末梢リンパ球サブセットに発現する細胞質内
bcl-2 蛋白の flow cytometry 法による定量的
測定法に関する基礎的検討とその応用

吉田 美代子・市川 幸延

Jpn. J. Clin. Immun., 20 (1) : 14~20, 1997.

**Quantitative flow cytometric determination of cytoplasmic bcl-2
oncoprotein in peripheral blood lymphocyte subsets**

Miyoko Yoshida and Yukinobu Ichikawa

The Fourth Department of Internal Medicine, Tokai University School of Medicine

【Summary】

We measured serial changes of cytoplasmic bcl-2 oncoprotein in peripheral blood lymphocyte subsets after preparation of cell samples or cultivation with mitogen or interleukin-2 (IL-2) by two-color flow cytometry using monoclonal antibodies to lymphocyte subsets and human bcl-2.

The bcl-2 levels determined by mean fluorescence intensity were diminished in most lymphocyte subsets when the samples were preserved at 4°C for 6 hours or more without 1% paraformaldehyde (PFA) fixation. However, the bcl-2 levels were kept constant for a week or more in the samples preserved at 4°C after immediate staining of cell surface markers and subsequent fixation with PFA.

The percentages of CD 4+ cells, CD 8+ cells, CD 19+ cells and Fas+ cells became high when lymphocytes were cultured with concanavalin-A, and bcl-2 levels were also enhanced in these subsets. In addition, the bcl-2 levels were compared between lymphocytes cultured with and those without recombinant IL-2. IL-2 inhibited spontaneous decrease of bcl-2 in cultured lymphocytes. Apoptosis of the cultured lymphocytes was also determined by a flow cytometric method. IL-2 seemed to diminish apoptosis of cultured lymphocytes.

Key words : apoptosis,
Fas antigen (CD 95),
bcl-2 oncoprotein,
flow cytometry

【概 要】

私達は flow cytometry 法でアポトーシス制御因子である細胞内 bcl-2 蛋白の末梢リンパ球での発現を定量的に測定し、検体採取後の経時的な変化を含めて、いくつかの基礎的な検討を行うとともに、活性化刺激に伴う bcl-2 量の変化や、その変動がアポトーシスにおよぼす効果などについて検討を加えた。

6 時間以上 4°C で検体を保存した場合には、大部分のリンパ球サブセットの bcl-2 の平均蛍光強度 (MFI) が低下を示した。一方、検体採取後、直ちに細胞表面抗原を一次抗体で染色し、paraformaldehyde で固定操作を行った後に 4°C で検体を保存した場合には、細胞表面抗原や細胞内 bcl-2 の MFI のいずれにも変動をきたさないことを見いだした。

末梢血単核球に Con-A を添加培養した場合には CD 4+, CD 8+, CD 19+, 特に Fas+細胞サブセットの百分率と、それらの bcl-2 の MFI は共に有意の高値を示した。

末梢リンパ球に rIL-2 (100 U/ml) を添加培養し、propidium iodide による核染色を行ってアポトーシスを flow cytometry で測定するとともに、細胞内 bcl-2 の経時の変化を測定した。rIL-2 非添加群とくらべて、添加群では bcl-2 の MFI の低下は有意に抑制され、同時にこれらリンパ球のアポトーシスが抑制される傾向を示した。

I. 緒 言

bcl-2 (B cell lymphoma/leukemia-2) 遺伝子は、1984 年 Tsujimoto らによって濾胞性リンパ腫に見られる t (14;18) の第 18 番染色体切断点 (18q21) からクローニングされ、染色体転座による bcl-2 遺伝子の活性化と発癌との関連などについてすでに多くの報告がある^{1,2)}。また、bcl-2 遺伝子産物でミトコンドリア内膜に主として存在する bcl-2 蛋白はアポトーシス (apoptosis) 抑制機能を有することから腫瘍性疾患や自己免疫疾患などについて研究が進められている³⁻⁷⁾。一方、アポトーシス促進因子としては細胞表面に発現する Fas (CD 95) 抗原とそのリガンドなども知られている^{8,9)}。

従来、細胞質内 bcl-2 は主として蛍光抗体法、酵素抗体法、immunoblot 法などを用いて測定されてきた。しかし、flow cytometry 法はより簡便で、感度に優れており、この方法を用いることにより以前は bcl-2 が陰性と考えられていた細胞にも bcl-2 を検出できることが示されている¹⁰⁾。

