

**CLONING OF IN VIVO-DERIVED THIOPURINE-RESISTANT  
HUMAN B CELLS**

生体内由来のチオグアニン抵抗ヒトB細胞のクローニング

MASAYUKI HAKODA, M.D. 箱田雅之

YUKO HIRAI, Ph.D. 平井裕子

YOICHIRO KUSUNOKI, Ph.D. 楠 洋一郎

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 are grateful to Dr. Michael A. Bean for the revision of the manuscript. We thank Yoshiko Watanabe, Hisae Okamitsu, and Mika Ito for their technical assistance, and Michiko Takagi for manuscript typing.

本論文の改訂に当たり、Michael A. Bean 博士に感謝の意を表すとともに、技術面で援助をいただいた渡辺芳子、岡光久恵、位藤美佳氏、論文のタイプを担当して下さった高木迪子氏に感謝する。

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。

*Mutat Res 210:29-34, 1989*

## 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。

## CLONING OF IN VIVO-DERIVED THIOPURINE-RESISTANT HUMAN B CELLS

生体内由来のチオグアニン抵抗ヒトB細胞のクローニング

MASAYUKI HAKODA, M.D. ( 箱田雅之 ); YUKO HIRAI, Ph.D. ( 平井裕子 );  
 YOICHIRO KUSUNOKI, Ph.D. ( 楠 洋一郎 ); MITOSHI AKIYAMA, M.D. ( 秋山實利 )

*Department of Radiobiology*

放射線生物学部

### SUMMARY

In vivo-derived thiopurine-resistant (TG<sup>r</sup>) B cells have been cloned from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of four healthy adults. This was done by using Epstein-Barr virus transformation of B cells enriched from a large number of PBMC obtained with a blood cell separator. The cloned TG<sup>r</sup> B cells lacked hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase enzyme activity. The frequency of in vivo TG<sup>r</sup> B cells was estimated to be  $8.6-13.1 \times 10^{-6}$  for the four individuals by comparing the cloning efficiency of nonselected cells and TG-selected cells. This frequency is somewhat higher but comparable to the in vivo frequency of TG<sup>r</sup> T cells. Because the cloned TG<sup>r</sup> B cells can be easily expanded in vitro, this procedure provides a large amount of material for the precise characterization of in vivo mutations in humans.

### INTRODUCTION

Detection of in vivo mutations in human somatic cells has been demonstrated widely by the used technique of cloning of TG<sup>r</sup> T cells present in the peripheral blood.<sup>1,2</sup> The frequency of these mutant T cells has been shown to increase with age<sup>3,4</sup> and in cancer patients who have received chemotherapy and/or radiotherapy.<sup>5,6</sup> Increased mutant T cell frequency in mice after injection of a chemical mutagen<sup>7</sup> or whole-body irradiation<sup>8</sup> has also been demonstrated using a similar T cell cloning method. These results demonstrate the feasibility of using this mutation assay for monitoring the mutagenic effects of environmental agents on somatic cells.

### 要 約

健康成人4人の末梢血単核細胞(PBMC)から得た、生体内由来チオグアニン抵抗(TG<sup>r</sup>)B細胞を、クローニングした。クローニングは、赤血球分離器によって得られた多量のPBMCから濃縮されたB細胞を、Epstein-Barrウイルスで転換することにより行った。クローニング後のTG<sup>r</sup>B細胞は、ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ酵素活性を欠いていた。対象者4名の生体内TG<sup>r</sup>B細胞の頻度は、非選択細胞とTG選択細胞のクローニング効率の比較によって、 $8.6 \sim 13.1 \times 10^{-6}$ と推定された。この頻度は幾分高いが、TG<sup>r</sup>T細胞の生体内頻度と同程度である。クローニングされたTG<sup>r</sup>B細胞は、試験管内では容易に増殖し得ることから、本手順は、ヒトの生体内突然変異の正確な特性を調べる上で、多くの材料を提供するものである。

### 緒 言

ヒト体細胞中の生体内突然変異の検出は、末梢血中に存在するTG<sup>r</sup>T細胞の従来のクローニング技法により、広く実証されてきた。<sup>1,2</sup> これら突然変異T細胞の頻度は、加齢と共に、<sup>3,4</sup> また、化学療法、放射線療法<sup>5,6</sup>を受けた癌患者に増加がみられた。化学的突然変異誘発物質の注入、<sup>7</sup> 若しくは、全身照射<sup>8</sup>後のマウスにみられる突然変異T細胞頻度の増加も、同様のT細胞クローニング法により実証された。これらの結果は、体細胞に対する環境因子の突然変異誘発性効果を検討する上で、この突然変異体アッセイが有用であることを示している。

However, our recent study on atomic bomb survivors<sup>9</sup> suggested that many of the induced mutant T cells have been lost from the blood after many years. The increase in mutant frequency in the survivors was much smaller than that observed in *in vitro* radiation experiments.<sup>10</sup> Ammenheuser et al<sup>11</sup> showed that the elevated frequency of TG<sup>r</sup> lymphocytes, which was detected by an autoradiographic technique<sup>12</sup> after cyclophosphamide therapy of multiple sclerosis patients, returned to background levels within six months.

