flow cytometry or under microscope the PE-streptavidin conjugate has less agglutinating activity for normal MN erythrocytes than does the TR-avidin (unpublished observation by Kyoizumi et al). Since the degree of induced erythrocyte agglutination may not be constant for each reagent, these staining reagents including MonAbs and avidins, should be carefully chosen to ensure the accurate measurement of variant erythrocyte frequencies.

In our previous study using the DBS,¹³ it was clearly demonstrated that variant cell frequencies in A-bomb survivors were significantly elevated over 40 years after exposure. The present study shows that variant frequency, measured by SBS and DBS, correlates significantly confirming the finding of elevated variant frequencies. The dose-response effect of radiation on the induction of GPA variants was analyzed in the previous report¹³ using the T65D dose estimates, which are currently being replaced by a newly revised dose estimate called DS86.¹⁴ The slope of the dose effect calculated using DS86 estimates (the mean of b values for $N\phi$ and $M\phi$ by SBS= $0.33 \times 10^{-4}/\text{Gy}$) is about 2.4 times steeper than that using T65D estimates (the mean of b by SBS= $0.14 \times 10^{-4}/\text{Gy}$). Since erythrocytes are continuously replenished every 120 days,¹⁹ radiation-induced mutations must be stably integrated in the long-lived hemopoietic stem cells of A-bomb survivors. Therefore, use of the estimated bone marrow dose is appropriate for analysis of the radiation dose effect. Dose estimates for bone

相違によるものであろう。DBS 解析による平均回収率は 1W1 測定法で約 270%, 2W2 測定法で 180% であったが,⁸ SBS 解析の場合の平均回収率は両測定法とも約 100% であった。したがって、正確な変異体頻度を得るには DBS 解析において観察された変異体頻度を 1W1 の場合は補正係数 2.7, 2W2 の場合は 1.8 で割らなければならない。回収率に影響を及ぼす主要因子は正常細胞対変異細胞の抗体による凝集の差に起因すると考えられる。変異細胞はモノクローナル抗体一つだけに結合し、正常細胞は両モノクローナル抗体に反応するので、正常細胞は変異細胞よりも凝集しやすい。正常細胞の凝集塊はシングルイベントとみなされるので、観察された回収率は 100% 以上になり得る。SBS 及び DBS の回収率の主要な差は、恐らく二次染色試薬である蛍光アビジンの凝集度の差異によるものであろう。この仮説は、正常な MN 赤血球はフローサイトメトリー又は顕微鏡下では PE ストレプトアビジンの方が TR アビジンよりも凝集活性が少ないという事実から指示される(京泉らによる未発表観察)。赤血球凝集度は各試薬で一定していないかもしれないので、変異赤血球頻度を正確に測定するためにはモノクローナル抗体及びアビジンを含むこれらの染色試薬を慎重に選ばなければならない。

DBS を用いた以前の調査¹³で、原爆被爆者の変異体頻度は被爆後 40 年以上経過しても有意に上昇していることが明確に証明された。今回の研究は、SBS と DBS により測定された変異体頻度の間には有意な相関関係があることを証明し、また変異体頻度の上昇を確認している。前報¹³では T65D 推定線量を用いて GPA 変異体の誘発に及ぼす放射線の線量反応効果を解析したが、その推定線量は現在 DS86¹⁴ と呼ばれる新しい推定線量に改訂された。DS86 推定線量値を用いて算定した線量効果の勾配(SBS による $N\phi$ 及び $M\phi$ の b 値の平均= $0.33 \times 10^{-4}/\text{Gy}$)は T65D 推定値を用いた場合の勾配(SBS による b 値平均= $0.14 \times 10^{-4}/\text{Gy}$)より約 2.4 倍急である。赤血球は絶えず 120 日ごとに補充されているので、¹⁹放射線誘発突然変異は原爆被爆者の長寿命の造血幹細胞に安定して維持されているはずである。したがって、放射線線量効果の解析には推定骨髄線量を使用することが適切であろう。骨髄の推定線量は DS86 方式¹⁴

