腎細胞癌の HLA class II 拘束性腫瘍特異抗原に対する免疫応答と その認識機序を検討した 1 例

琉球大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 小川由英教授)

西島さおり 菅谷 公男 小川 由英

沖縄徳州会南部徳州会病院

向 山 秀 樹

琉球大学大学院保健学研究科保健技術学教室

島 田 勝 政

ANALYSIS OF IMMUNE RESPONSE TO TUMOR SPECIFIC ANTIGEN RESTRICTED TO HLA CLASS II ON RENAL CELL CARCINOMA AND ITS RECOGNITION MECHANISM

Saori Nishijima, Kimio Sugaya and Yoshihide Ogawa

Department of Urology, Faculty of Medicine, University of the Ryukyus
(Director, Prof.: Y. Ogawa)

Hideki Mukouyama

Okinawa Nanbu Tokusyukai Hospital

Katsumasa Shimada

Department of Health Technology, Graduate School of Health Sciences, University of the Ryukyus

(Purpose) In this study, we studied the immune response against to human renal cell carcinoma and its antigenicity.

(Methods) Mixed lymphocyte tumor culture test was performed using tumor cells as stimulator cells, peripheral blood lymphocytes from tumor patient (autologous) or healthy volunteer (allogeneic) as responder cells, and tumor cells or peripheral blood lymphocytes from tumor patient as target cells. The cytotoxic activity of mixed lymphocyte tumor culture test was assayed by ^{51}Cr -release test, and cell surface antigens presented on tumor cells or peripheral blood lymphocytes were assayed by antibody block test.

(Results) The cytotoxic activity against to tumor cells was induced from allogeneic peripheral blood lymphocytes by mixed lymphocyte tumor culture test. Its cytotoxic activity was inhibited by anti-CD8 antibody treatment of peripheral blood lymphocytes and anti-HLA class II antibody treatment of tumor cells. Furthermore, allogeneic peripheral blood lymphocytes induced to tumor cells did not damage peripheral blood lymphocyte of the tumor patient derivation.

(Conclusion) Renal cell carcinoma may express tumor specific antigen restricted to HLA class II antigens that could be recognized by allogeneic CD8 positive T lymphocytes.

Key word: renal cell carcinoma, HLA (human leukocyte antigen), cytotoxic T lymphocytes

要旨：(目的) 腎細胞癌に対する担癌患者のリンパ球と健常者のリンパ球の細胞傷害活性度を比較することにより、腎細胞癌の抗原性とその抗原認識機序について検討した。

(方法) 腎細胞癌に対する免疫応答の解析にはリンパ球腫瘍細胞混合培養試験と ^{51}Cr 放出試験を行った。試験では刺激細胞として腎癌細胞を、応答細胞として担癌患者(自己)または健常者(非自己)の末梢血リンパ球を、標的細胞として ^{51}Cr 標識した腫瘍細胞または担癌患者の末梢血リンパ球を用い、標的細胞添加後の ^{51}Cr 放出量を測定して細胞傷害活性度へと換算した。また、応答細胞および刺激細胞に発現する表面抗原の解析は抗体阻害試験を用いて検討した。

(結果) リンパ球腫瘍細胞混合培養試験では、非自己リンパ球からのみ腫瘍細胞に対する細胞傷害活性が誘導されたが、この細胞傷害活性は末梢血リンパ球の抗 CD8 抗体処理、または腫瘍細胞の抗 HLA class II 抗体処理により阻害された。また、腫瘍細胞に対して高い細胞傷害活性を示した非自己リンパ球は、担癌患者の末梢血リンパ球に対しては傷害活性を示さなかった。

(結論) 一部の腎癌細胞には、非自己の CD8 陽性細胞傷害性 T リンパ球の認識しうる HLA class II 拘束性の腫瘍特異的抗原が発現している可能性が示唆された。

