

# フローサイトメトリー法による 末梢血骨髓系樹状細胞検出法の考察

奈良県立医科大学第2内科学教室

塚口信彦

## DETECTION OF PERIPHERAL BLOOD MYELOID DERIVED DENDRITIC CELLS BY FLOW CYTOMETRY

NOBUHIKO TSUKAGUCHI

*Second Department of Internal Medicine, Nara Medical University*

Received April 17, 2000

*Abstract*: Dendritic cells are strong antigen-presenting cells. Recently, antitumor immunity therapy using dendritic cells (DC therapy) has received attention. The clinical study of DC therapy for malignant diseases has been undertaken, and both cases of being effective responded and tumor-specific CTL-induced have been reported. However, no specific procedure for DC therapy has yet been established, so further detailed investigation is necessary. To perform a clinical study of such cell therapy, the technique for detecting and determining the cells to be used is critical. In this study, we devised a technique of detecting peripheral myeloid dendritic cells by three-color flow cytometry. Gates were set for HLA-DR<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> cells to determine one hundred thousands collected cells, leading to the clear identification of a cell population as being myeloid dendritic cells. The surface characteristics of this cell population were determined to be negative for CD3, CD19 and CD56, positive for CD2 and CD4, weakly positive for CD5, positive for CD11a and CD11c, negative to weakly positive for CD11b, negative for CD1a, CD80 and CD83, and positive for CD86. Such characteristics agree well with those previously reported for peripheral myeloid dendritic cells. Thus, peripheral myeloid dendritic cells were judged to have been identified by this technique. The proportion of myeloid dendritic cells in normal subjects was  $0.74 \pm 0.17\%$ , with absolute numbers of  $17.54 \pm 5.80/\mu\text{l}$ . In patients with chronic CML, incipient or recurrent malignant lymphoma, and acute leukemia in remission phase, the proportion of myeloid dendritic cells was reduced, suggesting a decrease in immunologic surveillance function. In patients with malignant lymphoma, following autologous peripheral blood stem cell transplantation, the proportion of myeloid dendritic cells was increased, representing the clinical effect of immunotherapy by autologous peripheral blood stem cell transplantation. This technique can readily determine exact numbers of peripheral myeloid dendritic cells and will contribute to the future study of dendritic cells and the development of DC therapy.

(*奈医誌*. J. Nara Med. Ass. 51, 145~156, 2000)

---

**Key words** : peripheral blood dendritic cell, flow cytometry, hematologic malignancy

## 緒 言

近年、癌治療の新しい治療概念の細胞療法(Cell therapy)は急速に発展してきている。従来から細胞療法として大量化学療法の補助療法に用いる造血幹細胞移植が広く行われているが、免疫担当細胞であるリンパ球や樹状細胞(dendritic cell: DC)などを採取し純化する技術の進歩で、これらの細胞成分を癌治療に利用する様々な治療法も新たに考案されている。中でも樹状細胞を用いる抗腫瘍免疫療法(DC therapy)は将来の癌治療の一翼を担う注目のべき治療法である。樹状細胞は一次免疫応答で未感作なT細胞に抗原を提示し活性化させることのできる唯一の強力な抗原提示細胞である<sup>1)</sup>。DC therapyはその特性を利用した治療法で、末梢血から採取し体外で腫瘍特異抗原を感作した樹状細胞を患者体内に輸注することで腫瘍特異的な細胞障害性T細胞(cytotoxic T cell: CTL)を体内で効率的に誘導しようとするものである。これまでに悪性リンパ腫<sup>2)</sup>や慢性骨髄性白血病<sup>3,4)</sup>、悪性黒色腫<sup>5)</sup>、多発性骨髄腫<sup>6,7)</sup>などの悪性疾患に対して臨床試験や研究が行われ、有効例や腫瘍特異的CTLの誘導例が報告され、副作用もほとんど認められずDC therapyの有用性が示されたが、樹状細胞採取法などの具体的な手法は未だ確立はされておらず、今後の詳細な検討が必要とされている。

