

① 主論文

6.3.25 甲/2/2

尿路移行上皮癌における血液型抗原の Flow-Cytometry による  
定量的解析に関する研究

岡山大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 大森弘之教授)  
高 松 正 武

QUANTITATIVE ANALYSIS OF BLOOD GROUP ANTIGEN OF TRANSITIONAL CELL  
CARCINOMA OF THE URINARY TRACT BY FLOW CYTOMETRY

Masatake Takamatsu  
Department of Urology, Okayama University Medical School  
(Director: Prof. H. Ohmori)

## 尿路移行上皮癌における血液型抗原の Flow-Cytometry による 定量的解析に関する研究

岡山大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 大森弘之教授)

高 松 正 武

### QUANTITATIVE ANALYSIS OF BLOOD GROUP ANTIGEN OF TRANSITIONAL CELL CARCINOMA OF THE URINARY TRACT BY FLOW CYTOMETRY

Masatake Takamatsu

Department of Urology, Okayama University Medical School

(Director: Prof. H. Ohmori)

We propose a new method of quantitative measurement of cell surface blood group antigen (BGA) in superficial transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary tract by using flow cytometry. Flow cytometric analysis was performed on 22 cases of superficial urinary tract TCC registered at the department of Urology, Okayama University Hospital during April, 1992-Feb. 1993. Fresh samples were divided into two specimens. One specimen was fixed in 20% formalin and was subjected to immunohistochemical staining of BGA using avidine-biotine complex (ABC) method. The other specimen was dissociated into single cell with mincing. The single cell suspension was further divided into two specimens. One specimen was incubated on ice with anti-ABH mouse monoclonal antibody (DAKO) as a primary antibody. The other specimen was incubated on ice with mouse IgM as a negative control. These two specimens were reacted with FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgM and propidium iodide (PI). Next, these cells were subjected to the flow cytometry using FACStar (Becton & Dickinson). By gating on the bivariate display of FSC vs. FL2 (PI), all nucleated cells were obtained separately and the positive rate was measured. The positive rate of FCM was successfully correlated with the degree of immunohistochemical stain. Compared with immunohistochemical staining thus far, this new technique provides a way to standardize the quantitative measurement of BGA expressions.

**Key words:** flow-cytometry, bladder cancer, ABH-isoantigen

**要旨:** 膀胱腫瘍における細胞表面糖鎖抗原, 特に血液型抗原 (BGA) 検索の臨床的有用性については免疫組織学的手法を用いて, 種々の検討が行われている。今回, Flow-Cytometry (FCM) を用い, 膀胱腫瘍細胞における細胞表面糖鎖抗原, 特に血液型抗原 (BGA) 定量化のための手法の開発を試みたので報告する。1992年4月より1993年2月までの間に岡山大学泌尿器科およびその関連病院にて治療を受けた尿路移行上皮癌の22症例を対象とした。手術により摘出した新鮮生標本を2分割し, 一方はホルマリン固定後, ABC法による免疫組織染色を行い, 他方はFCMによる解析に用いた。FCMによる解析法は, 検体をsingle cell suspensionとし, 第1抗体として抗BGAマウスモノクローナル抗体 (DAKO) を加え, 次にFITC標識抗マウス抗体 (DAKO) と propidium iodide (PI) の混合溶液を加え, 30分間水中で反応させた。この検体をFACStar (Becton Dickinson) により解析した。FSCとFL2 (PI) のdotplot上で有核細胞集団に対しgatingし陽性率を算出した。同一症例における固形組織と浮遊細胞につき, 従来の免疫組織染色とFCMによるpositive rateとを比較検討したところ, 免疫組織染色とFCMによる陽性率は, 高い相関関係が認められた。検者の主観により染色程度を判断する従来の免疫組織染色と比較して, FCMを用いた場合, より客観的かつ定量的であり, 今後の細胞表面抗原の解析には, 大きな役割を果たすものと考えられた。

### 緒言

膀胱腫瘍における malignant potential としての血液型抗原 (ABH-isoantigen, Blood group isoantigen, 以下 BGA) は, 1975年の Decenzo らの報告以来, 広く検討されている<sup>1)~4)</sup>. 1981年に Coon らは14論文で報告された951症例を集計し, BGA が陽性である表在性膀胱腫瘍のうち, 進行膀胱腫瘍へと移行したものはわずか7%であったのに対し, BGA が陰性であるものでは, 平均62%の症例で progression をきたしたと報告している. この様に, BGA が malignant potential として最も重要な指標の一つであることは明らかであるにもかかわらず, 今日 BGA は補助診断としての位置を占めるに過ぎない. その最も大きな理由として, 客観的な判定が困難であることが, 従来より指摘されている. 当科では, 以前より BGA について積極的な研究を行ってきたが<sup>5)~8)</sup>, やはり客観的な判定について困難を感じていた. 現在, 膀胱腫瘍における BGA 発現の判定法としては, 免疫染色法が広く施行されている. しかし, この方法では陽性率の判定が検者の主観に依存しており, 施設間の判定結果に差が生じる可能性がある点が指摘されている. 当科の那須<sup>9)</sup>は, 染色パターンに基づく判定基準の作成を試みた. これは, 全体の陽性率を50%で区切り, さらに染色 pattern を加味して全体を5型に分類するものである. しかし, 判定は基本的には検者の主観に依存しており, より普遍的で定量的な方法の確立が必要と考えられた.