キーワード：腎細胞癌, HLA (ヒト白血球抗原), 細胞傷害性 T 細胞

緒 言

一般に、腫瘍細胞はその細胞表面に腫瘍特異抗原を発現していると考えられている¹⁾。ヒトにおいても皮膚癌や乳癌などの一部の腫瘍で稀に腫瘍細胞の自然退行が認められるが、それらは腫瘍細胞が免疫機構に認識されうる抗原決定基を発現していることを示唆する²⁾。細胞表面の腫瘍特異抗原の存在を示す方法としてはリンパ球腫瘍細胞混合培養試験が用いられている。このリンパ球腫瘍細胞混合培養試験により、骨肉腫の一部に発現される腫瘍特異抗原の存在が明らかにされ³⁾、悪性黒色腫についても細胞傷害性 T 細胞による腫瘍特異抗原の認識機構が確認されている⁴⁾。腎細胞癌も悪性黒色腫と同様に固形腫瘍の中では高い免疫原性を示すが⁵⁾、腫瘍特異抗原の発現やその認識機序については不明な点が多い。また、多くのヒト悪性腫瘍細胞では主要組織適合複合体分子(ヒトではヒトリンパ球抗原:HLA)の発現頻度が著しく低下している場合があり⁶⁾、その発現率の低下は腫瘍細胞の免疫監視機構からの回避の原因となりうる。したがって、腫瘍特異抗原と同様、腫瘍細胞における HLA の有無を確認することは抗腫瘍免疫機構を理解する上で重要である。

そこで私達は、腎癌細胞と担癌患者または健常者由来の末梢血リンパ球を混合培養して腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を誘導し、両者の活性を比較することにより、腎細胞癌の抗原性とその抗原認識機序について検討した。

対象と方法

対象：琉球大学医学部附属病院で腎細胞癌のため根

治的腎摘除術を受けた患者(60歳, 男性)を対象とした。腫瘍組織の病理学的診断は alveolar type, common type, clear cell subtype, grade 2 であり, stage D であった。

腫瘍細胞の分離と刺激細胞の作製：患者に実験の内容を説明して組織提供に対する同意を得た後、腫瘍組織の一部を無菌的に切除して培養実験に用いた。細分した腫瘍組織をコラゲナーゼ溶液(1mg/ml)で30分間室温で攪拌した後、 α -minimum essential medium (α -MEM: Life Technologies, 東京)に20%ウシ胎児血清(和光純薬, 大阪)を添加した組織培養液で洗浄・希釈し、培養用フラスコに移して37°C, 5%CO₂の条件下で恒温槽にて培養した。2~3日毎にフラスコの培養液を交換し、培養から2週間後にフラスコ内をトリプシン溶液で洗浄してフラスコ底辺に付着した単細胞層を回収して腫瘍細胞とした。腫瘍細胞は α -MEMに10%ウシ胎児血清, 10 mM N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid] (HEPES: SIGMA Chemical Co., USA)と、 5×10^{-5} mM α 2-mercaptoethanol (和光純薬, 大阪)を添加した組織培養液(以下 complete medium)で洗浄・希釈してリンパ球腫瘍細胞混合培養の刺激細胞浮遊液とした。

末梢血リンパ球の分離と応答細胞の作製：担癌患者と成人健常者より得たヘパリン加末梢血から重層比重遠心法⁷⁾を用いて末梢血リンパ球を分離した。血液はHanks培溶液(日水製薬, 東京)で希釈してFicoll-Paque™ PLUS液(Amerham Pharmacia Biotech AB, Sweden)に重層し、遠心分離した。遠心後、分離したリンパ球層を回収し、complete mediumで洗浄・希釈

してリンパ球腫瘍細胞混合培養の応答細胞浮遊液とした。

リンパ球腫瘍細胞混合培養試験：末梢血リンパ球の腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を誘導するためにリンパ球腫瘍細胞混合培養試験を行なった。応答細胞浮遊液は反応性リンパ球の単クローン化を行なうため限界希釈法⁸⁾に従い連続的に希釈し ($1 \times 10^4 \sim 10^6$ cells/ml), 刺激細胞浮遊液 (1×10^5 cells/ml) と recombinant interleukin-2 (塩野義製薬, 東京) 5 IU/ml および interferon γ (塩野義製薬, 東京) 50 IU/ml 存在下に混合し, 0.2 ml/well の 96 穴 V 字型マイクロプレートで 5 日間, 恒温槽にて培養した。刺激細胞と各濃度の応答細胞の混合培養は一組あたり 8 well で行なった。