The loss of induced TG<sup>r</sup> T cells observed by us and others seems to be attributable to the *in vivo* kinetics of turnover of T cells rather than to the selection against hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase-deficient (HPRT<sup>-</sup>) cells (also discussed in Hakoda et al<sup>9</sup>). We have found one male A-bomb survivor who had a mutant frequency almost 100 times higher than the control level which was present over six months of observation. This high mutant frequency was due to a mutation in an undifferentiated stem cell before the differentiation *in vivo* to T or B cells (Hakoda et al, draft technical report submitted). Furthermore, Albertini et al (personal communication) and Nicklas et al<sup>13</sup> found a similar high mutant frequency due to a clonal expansion of mutant mature T cells in the blood of a nonmutagenized person which persisted for at least four years. Thus, the HPRT mutations induced at certain stages of development of the T cell lineage can persist for a long time. The number of such long-lived cells may be too small for the mutations to be frequently induced, or some mutant stem cells may not be able to differentiate into mature T cells in adults because of age-dependent involution of the thymus.<sup>14</sup>

The use of blood cells with different *in vivo* kinetics may enable us to detect mutations induced long ago. Although the frequency of glycophorin A variant erythrocytes is much higher than that of TG<sup>r</sup> mutant T cells in A-bomb survivors,<sup>15</sup> the nature of the mutation cannot be studied because mature erythrocytes lack DNA. We report here the cloning of *in vivo* spontaneous TG<sup>r</sup> mutant B cells from four healthy nonmutagenized adults using Epstein-Barr (EB) virus transformation of B cells enriched from a large number (>10<sup>9</sup>) of mononuclear cells obtained with a blood cell separator.

しかしながら、原爆被爆者に関する我々の最近の研究は、<sup>9</sup> 多くの誘発突然変異T細胞が、何年も経過するうちに血液から失われたことを示唆した。被爆者における突然変異細胞頻度の増加は、試験管内放射線実験で観察されたものを大幅に下回った。<sup>10</sup> Ammenheuser ら<sup>11</sup> は、多発性硬化症患者のマイクロホスファミド療法後に、オートラジオグラフィック技法により検出した高頻度のTG<sup>r</sup>リンパ球が、6か月以内に自然発生レベルにまで回復したことを明らかにした。

著者らが観察した誘発TG<sup>r</sup>T細胞の消失は、(箱田ら<sup>9</sup>のでも考察した)ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠乏(HPRT<sup>-</sup>)細胞に対する選択よりもむしろ、T細胞回転の生体内動態に起因すると思われる。著者らは、突然変異細胞頻度が6か月以上に及ぶ観察期間中、対照レベルのほぼ100倍であった1人の男性被爆者を発見した。このような高い突然変異細胞頻度は、T細胞又はB細胞への分化以前の、未分化な幹細胞における突然変異によるものであった(箱田らによる業績報告書草稿提出)。更に、Albertini ら(私信)と、Nicklas ら<sup>13</sup>は、突然変異源にさらされていない個人の血液中に、同じく突然変異成熟T細胞のクローン拡大により生じ、高い突然変異細胞頻度が少なくとも4年間持続したのを発見した。このように、T細胞系の成熟のある段階で、誘発されたHPRT突然変異は、長期にわたって持続できる。このような長期生存細胞の数は過少のため、突然変異が頻繁に誘発されないかもしれないか、若しくは、突然変異幹細胞には、胸腺の加齢依存退縮が原因で、成人の成熟T細胞に分化できないものがあるかもしれない。<sup>14</sup>

異なった生体内動態の血球を用いれば、かなり以前に誘発された突然変異を検出できるかもしれない。原爆被爆者においてグリコフォリンA変異体赤血球の頻度は、TG<sup>r</sup>突然変異T細胞頻度よりもかなり高いが、<sup>15</sup>成熟赤血球がDNAを欠如しているため、突然変異の性質は検討できない。著者らは、ここで、赤血球分離器によって得られた多数の単核細胞(>10<sup>9</sup>)から濃縮されたB細胞をEpstein-Barr(EB)ウイルスを用い形質転換することにより、4名の突然変異原にさらされていない成人健常者の、生体内自然発生TG<sup>r</sup>突然変異B細胞のクローン化について報告する。

## MATERIALS AND METHODS

### Peripheral blood mononuclear cells

The source of PBMC was platelet-enriched plasma obtained from four healthy adult males using a blood cell separator (IBM 2997). The plasma was centrifuged at  $200\times g$  to separate platelets (upper phase) from white blood cells (bottom phase). PBMC were recovered from the bottom phase plasma using Ficoll-Hypaque density centrifugation and were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) lacking  $Ca^{2+}$  or  $Mg^{2+}$ .