今回, フローサイトメトリー (Flow Cytometry, 以下 FCM) に注目し, 膀胱腫瘍における血液型抗原の定量的解析を行い, 良好な結果を得たので報告する.

### 対象

1992年4月より1993年3月までの間に, 岡山大学泌尿器科およびその関連病院において尿路上皮癌と診断, 治療された表在性の膀胱癌19例, 表在性の腎盂・尿管癌3例, 合計22症例を対象とした. 年齢は, 43~78歳, 平均62.8歳. 性別は男性15例, 女性7例であった. 組織型は全例とも移行上皮癌であり, Grade は, G1: 6例, G2: 12例, G3: 4例, Stage は, Ta: 12例, T1: 10例であった. また, 血液型は A 型: 4例, B 型: 8例, AB 型: 3例, O 型: 7例であった.

### 方法

手術で摘出した新鮮生標本を, 原則として同一の腫瘍で2分割し, 一方はホルマリン固定後, パラフィン

包埋し, 郭の報告<sup>9)</sup>に準じ, ABC 法による免疫組織染色を行い, 他方は FCM による解析を行った.

#### I. 免疫組織染色 (ABC 法)

一次抗体として, DAKO 社製 mouse anti-A, B, H monoclonal antibody (IgM) を, 4°C, 2時間反応させ, 二次抗体として, rabbit anti-mouse immunoglobulin を室温にて20分間反応させた. 希釈倍数は, A が100倍, B が20倍, H が5倍であった. 陽性率の算定は, 肉眼的に5~10%毎の段階に区切り評価した.

#### II. FCM による定量法

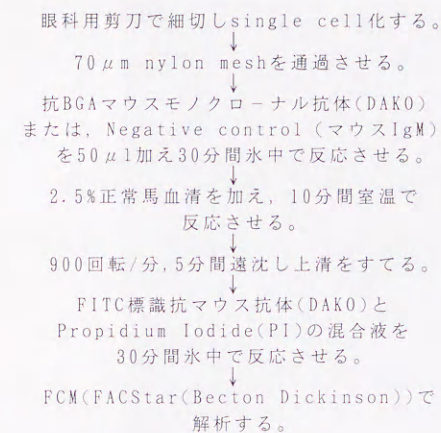
##### 1. 検体処理

まず, 検体を眼科用剪刀で mincing し, 70 $\mu$ m の nylon mesh を通過させ, single cell suspension とする. ついで, 検体を2等分し, 一方には一次抗体として, DAKO 社製 mouse anti-A, B, H monoclonal antibody (IgM) を加え, 他方には, negative control として Zymed 社製 mouse IgM を加え, 水中で30分間反応させる. 希釈倍数は A 型: 5倍, B 型: 1倍, H 型: 1倍とした. AB 型の検体については, 免疫染色と同様に, A 型で染色し陽性率を求めた. 次に normal horse serum を加え800 $\cdot$ r.p.m. 10分間遠沈し, 上清を捨てる. 二次抗体としての DAKO 社製 FITC 標識抗マウス抗体と10 $\mu$ g/ml に調整した Propidium Iodide (PI) との混合溶液100 $\mu$ l を加え, 水中で30分間反応させ, FCM による解析を行った (Fig. 1). なお検体処理は, 原則として検体採取当日に行った. 固定法については, BGA が細胞表面抗原であることを考慮し未固定の状態で行った.

##### 2. 解析

解析は, Becton & Dickinson 社製の FACStar を用いた. まず, negative control を FCM で処理し, 細胞の大きさを示す FSC を X 軸に, PI 染色を示す FL2 を Y 軸に規定し dotplot を描出する. この dotplot 上で, 有核細胞以外の粒子を除く目的で, 図の様に gating を施行した (Fig. 2A). 次いで, FITC の蛍光量を示す FL1 について histogram を描出し, 上位1%の細胞を含む channel 数を cut off 値と規定した (Fig. 2B). 続いて BGA で染色した検体を同様な条件で測定し, この cut off 値以上の細胞を陽性として全体に占める陽性率として算定した. 例示した症例の陽性率は, 10.9% であった (Fig. 2C).