標的細胞の作成と ^{51}Cr 標識：リンパ球腫瘍細胞混合培養試験の細胞傷害活性測定に用いる標的細胞として, 腫瘍細胞と担癌患者の末梢血リンパ球を 20% ウシ胎児血清と interferon γ 50 IU/ml を含む complete medium で希釈し, フラスコに移して恒温槽にて培養した。培養から 5 日後, フラスコ内をリン酸緩衝生理食塩水またはトリプシン溶液で洗浄して細胞を回収し, ^{51}Cr 溶液を添加して再び 1 時間培養した。培養後, 細胞浮遊液は complete medium で洗浄・希釈して ^{51}Cr 標識標的細胞浮遊液とした。

細胞傷害活性の測定：リンパ球腫瘍細胞混合培養試験による細胞傷害活性は Bernhard らの方法⁸⁾に従い, ^{51}Cr 放出試験を用いて測定した。5 日間リンパ球腫瘍細胞混合培養試験を行なった V 字型マイクロプレートから 100 μl ずつ上清を除去した後に同量の ^{51}Cr 標識標的細胞浮遊液 (1×10^5 cells/ml) を添加し, 再び 4 時間培養した。培養後, 各 well の上清 100 μl を採取し, 上清に放出される ^{51}Cr 量をオートウェルガンマシステムにて測定した。標的細胞の特異的 ^{51}Cr 放出率は下記の計算式に従って算出し, 細胞傷害活性率へと変換した。

細胞傷害活性 (%) = $\{(\text{実験的 } ^{51}\text{Cr 放出量} - \text{自然 } ^{51}\text{Cr 放出量}) / (\text{最大 } ^{51}\text{Cr 放出量} - \text{自然 } ^{51}\text{Cr 放出量})\} \times 100$

モノクローナル抗体による細胞傷害活性の抗体阻害試験：末梢血リンパ球に抗 CD4 モノクローナル抗体 (コスモバイオ, 東京) または抗 CD8 モノクローナル抗体 (コスモバイオ, 東京) を添加 (1×10^5 cells/4 μl) して 30 分間水中で反応させた応答細胞と, 腫瘍細胞に抗 HLA class I 抗体 (コスモバイオ, 東京) または抗 HLA class II 抗体 (コスモバイオ, 東京) を添加 (1×10^5 cells/

Fig. 1 自己および非自己末梢血リンパ球による腫瘍細胞傷害活性

自己リンパ球は腫瘍細胞に対してほとんど細胞傷害活性を示さなかったが, 非自己リンパ球は自己リンパ球活性に比べて有意に高い細胞傷害活性を示した。

4 μl) して 30 分間水中で反応させた刺激細胞を用いてリンパ球腫瘍細胞混合培養し, 各種モノクローナル抗体による細胞傷害活性の抗体阻害試験を行なった。リンパ球腫瘍細胞混合培養の細胞傷害活性度は ^{51}Cr 放出試験を用いて測定した。

統計処理：統計学的検討は Mann-Whitney's U test⁹⁾を用い, $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

腎細胞癌に対する細胞傷害活性の誘導

腎細胞癌の腫瘍細胞を刺激細胞とし, 自己由来または非自己の末梢血リンパ球を応答細胞としてリンパ球腫瘍細胞混合培養試験を行ない, 誘導される細胞傷害活性を比較した。自己リンパ球は腫瘍細胞に対してほとんど細胞傷害活性を示さなかったが, 非自己リンパ球は 3×10^4 cells/well においては 42.1%, 1×10^5 cells/well では 42.9% といずれも自己リンパ球活性に比べて有意に高い細胞傷害活性を示した (3×10^4 cells/well : $p = 0.002$, 1×10^5 cells/well : $p < 0.001$) (Fig. 1)。

抗体阻害試験によるリンパ球および腫瘍細胞表面抗原の同定

Fig. 2 各種抗体処理による細胞傷害活性の変化

- A) 腫瘍細胞に対する細胞傷害活性は応答細胞を抗 CD4 抗体処理した場合に比べて抗 CD8 抗体で処理した場合で有意に低下した。
 B) 腫瘍細胞に対する細胞傷害活性は刺激細胞を抗 HLA class I 抗体で処理した場合に比べて抗 HLA class II 抗体で処理した場合で有意に低下した。