For the enrichment of B cells, T cells were depleted from the PBMC by E-rosette formation. PBMC were suspended at a concentration of  $2 \times 10^7/ml$  with Eagle's MEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 24 mM Hepes, 100 U/ml penicillin, and 100  $\mu g/ml$  streptomycin. Sheep red blood cells (SRBC) were washed twice with PBS and suspended in FCS as a 2% (v/v) suspension. Equal volumes of PBMC and SRBC suspensions were mixed and centrifuged at  $240\times g$ . The cell pellets were kept at  $4^\circ C$  for two hours to allow rosette formation. The cells were resuspended using a pasteur pipet and the rosette-forming T cells were depleted from the PBMC by Ficoll-Hypaque density centrifugation.

### Cloning of TG<sup>f</sup> mutant B cells

T cell-depleted PBMC were infected with EB virus by incubating them at a concentration of  $2 \times 10^6/ml$  with a supernatant of the B 95-8 marmoset cell line for two hours at  $37^\circ C$ . After incubation, the cells were resuspended with fresh RPMI1640 (GIBCO) supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine and inoculated into the wells of 96-well microtiter plates (Coster, flat bottom). An average of either 100 cells or  $2 \times 10^5$  cells per well was inoculated into the wells without or with 2.5  $\mu g/ml$  TG, respectively. X-irradiated (100 Gy) Raji cells (a Burkitt lymphoma cell line) were also added to the wells without TG ( $10^4/well$ ). The cells were cultured in 200  $\mu l$  medium/well in a humidified 5%  $CO_2$  in air for four weeks. Half of the medium was replaced once a week.

Cloning efficiency (CE) was calculated from the proportion of colony-negative wells assuming a Poisson distribution of the cells. Frequency of TG<sup>f</sup> B cells was obtained by dividing the CE of TG-selected cells by the CE of nonselected cells.

### 材料及び方法

#### 末梢血単核細胞

PBMCを得たもとは、赤血球分離器 (IBM 2997) により4名の健常成人男性から得られた血小板濃縮血漿である。血漿は $200\times g$ で遠心分離し、白血球 (下部相) から血小板 (上部相) を分離し、PBMCをFicoll-Hypaque密度遠心分離法により、下部相血漿から回収し、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ を含まないリン酸緩衝食塩水 (PBS) で2回洗浄した。

B細胞を濃縮するために、T細胞をEロゼット形成により、PBMCから除去した。PBMCは、10%の牛胎児血清 (FCS)、2 mMのL-グルタミン、Hepes 24 mM、ペニシリン 100 U/ml、ストレプトマイシン 100  $\mu g/ml$ を添加したEagle MEMを用いて、 $2 \times 10^7/ml$ の濃度になるよう調整した。ヒツジ赤血球 (SRBC) は、PBSで2回洗浄後、FCSに懸濁し2%の懸濁液とした。同量のPBMCとSRBC懸濁液を混合し、 $240\times g$ で遠心分離した。細胞ペレットを、ロゼット形成するように $4^\circ C$ で2時間放置した。細胞を、パスツール・ピペットを用いて、再懸濁し、ロゼット形成T細胞は、Ficoll-Hypaque密度遠心分離法により、PBMCから除去した。

#### TG<sup>f</sup>突然変異B細胞のクローニング

T細胞を除去したPBMCは、濃度 $2 \times 10^6/ml$ で、B 95-8 marmoset cell lineの上清と、 $37^\circ C$ で2時間インキュベートすることによって、EBウイルスに感染させた。インキュベーション後、10% FCS、L-グルタミン 2 mMを添加した新鮮なRPMI 1640 (GIBCO)に再懸濁し、96ウェルのマイクロタイター・プレートのウェル (Coster, 平面底) に播種した。ウェル当たり平均100又は $2 \times 10^5$ の細胞を、2.5  $\mu g/ml$  TG無添加のウェル、あるいはTGを添加したウェルにそれぞれ播種した。X線照射 (100 Gy) のRaji細胞 (Burkittリンパ腺腫細胞系) も、TG無添加のウェルに加えた ( $10^4/well$ )。細胞は加湿した5%の $CO_2$ 中で4週間、200  $\mu l$  medium/ウェルで培養した。培地の半分は、1週間に1回取り替えた。