Fig. 1 FCM による陽性率算定 (蛍光抗体法)



### 結果

まず, 免疫染色と FCM の結果について代表的な染色 pattern の症例を順に示す. BGA の発現がほとんど認められなかった症例 (Fig. 3A, B) では, FCM では陽性率は2.0%, 免疫染色では血管内皮細胞以外全く染色が認められず, 肉眼的陽性率を0%とした. 一部に発現が認められた症例 (Fig. 4A, B) において, FCM

では陽性率は7.6%, 免疫染色では基底膜に沿って一部に染色された細胞が認められ, 肉眼的陽性率を10%と判断した. 強い発現の認められた症例 (Fig. 5A, B) では, FCM で陽性率は21.9%, 免疫染色では50%であった. 22例を集計した結果を表に示す (Table 1). さらに横軸に免疫組織染色, 縦軸に FCM の陽性率を示した相関図では, 両者の間には明らかな相関関係が認められた (Table 2). また, 陽性率の高い症例に関しては, FCM による陽性率がやや低く算定される傾向にあった.

Fig. 6 は FCM で解析する直前の検体 (症例8) の陽性細胞を, Confocal Laser Scanning Microscopy (オリンパス社製, LSM-GB200) で観察したものである. 細胞表面抗原は FITC により標識されており, 核は PI によりオレンジ色に染色されている. 細胞質領域に斑点状に PI で染色させた小胞体 (RNA) と考えられる顆粒が認められる. これは, 本法が RNase を使用していないためと考えられた.

### 考察

FCM を抗原等の定量に用いることで有利な点は, 1) 蛍光強度を機械的に測定するため判定結果が客観的であること, 2) 細胞を短時間のうちに数万個単位で

Fig. 2 FCM による陽性率算定方法. A: 有核細胞に対し gating を施行する. B: negative control における陽性率1%を cut off 値を定める. X-軸: 蛍光強度, Y-軸: 細胞数. C: 検体の陽性率.

