Immunobeads を用いた微量二重ロゼット法による T, B リンパ球の同時測定法

天 野 栄 子・鈴 田 達 男

**A simple, simultaneous micro-method for enumeration of
T- and B-cell populations with double-rosette assay using
immunobeads and sheep red blood cells (SRBC)**

Eiko Amano, Ph.D. and Tatsuo Suzuta, M.D.

*Department of Immunology and Serology,
Tokyo Medical College, Shinjuku Tokyo, 160 Japan*

【Summary】

As an application of Immunobeads, which are the synthetic polyacrylamide particles coated with anti-human immunoglobulin antibodies, the authors have improved Lee's method to a new micro technique to identify and enumerate human T and B lymphocytes simultaneously. Only 1 ml of heparinized blood is required as a specimen.

The principle is based on the reaction of lymphocytes attached onto a plastic microplate with SRBC and immunobeads. The key point of this technique is the order of the addition of the two reagents, at first Immunobeads and then SRBC, otherwise the number of B cells will be much affected. The optimum conditions for this technique were established including the concentration and the volume of lymphocytes and reagents, reaction time and temperature.

The improved, micro and simultaneous method showed a good coincidence with single rosette assay with SRBC, anti-Ig immunofluorescence and Immunobeads assay on 13 healthy normal lymphocytes. It is simple, easy to perform and clear-cut, resulting very few double-rosette cells.

Key words : T cell, B cell,
rosette immunobeads
Sheep red blood cells.

I. 序 論

臨床免疫学的にヒトリンパ球のT細胞とB細胞の区別には、一般にヒツジ赤血球によるEロゼット法によりTリンパ球を、Fc受容体やC3受容体をEA, EACロゼット法で検出し、あるいは細胞膜表面の免疫グロブリンを蛍光抗体法で検出する方法が、Bリンパ球の同定あるいは計測に用いられている。これらの検査法は細胞性免疫のもっとも基本となる反応であり、近年TおよびBリンパ球の比率を求め、患者の免疫機能の推定に欠くことのできない検査法として、日常検査に次第に広く行なわれるようになったが、従来の方法を用いるかぎり、別々のプレートを用いて、T, B細胞を個々に求めなければならない。また蛍光抗体法では、検体量も比較的多く必要とし、かつ特殊な器具や施設、技術などの制約を受けるなどの問題点がいくつかある。

著者らは、Chao¹⁾によって開発された抗ヒト免疫グロブリン抗体を結合させた合成ポリアクリルアミド粒子 (immunobeads) とヒツジ赤血球とをマイクロプレート上に付着させたリンパ球と反応させることにより、従来の方法と比べて、はるかに微量の検体で、しかもT細胞とB細胞とを二重ロゼット法で同時に検索しえる臨床細胞免疫学的検査法の開発、検討を試みた。

II. 材料と方法

1. ヒツジ赤血球浮遊液

緩衝生理食塩液 (PBS) で3回洗浄し、 $2 \times 10^8/\text{ml}$ にウシ胎児血清 (FCS) に浮遊した。

2. Immunobeads (Bio-Rad 社)

抗ヒト免疫グロブリン (抗 heavy and light chain) を使用した。これは直径 4μ のポリアクリルアミド粒子に抗ヒト IgG, IgM および IgA ウサギ抗体を結合させたものである。 $20 \text{ mg}/2.5 \text{ ml}$ に pH 7.2 の PBS で調整した。

3. 抗ヒト免疫グロブリン FITC 標識ウサギ血清 (ベリング社)

抗血清を $10,000 \text{ rpm}$ 30分遠心後 0.22μ のミリポアフィルターで濾過し、PBS で10倍に希釈して使用した。

4. 固定染色液

PBS に、グルタルアルデヒドを 0.25%, ブリリアントクリシルブルーを 0.005% に溶解し使用した。

5. プレーートの poly-L-lysine (PLL) 処理

橋ら²⁾に従いマイクロプレート (ファルコン社, 3034) の各穴に $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ の Poly-L-lysine (PLL sigma) $1 \mu\text{l}$ を入れ、室温 60分放置後、蒸留水で洗浄し、乾燥

させて使用した。

6. リンパ球の分離

健康者の肘静脈より採血したヘパリン加末梢血液から Böyum³⁾ の方法に準じて、Ficoll-Isopaque を用いた比重遠心法で分離し、3回洗浄後 $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した。

