

膀胱癌患者における細胞性免疫能の検討： 加齢と膀胱癌細胞 T24 に対するリンパ球細胞障害性

埼玉医科大学泌尿器科学教室（主任：岡田耕市教授）

加 藤 幹 雄

CELLULAR IMMUNE RESPONSE OF BLADDER TUMOR PATIENTS: EFFECTS OF AGING ON CYTOTOXIC ACTIVITY AGAINST T24

Mikio KATO

*From the Department of Urology, Saitama Medical School
(Director: Prof. K. Okada)*

The cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes of 39 control subjects, 42 bladder tumor patients and 15 patients with urological cancer other than bladder tumor against human bladder tumor cultured cell T24 was tested by a ^{51}Cr -release assay. In the healthy donor group, high cytotoxic activity was found in younger people and negative correlation was significantly found between the cytotoxicity and age. On the other hand, high cytotoxic activity was frequently found in older patients with bladder tumors and no correlation between the cytotoxicity and age was found in this group. The mean % cytotoxicity for patients over 50 years old in the bladder tumor group was significantly higher than that for the healthy donor group and other carcinoma group. A large proportion of the cytotoxicity of the control subjects and the bladder tumor patients to T24 was due to lymphocytes that did not form spontaneous rosettes with sheep erythrocytes.

(Acta Urol. Jpn. 34: 1363-1369, 1988)

Key words: Bladder tumor, Aging, Natural killer cells

緒 言

臨床例における腫瘍免疫能の検索は、メラノーマ、血液腫瘍などの領域と共に膀胱癌症例で、1970年代前半に活発な研究が行われた¹⁾。当初、腫瘍特異的もしくは疾患関連性を有する細胞性免疫能の存在が期待されたが、正常ヒトリンパ球にもヒト癌細胞に細胞障害性を有するものが広く認められる²⁾に至って、悪性腫瘍例における特異的細胞性免疫能の存在そのものが否定的にとらえられるようになった。一般に、正常個体に認められる、リンパ球細胞障害活性の主体は natural killer (NK) 細胞が担っているとされるが、NK 細胞活性に対して感受性を有する腫瘍細胞は多種の腫瘍種にわたっており、また NK 細胞の研究の進展と共に、NK 細胞の標的細胞が、ある種の胎児細胞や胸腺細胞にまで及ぶことが判明してきた³⁾ことは、疾患関連性を有する細胞性腫瘍免疫能を考えることをさらに困難なものとした。他方、NK 細胞の標的細胞となる腫瘍細胞の大多数は長期継代培養細胞であり、

培養初期の腫瘍細胞には NK 感受性が認められないものが多いとされる⁴⁾。これらの NK 感受性を規定する標的細胞側の差異については、従来十分な説明がなされなかったが、最近になり、標的細胞における NK 感受性と、発癌遺伝子の一つである、“ras”遺伝子の発現との間に明らかな関係があることが、分子遺伝学の手法を用いて明確に示された⁵⁾。これらの結果が一般的なものの否かは不明だが、NK 感受性にある種の規則性が存在することは、強く示唆されるところとなった。

本研究では、膀胱癌症例に、疾患関連性を有する細胞性腫瘍免疫能が認められるか否かを再度検討すること、標的細胞とした膀胱癌細胞に対するリンパ球細胞障害能の加齢に伴う変化が、健常群と膀胱腫瘍群で認められるか否かを検索することを目的として以下の実験を施行した。

材料および方法

対象：細胞障害性試験を行った被験対象は以下の

3群である。(i) 対照群39例。内訳は、健常者15例、尿路結石症、前立腺肥大症などの泌尿器科良性疾患例24例であり、22歳から83歳までの年齢分布であった。(ii) 膀胱腫瘍群は42例で、年齢は36歳から83歳までであった。(iii) 膀胱癌以外の泌尿器科悪性腫瘍症例15例を非膀胱腫瘍悪性腫瘍群とした。内訳は、前立腺癌7例、腎癌3例、4 睾丸腫瘍3例、その他2例であった。(ii), (iii) の腫瘍群では、免疫療法施行中の症例は除外されている。

腫瘍細胞：標的細胞にもちいた膀胱癌細胞 T24 は、Bubenik⁶⁾ により樹立された長期継代培養細胞で、日本医科大学中神義三博士より供与を受けた。10% FCS (GIBCO 社) 添加 TC199 (日水製薬) にて、継代培養された。また1例の症例では、膀胱腫瘍摘除標本より継代培養細胞 JTC29 [DM160 (極東製薬) + 10% FCS] が樹立された⁷⁾ ため、同細胞を自己標的細胞として使用した。