marrow are available in the DS86 system¹⁴ and are about 80% of the total dose in kerma. The induced rates per gray using bone marrow dose estimates are $b=0.40 \times 10^{-4}/\text{Gy}$ for $N\phi$, $0.41 \times 10^{-4}/\text{Gy}$ for $M\phi$, and $0.18 \times 10^{-4}/\text{Gy}$ for MM variant cells, which are 1.2 to 1.3-fold higher than using total dose. These values are nearly equal, within a factor of 2.0, to the induced mutation rate obtained through studies of radiation-induced HPRT mutation in cultured human lymphocytes^{20,21} and skin fibroblasts.^{22,23} It is noteworthy that the frequency of MM variants significantly increases with the DS86 dose estimate, suggesting that radiation exposure may induce events leading to homozygosity in a dose-dependent manner. However, the induced rate per gray for MM variants was less than half of that for hemizygous gene-loss variants. This is not surprising in that the events leading to somatic recombination and/or chromosome missegregation would be less probable than events leading to gene loss mutation.

The induction of HPRT mutant peripheral T-lymphocytes in A-bomb survivors was also previously reported.⁷ Mutant lymphocyte frequency was found to significantly increase with the DS86 dose estimates in 44 donors ($P < 0.05$), while both the spontaneous frequency ($a = 3.7 \times 10^{-6}$) and the slope of the linear regression line ($b = 7.5 \times 10^{-7}/\text{Gy}$) was much less than that for GPA mutant frequency. Furthermore, although data are not shown, the HPRT mutation assay was performed for 29 A-bomb survivors (8 controls and 21 exposed) who were examined in the present GPA study, and the correlation of frequencies between GPA variant erythrocytes and HPRT mutant lymphocytes was not significant ($P > 0.1$). This is thought to be due to the difference of in vivo kinetics between mutant erythrocytes and lymphocytes during the long period after A-bomb radiation exposure. The hemopoietic stem cells with mutational lesions at the GPA gene have survived for more than 40 years and they continuously supply mutant mature erythrocytes to the peripheral blood. In contrast, replenishment of HPRT-deficient T-lymphocytes from mutant stem cells may be limited in adult or older individuals because thymic processing required for T-cell differentiation is known to diminish with aging.^{24,25} Thus, the frequency of induced HPRT-deficient T-lymphocytes may have gradually decreased in the blood of A-bomb survivors during the long period since exposure without

では判明していて、kerma 総線量の約80%である。骨髄推定線量を用いた Gy 当たりの誘発率は $N\phi$ 変異細胞で $b = 0.40 \times 10^{-4}/\text{Gy}$, $M\phi$ 変異細胞で $b = 0.41 \times 10^{-4}/\text{Gy}$, 及び MM 変異細胞で $b = 0.18 \times 10^{-4}/\text{Gy}$ であり、総線量を用いた場合の誘発率の 1.2~1.3 倍高い。これらの値は係数 2.0 の範囲内で、培養ヒトリンパ球における放射線誘発 HPRT 突然変異の研究^{20,21} 及び皮膚線維芽細胞における研究^{22,23} を通じて得られた突然変異誘発率にほぼ等しい。MM 変異体頻度は DS86 推定線量に伴い有意に増加することは注目に値することであり、放射線被曝が線量依存的に同型接合性を誘発する可能性があることを示唆している。しかし、MM 変異体の Gy 当たり誘発率は半接合遺伝子欠変異体の誘発率の 1/2 以下であった。体細胞組み換え又は染色体不分離の誘発は遺伝子欠失突然変異の誘発ほど起こる確率は少ないので、このことは驚くに値しない。