7. 微量 Immunobeads 法

上記の PLL 処理プレートにリンパ球 $1 \mu\text{l}$ を付着させた後、FCS で未反応の PLL を処理し、Immunobeads の適当な濃度 $25 \mu\text{l}$ を加えて、一定温度に一定時間置いて反応後、転倒静置し、ふりすて (flicking) かトランペット管で非結合粒子を除去する。その後固定染色液で染色し、プレートのまま顕微鏡下で観察し、1個のリンパ球に3個以上の粒子が結合したものを陽性とし、リンパ球 200 個を数え、ロゼット形成率を求めた。計測はすべて三重測定で行ない、平均値で表現した。

8. 膜蛍光抗体法

Aisenberg⁴⁾に従い、リンパ球 $2 \times 10^6/\text{ml}$ 0.5 ml に FITC 標識抗ヒト免疫グロブリンウサギ血清 0.5 ml を加え、室温 30分反応後、5% FCS を含む PBS で3回洗浄し、蛍光顕微鏡でリンパ球 200 個を数え、膜蛍光が明瞭に認められる細胞の百分率を求めた。

9. Eロゼット法

橋ら²⁾の改良法に従って行なった。すなわちリンパ球を PLL 処理プレートに付着後、ヒツジ赤血球浮遊液 $10 \mu\text{l}$ を加え、室温で 90分、 4°C で一晚反応させ、ヒツジ赤血球を除去し、固定染色してロゼット形成率を求め、Tリンパ球とした。

10. 二重ロゼット法

PLL 処理プレートに付着したリンパ球に Eロゼット法と Immunobeads 法を組み合わせで行なった。

III. 実験結果

1. Immunobeads 微量法の検討

1) Immunobeads の濃度とふりすて (flicking) の影響

まず Immunobeads の濃度と、非結合粒子の除去方法として、ふりすて法とトランペット管による方法の比較を行なった。その結果を図1に示す。この図から明らかに、Immunobeads 濃度が $2 \text{ mg}/\text{ml} \sim 0.125 \text{ mg}/\text{ml}$ までは、ロゼット形成率は $23.4 \pm 5.9\% \sim 22.2 \pm 6.4\%$ の間でほぼ一定であるのに比して、 $0.0625 \text{ mg}/\text{ml}$ 以下では次第に低下し、 $0.015 \text{ mg}/\text{ml}$ では約 50% の減少を示す。したがって疾患で Bリンパ球の比率が高い場合を考慮して、 $0.25 \text{ mg}/\text{ml}$ を最適濃度と定めた。次に非結合粒子の除去法の比較では、どちらの方法でもロゼッ

図 1 Influence of Concentration of Immunobeads Suspension and Techniques of Removal Excess Particles on Rosette Formation

図 2 Effect of Incubation Time and Temperature on B Rosette Formation

ト形成率は 0.25 mg/ml まで、ほぼ同様の傾向を示し、標準偏差にも大きな差は認められなかったが、ふりすて法の方が比較的安定した成績で、またトランペット管法より多少高い値を示した。また非結合粒子はふりすて法の方がよく取り除かれるため、判定が容易となるので、除去法はふりすて法を用いることにした。

2) 反応時間と温度の検討

同一検体について、リンパ球と Immunobeads との反応温度を 4°C、室温 (約 22°C)、および 37°C の 3 種類にかえ、それぞれについて反応時間を 30 分から 180 分まで変化させたあらゆる組み合わせを作り検討した。その結果を図 2 に示す。4°C ではどの反応時間においても 37°C、室温に比して、ロゼット形成率は低く、37°C と室

表 1 Effect of Inversion Time on B Cell Rosettes

Time	Rosettes
30	13.2
60	14.8
120	11.8
180	12.5
over night	15.0

温とでは、いずれの反応時間においても差が認められなかった。また反応時間は 30 分では不十分で、長くする程ロゼット形成率は高くなるが、4°C、室温、37°C のいずれの温度でも、120 分で最高に達し、その時の値はそれぞれ $7.6 \pm 2.3\%$ 、 $9.9 \pm 3.1\%$ 、 $9.7 \pm 2.9\%$ を示した。180 分ではむしろ低下する傾向が認められた。したがって室温で 120 分を最適反応条件と定めた。

3) 転倒時間の検討

マイクロプレートを用いた場合、効果的に非結合粒子をふりすてによって除去するには転倒時間が関係するので、これについて検討した。表 1 に示すように、30 分間転倒しておけば、判定に支障のない程度に除去されることがわかった。