クローニング効率 (CE) は、細胞のポアソン分布を仮定したコロニー陰性ウェルの割合から算出した。TG<sup>f</sup> B細胞の頻度は、TG選択細胞のCEを非選択細胞のCEで割って得た。

### Measurement of HPRT activity

HPRT activity was measured by a modification of the method described by Albertini et al.<sup>1</sup> B cell colonies ( $2.5 \times 10^6$  cells) were washed three times with PBS and suspended in 500  $\mu$ l of cold 0.01 M Tris HCl, pH 7.4 and were disrupted by sonication. After centrifugation at  $27,000 \times g$  for 30 minutes, the supernatant protein concentration was estimated by the absorbance at 280 nm using a spectrophotometer and was adjusted to 500  $\mu$ g/ml using 0.01 M Tris HCl, pH 7.4. Twenty microliters of the cell extract was added to a reaction mixture (30  $\mu$ l) containing 0.1 M Tris HCl, pH 8.4, 5 mM  $MgCl_2$ , and 22  $\mu$ M [ $^{14}C$ ] hypoxanthine (49 Ci/mmol), 1 mM 5-phosphoribose 1-pyrophosphate. The reaction was stopped with 30  $\mu$ l of 0.1 M EDTA after two hours of incubation at 37°C. The reaction mixture was spotted on Watman 3MM paper and chromatographed with 5%  $NaH_2PO_4$ . Conversion of hypoxanthine to IMP was measured by liquid scintillation determination of radioactivity of paper spots. Conversion was calculated as follows:

$$\% \text{ conversion} = \frac{\text{cpm IMP}}{\text{cpm hypoxanthine} + \text{cpm IMP}} \times 100.$$

### Analysis of cell surface antigens

Surface antigens of the cloned lymphocytes were analyzed using immunofluorescence staining of  $1-2 \times 10^5$  cells for each antibody and a FACS Analyzer (Becton Dickinson). The monoclonal antibodies used were Leu 5 (anti-CD2), Leu 16 (anti-CD20), anti-IgM, IgG, and IgD, all obtained from Becton Dickinson.

### RESULTS

The B cells were enriched approximately 4-fold after depletion of T cells from the PBMC by E-rosetting as indicated by the proportion of Leu 16 (CD20, pan-B cell antigen) positive cells and the total cell count decreased to 1/5-1/7 (Table 1).

After four weeks of culture, each well of the microtiter plates was examined with an inverted microscope to determine the presence or absence of lymphocyte colonies. As shown in Table 2, 40% to 80% of the wells which received 100 cells/well without TG were colony positive, giving CEs of  $0.52$  to  $1.57 \times 10^{-2}$ .  $TG^F$  lymphocyte colonies were observed in 3 to 32 wells out of 258 to 1,824 wells which received  $2 \times 10^5$  cells/well and 2.5  $\mu$ g/ml TG. Thus, the mutant frequency was

### HPRT 活性の測定

HPRT 活性は, Albertini ら<sup>1</sup> が記述した方法に変更を加えたものにより測定された. B細胞コロニー ( $2 \sim 5 \times 10^6$  細胞) は, PBS で3回洗浄し, 冷却0.01 M Tris HCl, pH 7.4, 500  $\mu$ l に懸濁後, 超音波処理で破壊した.  $27,000 \times g$  で30分間遠心分離後, 上清蛋白濃度は, 分光光度計を用い280nmの吸光度で推定し, 0.01 M Tris HCl, pH 7.4により500  $\mu$ g/mlとなるように調整した. 0.1 M Tris HCl, pH 8.4, 5 mM  $MgCl_2$ , 22  $\mu$ M [ $^{14}C$ ] ヒポキサンチン (49 Ci/mmol), 1 mM 5ホスホリボス 1ピロリン酸からなる反応混合液 (30  $\mu$ l) に, 細胞抽出液20  $\mu$ l を添加した. 反応は, 37°C で2時間インキュベート後, 0.1 M の EDTA 30  $\mu$ l を加え停止した. 反応混合液を, Watman 3 MM 紙にスポットし, 5% の  $NaH_2PO_4$  で, クロマトグラフィを行った. ヒポキサンチンの IMP への転換の測定は, 濾紙上のスポットの放射能を, 液体シンチレーションで測定することにより行われた. 転換は, 以下のように算出した.

### 細胞表面抗原の分析

クローン化したリンパ球の表面抗原は, 各抗体で  $1 \sim 2 \times 10^5$  の細胞を蛍光抗体染色し, FACS アナライザー (Becton Dickinson) を用い分析した. 使用した単クローン抗体は, Leu 5 (anti-CD 2), Leu 16 (anti-CD20), anti-IgM, IgG, IgD で, すべて Becton Dickinson から得た.