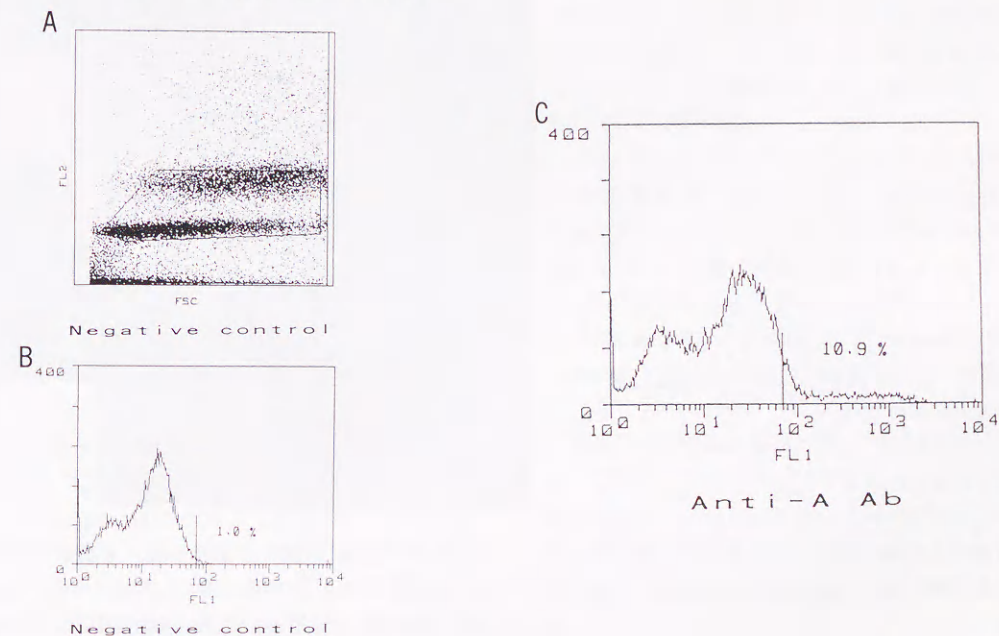


Fig. 3 症例17. A: FCMによる陽性率算定. B: 免疫組織染色像

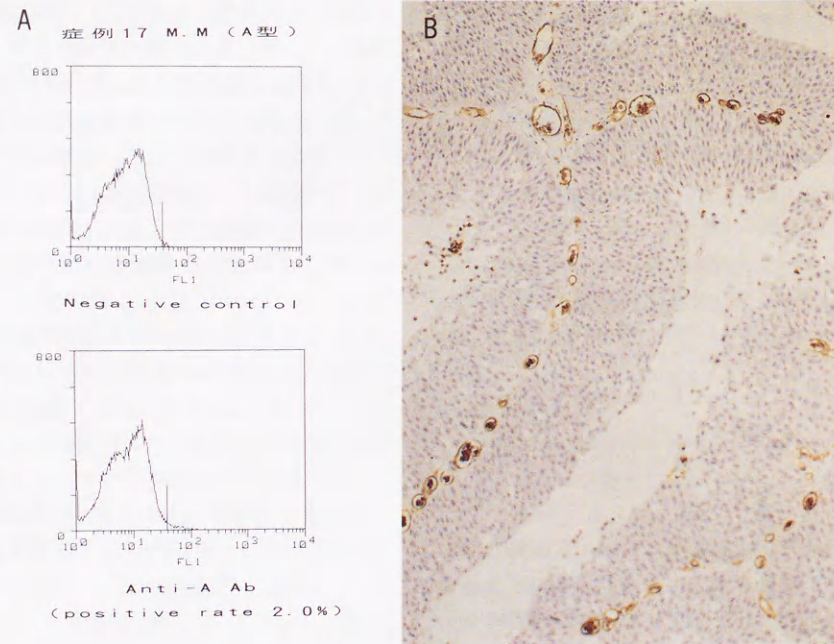
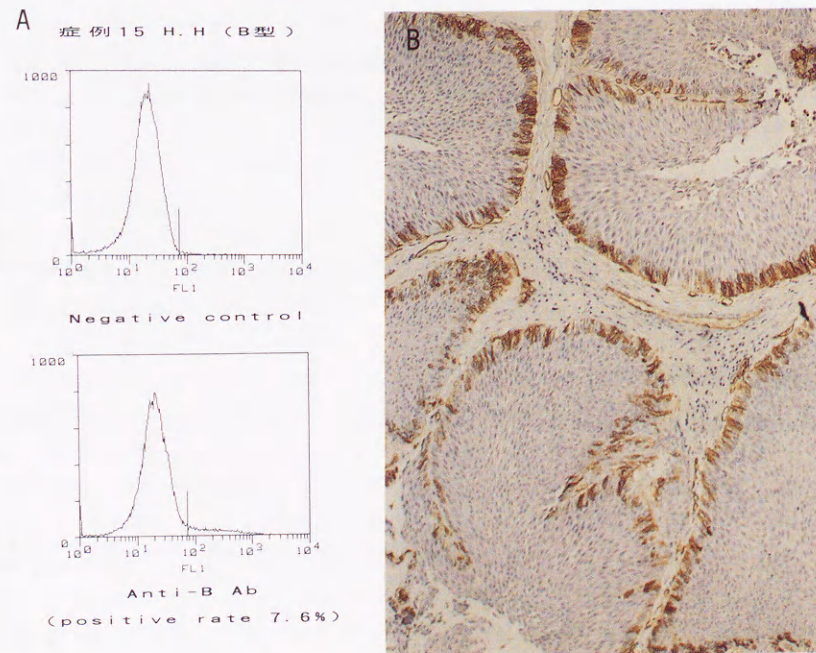


Fig. 4 症例15. A: FCMによる陽性率算定. B: 免疫組織染色像



測定するため、全体の傾向をより反映していることと  
考えられる。特に heterogeneity の評価について有利  
と思われる。

FCM を用いた抗原の定量は既に一般的であるが、  
多くの研究は以下のものに限定されている。すなわち、  
1) 培養細胞を対象とした in vitro の研究、2) 血液細

Fig. 5 症例18. A: FCMによる陽性率算定. B: 免疫組織染色像

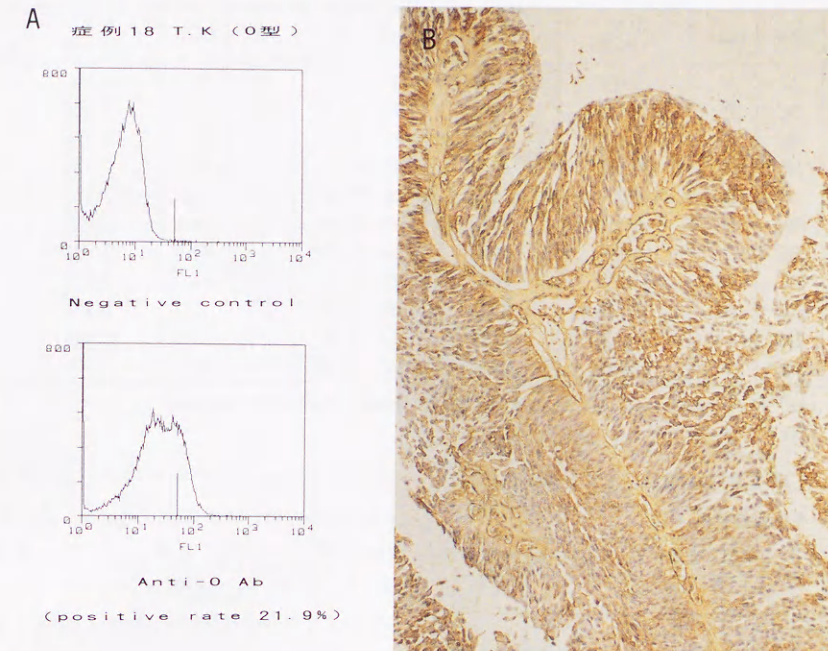
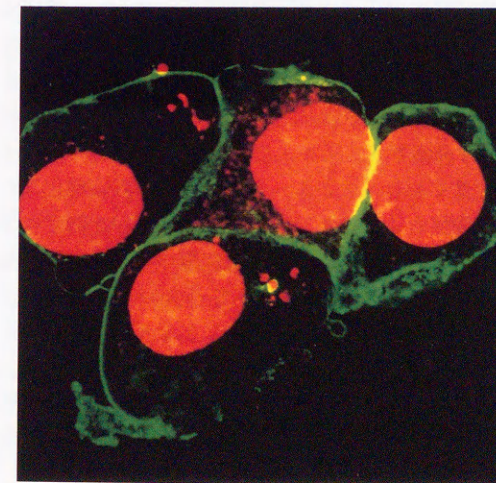