4) Immunobeads 法と蛍光抗体法との比較

正常健康人 13 人の末梢血液について、同一検体で両方法を同時に施行して比較した。その成績を表 2 に示す。これから、第 3 例を除いて、概ね一致した値を示しているが、蛍光抗体法に比して Immunobeads 法はやや高い値で、平均値でみると前者の $11.3 \pm 2.4\%$ に対して後者は $14.3 \pm 3.6\%$ であった。

2. 二重ロゼット法による T, B 細胞同時測定の検討

つぎに E ロゼット法により T リンパ球を、Immunobeads 法により B リンパ球を同時に計測する条件を、13 例の正常ヒト末梢血液について比較検討した。まずヒツジ赤血球と Immunobeads を加える順序の検討を行なった。すなわち、まず Immunobeads でロゼットを形成させ、非結合粒子を除去した後 E ロゼットを形成させる方法 A と、逆に E ロゼットを先に形成させ、非結合ヒツジ赤血球を除去後 Immunobeads を加える方法 B、および両者を同時にリンパ球と室温で 120 分反応させた後、4°C 一晚静置し、非結合赤血球および粒子を除去して判定する方法 C の三法を比較した。その結果を表 3 に示す。Immunobeads を先に加える方法 A では、T リンパ球平均 $81.1 \pm 2.4\%$ 、B リンパ球 $13.5 \pm 2.8\%$ となり、E ロゼット法単独で行なった T リンパ球 $77.4 \pm 5.8\%$ 、蛍光

表 2 Comparison of Immunobeads Method with Membrane Immunofluorescence

Case No.	Immuno-fluorescence	Immunobeads
1	11.9	14.2
2	13.0	14.9
3	11.5	23.0
4	10.2	11.4
5	11.3	18.2
6	14.4	14.4
7	10.0	14.5
8	15.4	17.0
9	6.3	8.8
10	10.8	14.0
11	10.0	10.7
12	8.4	10.2
13	14.1	15.0
mean $\pm$ S.D.	11.3 ± 2.4	14.3 ± 3.6

抗体法、Immunobeads 法をそれぞれ単独で行なった場合の B リンパ球それぞれ $11.3 \pm 2.4\%$ 、 $14.3 \pm 3.6\%$ と近似の値を示した。E ロゼット法を先に行なう方法 B では、T リンパ球 $73.7 \pm 5.6\%$ 、B リンパ球 $6.0 \pm 3.6\%$ となり、T リンパ球は単独に E ロゼット法を行なった場合と近似の値を示したが、B リンパ球は単独に行なった時より低い値を示した。また両者を同時にリンパ球と反応させる方法 C では、T リンパ球 $73.2 \pm 8.9\%$ 、B リンパ球 $2.1 \pm 1.3\%$ となり、T リンパ球は単独のそれと近い値を示したが、B リンパ球は著しく低い値であった。したがってヒツジ赤血球と Immunobeads を用いる T, B リンパ球の微量同時測定法は、まず Immunobeads でロゼットを形成させ、非結合粒子を除去後 E ロゼット法を行なう方法 A が良いことがわかった。図 3 にこの方法で行なった判定を示す。1 枚のプレート上でブリリアントクリシブルブルーによって染色されないヒツジ赤血球と青色および赤紫色にそれぞれ染色されたリンパ球が観察され、単核貪食細胞は Immunobeads を取り込んで、これらの鑑別はきわめて容易であり、試験管内の反応と異なりスライドグラスに移すことなく判定できる。表 3 に示すように、両者とともに反応する細胞はほとんど見られず、0.8% にすぎなかった。また両者のいずれにも反応しない null cell は Immunobeads を先に加える方法 A では平均 $4.8 \pm 2.7\%$ 、ヒツジ赤血球を先に加える方法 B で

表 3 Comparison of 3 Double Rosette Assay Techniques with Separate Assay

Technique	Rosetted with				Fluorescence Positive
	SRBC	Immunobeads	Both	None	
Single Assay	77.4±5.8	14.3±3.6	—	—	11.3±2.4
Method A I. B. — SRBC	81.1±3.6	13.5±2.8	0.8±0.9	4.8±2.7	
Method B SRBC — I. B.	73.7±5.6	6.0±3.6	0.3±0.5	19.9±6.8	
Method C SRBC & I. B.	73.2±8.9	2.1±1.3	0	24.2±8.7	