原爆被爆者における HPRT 変異末梢 Tリンパ球の誘発は既に報告されている。⁷ 44名の供血者において変異リンパ球頻度は DS86 推定線量とともに有意に増加 ($P < 0.05$) することがわかったが、自然変異頻度 ($a = 3.7 \times 10^{-6}$) 及び回帰直線の勾配 ($b = 7.5 \times 10^{-7}/\text{Gy}$) は GPA 変異体頻度の場合よりかなり少ない。更に、データは示されていないが、現在の GPA 調査の対象者である 29名の原爆被爆者 (対照者 8名及び被曝者 21名) について HPRT 突然変異測定を行ったが、GPA 変異赤血球頻度と HPRT 変異リンパ球頻度の間の相関関係は有意ではなかった ($P > 0.1$)。これは、原爆放射線被曝後、長期間にわたる変異赤血球及び変異リンパ球の生体内における動態の差に起因するものと考えられる。GPA 遺伝子に突然変異を有する造血幹細胞は 40年以上生存していて、絶えず末梢血に変異成熟赤血球を供給する。対照的に、T細胞分化に必要な胸腺の発達は加齢に伴い退縮することが知られているので、^{24,25} 変異幹細胞からの HPRT 欠損 Tリンパ球の補充は成人又は高齢者において少ないのかもしれない。このように、誘発 HPRT 欠損 Tリンパ球頻度は骨髄から変異細胞が補充されることなく、被曝後長期間にわたり原爆

replacement of mutant cells from bone marrow. Additionally, it remains to be seen whether radiation-induced HPRT-deficient T-lymphocytes also have a selective disadvantage similar to that observed in Lesch-Nyhan heterozygotes.²⁶

Large deviation of variant frequencies from the linear regression line using the T65D dose system were previously reported for the highly exposed donors.¹³ Such fluctuations were also observed using the SBS assay and the DS86 dose estimates. A decrease of the stem cell pool size caused by cell killing at high radiation doses can explain these fluctuations as previously proposed.¹³ High-dose exposure would dramatically reduce the number of stem cells available for "recording" induced mutations, and Poisson fluctuation would largely affect the number of induced mutations in a limited number of stem cells. $N\phi$ variant cells in the several donors showing extremely high variant frequency (1×10^{-3}) might have been derived from mono- or oligoclonal mutant precursor cells arising in a very small stem cell pool. The monoclonality of an in vivo mutation of exceptionally high frequency was also observed for HPRT mutant lymphocytes (2×10^{-4}) in an A-bomb survivor.²⁷ It was clearly demonstrated by Southern blotting analysis that the T and B mutant lymphocytes carried an identical alteration of the HPRT gene and exhibited a variety of rearrangement patterns of the T cell receptor ($C\beta$) and immunoglobulin genes (J_H), indicating differentiation of lymphocytes from a monoclonal mutant stem cell.

There is growing evidence that events leading to a homozygous state, including mitotic recombination and chromosome missegregation, occur in vivo and play an important role in the production of hereditary human tumors as suggested by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of tissues in retinoblastoma,^{10,28,29} Wilm's tumor,^{10,30-32} and other tumors.^{33,34} These studies also suggest that a new class of cancer gene may exist, defined as an antioncogene, in which mutation includes deletion of one allele followed by somatic recombination, which may result in carcinogenesis.^{10,29} The somatic recombination of these mutated antioncogenes may also play an important role in nonhereditary oncogenesis. We have recently observed an extraordinary high elevation of homozygous GPA variant frequency in Bloom's syndrome ($1-2 \times 10^{-3}$) which is known

被爆者の血液中で漸次減少したのかもしれない。更に、放射線誘発 HPRT 欠損 Tリンパ球も Lesch-Nyhan 異型接合体²⁶ に認められたと同様の選択的不利があるか否かはまだわかっていない。