このような細胞療法の臨床研究では、使用する細胞を検出し測定する方法が必要不可欠で、末梢血幹細胞移植では造血幹細胞をCD34陽性細胞として検出し採取幹細胞数を測定することで安全に移植がおこなえるようになった<sup>8)</sup>。DC therapyでも正確な樹状細胞検出法が必要であるが、現在は簡便で正確な樹状細胞検出法は確立されていないので本研究は簡便で正確な末梢血樹状細胞検出法の確立を目的として、5種類のモノクローナル抗体を同時に使用し3カラーフローサイトメトリー法を用いた樹状細胞検出法を考案した。同定した樹状細胞集団の表面形質はさらに4カラーフローサイトメトリー法でより詳細に検討した。また実際に本法を用いて健康人と今後DC therapyの対象疾患となる各種造血器悪性疾患患者との末梢血樹状細胞数を測定し、疾患別の末梢血樹状細胞数を検討した。

## 対象と方法

### 1) 樹状細胞検出法の考案

特定の血液細胞分画の簡便で正確な検出方法にはフローサイトメトリー法があるが、フローサイトメトリー法で測定するにはその細胞集団を特定する特異的表面マ

ーカーが必要である。組織中の樹状細胞の特異マーカであるCD83<sup>9)</sup>やCMRF-44<sup>10,11)</sup>、CMRF-56<sup>12)</sup>などはいずれも末梢血樹状細胞では細胞培養後に発現する表面抗原で、末梢血樹状細胞採取後直ちに利用できる特異マーカーは知られていない。そこで複数の表面マーカーを組み合わせ樹状細胞を同定する方法を考案した。まず樹状細胞は抗原提示細胞で特徴はMHC class II抗原が陽性であることである。したがってMHC class II抗原の一つHLA-DR抗原を第一のマーカーとする。次に末梢血中には、二つの樹状細胞集団があり、CTLを誘導するのはこのうちのCD33陽性の骨髄系樹状細胞であることが知られているので<sup>13-17)</sup>、CD33抗原を第二のマーカーとする。HLA-DR抗原陽性でCD33抗原陽性の細胞すなわち骨髄系抗原提示細胞には他にCD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>単球とCD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>単球とがあるが<sup>5)</sup>、樹状細胞はCD14抗原陰性CD16抗原陰性であるので、CD14とCD16とをマーカーとすればこれらの細胞と識別することができる。さらに末梢血液中には造血幹細胞がごくわずか含まれ、中には骨髄系樹状細胞と同じCD33<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>細胞もあるので、造血幹細胞の特異マーカーCD34抗原陽性細胞も除外する必要がある。すなわち、DC therapyに必要な骨髄系樹状細胞をHLA-DR<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup>/CD16<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>細胞と考え、第一の色素を標識したHLA-DR抗体、第二の色素を標識したCD33抗体、第三の色素を標識したCD14抗体、CD16抗体およびCD34抗体を用いた3カラーフローサイトメトリー法で骨髄系樹状細胞の同定を試みた。

### 2) 試薬と機器

使用した試料はLymphoprep(Nycomed, Norway); sodium azide, fetal calf serum(FCS)(和光純薬, 大阪); Phosphate buffered saline(PBS)tablet(宝酒造, 大津); FACS<sup>®</sup> BRAND LYSING SOLUTION 10X CONCENTRATE(Becton Dickinson Immunocytometry System[BD], San Jose, CA), fluorescein isothiocyanate(FITC)標識モノクローナル抗体は、コントロール抗体、CD2抗体、CD5抗体、CD11a抗体、CD14抗体、CD16抗体、CD18抗体、CD19抗体、CD25抗体、CD34抗体、CD44抗体(BD, San Jose, CA), CD40抗体、CD64抗体、CD80抗体(Immunotech, Marseille, France), CD49a抗体(T Cell Sciences, Cambridge, MA), phycoerythrin(PE)標識モノクローナル抗体は、コントロール抗体、CD3抗体、CD4抗体、CD11b抗体、CD11c抗体、CD33抗体、CD54抗体、CD56抗体、CD62L抗体、抗HLA-DR抗体(BD, San Jose, CA), CD1a抗体、CD83抗体、CD40L抗体(Immunotech, Mar-