すでに私達も末梢リンパ球サブセットに発現する bcl-2 蛋白を flow cytometry 法により定量的に測定した成績を報告してきた⁵⁾。しかし、検体の保存時間

によっても bcl-2 の発現量が変化することなども知られている¹¹⁾。そこで、この測定法を広く応用してゆくにあたり、末梢血を採取後、あるいは固定液で検体処理後のリンパ球サブセットの bcl-2 発現量の経時の変化について検討し、さらに本法を応用して concanavalin-A (Con-A) 刺激あるいは recombinant interleukin-2 (rIL-2) 添加による bcl-2 蛋白の変動についても検討を加えたので報告する。

II. 対象および方法

1. リンパ球サブセットにおける細胞内 bcl-2 蛋白の検出法⁵⁾

健康成人から得たヘパリン加末梢血を Ficoll-Hypaque 比重遠心法によって単核球 (peripheral blood mononuclear cell: 以下 PBMC と略す) を分離し、混入する赤血球を溶血試薬 [pH 7.3, NH₄C 18.26 g/l, KHCO₃ 1.0 g/l, ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) 0.037 g/l] を加えて除去した。0.2% ウシ血清アルブミンと 0.05% EDTA を加えたリン酸緩衝食液 (0.15 M, pH 7.6, 以下 PBS と略す) で洗浄後、同液に 1×10^6 細胞/ml となるように浮遊させた。

① 100 μ l の細胞浮遊液に一次抗体として

phycoerythrin (PE) 標識 CD 4, CD 8, CD 19 あるいは CD 45 RO モノクローナル抗体 (MAb, Becton Dickinson 社製) 5 μ l を加えて 4°C, 30 分間暗所にて反応させた。PBS にて 2 回洗浄した後, 細胞を 1% paraformaldehyde (PFA) を含む PBS 1 ml に浮遊させ, さらに 4°C で暗所に 17 時間静置した。

② 細胞表面の Fas 抗原の検出には, はじめに未標識マウス (IgG 1) 抗ヒト Fas MAb (MBL 社製) 5 μ l と反応させ, さらに二次抗体として PE 標識ラット抗マウス Kappa 鎖 MAb (Becton Dickinson 社製) 5 μ l を加えて 4°C, 30 分間反応させ, 同様に 1% PFA 1 ml に浮遊させ 4°C で保存した。

③ ①および②の過程で得られた細胞浮遊液を PBS で洗浄後, 70% methanol 1 ml を加え, 暗所にて室温で 60 分静置して, 細胞膜を透過性とした。PBS で洗浄後, fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 IgG 1 抗ヒト bcl-2 蛋白 MAb (Dako 社製) を 5 μ l 加え, 暗所にて 4°C, 30 分間反応させた。

④ また, 細胞浮遊液 100 μ l に PE 標識マウス IgG 2 a と PE 標識マウス IgG 1 混合液 (Becton Dickinson 社製) 5 μ l を加えて PFA, methanol で同様に処理した後, FITC 標識マウス IgG 1 (Becton Dickinson 社製) 5 μ l と反応させたものをコントロールとして用いた。

いずれも PBS で洗浄し, PBS 0.5 ml に浮遊させたあと, 50 μ のナイロンメッシュを通過させ, flow cytometer (FACScan: Becton Dickinson 社製) で解析した。flow cytometer は解析前に既報のごとく標準蛍光ビーズ (ポリサイエンス社製) を用いて一定の条件となるように設定した⁵⁾。

2. bcl-2 蛋白発現におよぼす細胞保存条件の検討

健康成人 5 例より分離した PBMC を分離直後, あらゆる室温で 6 時間, 4°C で 22 時間と 48 時間 PBS 中で保存した後にリンパ球表面抗原と細胞内 bcl-2 蛋白を染色し, bcl-2 蛋白の平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity: MFI) を測定した。

3. PFA 固定後の細胞表面抗原陽性率と bcl-2 蛋白発現量の経時的変化

健康成人 5 例から得られた PBMC に対して, 直ちに FITC 抗 CD 4 MAb で染色し, 1% PFA 1 ml 中で 4°C, 暗所にて保存したサンプルに対して一定時間ご