高線量被曝群における T65D 線量推定方式を用いて回帰直線からの変異体頻度の大きなずれが以前報告された。¹³ SBS 測定法及び DS86 推定線量を用いた場合にもこのようなばらつきが認められた。以前提議されたように¹³ 高線量での細胞死による幹細胞プールサイズの縮小によってこれらのばらつきを説明できる。高線量被曝は誘発突然変異を「記録する」ために使用される幹細胞の数を大幅に減少させ、ポアソン分布におけるばらつきが少数の幹細胞における誘発突然変異の数に大きく影響を及ぼす。変異体頻度が非常に高い (1×10^{-3}) 数人の供血者の $N\phi$ 変異体細胞は、ごく小さな幹細胞プールに現れるモノクローナル又はオリゴクローナル変異前駆細胞に由来していたかもしれない。頻度が非常に高い生体内突然変異のモノクローナル性は一人の原爆被爆者の HPRT 変異リンパ球 (2×10^{-4}) においても認められた。²⁷ T 及び B 変異リンパ球は HPRT 遺伝子の同一変化を示し、T 細胞レセプター ($C\beta$) 及び免疫グロブリン遺伝子 (J_H) の様々な再構成パターンを示すことが Southern プロット解析により明確に証明され、リンパ球のモノクローナル変異幹細胞からの分化が示された。

有糸分裂組み換え及び染色体誤不離などの同型接合を誘発する現象が生体内に起こり、網膜芽細胞腫、^{10,28,29} ウィルムス腫瘍、^{10,30-32} 及び他の腫瘍^{33,34} の細胞の restriction fragment length polymorphism (RFLP) の解析により、この現象が遺伝性ヒト腫瘍の発生に重要な役割を果たすことがしだいに明らかになっている。これらの研究は、発癌抑制遺伝子として定義される新しい種類の癌遺伝子が存在し、その一つの対立遺伝子の欠失とそれに続く体細胞組み換え変異が起こる結果、発癌が誘導されることも示唆している。^{10,29} これらの突然変異を生じた発癌抑制遺伝子の体細胞組み換えは非遺伝性発癌にも重要な役割を果たしているかもしれない。我々は最近、癌を起こしやすい遺伝性疾患として知られている Bloom 症候群における同型接合 GPA 変異体

to be a cancer-prone hereditary disease.³⁵ In these patients, it has been reported that the spontaneous mutation frequency is about 10 times higher than that of normal people.^{36,37} Thus, the increased spontaneous frequencies of both mutation and somatic recombination may provide predisposing condition for carcinogenesis. The observation that the frequency of homozygous MM variant cells significantly correlated with radiation dose may suggest that somatic recombination possibly contributes to radiation-induced oncogenesis in A-bomb survivors whose cancer incidences increase approximately linearly with DS86 dose.³⁸ However, an assay method remains to be established to detect NN homozygous variants. Since somatic recombination should produce two kinds of daughter cells, MM and NN, it is expected that the two frequencies should be similar. Because the GPA assay cannot provide confirmation at the DNA level of somatic recombination such as can be done with RFLP analysis, it is important to develop a precise method for detecting NN variant frequency in order to substantiate the results of the GPA assay for MM variants.

Finally, the frequency of chromosome aberrations in lymphocytes increased approximately linearly with increasing dose in Hiroshima A-bomb survivors,¹⁵ thereby providing valuable information as a biological dosimeter of past radiation exposure. Since the GPA variant frequency showed a significant correlation with chromosome aberration frequency, the erythrocyte GPA mutation may now be considered a new biological parameter indicative of radiation exposure, and more precise dose estimation may be achieved by the combination of the two assays. A large-scale study of GPA mutation in A-bomb survivors, using the SBS in conjunction with chromosome aberration frequencies, will be undertaken at RERF.

頻度の異常に高い上昇 ($1-2 \times 10^{-3}$) を観察した。³⁵ これらの患者においては、自然突然変異頻度は健康人の頻度の約10倍高いことが報告されている。^{36,37} したがって、自然突然変異及び自然体細胞組み換えの両頻度の増加は発癌の要因となっているかもしれない。同型接合 MM 変異体頻度は放射線量と有意な相関関係があったという所見は、癌発生率が DS86 線量の増加とともにほぼ直線的に増加する原爆被爆者において、体細胞組み換えが放射線誘発発癌の一因となることを示唆しているかもしれない。³⁸ しかし、NN 同型接合変異体を検出するための測定法はいまだ確立されていない。体細胞組み換えにより二種類の娘細胞 MM 及び NN が生じるので、二つの頻度が同一であることが予想される。GPA 測定では RFLP 解析のような体細胞組み換えの DNA レベルでの確認ができないので、MM 変異体の GPA 測定結果を実証するためには NN 変異体頻度検出の正確な方法を開発することが重要である。