Effector 細胞の分離：リンパ球の分離は、Ficol-Conray 法により行ったが、PBS にて等量希釈した被験血液を Lymphoprep (Nyegaard 社) 上に重層したのち、400 G, 30分遠沈後、リンパ球層を分離した。さらに一部の症例では、effector 機構の解析を目的として、リンパ球を羊赤血球ロゼット法⁸⁾ により、Fig. 1 のごとく3種の分画に分別したが、リンパ球

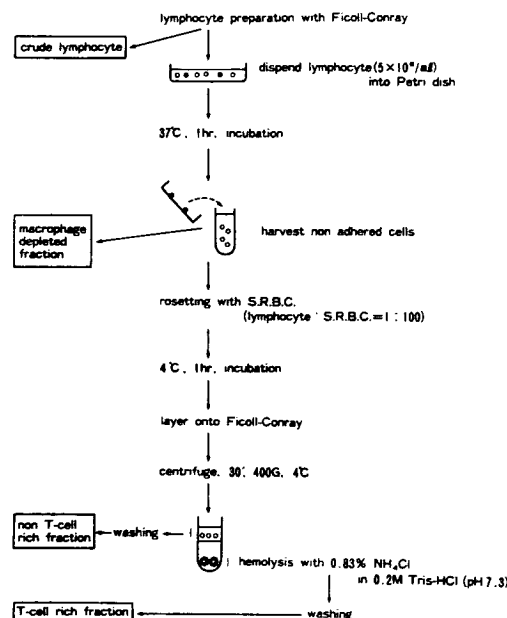


Fig. 1. Method of separation of peripheral blood lymphocytes by E rosette sedimentation.

3×10^5 個と、洗浄された羊赤血球 (日本生物材料センター) 3×10^5 個の両者を 0.1 ml FCS 中に混合したのち、氷上に1時間静置することにより、ロゼット形成を図った。分別された各分画の、ペルオキシダーゼ染色陽性率、Eロゼット形成率の検索はヒトリンパ球T細胞・B細胞微量測定用キット (JIMCO 社) により施行した。

細胞障害性試験： ^{51}Cr リリース法⁹⁾ により施行した。(i) 標的細胞の標識。標的細胞は0.25% trypsin (Sigma 社) 処理後、10% FCS 添加 RPMI1640 (GIBCO 社) にて $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調製し、同 1 ml 中に $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (200~500 mCi/mg ^{51}Cr New England Nuclear) 200 μCi を添加し、37°C, 30分培養後、RPMI1640 にて3回洗浄した。(ii) 障害性試験。前記標識細胞 1×10^4 個と、それぞれの標的細胞: effector 細胞比によって調製された effector 細胞を、10% FCS 添加 RPMI1640, 200 μl 中に混合し、U底96穴マイクロプレート (Nunc 社) を用いて、5% CO_2 条件下、6時間混合培養を行った。培養終了後、遠沈されたマイクロプレートより、上清液 100 μl を採取して、これを automatic gamma counter にて計測した。実験は triplicate にて行ったが、その平均値を用いて、被験対象ごとの % cytotoxicity を以下の式により算出した。

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximum release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

なお、spontaneous release としては、effector 細胞を添加しない標識細胞上清 100 μl を上記と同様に6時間後に採取したものの計測値を用いた。maximum release には、標識細胞 1×10^4 個を 2 ml の蒸留水に浮遊させ、3回の凍結融解を行ったのち、400 G, 10分間遠沈した上清 1 ml を計測したのちを用いた。また spontaneous release としての計測値が、標的細胞 1×10^4 個の標識カウントの20%を越えた場合は、実験として除外された。

検索された結果は、目的により統計学的処理を行ったが、平均値の比較には、t 検定法もしくは Cochran-Cox 法を用い、相関関係を検討したものには回帰分析を行った。

結 果

標的細胞と effector 細胞の量比による細胞障害性の差：T24 細胞を標的細胞としたヒトリンパ球細胞障害性の検討にあたって、正常対照32例、膀胱癌30例のおのおのにつき、標的細胞と末梢血リンパ球の混合