### 結果

B細胞は, Leu 16 (CD20, pan-B細胞抗原) 陽性細胞の割合でみられるように, Eロゼットにより PBMC からT細胞を除去後, 約4倍に濃縮された. 一方, 細胞数が $1/5 \sim 1/7$ に減少した(表1).

4週間培養の後, マイクロタイター・プレートの各ウェルを倒立顕微鏡で検査し, リンパ球コロニーの有無を決定した. 表2に示すとおり, TG無添加での100個/ウェルを播種したウェルの40%~80%は, コロニー陽性で, CEは,  $0.52 \sim 1.57 \times 10^{-2}$ であった.  $TG^F$ リンパ球コロニーは,  $2 \times 10^5$  個/ウェル, 2.5  $\mu$ g/ml TGを添加した258~1,824個のウェルのうち3~32ウェルにみられた. このように, 対象者4人の突然変異細胞

calculated to range from  $8.6$  to  $13.1 \times 10^{-6}$  for four individuals with a mean frequency of  $10.8 \times 10^{-6}$ .

頻度は、 $8.6 \sim 13.1 \times 10^{-6}$  の範囲で算出され、平均頻度は、 $10.8 \times 10^{-6}$  であった。

TABLE 1 ENRICHMENT OF B CELLS FROM PBMC

表1 PBMC からのB細胞濃縮

Donor	Age (yrs)	Number of PBMC		% B cells (Leu 16+)	
		Before E-rosetting	After E-rosetting	Before E-rosetting	After E-rosetting
HN	35	$3.5 \times 10^9$	$0.52 \times 10^9$	ND <sup>a</sup>	60.4%
MO	46	$1.5 \times 10^9$	$0.21 \times 10^9$	ND	72.8%
ES	41	$2.8 \times 10^9$	$0.42 \times 10^9$	14.4%	49.4%
TA	35	$0.7 \times 10^9$	$0.16 \times 10^9$	7.6%	33.1%

<sup>a</sup>Not done 未処理TABLE 2 SPONTANEOUS TG<sup>r</sup> B CELL FREQUENCY IN PERIPHERAL BLOOD表2 末梢血中の自然発生 TG<sup>r</sup> B細胞頻度

Donor	-TG plate (100 cells/well)			+TG plate ( $2 \times 10^5$ cells/well)		
	Total wells	Colony-positive wells (%)	CE ( $\times 10^{-2}$ )	Total wells	Colony-positive wells (%)	Mutant frequency ( $\times 10^{-6}$ )
HN	96	53 (55)	0.80	1824	25 (1.4)	8.6
MO	96	76 (79)	1.57	792	32 (4.0)	13.1
ES	76	32 (42)	0.55	1342	15 (1.1)	10.3
TA	42	17 (40)	0.52	258	3 (1.2)	11.2

- ln (negative wells/total wells)

- ln (陰性ウェル/ウェル総数)

$$CE = \frac{-\ln(\text{negative wells/total wells})}{\text{cells plated}}$$

プレートした細胞

HPRT activity of the TG<sup>r</sup> colonies was almost zero compared to that of the nonselected colonies as shown in Table 3. Thus, the TG<sup>r</sup> lymphocyte colonies obtained were true mutants lacking HPRT activity.

Table 4 shows the surface phenotypes of the lymphocyte colonies examined by immunofluorescence staining. All the lymphocyte colonies grown in both control and selection plates did not have pan-T cell antigen Leu 5 (CD2), but had a marker for B cells, Leu 16 (CD20), indicating that all the colonies

TG<sup>r</sup> コロニーの HPRT 活性は表3に示すとおり、非選択コロニーと比較して、ほぼゼロであった。得られた TG<sup>r</sup> リンパ球コロニーは、このように、HPRT 活性を欠如した真の突然変異体であった。

表4には、蛍光抗体染色法で調べたリンパ球コロニーの表面抗原型を示した。対照・選択両プレートで成育したリンパ球コロニーすべてが、pan-T 細胞抗原 Leu 5 (CD2) を有しておらず、B細胞の指標である Leu 16 (CD20) を有しており、すべてのコロニーが

TABLE 3 HPRT ACTIVITY OF NONSELECTED AND TG-SELECTED B CELL COLONIES

表3 非選択及びTG選択B細胞コロニーのHPRT活性

		HPRT		HPRT		
		Donor	activity (%)	Donor	activity (%)	
Nonselected colonies				TG-selected colonies		
1B1	HN		89	1B7 <sup>f</sup>	HN	2
1B2	"		64	1B15 <sup>f</sup>	"	2
1B3	"		55	1B23 <sup>f</sup>	"	1
1B4	"		95	1B25 <sup>f</sup>	"	0
1B7	"		54	2B6 <sup>f</sup>	MO	2
1B12	"		70	2B7 <sup>f</sup>	"	1
2B1	MO		54	2B10 <sup>f</sup>	"	0
2B2	"		89	2B11 <sup>f</sup>	"	1
2B3	"		66	2B12 <sup>f</sup>	"	0
2B4	"		97	2B14 <sup>f</sup>	"	0
2B5	"		71	2B17 <sup>f</sup>	"	1
2B6	"		96	2B20 <sup>f</sup>	"	0
2B7	"		43	2B21 <sup>f</sup>	"	0
2B8	"		50	3B7 <sup>f</sup>	ES	0
2B10	"		74	3B14 <sup>f</sup>	"	0
2B12	"		21			
3B3	ES		46			