最後に、広島原爆被爆者においてリンパ球の染色体異常頻度は線量の増加とともにほぼ直線的に増加し、¹⁵ 過去の放射線被曝の生物学的 dosimeter として貴重な情報を提供した。GPA 変異体頻度は染色体異常頻度と有意な相関関係を示したので、現在赤血球 GPA 突然変異は放射線被曝を示す新しい生物学的パラメーターと考えられ、また二つの測定法を組み合わせてより正確な線量推定が可能になるかもしれない。染色体異常頻度とともに、SBS を用いた原爆被爆者における GPA 突然変異の大規模な研究が放影研で着手されることになっている。

REFERENCES

参考文献

1. WEINBERG RA: The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. *Science* 230:770-6, 1985
2. ALBERTINI RJ, CASTLE KL, BORCHERING WR: T-cell cloning to detect the mutant 6-thioguanine-resistant lymphocytes present in human peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:6617-21, 1982
3. MORLEY AA, TRAINOR KJ, SESHADRI R, RYALL RG: Measurement of *in vivo* mutations in human lymphocytes. *Nature* 302:155-9, 1983
4. HAKODA M, AKIYAMA M, KYOIZUMI S, KOBUE K, AWA AA, YAMAKIDO M: Measurement of *in vivo* HGPRT-deficient mutant cell frequency using a modified method for cloning human peripheral blood T-lymphocytes. *Mutat Res* 197:161-9, 1988 (RERF TR 14-86)
5. ALBERTINI RJ, O'NEILL JP, NICKLAS JA, HEINTZ NH, KELLEHER PC: Alterations of the *hprt* gene in human *in vivo*-derived 6-thioguanine-resistant T lymphocytes. *Nature* 316:369-71, 1985
6. TURNER DR, MORLEY AA, HALIANDROS M, KUTLACA R, SANDERSON BJ: *In vivo* somatic mutations in human lymphocytes frequently result from major gene alterations. *Nature* 315:343-5, 1985
7. HAKODA M, AKIYAMA M, KYOIZUMI S, AWA AA, YAMAKIDO M, OTAKE M: Increased somatic cell mutant frequency in atomic bomb survivors. *Mutat Res* 201:39-48, 1988 (RERF TR 18-87)
8. LANGLOIS RG, BIGBEE WL, JENSEN RH: Measurements of the frequency of human erythrocytes with gene expression loss phenotypes at the glycophorin A locus. *Hum Genet* 74:353-62, 1986
9. FURTHMAYR H: Structural comparison of glycophorins and immunochemical analysis of genetic variants. *Nature* 271:519-24, 1978
10. KNUDSON AG: Hereditary cancer, oncogenes, and anti-oncogenes. *Cancer Res* 45:1437-43, 1985
11. EKBLUM M, GAHMBERG CG, ANDERSSON LC: Late expression of M and N antigens on glycophorin A during erythroid differentiation. *Blood* 66:233-6, 1985
12. LOKEN MR, SHAI VO, DATTILIO KL, CIVIN CI: Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. *Blood* 69:255-63, 1987
13. LANGLOIS RG, BIGBEE WL, KYOIZUMI S, NAKAMURA N, BEAN MA, AKIYAMA M, JENSEN RH: Evidence for increased somatic cell mutations at the glycophorin A locus in atomic bomb survivors. *Science* 236:445-8, 1987 (RERF TR 1-87)
14. ROESCH WC (Ed): Final Report on US-Japan Joint Reassessment of Atomic Bomb Radiation Dosimetry in Hiroshima and Nagasaki. Hiroshima, RERF, 1987
15. AWA AA, SOFUNI T, HONDA T, ITOH M, NERIISHI S, OTAKE M: Relationship between radiation dose and chromosome aberrations in atomic bomb survivors of Hiroshima and Nagasaki. *J Radiat Res* 19:126-40, 1978 (RERF TR 12-77)
16. BIGBEE WL, VANDERLAAN M, FONG SSN, JENSEN RH: Monoclonal antibodies specific for the M- and N-forms of human glycophorin A. *Mol Immunol* 20:1353-62, 1983
17. 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 MN^v-type chimpanzee erythrocytes. *J Immunol* 133:3149-55, 1984

