モノクローナル抗体による細胞表面抗原検出における 非特異反応の成因とその除去に関する研究

高瀬 浩造・水野 和枝*
大川 洋二・矢田 純一

Jpn. J. Clin. Immun., 8(4): 184~191, 1985.

Detection and elimination of non-specific bindings of monoclonal antibodies in the cell surface marker assay

Kozo Takase, Kazue Mizuno*, Hiroji Okawa and Junichi Yata

*Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Tokyo Medical
and Dental University *Japan Scientific Instrument Co. Ltd*

【Summary】

So-called "non-specific bindings" are troublesome problems in flow cytometric surface marker assay with monoclonal antibodies. Especially in the detection of weakly positive populations and in the fine evaluation of fluorescence intensity, it should be resolved for practical purpose.

We examined the reactivities of mouse serum IgG fractions and mouse monoclonal isotypic control antibodies to some cell lines bearing Fc receptor, and also referred these subclass specificities to other monoclonal antibodies against defined surface markers. Well controlled staining procedures and use of selected monoclonal antibodies and fluorochromic anti-mouse antibodies disclosed that most cause of the non-specific binding was thought to be deduced to the antibody binding activities of Fc receptors.

We attempted to eliminate Fc receptor derived non-specific binding by adding a step to the conventional staining procedures. The pretreatment of the cells with commercial human gamma globulins was quite effective in the neglection of false positivities of control antibodies. However this simple but useful technique might have some adverse possibilities that it decreases the fluorescence intensity of some special markers, for example Leu-11a (antibody directed against Fc receptor).

Negative control staining with control antibodies is essential for practical surface marker assay and non-specific binding can be prohibited by blocking of Fc receptor with human globulins in most cases.

Key words : monoclonal antibody,
flow cytometry,
non-specific binding,
surface marker assay,
Fc receptor

【概 要】

モノクローナル抗体を用いた表面形質分析において問題となる非特異反応は、現在の一般的な染色条件下では主として Fc レセプターに由来していると考えられた。この Fc レセプターによる非特異反応は、市販のコントロール抗体の使用により、その有無を検出することが可能であり、一部の例外を除いて本来陰性の形質に対するモノクローナル抗体もサブクラス特異的に偽陽性を示した。

この Fc レセプターに由来する非特異反応の除去の目的で、ヒトグロブリンの添加の効果を検討したが、非特異反応の抑制という点では有効であった。ただし、グロブリン添加による新たな問題点もあり今後検討を必要とするだろう。

どちらにせよ、コントロール抗体によるネガティブコントロールの設定は必須であり、その上で対策が講じられるべきである。

緒 言

表面形質分析は、抗体などを用いて細胞表面の各種物質の有無を検出し、その細胞の形質の一つとして評価を可能とすることを目的としている。実際にはモノクローナル抗体による細胞表面抗原検出がその主体であり、末梢血リンパ球サブセット分析や腫瘍細胞の帰属を決定するために応用されており、またその測定法としては一般に flow cytometry (以下 (FCM と略す) が使用されている。

モノクローナル抗体を用いた表面形質分析では、その目的が陽性・陰性の判別であること、また弱陽性群の検出がときに必要となることがあり、さらには形質の発現の程度が問題となる場合もある。このような目的に際して、もし非特異反応が存在すれば、それはきわめて重要な問題と考えられる。また事実この非特異反応と考えられる現象はときに存在し、その原因としては Fc レセプター、細胞変性による細胞膜透過性の増大による細胞質の染色、使用する抗体自体の問題などが考えられている。とくに FCM においては、染色部位の特異性の確認が不可能であり、その点からもあらかじめ十分検討しておく必要があるものと考えられる。

そこで今回、モノクローナル抗体を用いた FCM による表面形質分析において、非特異反応の主体である Fc レセプターの影響について、検討した。具体的には、Fc レセプターによる非特異反応の検出法およびヒト γ -グロブリンを用いたその防止法について、実際の応用を踏