TABLE 4 SURFACE PHENOTYPE OF NONSELECTED AND TG-SELECTED COLONIES

表4 非選択及びTG選択コロニーの表面表現型

		Surface antigens					
		Donor	Leu 5 (CD2)	Leu 16 (CD20)	IgM	IgD	IgG
Nonselected colonies							
1B5	HN		-	+	+	+	-
1B6	"		-	+	+	+	-
1B8	"		-	+	+	+	-
3B3	ES		-	+	+	+	-
4B3	TA		-	+	+	+	-
4B14	"		-	+	+	-	-
TG-selected colonies							
1B7 <sup>f</sup>	HN		-	+	+	-	-
1B15 <sup>f</sup>	"		-	+	+	-	-
1B23 <sup>f</sup>	"		-	+	+	+	-
2B6 <sup>f</sup>	MO		-	+	+	+	-
2B7 <sup>f</sup>	"		-	+	+	-	-
2B11 <sup>f</sup>	"		-	+	+	+	-
2B15 <sup>f</sup>	"		-	+	+	+	-
2B17 <sup>f</sup>	"		-	+	+	+	-
2B20 <sup>f</sup>	"		-	+	+	+	-
2B21 <sup>f</sup>	"		-	+	+	+	-
3B7 <sup>f</sup>	ES		-	+	+	+	-
3B14 <sup>f</sup>	"		-	+	+	+	-
3B16 <sup>f</sup>	"		-	+	+	-	-



belong to B cell lineage. All of the colonies also had surface immunoglobulins (mostly both IgM and IgD) confirming their origin in B cells.

## DISCUSSION

HPRT<sup>-</sup> mutant B cells have been cloned from the peripheral blood of four healthy nonmutagenized adults. Because these mutant B cells had been transformed by EB virus and some of the virus genome is integrated in the host DNA,<sup>16</sup> there is a possibility that the mutants had been induced in vitro during the process of transformation rather than in vivo. However, this is unlikely for the same reason as was discussed in the system using T cells.<sup>1</sup>

Cultured mammalian cells usually require several cell divisions to express the mutant phenotype (TG<sup>r</sup>) after induction. Human B lymphocytes require as many as 16 divisions to fully express this phenotype.<sup>17</sup> In the assay presented here, TG was added within 2-3 hours after the start of incubation with the culture supernatant containing EB virus. Thus, the cell divisions necessary for the expression of mutant phenotype could not have occurred during the transforming process before the addition of TG.

The frequency of HPRT<sup>-</sup> mutant B cells obtained here ranged from 8.6 to 13.1 × 10<sup>-6</sup> in the four individuals. This frequency is 2-3 times higher than that observed for HPRT<sup>-</sup> T cells.<sup>2,9,18,19</sup> Although Albertini et al<sup>1</sup> reported a TG<sup>r</sup> T cell frequency in the order of 10<sup>-5</sup> for two healthy adults in their initial study, they have subsequently set the "normal" level of the frequency as less than 10 × 10<sup>-6</sup> in a more recent report.<sup>13</sup> Albertini<sup>20</sup> pointed out that the mutant T cell frequency tended to be overestimated when the CE of nonselected cells was low. In the method for cloning B cells presented here, the culture conditions for nonselected B cells and TG-selected B cells are fairly different: 100 lymphocytes and 10,000 Raji cells were inoculated into the wells without TG and 2 × 10<sup>5</sup> lymphocytes into the wells with TG. To produce more similar culture conditions, 2 × 10<sup>5</sup> infected irradiated lymphocytes instead of Raji cells could have been added to the wells without TG but was not done routinely because of a shortage of cells. In a preliminary experiment, the CE of nonselected B cells approximately doubled when we added x-irradiated lymphocytes instead of Raji cells (unpublished results). Therefore, the higher