は平均 19.9±6.8%, 両者を同時に加える方法 C では平均 24.2±8.7% の値を示し, 試薬の添加順序によって大きな影響をうけることがわかった. 以上の検討の結果, 微量二重ロゼット法の最良の条件をつぎのように確立した. 1 ml の被検血液から分離した $1 \times 10^6/\text{ml}$ のリンパ球浮遊液 1 μl を PLL 処理マイクロプレートに付着させ, FCS で未反応の PLL をふさいだ後, 0.25 mg/ml の Immunobeads を 25 μl 加え, 室温で 120 分反応させた後 30 分間プレートを転倒し, 過剰の粒子をふりすて (flicking) $2 \times 10^8/\text{ml}$ のヒツジ赤血球浮遊液 10 μl を加え, 室温に 90 分おいたのち 4°C で一夜反応させ, 同様の方法でヒツジ赤血球を除き, 固定染色後鏡検し判定する.

IV. 考 察

細胞性免疫学の進歩により, これまでの体液性免疫学的検査ではうかがい知ることができなかった患者の免疫学的状態がよりの確に把握できるようになり, とりわけ末梢血液中のリンパ球の T 細胞と B 細胞の比率は先天性免疫不全症の診断のみならず, リンパ網内系をはじめとする悪性腫瘍や特殊感染症などの患者の診断や病態の把握に次第に広く応用されるようになった⁹⁾.

しかし現在用いられている臨床免疫学的方法では, T 細胞と B 細胞を別々に計測するため, 測定操作に手間と時間を要し, また検体も多量に必要とし, これらの解決が強く要望されていた.

今日 T 細胞の同定にはその方法の簡便さからヒツジ赤血球とのロゼット形成反応 (E ロゼット) が用いられ, B 細胞の検出には膜表面免疫グロブリンを蛍光抗体法で検出する方法のほか, Fc 受容体を感作した赤血球 (EA), C3 受容体を感作血球 (EAC) で検出する方法が主として用いられているが, 相互の結果は必ずしも一致せず⁶⁾, 大きな困惑を招いている.

B 細胞のもっとも特徴的な性格は表面免疫グロブリン

を保有することであり, この検出がもっとも信頼しうる B 細胞の同定法であるが, 蛍光抗体法を用いるかぎり, 蛍光顕微鏡や暗室などの特別な装置と熟練した手技を要し, 時間もかなりかかる.

蛍光抗体法の蛍光色素の代わりに視認可能な粒子を用いてトレーサーをする考えは, 抗ヒト免疫グロブリンで感作したウシ赤血球を用いたロゼット法について原田ら⁷⁾, Johnsen ら⁸⁾が報告しており, われわれは生物材料の抗原性や不安定さを除くために 1973 年にナイロン粒子を用いてクームズ反応をロゼットとして観察した⁹⁾のであるが, ナイロン粒子の大きさの不均一さと非特異的な細胞への付着のため, 残念ながらその後の発展に至らなかった.

最近 Sjöberg ら¹⁰⁾は IgG を結合したラテックス粒子を用いて, Fc 受容体をもつリンパ球の検出法を報告している. また Chao ら¹¹⁾, 石黒ら¹²⁾は抗ヒト免疫グロブリン抗体を結合させたポリアクリルアミド粒子 (Immunobeads) を開発し, これを用いて B リンパ球の膜表面免疫グロブリンをロゼット法により検出し, B リンパ球の比率を求める方法を報告し, Lee ら¹²⁾, 倉持¹³⁾, 坂口ら¹⁴⁾は, この方法と E ロゼット法とを組み合わせて試験管内で同時に T リンパ球と B リンパ球を検出する方法を工夫している.

Immunobeads 法の特徴としては, 従来の EA ロゼット法, EAC ロゼット法は, 赤血球を利用しているので検査前調製しなければならず, かつ保存の面で問題があるのに対し, 合成品であるため安定で保存に注意すれば長期間使用可能な点がまずあげられる. さらに蛍光抗体法のように設備や高価な器具を必要とせず, 通常の光学顕微鏡で判定しうる点は, 実用上はなほだ有利である. しかも粒子の細胞内への取り込みによって喰能をもつ細胞を区別できるので, わざわざ喰能細胞を除く操作をしなくても, そのまま判定できることも手技の簡易化に

役立つ。

われわれはこれらの方法をもとに、さらに改良を加えリンパ球を PLL でマイクロプレートに付着させ、試薬を加えて反応させた後過剰の試薬をふりすてることにより、微量で迅速さらに同時に T リンパ球と B リンパ球とを計測する方法を開発した。