Fig. 6 Confocal Laser Microscopy を用いた陽性細胞の観察



胞における細胞表面抗原を対象としたもの (CD 分類  
etc.)<sup>10)</sup>、3) 固形腫瘍における核内抗原を対象とした  
もの (Ki-67, BrdU etc.)<sup>11)</sup> などである。しかしながら、  
膀胱腫瘍に代表されるような固形腫瘍を対象とした報  
告は極めて少数である<sup>12)</sup>。その理由としては、1) FCM  
では、細胞は単離状態 (single cell suspension) であ

る必要があること、2) 臨床検体、特に固形腫瘍では、  
必ずしも検体中に腫瘍細胞のみが含まれているとは限  
らないことが考えられる。多くの固形腫瘍は、これら  
の点で不利である。単離化に関しては裸核化という操  
作が一般的であり、そのため核内抗原に関する研究が  
主なものとならざるを得ない。また、腫瘍細胞以外の  
細胞の混入に関しても、赤血球の混入などは、BGA の  
判定結果に大きな影響を及ぼすと考えられ、この点慎  
重にならざるを得ない。

従来、BGA の消失を評価する方法として、特異的赤  
血球吸着試験 (SRCA 法)<sup>13)14)</sup> immunoperoxidase  
staining<sup>2)15)</sup>、immuno-fluorescence<sup>16)</sup> が行われてきた。  
SRCA 法は、定量化が最も容易であり、事実、定量化  
を試みた報告も存在するが、赤血球の吸着力が弱いた  
め false negative を生じ易く immunoperoxidase  
staining、immuno-fluorescence と比較して感度、特異  
性、再現性の点で劣っている。Immunoperoxidase  
staining における定量化の試みについては、当科の那  
須の分類<sup>6)7)</sup> が挙げられる。すなわち、全体の陽性率を  
50% で区分し、さらに染色 pattern を加味して全体を  
5 型に分類するものである。しかし、この方法も、判  
定を検者の眼に頼っている点に判定の困難さが存在す  
る。

Table 1 FCM と免疫組織染色との比較

症 例	診断	BGA	P.R. -FCM	P.R. -I.H.	症 例	診断	BGA	P.R. -FCM	P.R. -I.H.
1 H, S	BC	A	3.0%	0%	12 I, U	BC	B	14.0%	10%
2 K, O	BC	B	1.0%	0%	13 K, K	BC	B	3.6%	5%
3 M, T	BC	B	11.6%	10%	14 S, O	UC	O	6.0%	10%
4 S, S	BC	O	26.2%	40%	15 H, H	UC	B	7.6%	10%
5 T, F	BC	B	6.3%	5%	16 Y, A	BC	AB	7.5%	5%
6 S, T	BC	B	6.4%	10%	17 M, M	BC	A	2.0%	0%
7 T, K	BC	O	10.5%	10%	18 T, K	BC	O	21.9%	50%
8 A, T	BC	A	81.5%	80%	19 F, F	BC	O	0.2%	0%
9 T, M	BC	AB	30.5%	40%	20 I, S	BC	A	2.8%	5%
10 S, I	BC	AB	10.7%	10%	21 T, E	UC	B	6.9%	5%
11 T, K	BC	O	1.0%	0%	22 H, M	BC	O	3.0%	0%

BC: bladder ca. P.R.: positive rate. UC: ureteral ca. I.H.: immunohistochemical stain

Table 2 FCM と免疫組織染色との比較

FCM (%)	免疫組織染色 (%)							
	0	5	~10	~20	~40	~60	~80	~100
0								
~5	6	2						
~10		3	3					
~20			4					
~40					2	1		
~60								
~80								
~100							1	

最近の新しい機器を導入した BGA の定量化の報告はいくつか散見される。Eric ら<sup>17)</sup>は、膀胱腫瘍組織を洗浄し、浮遊細胞をスライドガラスに塗抹し、蛍光抗体法で染色した標本について Microfluorometer を用いて各細胞の蛍光量を測定し、蛍光強度の histogram (48細胞) を作製し定量化した。その結果、肉眼的な陽性、陰性の判別と平均蛍光強度の値とはよく相関したと報告している。しかしながら、測定細胞数が少ないため腫瘍全体の傾向を反映していないのではないかと懸念がある。この他顕微鏡法、laser microscopy、画像解析装置でも同様の懸念が存在する。