B細胞系に属することを示していた。また、すべてのコロニーに、B細胞に起源があることを示す表面免疫グロブリン(主としてIgMとIgD)があった。

## 考 察

HPRT<sup>-</sup>突然変異B細胞は、突然変異原にさらされていない成人健常者4人の末梢血からクローン化された。これら突然変異B細胞は、EBウイルスによって形質転換され、ウイルスゲノムの幾つかは、宿主DNAに組み込まれるため、<sup>16</sup>突然変異は、生体内よりもむしろ形質転換の過程で、試験管内で誘発された可能性がある。しかし、これは、T細胞を用いたシステムで考察したときと同じ理由によって起こると思われな<sup>1</sup>。

培養されたほ乳類細胞は、通常、誘発後、突然変異体表現型(TG<sup>r</sup>)が出現するために、数回の細胞分裂が必要である。ヒトBリンパ球では、この表現型が十分出現するためには、16回の分裂が必要である。<sup>17</sup>ここで提示したアッセイでは、EBウイルスを含む培養上清で培養開始後、2～3時間以内にTGを添加した。このように、突然変異体表現型の出現に必要な細胞分裂は、TGを添加するまでの転換中には、生じえなかった。

ここで得られたHPRT<sup>-</sup>突然変異B細胞の頻度の範囲は、4人の対象者で、8.6～13.1×10<sup>-6</sup>であった。この頻度は、HPRT<sup>-</sup>T細胞で観察された頻度より2～3倍高い。<sup>2,9,18,19</sup> Albertiniら<sup>1</sup>は、当初の調査で、2人の健常成人のTG<sup>r</sup>T細胞頻度は、ほぼ10<sup>-5</sup>であると報告したが、その後、最近の報告では、正常頻度を10×10<sup>-6</sup>以下と設定している。<sup>13</sup> Albertini<sup>20</sup>は、突然変異T細胞頻度は、非選択細胞のCEが低いとき、過大評価される傾向にあったと指摘した。ここに提示されたB細胞のクローニング技法では、非選択B細胞とTG選択B細胞の培養条件は相当異なる。すなわち、100個のリンパ球と10,000個のRaji細胞は、TG無添加のウェルに、また2×10<sup>5</sup>個のリンパ球は、TGを含んだウェルに播種された。更に類似した培養条件をつくるために、Raji細胞の代わりに2×10<sup>5</sup>個の感染照射リンパ球をTG無添加のウェルに添加することもできたが、細胞が不足していたためルーチン化はされなかった。予備実験では、Raji細胞に代わりX線照射のリンパ球を添加した際、非選択B細胞のCEはおよそ2倍になった(未発表)。したがって、T細胞

frequency of mutant B cells observed here relative to T cells is probably the result of less than optimal culture conditions for the cloning of nonselected cells.

Although the variation in CE between persons of nonselected B cells ranges from  $0.52 \times 10^{-2}$  to  $1.57 \times 10^{-2}$ , the variation in mutant frequency was much smaller. Furthermore, dependence of mutant frequency on the CE of nonselected cells was not observed to occur. This indicates that the assay described here can be used for the comparison of the mutant B cell frequency between individuals or groups. However, further studies to improve the CE are needed before screening a large number of samples because the present assay requires approximately 100 ml of peripheral blood to obtain one to two spontaneous mutant B cell colonies.

Because EB-transformed B cells can easily be cultured in vitro, the analysis of nature of the mutations at the molecular level will become more easy. Recently, Gibbs and Caskey<sup>21</sup> reported the detection of point mutations in HPRT messenger RNAs of patients with Lesch-Nyhan syndrome in whom no HPRT Southern or Northern blot changes had been found. A similar analysis for the characterization of in vivo somatic mutations is also needed because Southern blot analysis revealed that 80%-90% of spontaneous mutant T cells had no detectable changes in DNA (Nicklas et al<sup>13</sup> and Hakoda et al, draft technical report submitted). Because the cloned mutant TG<sup>r</sup> B cells can be readily expanded in vitro, the analysis of the molecular nature of such mutant will be facilitated.

に比較してここで観察された突然変異B細胞の頻度が高いのは、恐らく非選択細胞のクローン化に最適な培養条件よりも劣った条件がもたらす結果であろう。

非選択B細胞のCEにみられる個人差は、 $0.52 \times 10^{-2}$ から $1.57 \times 10^{-2}$ の範囲であるが、突然変異細胞頻度の差は、より小さいものであった。更に、非選択細胞のCEへの突然変異頻度の依存性はみられなかった。これは、ここで提示されたアッセイが突然変異B細胞頻度の個人間、グループ間の比較に利用できることを示している。しかし、現行のアッセイ法では1~2個の自然発生突然変異B細胞コロニーを得るためには、約100 mlの末梢血を必要とすることから、多数の試料を調べる前に、CE向上のための調査が更に必要である。