本法の特徴は、上記の Immunobeads 法の特徴のほかわずか 1 ml の検体で T リンパ球と B リンパ球とを同時に同一プレート上で測定できる点である。本法のもう 1 つの特徴は図 3、表 3 から明かなように、ヒツジ赤血球とロゼットを形成する細胞はほとんど Immunobeads を結合せず、逆に Immunobeads を結合する細胞はヒツジ赤血球とロゼットを形成せず、両者の区別はきわめて明瞭であることである。これは本法が T、B 細胞の区別に非常にすぐれた方法であることを示している。

B リンパ球の検出上、赤血球を用いる EA ロゼット法、EAC ロゼット法では、往々にして Fc、C3 受容体をもつ null cell をはかりこみ、過大な値を示す¹⁵⁾のに対し、その恐れがなく、したがって亜分画の合計が 100% をこえることはない。

本法の施行上もっとも注意すべき事は試薬の添加順序である。すなわち表 3 で明かなように、Immunobeads、ヒツジ赤血球の順序で反応させた場合には、それぞれ単独で測定した時ともっとも近い値を示すが、順序を逆にしたり、あるいは同時に加えた時には B 細胞の比率が著しく減少する。これはヒツジ赤血球によって Immunobeads の結合が立体的に障害されたためとして説明可能であろう。また一見奇異に感ずることはヒツジ赤血球を先に加えても必ずしも T 細胞の比率は上昇せず、かえってあとから加えた方が高い値を示すことである。これは E ロゼットの結合が弱く Immunobeads と至適温度を異にするためと考えられる。すなわち先にヒツジ赤血球を作用させたのでは、あとから加えた Immunobeads の最適温度である室温で形成された E ロゼットが解離してしまうためと考えられる。その結果両者とも結合しない null cell が方法 B および C で方法 A に比して著しく増大しており、本来 T 細胞または B 細胞と判定されるべきものの一部が偽陰性を示すことがわかる。

このような検討の上に立って本法の Immunobeads の成績を他の研究者のそれと比較すると、われわれの得た $14.3 \pm 3.6\%$ の値は Chao ら¹¹⁾の $10.5 \pm 4.3\%$ よりはやや高いが、倉持¹³⁾の $15.29 \pm 6.37\%$ とほぼ等しい値を示した。また同一検体について Immunobeads 法と蛍光抗体法とを比較した成績では、倉持¹³⁾は両者に差がなかったと述べているが、Chao ら¹¹⁾は前者の $10.5 \pm 4.3\%$ に

図 3 微量二重ロゼット法による T、B リンパ球の測定結果

対して後者は $19.3 \pm 5.1\%$ で蛍光抗体法が高い値を示している。われわれはこれに反して Immunobeads 法より蛍光抗体法 ($11.3 \pm 2.4\%$) の方が低い値を示した。この原因は、人種差、蛍光抗体の濃度、発光効率、蛍光顕微鏡の輝度あるいは判定基準が個人により異なることなどの技術上の問題とともに、われわれは Fc 受容体による凝集標識 IgG の非特異結合を防ぐため、あらかじめ蛍光抗体を十分遠心沈澱して除いていること、Immunobeads 法では 1 個の粒子に多数の抗体が結合しているため、リンパ球表面上の免疫グロブリンと多点接触をするので、分子状の蛍光抗体よりも効率良く検出できるためと思われる。

つぎに T 細胞についてわれわれの $81.1 \pm 3.6\%$ は橘ら²⁾の $80.2 \pm 7.2\%$ 、矢田ら⁵⁾の $82 \pm 5\%$ と一致しているが、試験管法を用いた諸研究者の T 細胞の値より高く、また Immunobeads とヒツジ赤血球を試験管内で併用した Lee¹²⁾、Chao¹¹⁾、倉持¹³⁾の値より高い。これはマイクロプレート付着法を用いているので当然のことであろう。

つぎにヒツジ赤血球と Immunobeads の両者が同時に 1 つの細胞にロゼットを形成する二重ロゼット細胞 (double rosette cell) について倉持¹³⁾は 1.54% の値を報告しているが、われわれの得た成績はこれより低く、Lee ら¹²⁾の値とほぼ近い値を示した。T 細胞もごくわずかの免疫グロブリンをもつことが知られており、両マーカーをもつ細胞が存在することは Bentwich ら¹⁶⁾も明らかにしているとおり事実なので、この検討は興味ある。しかし正常ヒトリンパ球における 1% 前後の低い分布では検討材料として不十分であり、技術的な問題点としてヒツジ赤血球あるいは Immunobeads がリンパ球と結合する際、他方をまきこんであたかも二重ロゼットのように見える可能性もまず除外しなければならない。またヒ