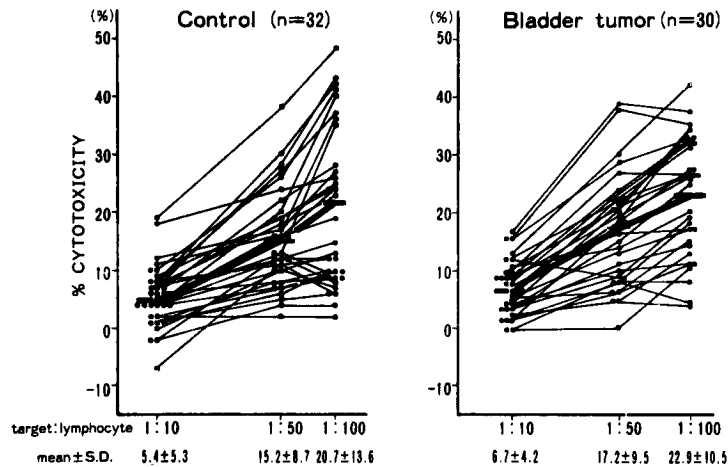


Fig. 2. Lymphocyte-mediated cytotoxic activity of control adults and bladder tumor patients against T24, at target to effector ratios of 1: 10, 1: 50 and 1: 100.

比を 1 : 10, 1 : 50, 1 : 100 の 3 点として細胞障害性試験を行った (Fig. 2)。対照群, 膀胱腫瘍群ともに, 小数例を除いて, 混合比の増加と共に細胞障害性の増加が認められ, 両群とも細胞障害の平均値の増加は, 片対数表記においてほぼ直線的な増加として認められた。したがって T24 細胞を標的細胞とした本検査系では, 1 : 50 の量比において有効な解析が可能であると考えられたため, 引き続き検索には, 1 : 50 の target 対 effector 比を選択した。正常対照群における性差による比較では, 1 : 50 の細胞比において, 男性 15.6%, 女性 14.0% の % cytotoxicity を示し, 明らかな性差を認めなかった。

対照群と腫瘍群における細胞障害性の差異: T24 に対するリンパ球細胞障害性の差異を, 対照群, 膀胱腫瘍群, 非膀胱腫瘍泌尿器系腫瘍群の 3 群間で, 1 : 50 の細胞比において比較した結果では, 対照群と膀胱腫瘍群との間に明らかな差異は認められなかった (Table

Table 1. Lymphocyte-mediated cytotoxic activity of control subjects, bladder tumor patients and other carcinoma patients against T24.

	No. of cases	Mean age (y.)	% Cytotoxicity (%)
Control	39	47	15.9±9.5
Bladder tumor	42	64	19.6±10.9*
Other carcinoma	15	58	11.8±8.9*
(*: p<0.05)			Mean±SD

1)。

次に 3 群の各個体の細胞障害性と年齢との関係を検討した (Fig. 3)。対照群では若年者に高い細胞障害性を示すものが多く, 加齢と共に細胞障害性が低下する傾向が認められた。また若年者では高い細胞障害性を示すものと, 低値を示すものとの差異がきわだっていた。年齢と細胞障害性との相関関係では, 高い相関係数は得られなかったものの, 統計学的に有意な負の相関関係が認められた。同様のことは非膀胱腫瘍群に

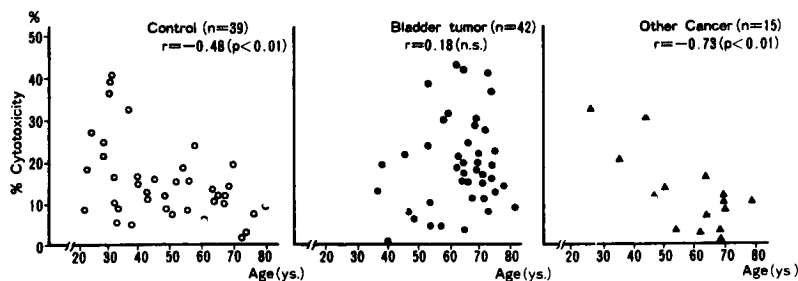


Fig. 3. Relationships between lymphocyte-mediated cytotoxic activity against T24, at target to effector ratio of 1: 50, and age.

Table 2. Comparison of cell-mediated cytotoxic activity against T24 in young and old subjects.