Coon ら<sup>4)18)</sup>は、FCM を用いて膀胱癌培養細胞を対象に BGA を FITC で標識し、PI との 2 重染色を行っている。この研究の主眼は、細胞周期における染色性の差を見出すことにあるため、定量化という点からは若干視点がずれることになる。細胞周期における染色性の差に関して、Coon らは、G<sub>2</sub>/M 期は G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期と比

較してより強い染色性を示すと述べている。BGA single histogram は、これら G<sub>2</sub>/M 期、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期の overlap したものであると考えられる。我々は、gating の際、G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期、G<sub>2</sub>/M 期をそれぞれ分割して陽性率を求めるべきか否かを検討したが、検体により G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期、G<sub>2</sub>/M 期の比率はまちまちであるため、両者を同時に含んだ gating を行うこととした。Coon らは、細胞周期における染色性の差は細胞周期により cell size が異なるためではないかと述べており、細胞周期の相違は、染色性において主要な決定因子ではないと述べている。

Oda ら<sup>12)</sup>は、糖鎖抗原である Thomsen-Friedenreich antigen (T-Ag) と neuraminidase 処理後の cryptic T-Ag (cT-Ag) との比率につき FCM を用い定量化を行っている。まず検体を単離細胞化した後に、検体を 4 分割し sample 1, 2 は T-Ag 測定に用い sample 3, 4 は cT-Ag の測定に用いている。sample 1 には negative control として mouse monoclonal anti-rat IgG1 を反応させ、同時に sample 2 は、FITC 標識抗 T-Ag mAb で標識し FCM による測定に供している。sample 3, 4 については、neuraminidase で処理した後に、sample 1, 2 と同様の処理を施行し、陽性率を算出している。臨床検体を用いているが単染色であるため、測定の対象が目的とする細胞のみであるか否か疑問のある所である。

今回の実験を行うにあたり、既に報告された手技をそのまま導入することは困難であると判断し、下記の問題の解決を試みた。

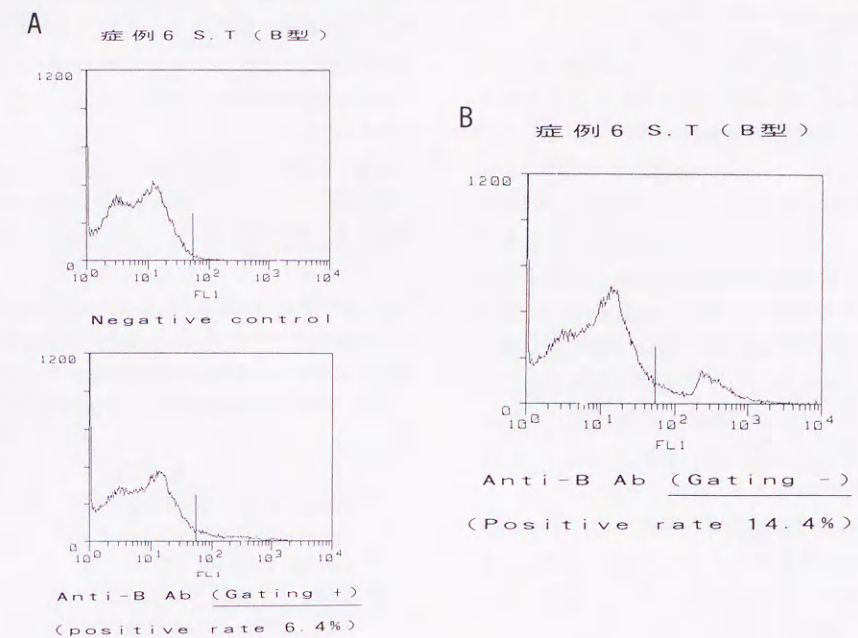
#### 1. 不必要な細胞の除去

既に指摘したように、臨床検体の場合には様々な細

胞が混合しているため、FCM で陽性率を算出する場合に腫瘍細胞以外の細胞をも測定し、陽性率が不確定的に変化してしまう可能性がある。そこで我々は不必要な細胞をいかに除去するかが問題であると考えた。陽性率を上昇させる大きな要因は赤血球であり逆に陽性率を下げる要因は白血球系細胞などである。その他、様々な debris は、極めて良く染色される検体から全く染色されない検体まで、その存在は一定していない。

不必要な細胞の除去として、我々は、まず膀胱癌細胞のみを特異的に認識する物質 (抗体) の存在を考えた。しかし、現在あらゆる膀胱癌細胞を例外なく認識する抗体は存在しない状況にあり、この方法は適当でないと判断した。そこで、核の DNA を主として染色する propidium iodide (PI) との 2 重染色を試みることによって、有核細胞を選択的に検出し、陽性率を算出することを考えた。この方法では、BGA 抗原を多量に保持する赤血球は完全に除去することが可能である。次に、リンパ球等の腫瘍内への混入の可能性といった問題点については、single cell suspension の状態で、細胞を位相差顕微鏡で観察したところ、肉眼的にはリンパ球の混入は全く認められなかった。さらに、ヒト白血球共通抗原である FITC-conjugated CD45RB・マウスモノクローナル抗体 (DAKO) にて染色し、位相

Fig. 7 症例 6, gating を施行した場合としない場合の陽性率の比較. A: gating を施行した場合. B: gating を施行しなかった場合.