まえて基礎的検討を加えたので報告する。

I. 実験方法

1. 使用細胞

細胞としては、Fc レセプターを有しかつ表面形質についての検索が終了している細胞株²⁾、ヒト前骨髄性白血病由来 HL-60 とヒト単球性白血病由来 THP-1-0 を使用した。これらの細胞株は、10% FCS (ウシ胎児血清) と Tobramycin (シオノギ) を 50 $\mu\text{g/ml}$ 含む RPMI 1640 にて、コーニングカルチャーボトル中で、5% CO₂, 37°C で継代培養した。なお、一部の実験では、継代培養中に形質転換して Fc レセプターの発現が著しく増強した THP-1-0 の変異株も使用したが、この変異細胞の詳細は未検のため不明である。

2. 使用抗体

ネガティブコントロールとしては、マウス血清 IgG (ポリクローナル IgG 1, IgG 2a, IgG 2b, IgG 3 サブクラスを含む)、モノクローナルマウス IgG 1, モノクローナルマウス IgG 2a, モノクローナルマウス IgG 2b, モノクローナルマウス IgG 3, モノクローナルマウス IgM (すべて Coulter Immunology) を使用した。

表面形質検出用モノクローナル抗体としては、マウス IgG 1 サブクラスの My 7³⁾, T 11⁴⁾, マウス IgG 2a サブクラスの I 2⁵⁾, B 1⁶⁾, J 5⁷⁾, マウス IgG 2b サブクラスの ILR 2⁸⁾, OKM 1⁹⁾ My 9¹⁰⁾ (文献 10 では IgG 1 サブクラスとなっているが、製品は IgG 2b サブクラス

である)を使用した(OKM1のみ Ortho Diagnostic, 他は Coulter Immunology)。

今回使用した抗体はすべて非標識抗体で、標識のための二次抗体には FITC 標識 F(ab')₂ 分画ヤギ抗マウス IgG(γ鎖・L鎖特異性)抗血清(TAGO)を使用した。

3. 細胞の抗体による染色法

培養細胞株は洗浄後、10% FCS 加 RPMI 1640 に 3×10⁶/ml の細胞濃度で浮遊させ 4°C に冷却した。γ-グロブリンを添加する場合には、この時点で筋注用ヒトガンマグロブリン(150 mg/ml, グロブリンミドリ, ミドリ十字)を 1/20 容量加えて 4°C で 15 分間静置した。

次に、細胞浮遊液を 200 μl ずつファルコンチューブに分注し、ネガティブコントロール用および表面形質検出用抗体を 100 サンプル用バイアルに換算して 3 μl 添加し攪拌して、4°C で 30 分間反応させた。これに 4°C の 0.1% BSA (ウシ血清アルブミン) 0.1% azide を含む PBS (リン酸緩衝生理食塩水 Ca・Mg 不含, pH=7.2) 3 ml を加えて 4°C で遠心洗浄、さらに 0.1% BSA 0.1% azide 加 PBS 100 μl に再浮遊させた。これに FITC 標識の二次抗体 3 μl を添加し攪拌し 4°C で 30 分間反応させた後、4°C の 0.1 BSA 0.1% azide 加 PRB で 2 回遠心洗浄し、さらにこの BSA・azide 加 PBS 1 ml に浮遊させ、氷水中で遮光して FCM にて測定した。

なお、それぞれの染色のシリーズにおいて、ヒトガンマグロブリン添加および染色のための抗体の反応操作を加えない、洗浄操作のみ行ったものを非染色細胞として測定した。この非染色細胞は自家蛍光を表現しているものと考え、抗体により染色した検体それぞれの蛍光強度と比較することにより反応性評価の基準とした。

4. フローサイトメトリー

フローサイトメーターとしては、FACS 440 を 488 nm 200 mW のアルゴンイオンレーザーと 70 μmφ のノズルで使用した。測定は 560nm short pass dichroic mirror, 530nm band pass filter を通して光学系 FL-1 で行い、PMT の電圧は 650 V で使用した。データ入力にはログスケールとし、ゲインは 1×0.8 に設定したが、この条件では約 80 チャンネル数の差が蛍光量の比 10 倍に相当する。