	Under 50y. old		Over 50y. old	
	Mean age(y.)	% Cytotoxicity*	Mean age(y.)	% Cytotoxicity*
Control	34(n=21)	19.3±10.7 ^a	64(n=18)	12.0±5.6 ^b
Bladder tumor	43(n=6)	11.7±7.2	67(n=36)	21.0±10.8 ^c
Other carcinoma	38(n=4)	23.1±8.1	65(n=11)	7.7±4.5 ^d

*, %: mean±SD

a>b: p<0.05
c>b: p<0.01
c>d: p<0.01
b>d: p<0.05

も認められ、明らかな負の相関関係を示した。一方膀胱腫瘍群では、加齢の影響はまったく認められず、高齢者にもT24に対する高い細胞障害性を示すものが認められた。

以上の所見と膀胱腫瘍の発生頻度が50歳代より急増することを考慮して、前記3群の細胞障害性を50歳以下の若年者と50歳以上の高齢者とに分け、再度集計検討を加えた(Table 2)。正常対照群では高齢者に比し、若年者群で明らかな細胞障害性の増強が認められた。非膀胱腫瘍群にも同様の傾向が認められたが、有意差は認められなかった(p<0.1)。一方、高齢者層の3群間の比較では、3群の平均年齢はほぼ均一であったが、膀胱腫瘍群が他の2群に比して明らかに強い細胞障害性を示した。

次に膀胱腫瘍症例を、腫瘍浸潤度、組織異型度のおのおのについて2群に分別し、細胞障害性の程度を検討した(Table 3)。なお、浸潤度ではT₂以下をlow stage, T₃以上をhigh stageとし、異型度では、移行上皮癌の組織診断を得たもので、grade 3もしくはgrade 3が混在するgrade 2症例をhigh gradeとし、他をlow gradeとした。浸潤度別の比較では、stage間の年齢の差異は認められなかったが、リンパ球細胞障害性はlow stage群で有意に高値を示した。grade別での比較では有意な差を認めなかった。

分別されたeffector細胞の細胞障害性: Ficol-Conray法により分離された末梢血リンパ球の細胞障害性が比較的高値を示したもののうち、正常人8例、膀胱腫瘍例20例のおのおのについて、マクロファージ除去リンパ球分画、T cell rich分画、non T cell rich分画に分別したのち、それぞれの分画のT24細胞に対する細胞障害性を、分画前のリンパ球細胞のそれとの比較の上で検討した。はじめに、分画法の効率を検討したが、プラスチックプレート付着細胞除去前後のペルオキシダーゼ陽性細胞の比較では、91%~95%のペルオキシダーゼ陽性細胞が除去された。またT cell rich分画、non T cell rich分画のおのおの

Table 3. Comparison of cytotoxicity of bladder tumor patients against T24 in low and high stage or in low and high grade group.

	No. of patients	% Cytotoxicity
Low stage	30	21.9±11.4*
High stage	12	13.9±6.7*
Low grade	24	21.6±10.1
High grade	18	17.1±11.4

* : p<0.05

Mean±SD

Eロゼット形成率は、83%~87%ならびに16~17%であった。各分画の生細胞率はすべて90%以上であった。effector細胞の分画に伴う細胞障害性の変化は、各個体の分画前のリンパ球細胞障害性を1とし、分画後の各細胞障害性の値を率として算出し集計した(Fig. 4)。また、統計的検討は、各分画の細胞障害性の実測値によって行った。これらの結果では、正常対照群と膀胱腫瘍群で同一の傾向を示した。マクロファージ除去に伴う細胞障害性の変動は認められなかった。T cell rich分画では、顕著な細胞障害性の減弱が認められた。non T cell rich分画では分画前の細胞障害性と同一の値であった。

自己腫瘍細胞に対するリンパ球細胞障害性: 1例の76歳の膀胱腫瘍患者より確立された継代培養細胞JTC29を標的細胞とした。自己の系によるリンパ球細胞障害性試験を施行した。原腫瘍は分化型乳頭状癌の所見であった。細胞障害性検索時点は、腫瘍摘除ならびに培養開始後7カ月であり、患者はtumor freeの状態であった。Ficol-Conray分離によるリンパ球の細胞障害性は、1:50の細胞比で、25.9%の% cytotoxicity値を示し、一定の細胞障害活性を認める結果となった。また、リンパ球の分別を前述の方法と同様に行い、自己腫瘍細胞に対するeffector細胞の解析を試みたが、マクロファージ除去に伴った軽度の細胞障害性の減弱が認められたものの、基本的にnon T cell rich分画に細胞障害性が存在することを示唆