18. 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
19. WINTROBE MW, LEE RG, BOGGS DR, BITHHELL TC, FOERSTER J, ATHENS JW, LUKENS JN: *Clinical Hematology*, 8th Ed. Philadelphia, Lee and Febiger Inc., 1981. pp 171-5
20. SANDERSON BJS, DEMPSEY JL, MORLEY AA: Mutations in human lymphocytes: Effect of X- and UV-irradiation. *Mutat Res* 140:223-27, 1984
21. 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
22. COX R, MASSON WK: X-ray-induced mutation to 6-thioguanine resistance in cultured human diploid fibroblasts. *Mutat Res* 37:125-36, 1976
23. DE RUIJTER YCEM, SIMONS JWIM: Determination of the expression time and the dose-response relationship for mutations at the HGPRT (hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase) locus induced by X-irradiation in human diploid skin fibroblasts. *Mutat Res* 69:325-32, 1980
24. BOYD E: The weight of the thymus gland in health and in disease. *Am J Dis Child* 43:1162-214, 1932
25. ANTONACI S, JIRILLO E, BONOMO L: Immunoregulation in aging. *Diagn Clin Immunol* 5:55-61, 1987
26. 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
27. HAKODA M, HIRAI Y, SHIMBA H, KUSUNOKI Y, KYOIZUMI S, KODAMA Y, AKIYAMA M: Cloning of phenotypically different HPRT mutant human lymphocytes originating from a single stem cell. RERF TR 11-88
28. CAVENEE WK, DRYJA TP, PHILIPS 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
29. KNUDSON AG: Genetics of human cancer. *Ann Rev Genet* 20:231-51, 1986
30. FEARON ER, VOGELSTEIN B, FEINBERG AP: Somatic deletion and duplication of genes on chromosome 11 in Wilm's tumors. *Nature* 309:176-8, 1984
31. KOUFOS A, HANSEN MF, LAMPKIN BC, WORKMAN ML, COPELAND NG, JENKINS NA, CAVENEE WK: Loss of alleles at loci on human chromosome 11 during genesis of Wilm's tumour. *Nature* 309:170-2, 1984
32. ORKIN SH, GOLDMAN DS, SALLAN SE: Development of homozygosity for chromosome 11p markers in Wilm's tumor. *Nature* 309:172-4, 1984
33. DRYJA TP, RAPAPORT JM, EPSTEIN J, GOORIN AM, WEICHELBAUM R, KOUFOS A, CAVENEE WK: Chromosome 13 homozygosity in osteosarcoma without retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 38:59-66, 1986
34. SCRABLE HJ, WITTE DP, LAMPKIN BC, CAVENEE WK: Chromosomal localization of the human rhabdomyosarcoma locus by mitotic recombination mapping. *Nature* 329:645-7, 1987
35. KYOIZUMI S, NAKAMURA N, TAKEBE H, TATSUMI K, AKIYAMA M: Frequency of mutant erythrocytes at the glycophorin A locus in two Bloom's syndrome patients. (Manuscript in preparation)
36. WARREN ST, SCHULTZ RA, CHANG CC, WADE MH, TROSKO JE: Elevated spontaneous mutation rate in Bloom syndrome fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3133-7, 1981

37. VIJAYALAXMI, EVANS HJ, RAY JH, GERMAN J: Bloom's syndrome: Evidence for an increased mutation frequency in vivo. *Science* 221:851-3, 1983
38. SHIMIZU Y, KATO H, SCHULL WJ, PRESTON DL, FUJITA S, PIERCE DA: Life Span Study Report 11. Part 1. Comparison of risk coefficients for site-specific cancer mortality based on the DS86 and T65DR shielded kerma and organ doses. RERF TR 12-87