とに bcl-2 染色操作を行い, CD 4+細胞の陽性率と, その bcl-2 蛋白発現量の変化を測定した。

4. Con-A 添加培養によるリンパ球サブセットの変動と, それらの細胞内 bcl-2 蛋白量の変化

健康成人 10 例より分離した PBMC 5 $\times$ 10⁶ 個を 10% 非働化ウシ胎児血清 (FBS: Gibco 社製), 25 mM Hepes (Sigma 社製), penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 μ g/ml (Gibco 社製) を加えた RPMI-1640 培養液 (Gibco 社製) 中で, Con-A (Sigma 社製) を最終濃度 25 μ g/ml となるように添加し, 37°C, 5% CO₂ 条件下で 5 日間培養した。また, 別に 5 例の健康成人から分離した PBMC を Con-A を添加せずに 5 日間培養した。それぞれのサンプルについて各リンパ球サブセットの百分率と, それらの細胞内 bcl-2 の発現について経時的に検討した。

5. rIL-2 添加培養によるリンパ球のアポトーシスと細胞内 bcl-2 蛋白量の変化

健康成人 11 例のヘパリン加末梢血に貧食細胞除去用試薬 (KAC-2, 日本抗体研究所製) を 10 分の 1 量加え, 37°C 1 時間インキュベートしたあと Ficoll 比重遠心法で単球, 多核白血球を除去した PBMC を採取した。PBMC 4 $\times$ 10⁶ 個を 10% FBS 加 RPMI 培養液に浮遊させ, rIL-2 (イムネース注 35, 塩野義製薬) 100 U/ml を添加した群と, 非添加群を作成し, 37°C, 5% CO₂ 条件下で 24~72 時間培養した。それぞれのサンプルについて, CD 4+, CD 8+細胞内の bcl-2 蛋白の MFI を測定した。

また, 同じ培養細胞を PBS で洗浄した後に, Nicoletti らの方法¹²⁾に従って 4°C の 70% ethanol 1 ml をゆるやかに滴下し, 4°C で 1 時間静置した。さらに, PBS で洗浄後細胞を 0.5 ml の PBS に再浮遊させ, ribonuclease A (1 mg/ml, Sigma 社製) - PBS 溶液を 0.5 ml 加え 37°C, 1 時間反応させた。最後に, propidium iodide (100 μ g/ml, PI; Sigma 社製) - PBS 溶液を 0.5 ml 加え, 4°C, 17 時間, 暗所に保存した後に 50 μ のナイロンメッシュを通過させ, flow cytometer でアポトーシスを生じた細胞の百分率を測定した。

III. 結 果

1. bcl-2 蛋白発現におよぼす細胞保存時間の影響

各リンパ球サブセットの bcl-2 蛋白の MFI は、室温で 6 時間保存した場合には分離直後と変わらなかったが、4°C で 22 時間、および 48 時間保存した場合には CD 45 RO+, CD 4+, CD 8+, および Fas+細胞内の bcl-2 の MFI は、ともに有意に低下 ($p<0.05$) を示した (表 1)。

2. PFA 固定後の細胞表面抗原陽性率と bcl-2 蛋白発現量の経時的変化

PBMC を一次抗体染色後に、1% PFA 固定液中で 2, 4, 10 日間保存し、bcl-2 染色を行ったさいの CD 4+細胞の陽性率は、通常の 1 日保存の場合と比べてほとんど変動しなかった (表 2)。また、CD 4+細胞内の bcl-2 蛋白の MFI にも有意な変動を認めなかった。

3. Con-A 添加培養によるリンパ球サブセットの変動と、それらの細胞内 bcl-2 蛋白の変化

Con-A 非添加培養のさいには CD 4+, CD 8+, CD 19+, CD 45 RO+, Fas+細胞サブセットの百分率には明らかな変化を認めなかったが、それぞれのサ

ブセットの bcl-2 の MFI は CD 45 RO+細胞をのぞいて 5 日目には有意の低下を示した ($p<0.05$, 図 1. A~E)。Con-A を添加したさいには Fas+細胞の百分率は、day 0 ($15.69\pm10.13\%$) と較べて、day 1 ($43.78\pm5.88\%$), day 2 ($62.0\pm8.55\%$), day 3 ($64.61\pm9.11\%$), day 5 ($61.50\pm21.46\%$) と著しい高値を示した ($n=10$, $p<0.01$)。