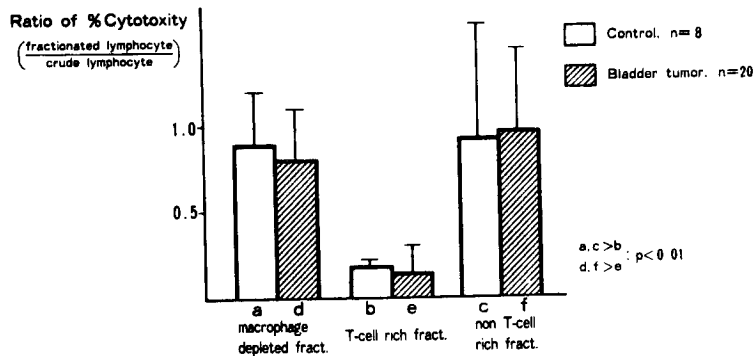


Fig. 4. Relative cytotoxic activities of fractionated lymphocytes to those of crude lymphocytes against T24.

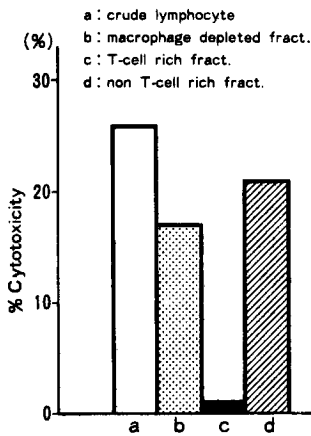


Fig. 5. Cytotoxic activity of fractionated lymphocytes of a bladder tumor patient against autochthonous tumor cells.

する結果となった (Fig. 5).

考 察

膀胱癌に関し報告される、疾患関連性を有する細胞性免疫能については、その存在を認める多くの報告^{1,10)}にもかかわらず、否定的な報告も少なくない^{11,2)}。また疾患関連性が指摘される場合でも、初期の一部のものを除き、正常人リンパ球中にも膀胱癌細胞に対して細胞障害性を有するものが存在する¹³⁾と報告されることが多い。本報告の結果でも、正常対照群中に、膀胱癌細胞に対する高いリンパ球細胞障害能を有するものが認められ、すべての年齢層を含めた、対照群と膀胱腫瘍群との比較では、細胞障害能に差異を認め得なかった。これらの結果からは疾患関連性を有する細胞性免疫能を考えることは不可能と思われた。しかしながら対照群に認められた高い細胞障害性を有

するものの多くは、若年者に集中していたため、対照群に認められたT24細胞に対する natural cytotoxicity の加齢による影響を検討したところ、細胞障害性と年齢との間に有意な逆相関が認められることと、若年群と高齢者群の細胞障害性の比較で、若年群に有意な高値を認めたことより、加齢に伴ってT24細胞に対する natural cytotoxicity が低下することが強く推測された。natural cytotoxicity では、NK細胞が重要なものとされるが、マウスにおいては加齢に伴うNK活性の低下が知られている。一方ヒトにおける検索では、加齢とNK活性との間に定説が認められない。K562細胞を標的細胞とした検索系では、NK活性が加齢と共に増強するとされる¹⁴⁾。一方Chang cellを用いた検索では、本報告と同様に若年者に高いNK活性を認めている¹⁵⁾。また、多種類の固型癌細胞を標的細胞とした検索では、加齢による細胞障害性の変化は認められないと報告された²⁾。しかしながら、同報告中にも、一種類の前立腺癌細胞を標的とした場合、加齢に伴って細胞障害能が低下する結果が示されている。

現在ではヒトNK活性の検索を行う場合、標的細胞としてK562細胞を用いることがほとんどであり、したがってK562細胞に対するリンパ球細胞障害性の性状が、等しくヒトNK活性の性状と理解される場合が多い。しかしながらヒトNKクローン細胞を用いたNK標的細胞の検討では、K562細胞を障害しないNK細胞の存在が認められている¹⁶⁾。このことは、NK細胞の標的特異性に関する複雑さをうかがわせると同時に、NK活性と加齢との問題を検討する場合にも、問題とする標的細胞のおおのについての検討が必要であることを示唆している。本研究で用いたT24細胞を標的とする場合には、明らかな加齢