細胞傷害活性を示す非自己リンパ球と腫瘍細胞の表面抗原を同定するためにモノクローナル抗体による抗体阻害試験を行なった。応答細胞である非自己リンパ球を抗 CD4 抗体で処理した場合、腫瘍細胞に対する細胞傷害活性は 3×10^4 cells/well においては 27.1%, 1×10^5 cells/well においては 26.4% であったが、抗 CD8 抗体で処理した場合では 3×10^4 cells/well においては -4.8%, 1×10^5 cells/well においては -4.4% といずれも抗 CD4 抗体処理したリンパ球に比べて細胞傷害活性が有意に低下した (3×10^4 cells/well : $p < 0.001$, 1×10^5 cells/well : $p = 0.002$) (Fig. 2A)。同様に、刺激細胞である腫瘍細胞を抗 HLA class I 抗体で処理した場合、腫瘍細胞に対する細胞傷害活性は 1×10^5 cells/well においては 31.1% であったが、抗 HLA class II 抗体で処理した場合では 15.8% と抗 HLA class I 抗体で処理した腫瘍細胞に比べて細胞傷害活性が有意に低下した ($p < 0.001$) (Fig. 2B)。

腫瘍細胞とがん患者の末梢血リンパ球に対する細胞傷害活性の比較

リンパ球腫瘍細胞混合培養試験の標的細胞として、がん患者の腫瘍細胞と患者の同じ HLA ハプロタイプ

Fig. 3 非自己リンパ球の標的細胞に対する細胞傷害活性の比較

非自己リンパ球はがん患者の末梢血リンパ球に対してほとんど細胞傷害活性を示さなかったが、腫瘍細胞に対しては有意に高い細胞傷害活性を示した。

プを持つ末梢血リンパ球の2種類を用いることにより、腫瘍細胞の抗原性についてさらに検討を加えた。非自己リンパ球は担癌患者の末梢血リンパ球に対してほとんど細胞傷害活性を示さなかったが、腫瘍細胞に対しては 1×10^5 cells/well で 26.6% と末梢血リンパ球に比べて有意に高い細胞傷害活性を示した ($p < 0.001$) (Fig. 3)。

考 察

本研究では、非自己リンパ球は腎腫瘍細胞に対して高い細胞傷害活性を示したが、その細胞傷害活性は応答細胞の抗 CD8 抗体処理または刺激細胞の抗 HLA class II 抗体処理により阻止された。また、リンパ球腫瘍細胞混合培養試験で腫瘍細胞に対して傷害活性を示した非自己リンパ球は、同患者の末梢血リンパ球に対しては傷害活性を示さなかった。

腎細胞癌は従来、免疫提示能力の強い癌であることから、臨床の場において各種の免疫療法が施行されている。腎細胞癌に対する免疫療法には液性免疫と細胞性免疫を用いた2種類の治療方法がある。前者の代表は interferon α や interferon γ を用いた治療方法であり、後者ではリンホカイン活性化キラー細胞療法 (LAK 療法)¹⁰⁾ や腫瘍組織浸潤性リンパ球細胞療法 (TIL 療法) があげられる¹¹⁾。このような免疫応答を用いた治療が潤滑に進行するためには、腫瘍細胞に発現する抗原の種類と、その抗原を認識するリンパ球のサブセットが重要となる¹²⁾。

リンパ球は大きく T 細胞と B 細胞に分類されるが、HLA 分子の認識は T 細胞の T 細胞受容体を介して行なわれる。T 細胞受容体は非自己の HLA 分子を識別して傷害することができるが、通常自己の HLA 分子を傷害することはない。また、T 細胞受容体は抗原単独を識別しない。生体内で抗原は一旦マクロファージなどの抗原提示細胞に摂取され、断片化した抗原ペプチドとなり、それらが自己 HLA 分子の抗原結合溝に結合することで初めて T 細胞受容体に認識される¹³⁾。断片化された抗原ペプチドが HLA class II 分子に結合すると CD4 陽性 T リンパ球による抗原認識が可能となり、活性化された T リンパ球は様々なサイトカインを放出して B 細胞の分化や抗体産生が促進され液性免疫が機能する¹⁴⁾。また、抗原ペプチドが HLA class I 分子に結合すると CD8 陽性 T リンパ球が活性化し、細胞傷害活性が誘導される。今回の実験で、腫瘍細胞に対する細胞傷害活性は自己リンパ球からは誘導されなかったが、非自己リンパ球からは高い細胞傷