染色した細胞は、少数含まれる死細胞を除去するように前方散乱分布に gating を施し、約 10⁴ 個計測して得られた蛍光強度分布ヒストグラムをマイクロコンピュータのフロッピーディスクに蓄積保存した。

5. 蛍光強度に対するデータ処理

対象は基本的に単一細胞群とみなし、抗体に対する反応性の有無ならびにその程度を、蛍光強度分布ヒストグラム上のピーク位置を中心として評価した。ヒストグラムパターンにおける蛍光強度の代表値とその分布の広がり、付随する少数の蛍光パターンの異なる群の影響を最小限にして算出するために、Simplex法¹⁾による非線形最少二乗法を用いた正規分布へのフィッティングにより計算した。

具体的には“nfit”と呼ばれるこの実験専用のプログラムによって処理した。まず、蛍光ヒストグラムパターン上の最大のピークを検出し、そのチャンネル位置を平均の初期値 μ_0 とする。次にこのピークの 0.606 倍の高さに相当するチャンネル位置を左側の傾斜部分で求め、ピーク位置とのチャンネル数差を標準偏差の初期値 σ_0 とする。さらに正規分布の面積の初期値 a_0 を 1.0 とし、最終打ち切り誤差を平均 μ に対して 0.2、標準偏差 σ に対して 0.1 とし、チャンネル数に対応する蛍光強度で $\mu_0 - 3\sigma_0$ から $\mu_0 + 2\sigma_0$ の範囲で、Simplex 法を用いて残差の二乗和が最少となるように正規分布に近似させた。なお、残差に対しての荷重は行わず、そのためピーク近傍重視の演算となっている。度数分布を変換して確率密度で表現したヒストグラムの高さを y とすると、蛍光強度を変数 x とした正規分布は次式で示される。

$$y = a \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2}$$

II. 結 果

1. 培養細胞のコントロール抗体に対する反応性

3 種の細胞株についての、マウス血清 IgG と、マウスモノクローナルコントロール IgG 1, IgG 2a, IgG 2b, IgG 3, IgM の反応性を、ログスケールでの蛍光強度ヒストグラム分布を正規分布に適合させた場合の平均と標準

表 1 HL-60 細胞での各種コントロール抗体の反応性

antibodies	globulin(-)	globulin(+)
cell	54.1 ± 8.2	
MsIgG	71.1* ± 10.3	54.8 ± 7.3
MsIgG1	53.8 ± 7.5	52.8 ± 7.5
MsIgG2a	67.9* ± 9.8	52.6 ± 7.4
MsIgG2b	52.6 ± 7.7	51.7 ± 7.4
MsIgG3	55.6 ± 7.6	52.0 ± 7.4
MsIgM	57.5 ± 7.4	52.2 ± 7.5

数字は正規分布に対応させた蛍光強度ヒストグラムパターンの(平均)±(標準偏差)を記載した。また、*軽度の反応性、**高度の反応性を意味している(本文参照、以下の表においても同様)。

表 2 THP-1-0 の細胞での各種コントロール抗体の反応性

antibodies	globulin(-)	globulin(+)
cell	53.4 ± 7.9	
MsIgG	120.6** ± 11.0	56.4 ± 7.6
MsIgG1	55.4 ± 7.7	54.2 ± 7.9
MsIgG2a	123.0** ± 11.0	55.0 ± 7.6
MsIgG2b	62.5* ± 7.5	54.4 ± 7.8
MsIgG3	86.6** ± 11.4	54.5 ± 7.7
MsIgM	70.1* ± 8.4	56.4 ± 7.6

表 3 THP-1-0 変異細胞での各種コントロール抗体の反応性

antibodies	globulin(-)	globulin(+)
cell	53.0 ± 7.7	
MsIgG	142.8** ± 16.6	72.5* ± 10.0
MsIgG1	95.3** ± 25.6	54.7 ± 8.2
MsIgG2a	112.6** ± 23.3	55.8 ± 8.1
MsIgG2b	109.5** ± 23.0	55.1 ± 8.2
MsIgG3	53.0 ± 8.3	55.6 ± 7.9
MsIgM	57.4 ± 8.6	57.1 ± 8.1