一方、Con-A 添加培養後の bcl-2 の MFI では CD 4+, CD 8+, CD 19+, CD 45 RO+, Fas+細胞のいずれも 3 日目をピークとして高値を示した ($p<0.05\sim0.01$, 図 F~J)。

4. rIL-2 添加培養によるアポトーシスと細胞内 bcl-2 蛋白量の経時的変化

rIL-2 添加、非添加群ともに培養前に較べ 24 時間、72 時間ともにリンパ球のアポトーシスは高値を示し ($p<0.01$)、rIL-2 添加群では、非添加群と較べてアポトーシスの抑制傾向が見られた (図 2-A)。リンパ球細胞内の bcl-2 蛋白の MFI は、非添加群では時間の経過とともに徐々に低下したが、培養前と較べ有意差は認めなかった。しかし、非添加群と較べると添加群では培養 24 時間、72 時間ともに bcl-2 の MFI は有意に高値を示した (図 2-B)。さらに、CD 4+細胞、CD 8+細胞に分けて細胞質内の bcl-2 蛋白の MFI を検討してみると、CD 4+, CD 8+細胞ともに

表 1 bcl-2 蛋白発現 (MFI) におよぼす細胞保存時間の影響

		細胞保存時間(h)			
		0	6 (室温)	22 (4°C)	48 (4°C)
CD 45 RO+	(n=5)	129.7 $\pm$ 17.2	136.5 $\pm$ 14.2	96.3 $\pm$ 11.8*	94.3 $\pm$ 19.2*
CD 4+	(n=5)	141.6 $\pm$ 4.0	150.4 $\pm$ 7.1	111.0 $\pm$ 14.8*	106.0 $\pm$ 11.6*
CD 8+	(n=5)	130.9 $\pm$ 19.0	132.0 $\pm$ 19.6	104.0 $\pm$ 9.4*	102.2 $\pm$ 12.9*
CD 19+	(n=5)	118.1 $\pm$ 15.3	126.3 $\pm$ 14.6	99.5 $\pm$ 26.6	112.1 $\pm$ 33.5
Fas+	(n=5)	122.1 $\pm$ 18.2	133.0 $\pm$ 16.6	95.6 $\pm$ 16.5*	103.6 $\pm$ 18.8*

* = PBMC 分離後 22 時間以後と分離直後 (0 h) での bcl-2 (MFI) の比較 ($p<0.05$)。

表 2 PFA 固定後の細胞表面抗原陽性率と bcl-2 蛋白発現量の経時的変化

		細胞保存日数(日)			
		1	2	4	10
CD 4+細胞	(%)	33.3 $\pm$ 5.0	34.1 $\pm$ 6.2	34.4 $\pm$ 8.6	34.2 $\pm$ 9.9
	(n=5)				
CD 4+細胞の bcl-2		91.9 $\pm$ 6.1	93.4 $\pm$ 6.8	97.9 $\pm$ 15.8	79.5 $\pm$ 14.8
(MFI)	(n=5)

図 1 Con-A 添加培養によるリンパ球サブセットの細胞内 bcl-2 蛋白量の変化

Con-A 非添加群 (n=10, ○, A~E), 添加群 (n=10, ●, F~J).

day 0 との比較: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$.

図 2 rIL-2 添加, 非添加培養によるアポトーシスの変動とリンパ球 CD4+, CD8+ 細胞における細胞内 bcl-2 の変化

添加群 (n=10, ●), 非添加群 (n=10, ○). 添加前値 (day 0) との比較: ★ = $p < 0.05$, ★★ = $p < 0.01$. 添加培養群と非添加培養群との比較: + = $p < 0.05$, ++ = $p < 0.01$.

rIL-2 非添加群と較べて, 添加群では bcl-2 の MFI は培養後 24, 72 時間で明らかに高値を示した (図 2-C, D). しかも, CD8+ 細胞では培養前と較べて 72

時間培養後に添加群で bcl-2 の MFI は高値を示し, 逆に非添加群では低下していた (図 2-D).