害活性が誘導されたことから、少なくとも腫瘍細胞に HLA 分子が発現していることが示唆された。また、抗体阻止試験で腫瘍細胞に対する細胞傷害活性が抗 HLA class II 抗体及び抗 CD8 抗体によって阻止されたことから、腫瘍細胞に発現する HLA が class II 分子であり、認識する非自己リンパ球が CD8 陽性の細胞傷害性 T リンパ球であることが分かった。さらに、非自己由来の細胞傷害性 T リンパ球が腫瘍細胞と同じ HLA ハプロタイプを持つ担癌患者の末梢血リンパ球を傷害しなかったことから、腎癌細胞の一部に HLA class II 分子と正常細胞が持っていない特異的な抗原ペプチド (腫瘍特異抗原) の両方が存在する可能性が示唆された。T リンパ球が抗原を認識する場合、非自己リンパ球は HLA のタイプに関係なく HLA 分子を認識できるが、原則的に CD8 陽性 T リンパ球は自己 HLA class I 分子と抗原ペプチドを¹⁵⁾、CD4 陽性 T リンパ球は自己 HLA class II 分子と抗原ペプチドをそれぞれ認識する¹⁶⁾。したがって、仮に腎癌細胞が HLA class I 分子を発現し、かつ、その抗原結合溝に腫瘍特異的抗原ペプチドが存在していれば、非自己リンパ球からだけでなく、自己末梢血の CD8 陽性の細胞傷害性 T リンパ球による抗腫瘍効果も期待できただろう。しかし、今回対象とした腎細胞癌の実験では腫瘍細胞に発現する HLA が class II 分子であったことから、腎細胞癌に反応する自己リンパ球は主に CD4 陽性 T リンパ球であったと推測され、そのため腫瘍細胞に対する直接的な細胞傷害活性が認められなかったと考えられる。

ヒトの悪性黒色腫などで確認されている腫瘍特異抗原は、そのほとんどが HLA class I 分子上に存在する抗原 (HLA class I 拘束性抗原) である^{11,17)}。HLA 分子と T 細胞サブセットの組み合わせから考えると、腫瘍特異抗原が HLA class I 抗原上に存在する場合と HLA class II 分子上に存在する場合とでは、リンパ球の抗腫瘍効果に大きな違いが生じると予想される。つまり、腎癌細胞が HLA class II 拘束性に腫瘍特異抗原を発現していたとしても、それに応答する自己リンパ球が原則的に CD4 陽性のヘルパー T 細胞であれば誘導されるのは主に液性免疫反応であり、細胞性免疫による CD8 陽性 T リンパ球の細胞傷害活性は十分に発揮されない。ただし、ヘルパー T 細胞が反応することによるサイトカインの分泌は多岐にわたると考えられるため、腫瘍組織内に遊走してくる免疫細胞数は多いと予想される。これは、臨床の場において腎癌組織に

浸潤しているリンパ球や好酸球などの免疫細胞の数が他の腫瘍に比べて多いことや、進行性腎細胞癌では炎症性物質が上昇してくることと矛盾しない¹⁸⁾¹⁹⁾。また、腫瘍組織内に浸潤する細胞のサブタイプが、悪性黒色腫では細胞傷害性 T 細胞が 70~80% を占めるのに対し²⁰⁾、腎細胞癌では 20~30% であり²¹⁾、この違いが TIL 療法による両者の奏効率の違いを示しているのかも知れない。

今回の研究は腎細胞癌患者 1 例についての検討であるため、全ての腎細胞癌症例で同様な免疫現象があるとは言えないが、少なくともある一部の腎癌細胞で HLA class II 分子の発現と腫瘍特異抗原が存在する可能性が考えられたことは、今後の腎細胞癌に対する免疫機構や免疫療法を考える上で有意義である。