準偏差を用いて、非染色細胞（自家蛍光を表現していると考えられる）と対比させて示したのが、表 1・表 2・表 3 である。前述した測定条件では、5 チャンネル前後の変化は蛍光強度に換算して 15% 程度の増減に相当し、この範囲内の変動はここでは有意なものとは考えなかった。さらに、25 チャンネルの変化は約 2.0 倍の蛍光量変化に相当するため、これ以上の蛍光強度の増強を高度の反応性、これ未満を軽度の反応性として区別して評価した。

HL-60 細胞では、マウス血清 IgG とモノクローナル IgG 2a に軽度の反応性を認めた。THP-1-0 細胞では、マウス血清 IgG とモノクローナル IgG 2a, IgG 3 に高度の反応性を認め、とくに血清 IgG と IgG 2a の反応性は著しかった。モノクローナル IgG 2b と IgM は軽度の反応性を示し、また IgG 1 のみ反応性を示さなかった。形質転換したと考えられる THP-1-0 変異株細胞では、マウス血清 IgG とモノクローナル IgG 1, IgG 2a, IgG 2b に高度の反応性が認められた。

2. ヒトグロブリン存在下でのコントロール抗体の反応性

筋注用ヒトグロブリンをあらかじめ 1/20 量添加して、それぞれの細胞株に対するコントロール抗体の反応性を検討した結果が同様に表 1・表 2・表 3 である。また、グロブリンの有無による蛍光強度ヒストグラムパターン

表 4 HL-60 細胞での各種表面形質検出用モノクローナル抗体の反応性

antibodies	globulin(-)	globulin(+)
cell	54.1 ± 8.2	
My7(IgG1)	143.0** ± 14.2	140.4** ± 14.3
T11(IgG1)	57.3 ± 7.8	54.9 ± 7.5
I2(IgG2a)	63.4* ± 9.3	52.8 ± 7.4
My9(IgG2b)	124.5** ± 9.0	123.2** ± 8.8
ILR2(IgG2b)	56.5 ± 7.7	50.9 ± 7.5
OKM1(IgG2b)	54.4 ± 8.0	52.9 ± 8.1

の変化を示したものが図 1・図 2・図 3 である。なおこの条件下での γ -グロブリンとしての終濃度は 750 mg/dl 程度と考えられ、正常人での血清での濃度と同じかやや低めである。

HL-60 細胞では、すべてのコントロール抗体の反応性が認められなくなった。具体的には、マウス血清 IgG とモノクローナル IgG 2a の蛍光強度の減少が認められ、IgG 3 と IgM では微少な変化が認められるものの、IgG 1 と IgG 2b ではまったく変化が認められなかった。THP-1-0 細胞でも同様にすべてのコントロール抗体の反応性が消失しており、反応性のなかった IgG 1 を除いて蛍光強度の減少がみられ、すべてが自家蛍光に一致した。THP-1-0 変異株細胞では、かなり蛍光強度は減少したもののマウス血清 IgG には反応性が残存したが、他のモノクローナルコントロール抗体の反応性はすべて消失した。

3. ヒトグロブリンによる表面形質検出用モノクローナル抗体の反応性の変化

まず表面形質検出用モノクローナル抗体としては、My 7, My 9, OKM 1, T 11, I2, ILR 2 を使用し、ヒトグロブリン添加の有無による蛍光強度分布の変化を検討した。

HL-60 細胞での結果を表 4 に示す。My 7 と My 9 はグロブリンの有無にかかわらず強陽性を示しており、グロブリン添加によっても蛍光強度の平均および標準偏差の数値に変化は認められなかった。その他の形質では、唯一 IgG 2a サブクラスの I2 のみがグロブリン非添加では軽度の反応性を示すが、グロブリン添加により反応性は消失した。IgG 1 サブクラスの T 11, IgG 2b サブクラスの ILR 2 および OKM 1 は最初から反応しなかった。

THP-1-0 細胞での実験結果は表 5 に示すとおりで、グロブリン非添加ではすべての抗体が反応していた。このなかで My 7 と My 9 はグロブリンの有無に関係なく