EB形質転換B細胞は、試験管内で容易に培養できることから、分子レベルでの突然変異の性質の分析は、一層、容易になるであろう。最近、GibbsとCaskey<sup>21</sup>がHPRT Southern, Northernプロットの変化がみられなかった Lesch-Nyhan 症候群患者のHPRT messenger RNA中に、点突然変異を検出したことを報告した。Southernプロット分析により、自然発生突然変異T細胞の80%~90%は、DNA中に検出可能な変化がなかったことが明らかになっており (Nicklasら,<sup>13</sup> 箱田ら業績報告書草稿投稿済)、生体内体細胞突然変異の特性をみるためには、同様の分析法が必要である。クローン化した突然変異TG<sup>r</sup>B細胞は、試験管内で容易に拡大できるので、このような突然変異体の分子的性質の分析は促進されるであろう。

## REFERENCES

## 参考文献

1. ALBERTINI RJ, CASTLE KL, BORCHERDING 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
2. MORLEY AA, TRAINOR KJ, SESHADRI R, RYALL, RG: Measurement of *in vivo* mutations in human lymphocytes. *Nature* 302:155-6, 1983
3. 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
4. TRAINOR KJ, WIGMORE DJ, CHRYSOSTOMOU A, DEMPSY JL, SESHADRI R, MORLEY AA: Mutation frequency in human lymphocytes increases with age. *Mech Aging Dev* 27:83-6, 1984
5. DEMPSY JL, SESHADRI RS, MORLEY AA: Increased mutation frequency following treatment with cancer chemotherapy. *Cancer Res* 45:2873-7, 1985
6. MESSING K, BRADLEY WEC: *In vivo* mutant frequency rises among breast cancer patients after exposure to high doses of  $\gamma$ -radiation. *Mutat Res* 125:107-12, 1985
7. JONES IM, BURKHART-SCHULTZ K, CARRANO AV: A study of the frequency of sister-chromatid exchange and of thioguanine-resistant cells in mouse spleen lymphocytes after *in vivo* exposure to ethylnitrosourea. *Mutat Res* 143:245-9, 1985
8. DEMPSY JL, MORLEY AA: Measurement of *in vivo* mutant frequency in lymphocytes in the mouse. *Environ Mutagen* 8:385-91, 1986
9. 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)
10. SANDERSON BJS, DEMPSY JL, MORLEY AA: Mutations in human lymphocytes: Effect of x- and UV-irradiation. *Mutat Res* 140:223-7, 1984
11. AMMENHEUSER MM, WARD JB, KOLLIAN JM: A longitudinal study of the frequency of 6-thioguanine-resistant lymphocytes from multiple sclerosis patients receiving cyclophosphamide. *Environ Mutagen* 8 (Suppl 6): 3, 1986 (Abstract)
12. STRAUSS GH, ALBERTINI RJ: Enumeration of 6-thioguanine-resistant peripheral blood lymphocytes in man as a potential test for somatic cell mutations arising *in vivo*. *Mutat Res* 61:353-79, 1979
13. NICKLAS JA, HUNTER TC, SULLIAN LM, BERMAN JK, O'NEILL JP, ALBERTINI RJ: Molecular analysis of *in vivo* *hprt* mutations in human T-lymphocytes. I. Studies of low frequency 'spontaneous' mutants by Southern blots. *Mutagenesis* 2:341-7, 1987
14. BOYD E: The weight of the thymus gland in health and in disease. *Am J Dis Child* 43:1162-214, 1932
15. 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)
16. KASCHKA-DIERICH C, ADAMS A, LINDAHL T, BORNKAMN GW, BJURSELL G, KLEIN G: Intracellular forms of Epstein-Barr virus DNA in human tumor cells *in vivo*. *Nature* 260:302-6, 1976

17. THILLY WG, DELUCA JG, HOPPEIV H, PERMAN BW: Phenotypic lag and mutation to 6-thioguanine resistance in diploid human lymphocytes. *Mutat Res* 50:137-44, 1978
18. HENDERSON L, COLE H, COLE J, JAMES SE, GREEN M: Detection of somatic mutations in man: Evaluation of the microtiter cloning assay for T-lymphocytes. *Mutagenesis* 1:195-200, 1986
19. HAKODA M, AKIYAMA M, KYOIZUMI S, KOBUE K, AWA AA, YAMAKIDO M: Measurement of *in vivo* HGPRT-deficient mutant cell frequency using modified method for cloning human peripheral blood T-lymphocytes. *Mutat Res* 197:161-9, 1988 (RERF TR 14-86)
20. ALBERTINI RJ: Somatic gene mutations *in vivo* as indicated by the 6-thioguanine-resistant T-lymphocytes in human blood. *Mutat Res* 150:411-22, 1985
21. GIBBS RA, CASKEY CT: Identification and localization of mutations at the Lesch-Nyhan locus by ribonuclease A cleavage. *Science* 236:303-5, 1987