結 語

腎細胞癌の抗原性とその抗原認識機序について検討した。今回対象とした腎細胞癌では、非自己由来の CD 8 陽性細胞傷害性 T 細胞の認識しうる HLA class II 抗原が存在するとともに、正常細胞には存在しない腫瘍特異抗原を発現している可能性が示唆された。

文 献

- 1) Koldovsky, P.: Recent Results in Cancer Research. 22: Springer-Verlag, New York, 1969.
- 2) Gromet, M.A., Epstein, W.L., et al.: The regressing thin malignant melanoma: a distinctive lesion with metastatic potential. *Cancer*, **42**, 2282—2292, 1978.
- 3) Minami, A., Hayakawa, K., et al.: Detection of tumor-associated antigens of osteosarcoma in humans by the mixed lymphocyte tumor cell culture assay. *Jap. J. clin. Oncol.*, **9**, 111—116, 1979.
- 4) van der Bruggen, P., Traversari, C., et al.: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, **254**, 1643—1647, 1991.
- 5) Aulitzky, W., Gastl, G., et al.: Successful treatment of metastatic renal cell carcinoma with a biologically active dose of recombinant interferon-gamma. *J. Clin. Oncol.*, **7**, 1875—1884, 1989.
- 6) Houghton, A.N., Thomson, T.M., et al.: Surface antigens of melanoma and melanocytes. Specificity of induction of Ia antigens by human gamma-interferon. *J. Exp. Med.*, **160**, 255—269, 1984.
- 7) Boyum, A.: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, **97**, 7, 1968.
- 8) Good, M.F., Halliday, J.W., et al.: A method for analysing the clonal precursors of concanavalin A-induced suppressor cells. *J. Immunol. Methods*, **80**, 163—175, 1985.
- 9) 里見佳昭, 福田百邦, 他: 腎癌の予後に関する臨床統計. *日泌尿会誌*, **79**, 858—863, 1988.
- 10) Tomita, Y., Katagiri, A., et al.: Adoptive immunotherapy of patients with metastatic renal cell cancer using lymphokine-activated killer cells, interleukin-2 and cyclophosphamide: long-term results. *Int. J. Urol.*, **5**, 16—21, 1998.
- 11) Rosenberg, S.A., Aebersold, P., et al.: Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N. Engl. J. Med.*, **323**, 570—578, 1990.
- 12) Kronenberg, M., Siu, G., et al.: The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, **4**, 529—591, 1986.
- 13) Strominger, J.L.: Developmental biology of T cell receptors. *Science*, **244**, 943—950, 1989.
- 14) Morrison, L.A., Lukacher, A.E., et al.: Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J. Exp. Med.*, **163**, 903—921, 1986.
- 15) Braciale, T.J.: Antigen processing for presentation by MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.*, **4**, 59—62, 1992.
- 16) Jensen, P.E., Weber, D.A., et al.: HLA-DM and the MHC class II antigen presentation pathway. *Immunol. Res.*, **20**, 195—205, 1999.
- 17) Darrow, T.L., Slingluff, et al.: The role of HLA class I antigens in recognition of melanoma cells by tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. Evidence for shared tumor antigens. *J. Immunol.*, **142**, 3329—3335, 1989.
- 18) Kim, T.Y., von Eschenbach, A.C., et al.: Clonal analysis of lymphocytes from tumor, peripheral blood, and nontumorous kidney in primary renal cell carcinoma. *Cancer. Res.*, **50**, 5263—5268, 1990.
- 19) Simons, J.W., Jaffee, E.M., et al.: Bioactivity of autologous irradiated renal cell carcinoma vaccines generated by ex vivo granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer. *Cancer. Res.*, **57**, 1537—1546, 1997.
- 20) Meecham, W.J., Char, D.H., et al.: Infiltrating lymphocytes and antigen expression in uveal melanoma. *Ophthalmic. Res.*, **24**, 20—26, 1992.
- 21) Kowalczyk, D., Skorupski, et al.: Flow cytometric analysis of tumour-infiltrating lymphocytes in patients with renal cell carcinoma. *Br. J. Urol.*, **80**, 543—547, 1997.

(2001 年 4 月 12 日受付, 9 月 17 日受理)