図 1

図 2

図 3

図 1 HL-60 細胞でのコントロール抗体の反応パターン

上段より非染色細胞, マウス血清 IgG, モノクローナル IgG 1, IgG 2 a, IgG 2 b, IgG 3, IgM の順. 実線がグロブリン非添加, 破線がグロブリン添加での蛍光強度分布パターン. パターンの縦軸は細胞数の相対目盛, 横軸はログスケールでの蛍光強度を表現するチャンネル数に対応 (最大表示目盛 256). 以下の図も同様の表現

図 2 THP-1-0 細胞でのコントロール抗体の反応パターン

図 3 THP-1-0 変異株でのコントロール抗体の反応パターン

表 5 THP-1-0 細胞での各種表面形質検出用モノクローナル抗体の反応性

antibodies	globulin(-)	globulin(+)
cell	53.4 ± 7.9	
My7(IgG1)	178.6** ± 14.5	180.3** ± 15.4
T11(IgG1)	76.5* ± 9.5	55.5 ± 7.8
I2(IgG2a)	125.7** ± 20.4	113.1** ± 40.2
My9(IgG2b)	143.9** ± 9.4	136.8** ± 9.4
ILR2(IgG2b)	75.0* ± 9.6	54.5 ± 7.8
OKM1(IgG2b)	70.8* ± 9.7	56.7 ± 9.4

強陽性を示し, HL-60 同様に平均および標準偏差にも著変は認められなかった. I2 ではグロブリン添加により平均の数値の減少 (125.7→113.1) と標準偏差の数値の増大 (20.4→40.2) が認められた. その他の T 11, ILR 2, OKM 1 では軽度の反応性がグロブリン添加により消失した. なおこの OKM 1 には少数弱陽性群が存在しており, その結果グロブリン添加での標準偏差の数値がやや高めている.

4. 同一サブクラスの抗体の反応性

細胞株 THP-1-0 を用いて, 非特異反応が強く認めら

表 6 THP-1-0 細胞でのマウス IgG 2a サブクラスモノクローナル抗体の反応性

antibodies	globulin(-)	globulin(+)
cell	41.3 ± 8.6	
FITC-GAM	47.8 ± 8.1	45.7 ± 8.1
MsIgG2a	138.7** ± 12.0	45.7 ± 8.1
I2(IgG2a)	132.7** ± 16.4	108.7** ± 34.3
B1(IgG2a)	133.6** ± 12.4	49.0 ± 8.1
J5(IgG2a)	138.0** ± 12.2	48.1 ± 8.0

図 4 THP-1-0 細胞でのマウス IgG 2a サブクラスモノクローナル抗体の反応パターン

上段より非染色細胞, 二次抗体のみ, モノクローナル IgG 2a コントロール抗体, 抗 I2 抗体, 抗 B1 抗体, 抗 J5 抗体の蛍光強度分布パターン。

れる IgG 2a サブクラスの抗体の反応性を, グロブリンの有無にて検討した。ここでは, 非染色細胞のほかに過去にネガティブコントロールとして利用された二次抗体のみの染色 (FITC-GAM と表示した) も加え, またモノクローナルコントロール IgG 2a, IgG 2a サブクラスの表面形質検出用抗体としては, I2, B1, J5 を使用した。このなかで, THP-1-0 に関して I2 は陽性, B1 と J5 は陰性の形質である。

蛍光強度に関する統計データを表 6 に, パターンの変化を図 4 に示す。グロブリン添加前では, コントロール抗体 IgG 2a, 形質検出用抗体 I2, B1, J5 のすべてが高度の反応性を示し, さらに I2 を除いて平均・標準偏差とともにほぼ同一の数値となっていた。図 4 のパターンでも 3 者にとくに相違点はない。グロブリンを添加すると IgG 2a, B1, J5 は反応性が認められなくなったが, I2 は陰性から陽性にかけて幅広く分布するようになり, その結果平均の減少と標準偏差の増大が生じていた。また二次抗体のみの染色では, 最初から反応性が認められず, グロブリン添加によってもとくに変化は認められなかった。