IV. 考 察

末梢リンパ球の bcl-2 蛋白発現に関しては従来の成績は必ずしも一致していない。すでに私達は flow cytometry 法で PBMC の bcl-2 蛋白の発現を検討し、PBMC のほとんどすべてに bcl-2 が発現していることを示した⁵⁾。

しかし、健康成人の PBMC の bcl-2 蛋白の発現を immunoblot 法を用いて検討した Reed らの結果¹¹⁾では bcl-2 蛋白は採血直後に分離した PBMC では証明できたが、採血後 4°C で一晩静置した後に PBMC を分離したサンプルでは bcl-2 蛋白は全く消失していた。しかし、一晩保存後に分離した PBMC に Con-A と IL-2 を添加培養すると、細胞内 bcl-2 量は採血直後の PBMC とほぼ同程度に回復したと報告している。このように末梢リンパ球の bcl-2 発現量に関する従来の報告の差異には bcl-2 蛋白の測定法や検体保存条件に違いがあると考えられる。

そこで私達は flow cytometry 法で PBMC の bcl-2 蛋白発現量を測定するさいの、いくつかの基礎的条件を検討することとした。まず、ヘパリン加末梢血から PBMC を分離し、室温で 6 時間、4°C で 48 時間まで保存したさいの bcl-2 蛋白の変動を検討した。その結果、室温 6 時間では bcl-2 の MFI に全く変化を認めないが、4°C で 22 時間～48 時間保存した場合には bcl-2 蛋白の MFI は明らかに低下することを見出した。しかし、Reed らの成績¹¹⁾とは異なり bcl-2 蛋白が完全に陰性化する細胞はなく bcl-2 の MFI の低下が認められたのみであった。この差異は immunoblot 法と flow cytometry 法による検出感度の違いによると考えられるが、しかし、冷暗所保存により細胞内 bcl-2 蛋白が減少傾向を示す機序については不明である。

次に、私達は一次抗体処理後すぐに 1% PFA 固定を行えば細胞質内 bcl-2 の MFI は数日以上にわたり安定していることを見いだした。これらの成績から、bcl-2 蛋白の測定には採血後の検体の 4°C 保存をさけ、なるべく速やかに PFA 固定操作まで進めておくことが重要であることが判明した。

一方、flow cytometry 法で細胞質内 bcl-2 を検出するさいの固定方法については、para-formaldehyde/triton あるいは acetone に methanol 処理を併用する方法も検討されているが¹⁰⁾、私達の用いた 1% PFA 固定後に 70% methanol 処理を行う方

法¹³⁾でも十分な感度と安定した成績が得られた。

実際、本法を用いて初めて細胞内 bcl-2 を測定した Aiello らの成績¹⁰⁾では末梢血 T、B リンパ球の bcl-2 の陽性率は 80% 以上とされているが、私達の方法はより感度が良好でいずれの末梢リンパ球サブセットでも 99% 以上の細胞に bcl-2 が陽性を示した⁵⁾。

さらに、私達は本法を応用して新鮮な PBMC の培養実験により、CD 4+, CD 8+, Fas+, CD 19+, CD 45 RO+細胞のいずれも細胞内 bcl-2 量が Con-A 添加培養後に高値となることを示した。しかし、T細胞を IL-2 と抗 CD 3 抗体または phytohemagglutinin と phorbol myristate acetate を添加して活性化した場合には、Fas+細胞の増加とともに細胞内 bcl-2 蛋白が減少するとの報告もある¹⁴⁻¹⁶⁾。このことから刺激物質の違いによりリンパ球の bcl-2 蛋白の経時的な変動は必ずしも一定していない可能性がある。

次に、私達は PBMC を 10% FBS 加 RPMI-1640 培養液中で 24 時間または 72 時間培養すると、自発的なアポトーシスが亢進することを示した。さらに、rIL-2 を添加培養した場合には、添加していない場合よりも PBMC の bcl-2 蛋白の減少が抑制され、これらの PBMC のアポトーシスも抑制される傾向が認められた。これらの成績は PBMC の bcl-2 蛋白発現量と自発的なアポトーシスとがある程度関連していることを示唆していると考えられた。

V. ま と め

① flow cytometry 法により細胞質内 bcl-2 蛋白の発現を定量的に測定した。PBMC の細胞質内 bcl-2 蛋白の測定のさいには、採血後なるべく速やかに PFA 固定操作まで行うことが肝要と考えられた。