差顕微鏡で観察したが、陽性細胞は全く認められなかった。したがって、白血球系の細胞の混入は表在性膀胱癌の場合にはあまり考慮しなくてもよいと考えられた。また、その他の細胞の混入も位相差顕微鏡による観察では、特に問題となる程度では無かった。症例 6 で gating を施行した場合と施行しなかった場合との相違を示す (Fig. 7A, B)。Histogram の形態には大きな変化が認められ、陽性率の点では gating を施行した場合は 6.4% であったのに対し、施行しなかった場合は 14.4% と両者に大きな差が認められた。引き続き sorting を施行し、図中の除去された peak は、主に赤血球であることを確認している。

#### 2. 検体処理—single cell suspension の作製—

化学的分散法においては、trypsin, EDTA, collagenase, dispase などが考えられるが、細胞表面の糖鎖抗原を障害する可能性も考えられる。そこで、今回は機械的分散法のみにより single cell 化を図ることとした。機械的分散法では、超音波破碎装置なども試みたが、眼科用剪刀で細切した後に nylon mesh を通過させる方法が最も simple で良好な single cell 化が得られた。Nylon mesh の size としては、70 $\mu$ m を用いた<sup>19)~22)</sup>。

最後に位相差顕微鏡にて、nylon mesh を通過させた

後の状態を観察したが、すべて良好な単離状態であった。

### 3. 陽性率の算定方法

FCMにおける陽性率の算出方法は、議論の別れるところであり、いずれの方法を用いるかによりかなり陽性率は異なる。著者の知るところでは、主として2種類の方法が存在し、1つは、negative controlを検体から subtraction する方法、他は negative controlの最高値を cut off 値としそれ以上を陽性とするものである。今回は血液細胞の細胞表面抗原を定量する際にしばしば用いられる方法に準じ、negative controlの上位1%以上に存在する細胞の割合で陽性率を算出した。いずれの方法を採用しても免疫組織染色との相関関係は変化なかった。FCMによる陽性率が若干低めに算定された理由は、陽性率の算出方法に一つの原因があるのではないかと考える<sup>23)</sup>。

最後に、本法の利点と問題点を総括する。まず利点であるが、本法は、細胞表面抗原を客観的に定量化することが可能であり、免疫染色では陽性・陰性と明らかに区分できない中間の細胞などでも、明確な区分が可能である。また、細胞を数万個単位で解析することが可能であり、腫瘍全体の傾向をよりよく反映していると考えられ、腫瘍の heterogeneity の問題も解決出来る可能性があると考えられた。

問題点としては、免疫染色よりも陽性率が若干低めに算定される傾向が認められたことである。これが、陽性率の算定方法によるのか、染色方法に問題があるのか、他の細胞の混入によるのか、あるいはこの値がむしろ真実なのか、今後の検討が必要と思われる。また、一定量以上の sample volume が必要であり(約30  $\mu$ l以上)、さらに、生標本が望ましいため retrospective な検討が困難であるといった問題点があげられる。

なお、血液型抗原に関する研究では、分泌型、非分泌型の問題がしばしば議論の対象となる。今回の研究は、定量化という点に主眼をおいているのでこの点に関してはあまり問題とならないと考えている。しかしながら、臨床応用という点では将来的に clear しなくてはならない問題と考える。

### 結 語

Flow-Cytometry (FCM) を用い、膀胱腫瘍細胞における血液型抗原 (BGA) 定量化の手法の開発を試みた。摘出標本を2分割し、一方はホルマリン固定後、ABC法による免疫組織染色を行い、他方はFCMを用

いて陽性率を算出し比較検討した。免疫組織染色とFCMによる陽性率は、良好な相関関係が認められた。本法は検者の主観により染色程度を判断する従来の免疫組織染色と比較してより客観的、かつ定量的であり、今後の細胞表面抗原の解析には、大きな役割を果たすものと考えられた。

本論文の要旨は第81回日本泌尿器科学会にて発表した。稿を終えるにあたり、御指導、御校閲頂いた恩師大森弘之教授、また直接御指導いただいた那須保友講師に深謝いたします。また本研究に御協力頂いた津島知靖講師、大野勝雄技官、梅井幸江、原淵尚子技術員、ならびに泌尿器科教室員各位に深謝いたします。また、貴重な検体を提供頂いた関連病院の泌尿器科の各位に深謝いたします。