III. 考 案

今回の実験で認められた非特異結合は, サブクラス特異性があることおよびヒトグロブリンの添加により消失することにより, Fc レセプターに由来している可能性が高い。実際に観察される反応性は単なる「非特異」ではなく, 明らかにサブクラス特異性が認められており, その意味でサブクラス一致のネガティブコントロールの意義がある。ネガティブコントロールとしては, 実用的な面からは検出能力という点でマウス血清 IgG で十分であるが, 陽性率算定が前提であれば, サブクラス一致が要求されよう。また以前よりネガティブコントロールとして使用されていた二次抗体のみの染色は, 今回のように F(ab')₂ 分画でさらにヤギ血清成分を分別再添加して非特異結合を防止したものを使用する限り, 表 6・図 4 より明かなように, 非特異結合があっても反応性が認められず意味がない。

主として Fc レセプターに由来すると考えられる非特異結合の対策としては, 従来より使用する抗体を超遠心後反応させる方法がとられているが, 凝集物によらない Fc レセプターへの結合もあると考えられ, ここではヒト γ -グロブリンによる防止法を検討した。この方法はいわゆるコントロール抗体に認められる反応性を減弱させて, THP-1-0 変異株細胞でのマウス血清 IgG を除いて, ほぼ完全に消失させている。このことは, 現在の染色法 (抗体 染色条件も含めて) で認められる非特異結合の大部分が, Fc レセプターを介したものであったことを示している。ヒトグロブリンの使用濃度は, 全血法で非特異結合が少ないという経験から, 正常人の血清中濃度前後で検討したが, 1/20, 1/10, 1/5 の添加量ではほとんど 1/20 で十分であった (未発表データ)。またヒト免疫グロブリンのサブクラスとマウス免疫グロブリンのサブクラスにおけるヒト細胞上の Fc レセプター結合

についての関係は不明であるが、今回使用したヒトグロブリンの組成は、IgG 1 63.42%, IgG 2 20.25%, IgG 3 6.45%, IgG 4 0.70%, IgA 0.34%, IgM 0.34% (ミドリ十字社内資料より算出) であった。

ヒトグロブリン添加による非特異結合の抑制に関しては、コントロール抗体と本来陰性である表面形質に対する抗体の反応性は同一の挙動を示すはずであるが、今回の検討においても不一致が認められた。THP-1-0 細胞での IgG 1 コントロール抗体と IgG 1 に属す抗 T 11 抗体では、コントロールでは最初から反応性がないが抗 T 11 抗体はヒトグロブリン非添加での軽度の反応性が添加により消失している。このことは、2 者の Fc レセプターに対する反応性が異なることを示していると考えられるが、抗 T 11 抗体中に IgG 1 サブクラス以外のマウス免疫グロブリンの微量な混入があった可能性も否定できない。その原因としては、自発的な isotype switch が想定されよう¹²⁾。

このヒトグロブリン添加による非特異反応の防止法の問題点は、まず表面免疫グロブリンの検出に際しては当然のことながらまったく応用できないこと、またこの方法により本来陽性のものまで陰性にするかもしれないという点である。今回の表面マーカーでは、My 7 および My 9 とともに影響が認められなかったが、図 4 の I 2 のパターンの変化はヒトグロブリン添加により本来の分布パターンが得られたと考えるものの、ヒトグロブリン製品中にヒト HLA-DR 抗原に対する抗体が含まれていた結果ということ否定はできない。また明らかな蛍光強度の減弱が、Fcγ レセプターを認識する抗 Leu 11 a 抗体でヒトグロブリンを添加した場合にみられる (未発表データ) ので、これは全血法においても同様であるが十分注意を払う必要があろう。

今回の検討は、表面マーカーの分布および Fc レセプター発現について画一的に評価するために培養細胞株を使用した。非特異反応の検出法および Fc レセプターに由来する非特異結合の抑制については一般的なものと考える。実際の非特異反応が必ずしも弱いとは限らないこと、ネガティブコントロールの設定には十分注意する必要があること、またヒトグロブリン添加は簡単かつ有効な手段ではあるが、ときに蛍光強度の減弱をもたらすことがある点などが検討に価しよう。