によるリンパ球細胞障害性の低下が健常者群で認められるため、同様の検討を膀胱腫瘍群でも行ったが、対照群と異なり、高齢者にも高い細胞障害性を有するものが多数認められた。これらのことは腫瘍負荷に伴う非特異的反応であることも考えられるが、非膀胱腫瘍泌尿器悪性腫瘍群においても、加齢とT24細胞に対する細胞障害との関係が対照群とまったく同様の傾向を有することは、非特異的腫瘍負荷のみで、膀胱腫瘍群の高い細胞障害性を理解することが困難であることを示している。また、50歳以上的高齢者に限定した、3群間の比較で、膀胱腫瘍群に有意に高い細胞障害性が認められることは、なんらかの疾患関連性を有する細胞性免疫能の存在が示唆される。

ヒトNK細胞は半数の細胞で羊赤血球に対するreceptorを有さず、残り半数はT cellリンパ球に比し弱い結合能をもつ同receptorを有するとされる¹⁷⁾。T24細胞に対する膀胱腫瘍群と対照群の反応機構は、活性細胞がリンパ球系の細胞で構成されており、両群とも羊赤血球とロゼットを形成しない分面に活性の残存が認められることより、NK細胞によるものである可能性が考えられる。

ヒトNK細胞の性状は、表面抗原に関して、T cellリンパ球の性状の一部と、非特異的細胞障害能を有するmonocyte, granulocyte系の性状の一部を合わせ持つとされ、NK細胞間においても不均一性が認められている¹⁸⁾。同様のことは前述の標的細胞の特異性の面からもうかがわれる。またT cell killingに認められるmemory現象はNK細胞には存在しないが、マウスの系で、腫瘍細胞を移植することによって、生体内に同移植細胞に対するNK細胞活性を増強せしめるとする報告¹⁹⁾が認められる。

本報告で示した、疾患関連性をもった細胞性免疫能の成立機序に関してはまったく不明であるが、一つの推論として、比較的広範な細胞上に存在しNK細胞の標的となり得る抗原系が、膀胱癌細胞に比較的高率に出現し、このために何らかの機序によって患者生体内に、同抗原をもつ標的細胞に対するNK活性の増強をひきおこしたことが挙げられる。

Fujitaら²⁰⁾は、T24細胞に認められた発癌遺伝子の一つである“ras”遺伝子の活性化が、臨床材料の膀胱癌にも認められると報告している。“ras”遺伝子の発現の有無が、NK標的性を規定しているとする報告⁹⁾を勘案すると、これらの報告は、疾患関連性を有する細胞性免疫能の理解の上で興味深い。

本報告は*in vitro*の検索結果を示したが、NK活性の増強のもつ臨床上の意義に関しては今後の検討を

待たざるを得ない。自己腫瘍細胞に対するNK活性様の細胞障害性を有する症例を認めたことは、患者生体内の自己腫瘍に対してもNK細胞による細胞障害性が発揮される可能性は考えられるが、一方、転移を有する膀胱癌症例の一部に、T24細胞に対する高いNK活性が認められていることは、抗腫瘍効果の面で、NK活性に十分な期待を持ち得ないことも予測させる。Greenbergら²¹⁾は、NK標的性と転移原性との関係を、実験的肺転移モデルで検討しているが、当初有効であったNK細胞による転移抑制状態が、残存する一部の腫瘍細胞の形質転換により破壊されていく過程を報告している。

最近のbiological response modifier製剤を含めた腫瘍免疫療法が臨床的にも可能となってきた。膀胱癌症例に疾患関連性を有する細胞性免疫能の存在を示唆し得たことは、治療的側面からの意義が認められるものと考えられる。

結 語

膀胱癌細胞T24を標的細胞とする細胞性免疫能の検討を、健常者39例、膀胱癌42例、非膀胱腫瘍泌尿器癌15例の3群で行い、以下の結果を得た。

1. T24細胞に対する、正常人NK活性は加齢により低下する傾向であった。
2. 膀胱癌群では、加齢による細胞障害性の低下は認められず、高齢者間の3群の比較では、疾患関連性を有する細胞性免疫能の存在を示唆する結果を得た。
3. 膀胱癌症例に認められたT24細胞に対する細胞障害性にも、NK細胞の関与が強く示唆された。
4. 膀胱癌群に認められた細胞障害性は、stage間の比較では、low stage群で高値を示す傾向であった。grade別の比較では差異が認められなかった。