ツジ赤血球とImmunobeadsを加える順序を逆にすると二重ロゼット細胞が変動することから、つねに一定の高い率の二重ロゼット細胞を示す材料について検索する必要がある。現在このための試料としてもっとも有効と考えられるのは腫瘍細胞であろう。したがって、その詳細な検討は適当な試料が得られた時の研究にゆづらねばなるまい。

V. ま と め

PLL 処理プレートにリンパ球を付着させ、ヒツジ赤血球とImmunobeadsを組み合わせて反応させることにより、わずか1mlの血液で、1回の操作でTリンパ球、Bリンパ球のみならず二重ロゼット形成細胞、null cell 喰細胞を同時に検出することができた。本法を13

例の正常ヒトリンパ球について標準的なEロゼット法、膜蛍光抗体法、試験管内Immunobeads標準法を単独で施行した時の成績と比較し、それぞれきわめて良く一致することを確認した。本法は方法が簡易で判定が明瞭であり、通常の光学顕微鏡のほか、何らの特殊な装置を要せず、臨床免疫学的に有用な方法と考えられる。

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費（リンパ球の膜抗原と膜レセプター研究班、班長 橘 武彦）の援助をうけた。

付 記

この研究の一部は第17回日本移植学会、第28回日本臨床病理学会総会で発表した。

文

献

- 1) Chao, W. & Yokoyama, M.M. : Determination of B lymphocytes population using antibody coated polyacrylamide beads. Clin. Chim. Acta., 78 : 79, 1977.
- 2) 橘 武彦 : マイクロテストプレートを用いたロゼット形成細胞の迅速簡便検出法。日本臨床, 37 : 1417~1420, 1979.
- 3) Böyum, A. : Isolation of leucocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, Suppl. 97, 9, 1968.
- 4) Aisenberg, A.C. & Block, K.J. : Immunoglobulin on the surface of neoplastic lymphocytes. New. Eng. J. Med., 287 : 272, 1972.
- 5) 矢田純一・藤原道夫編 : リンパ球機能検査法。p. 43. 中外医学社, 東京, 1980.
- 6) Froland, S.S. & Natvig, J.B. : Identification of three different human lymphocyte populations by surface markers. Transplant. Rev., 16 : 114~162, 1973.
- 7) 原田弘智・笠原 忠・伊藤喜久・他 : ヒトリンパ球のロゼット法による検出。臨床病理, 28 : 1232, 1980.
- 8) Johnsen, H.E. & Madsen, M. : Lymphocyte subpopulations identified by membrane markers. Scand. J. Immunol., 9 : 419, 1979.
- 9) 鈴田達男・丸本一彰・室谷和枝 : ナイロン結合抗原。アレルギー, 23 : 220, 1974.
- 10) Sjöberg, O. & Inganäs, M. : Detection of Fc receptorbearing lymphocytes by using IgG-coated latex particles. Scand. J. Immunol., 9 : 547, 1979.
- 11) 石黒達也, Yokoyama, M.M. & Chao, W. : Antibodycoated polyacrylamide beads を用いた B リンパ球の測定法。医学のあゆみ, 103 : 89, 1977.
- 12) Lee, Y., Yoshizawa, Y., Carr, R.G. & Yokoyama, M.M. : A simpler method for combined detection of human peripheral lymphocyte subpopulations. Int. Arch. Allergy, 59 : 114~116, 1979.
- 13) 倉持恒雄 : T 細胞, B 細胞の population 測定法標準化の検討。移植, 16 : 8, 1981.
- 14) 坂口日出男・指宿健夫・石黒達也 : E ロゼット法, beads ロゼット法を併用した T, B リンパ球の測定法について。臨床病理, 28 : 597, 1980.
- 15) Rowlands, R.T. Jr., Whiteside, T.L. & Daniele R.P. : Lymphocytes, in Todd-Sanford. Davidson Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Edited by Henry, J.B., Saunders, W.B., Philadelphia, 1979, pp. 1301~1334.
- 16) Bentwich, Z., Douglas, S.D., Siegal, F.P. & Kunkel, H.G. : Human lymphocyte-sheep erythrocyte rosette formation : some characteristics of the interaction. Clin. Immunol. Immunopathol., 1 : 511~522, 1973.