また、本研究の一部は、平成4年度文部省科学研究費の補助を受けた(奨励研究A:04771147)。

### 文 献

- 1) Lange, P.H. and Limas, C.: Molecular markers in the diagnosis and prognosis of bladder cancer. *Urology*, 23, 46-54, 1984.
- 2) Coon, J.S. and Weinstein, R.S.: Detection of ABH tissue isoantigens by immunoperoxidase methods in normal and neoplastic urothelium. Comparison with the erythrocyte adherence method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 76, 163-171, 1981.
- 3) Limas, C. and Lange, P.H.: Altered reactivity for A,B,H antigen in transitional cell carcinomas of the urinary bladder. A study of the mechanisms involved. *Cancer*, 46, 1366-1373, 1980.
- 4) Coon, J.S. and Weinstein, R.S.: Blood group-related antigens as markers of malignant potential and heterogeneity in human carcinomas. *Human Pathology*, 17, 1089-1106, 1986.
- 5) 公文裕巳, 朝日俊彦, 森岡政明, 松村陽右, 大森弘文: 膀胱腫瘍における malignant potential の指標としての ABH-isoantigen. *日泌尿会誌*, 71, 767-774, 1980.
- 6) 那須保友, 公文裕巳, 松村陽右, 大森弘之: 膀胱腫瘍における malignant potential の指標としての ABH-isoantigen その3. PAP法による検出と染色パターンの分類. *日泌尿会誌*, 75, 739-743, 1984.
- 7) 那須保友: 膀胱腫瘍における malignant potential の指標としての ABH-isoantigen PAP法による染色パターンに基づく判定基準の作成ならびに CEA, Fibronectin との関連性. *日泌尿会誌*, 77, 977-987, 1986.
- 8) 三枝道尚: 膀胱腫瘍における Malignant potential の指標としての ABH-isoantigen: CEA,

- BMG, Leu-M1, H 抗原の併用に関する検討. *泌尿紀要*, 35, 1311-1321, 1989.
- 9) 郭 春鋼: 表在性膀胱癌における Malignant potential としての ABH-isoantigen: PCNA, c-erbB-2 との関連について. *西日泌尿*, 投稿中.
  - 10) 高本 滋, 上田龍三, 太田和雄: 腫瘍細胞の膜表面抗原の解析-白血病. *フローサイトメトリー手技と実際*, 第2版, p. 226-250, 蟹書房, 東京, 1988.
  - 11) 島袋智之: Flow cytometry による Bromodeoxyuridine (BrdU)/DNA 同時解析の応用. 1. その基礎的・技術的検討. *泌尿紀要*, 34, 1339-1348, 1988.
  - 12) Oda, H., Oda, T. and Ohoka, H.: Flow cytometric evaluation of Thomsen-Friedenreich antigen on transitional cell cancer using monoclonal antibody. *Urol. Res.*, 18, 107-111, 1990.
  - 13) Davidsohn, I., Kovarik, S. and Lee, C.L.: A,B and O substances in gastrointestinal carcinoma. *Arch. Pathol.*, 81, 381-390, 1966.
  - 14) Srinivas, V. and Kiruluta, J.G.: ABO (H) isoantigens in bladder tumors: A new technique of quantitative analysis. *J. Urol.*, 131, 245-248, 1984.
  - 15) Sadoughi, N., Misna, J., Guinan, P. and Rubenstone, A.: Prognostic value of cell surface antigens using immunoperoxidase methods in bladder carcinoma. *Urology*, 20, 143-146, 1982.
  - 16) Cooper, H.A. and D'Elia, J.L.: Comparison

- between the methods of indirect immunofluorescence and specific red cell adherence in detecting ABH-isoantigens in bladder carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, 77, 548-554, 1982.
- 17) Borgstroem, E. and Wahren, B.: Quantitative analysis of the A,B and H isoantigens in single transitional carcinoma cells. *J. Urol.*, 134, 199-202, 1985.
  - 18) Coon, J.S., Watkins, J.R., Pauli, B.U. and Weinstein, R.S.: Flow cytometric analysis of heterogeneity in blood group-related antigen expression in a human urinary bladder carcinoma cell line. *Cancer Res.*, 45, 3014-3021, 1985.
  - 19) 保坂義雄: 試料作製法: 細胞浮遊液の作製と保存, 固形細胞, 固形材料. *フローサイトメトリー手技と実際*, 第2版, p. 45-50, 蟹書房, 東京, 1988.
  - 20) 高橋 学: サンプルの調製. *フローサイトメトリーハンドブック*, p. 103-119, サイエンスフォーラム, 東京, 1984.
  - 21) 野村和弘: 試料作製法: 固形細胞, 新鮮材料. *フローサイトメトリー手技と実際*, 第2版, p. 37-44, 蟹書房, 東京, 1988.
  - 22) 坂口耀子, 杉田道夫, 室谷哲弥, 他: Flow-cytometry のための組織細胞分散法の確立. *J. Jpn. Soc. Clin. Cytol.*, 22, 228-234, 1983.
  - 23) 高瀬浩造: データ解析法: 抗原検索における解析. *フローサイトメトリー手技と実際*, 第2版, p. 667-675, 蟹書房, 東京, 1988.
- (1993年9月22日受付, 11月15日受理, 特別掲載)