本研究の一部は、第38回日本癌学会において発表した。稿を終るに当たり御校閲いただいた岡田耕市教授に深謝致します。また種々の御教示、御助言を頂いた東京医科歯科大学大島博幸教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Bubeník J, Perlmann P, Helmstein K and Moberger G: Cellular and humoral immune responses to human urinary bladder carcinomas. *Int J Cancer* 5: 310-319, 1970
- 2) Takasugi M, Mickey MR and Terasaki PI: Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer Res* 33: 2898-2902, 1973
- 3) Hansson M, Kiessling R and Andersson B: Human fetal thymus and bone marrow

- contain target cells for natural killer cells. *Eur J Immunol* **11**: 8-12, 1981
- 4) Hewitt HB: Animal tumor models and their relevance to human tumor immunology. *J Biol Response Modif* **1**: 107-119, 1982
 - 5) Trimble WS, Johnson PW, Hozumi N and Roder JC: Inducible cellular transformation by a metallothionein-ras hybrid oncogene leads to natural killer cell susceptibility. *Nature* **321**: 782-784, 1986
 - 6) Bubeník J, Baresova M, Viklicky V, Jakoubkova J, Sainerova H, and Donner L: Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumor-specific antigen. *Int J Cancer* **11**: 765-773, 1973
 - 7) Kakuya T, Yamada T, Yokokawa M and Ueda T: Establishment of cell strains from human urothelial carcinoma and their morphological characterization. *In Vitro* **19**: 591-599, 1983
 - 8) Wahl SM, Rosenstreich DL and Oppenheim JJ: Separation of human lymphocytes by E rosette sedimentation. In: *In Vitro Methods in Cell-mediated and Tumor Immunity*, Bloom BR and David JR (ed): 231-240, Academic Press, New York, 1976
 - 9) Leclerc JC, Gomard E and Levy JP: Cell-mediated reaction against tumors induced by oncornaviruses. I. Kinetics and specificity of the immune response in murine sarcoma virus (MSV)-induced tumors and transplanted lymphomas. *Int J Cancer* **10**: 589-601, 1972
 - 10) O'Toole C, Perlmann P, Unsgaard B, Almgard LE, Johansson B, Moberger G and Edsmyr F: Cellular immunity to human urinary bladder carcinoma. I. Correlation to clinical stage and radiotherapy. *Int J Cancer* **10**: 77-91, 1972
 - 11) Bean M, Bloom B, Herberman R, Old L, Oettgen H, Klein G and Terry W: Cell mediated cytotoxicity for bladder carcinoma; evaluation of a workshop. *Cancer Res* **35**: 2902-2913, 1975
 - 12) Moore M and Robinson N: Cell-mediated cytotoxicity in carcinoma of the human urinary bladder. *Cancer Immunol Immunother* **2**: 233-243, 1977
 - 13) Troye M, Vilien M, Pape GR and Perlmann P: Cytotoxicity in vitro of blood lymphocytes from bladder cancer patients and controls to allogenic or autologous tumor cells derived from established cell lines or short-termcultures. *Int J Cancer* **25**: 33-43, 1980
 - 14) Batory G, Benzur M, Varga M, Garam T, Onody C and Petranyi GG: Increased killer cell activity in aged humans. *Immunobiol* **158**: 393-402, 1981
 - 15) Penschow J and Mackay IR: NK and K cell activity of human blood; differences according to sex, age and disease. *Annals of the Rheumatic Diseases* **39**: 82-86, 1980
 - 16) Allavena P and Ortaldo JR: Characteristics of human NK clones; target specificity and phenotype. *J Immunol* **132**: 2363-2369, 1984
 - 17) West WH, Cannon GB, Kay HD, Bonnard GD and Herberman RB: Natural cytotoxic reactivity of human lymphocytes against a myeloid cell line; characterization of effector cells. *J Immunol* **118**: 355-361, 1977
 - 18) Ortaldo JR and Herberman RB: Heterogeneity of natural killer cells. *Ann Rev Immunol* **2**: 359-394, 1984
 - 19) Djeu JY, Huang KY and Herberman RB: Augmentation of mouse natural killer activity and induction of interferon by tumor cells in vivo. *J Exp Med* **151**: 781-789, 1980
 - 20) Fujita J, Snivastava SK, Kraus MH, Rhim JS, Tronick SR and Aaronson SA: Frequency of molecular alterations affecting ras protooncogenes in human urinary tract tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 3849-3853, 1985

(1988年4月12日迅速掲載受付)