また実際の応用においては、まずネガティブコントロールを設定して非特異結合の有無をチェックし、ヒトグロブリンによる防止を行ったのち再度ネガティブコントロールによる非特異結合の消失の確認が必要である。我々は、最初から非特異結合が十分考えられ、ヒトグロブ

リンによる蛍光減弱のないマーカーの場合には、最初からヒトグロブリンを添加してネガティブコントロールを設定しいる。

IV. 結 語

モノクローナル抗体を用いた細胞表面抗原検出法における非特異結合の大半が Fc レセプターに由来する可能性が大であること、およびその有無の検出がコントロール抗体によって実施できること、ならびにヒトガンマグロブリンがその非特異結合の抑制に有効であることを報告した。少なくとも FcM を用いた表面形質分析においては、これらコントロール抗体によるネガティブコントロールの設定が必要であり、それが行われない際には場合によっては測定データの信頼性がきわめて低くなっている危険性も出てくるという点は重要である。もしコントロール抗体によって、非特異結合が認められた場合には、その対策の一つとしてヒトグロブリン添加も一度は考慮されてもよいものと思う。

最後に、細胞株 HL-60 と THP-1-0 を提供下さった国立ガンセンター内科 湊 啓輔先生に深謝致します。またこの研究は文部省科学研究費、59440046 によった。

文 献

- 1) 高瀬浩造: Flow cytometry で用いた蛍光標識モノクローナル抗体染色陽性細胞率の算定方法. 最新医学, 40: 45~48, 1985.
- 2) Bernard, A., Boumsell, L., Hill, C.: Joint report of the First International Workshop on Human Leucocyte Differentiation Antigens by the investigators of the participating laboratories M 2 protocol, Leucocyte Typing. Edited by Bernard, A. et al., Springer-Verlag, Berlin, 1984, pp 82~108.
- 3) Griffin, L.D., Ritz, J., Nadler, L.M. et al.: Expression of myeloid differentiation antigens on normal and malignant myeloid cells. J. Clin. Invest., 68: 932~941, 1981.
- 4) Reinherz, E.L., Schlossman, S.F.: Strategies for regulating the human immune response by selective T cell subset manipulation, The potential role of T cell populations in cancer therapy. Edited by Feifer, A., Raven Press, New York, 1982, pp. 253~268.
- 5) Reinherz, E.L., Kung, P.C., Pesando, J.M. et

- al. : Ia determinants on human T cell subsets defined by monoclonal antibody, *J. Exp. Med.*, 150 : 1472~1482, 1979.
- 6) Stashenko, P., Nadler, L.M., Hardy, R. et al. : Characterization of a human B lymphocyte specific antigen. *J. Immunol.*, 125 : 1678~1685, 1980.
- 7) Ritz, J., Pesando, J.M., Notis-McConarty, J. et al. : A monoclonal antibody to human acute lymphoblastic leukemia antigen. *Nature*, 283 : 583~585, 1980.
- 8) Nadler, L.M., Stashenko, P., Hardy R. et al. : Monoclonal antibodies defining distinct HLA-D/DR related Ia-like antigens in man. *Human Immunol.*, 1 : 77~83, 1981.
- 9) Breard, J., Reinherz, E.L., Kung, P.C. et al. : A monoclonal antibody reactive with human Peripheralblood monocytes. *J. Immunol.*, 124 : 1943~1948, 1980.
- 10) Griffin, J.D., Schlossman, S.F. : Expression of myeloid differentiation antigens in acute myeloblastic leukemia, *Leucocyte Typing*. Edited by Bernard, A. et al., Springer-Verlag, Berlin, 1984, pp. 404~410.
- 11) Nelder, J.A., Mead, R. : A simplex method for function minimization. *Computer J.*, 7 : 308~313, 1965.
- 12) Dangl, J.L., Parks, D.R., Oi, V.T. et al. : Rapid isolation of cloned isotype switch variants using fluorescence activated cell sorting. *Cytometry*, 2 : 395~401, 1982.
-