② しかし、細胞表面抗原を一次抗体で染色したあと、1% PFA 固定を行えば細胞表面抗原の陽性率や bcl-2 蛋白発現量は数日間にわたり安定していた。

③ Con-A 添加培養後には CD 4+, CD 8+, Fas+, CD 19+ および CD 45 RO+細胞のいずれも細胞内 bcl-2 蛋白の発現増加を示した。

④ 単球、多核白血球を除去した PBMC に IL-2 を添加して 24～72 時間培養すると、細胞内 bcl-2 蛋白の減少が抑制されると共に、それらの細胞の自発的なアポトーシスの程度も抑制される傾向を示した。

文 献

- 1) Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., et al. : Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cell with the t(14; 18) chromosome translocation. *Science*, 226 : 1097~1099, 1984.
- 2) Gauwerky, C.E., Haluska, F.G., Tsujimoto, Y., et al. : Evolution of B-cell malignancy : pre-B-cell leukemia resulting from MYC activation in a B-cell neoplasm with a rearranged BCL 2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85 : 8548~8552, 1988.
- 3) Hockenbery, D.M., Zutter, M., Hickey, W., et al. : BCL 2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 : 6961~6965, 1991.
- 4) Broome, H.E., Dargan, C.M., Krajewski, S., et al. : Expression of Bcl-2, Bcl-x, and Bax after T cell activation and IL-2 withdrawal. *J. Immunol.*, 155 : 2311~2317, 1995.
- 5) Ichikawa, Y., Arimori, K., Yoshida, M. et al. : Abnormal expression of apoptosis-related antigens, Fas and bcl-2, on circulating T-lymphocyte subsets in primary Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 13 : 307~313, 1995.
- 6) Aringer, M., Wintersberger, W., Steiner, C. W., et al. : High levels of bcl-2 protein in circulating T lymphocytes, but not B lymphocytes, of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 37 : 1423~1430, 1994.
- 7) Ohsako, S., Hara, M., Harigai, M., et al. : Expression and function of Fas antigen and bcl-2 in human systemic lupus erythematosus lymphocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 73 : 109~114, 1994.
- 8) Shima, Y., Nishimoto, N., Ogata, A., et al. : Myeloma cells express Fas antigen/Apo-1 (CD95) but only some are sensitive to anti-Fas antibody resulting in apoptosis. *Blood*, 85 : 757~764, 1995.
- 9) Lynch, D.H., Ramsdell, F., and Alderson, M. R. : Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol. Today*, 16 : 569~574, 1995.
- 10) Aiello, A., Delia, D., Borrello, M.G., et al. : Flow cytometric detection of the mitochondrial BCL-2 protein in normal and neoplastic human lymphoid cells. *Cytometry*, 13 : 502~509, 1992.
- 11) Reed, J.C., Miyashita, T., Cuddy, M., et al. : Regulation of p 26-Bcl-2 protein levels in human peripheral blood lymphocytes. *Lab. Invest.*, 67 : 443~449, 1992.
- 12) Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., et al. : A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Metho.*, 139 : 271~279, 1991.
- 13) Pollice, A.A., McCoy, J.P.Jr, Shackney, S.E., et al. : Sequential paraformaldehyde and methanol fixation for simultaneous flow cytometric analysis of DNA, cell surface proteins, and intracellular proteins. *Cytometry*, 13 : 432~444, 1992.
- 14) Yoshino, T., Kondo, E., Cao, L., et al. : Inverse expression of bcl-2 protein and Fas antigen in lymphoblasts in peripheral lymph nodes and activated peripheral blood T and B lymphocytes. *Blood*, 83 : 1856~1861, 1994.
- 15) Massaia, M., Borriore, P., Attisano, C., et al. : Dysregulated Fas and Bcl-2 expression leading to enhanced apoptosis in T cells of multiple myeloma patients. *Blood*, 85 : 3679~3687, 1995.
- 16) Graninger, W.B., Seto, M., Boutain, B., et al. : Expression of Bcl-2 and Bcl-2 Ig fusion transcripts in normal and neoplastic cells. *J. Clin. Invest.*, 80 : 1512~1515, 1987.