seille, France), CD86 抗体(PharMingen, San Diego, CA), streptavidin Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP)標識では HLA-DR モノクロナール抗体, Allophycocyanin(APC)標識では CD33 モノクロナール抗体 (BD, San Jose, CA), phycoerythrin-cyanin 5.1(PC 5 /PE-Cy 5)標識モノクロナール抗体は CD14 抗体, CD16 抗体, CD34 抗体(Immunotech, Marseille, France)を用いた。

フローサイトメトリーの測定と解析には FACScan, FACSCalibur, CellQuest soft ware(BD, San Jose, CA)を使用した。

3) 対象

樹状細胞検出法の検討には健康人ボランティアの末梢血を使用し, 末梢血樹状細胞測定の対象は十分なインフォームドコンセントを行った健康人ボランティア 41 例と造血器悪性疾患患者 30 例とで, ヘパリンナトリウム加採血末梢血 5 ml を検体とした。この一部で白血球数を算定し, May-Grünwald-Giemsa 染色した塗抹標本で細胞分画を算定した。造血器悪性疾患は, 慢性骨髄性白血病(CML)慢性期 7 例, うち 4 例がインターフェロン投与中, 2 例がヒドロキシウレア投与中で, 1 例は両者を併用していた。悪性リンパ腫 12 例, うち 2 例が初発例, 1 例が再発例, 9 例は寛解例, その 5 例は自己末梢血幹細胞移植施行であった。急性白血病は急性骨髄性白血病(AML)寛解期が 10 例, うち同種骨髓移植後が 1 例, 急

性リンパ性白血病(ALL)寛解期が 1 例であった(Table 1)。

4) 免疫染色とフローサイトメトリー法

ヘパリン加末梢血は単核球分離法あるいは全血法で免疫染色した。単核球分離法では Ficoll 比重遠心法で単核細胞を分離, 赤血球溶解液(0.83% NH<sub>4</sub>Cl, 0.1% KHCO<sub>3</sub>, 0.37% EDTA-2 Na, pH 7.4)で混入赤血球を溶血後に免疫染色し, 1% paraformaldehyde(PFA)含有燐酸緩衝生理食塩水(calcium magnesium free phosphate buffered saline; PBS free)溶液で固定した。全血法では 1 サンプル当たり末梢血 100 μl を用いて免疫染色後, FACS Lysing Solution で赤血球を溶血, 1% PFA-PBS 溶液で固定した。免疫染色は, 細胞を 0.1% sodium azide, 2% FCS 含有 PBS free 中に浮遊させ, まずマウス血清にて非特異的反応を阻止後, PerCP 標識 HLA-DR 抗体, PE 標識 CD33 抗体, FITC 標識 CD14, CD16, CD34 抗体と 4℃で 30 分間反応させた(3 カラー染色)。樹状細胞の表面形質の検討には, PerCP 標識 HLA-DR 抗体, APC 標識 CD33 抗体, FITC 標識 CD 14, CD16, CD34 抗体と, 第四の色素として PE 標識 CD 1a, CD3, CD4, CD11b, CD11c, CD40L, CD54, CD 56, CD62L, CD83, CD86 抗体, あるいは PE 標識 HLA-DR 抗体, APC 標識 CD33 抗体, PC 5/PE-Cy 5 標識 CD14, CD16, CD34 抗体と, 第四の色素として FITC 標識 CD2, CD5, CD11a, CD18, CD19, CD25, CD40, CD

Table 1. Patients' characteristics

Diagnosis	Status	No. of patient	Age range	Treatment
CML	Chrosic phase	7	34-70	IFN-α 4 HU 2 INF-α+HU 1
ML (NHL 3)	NR	3	35-74	Post-local irradiation 1 No prior treatment 2 (1st relapse 1)
ML (NHL 3, HD 2)	CR	5	22-54	Post-PBSCT 5
ML (NHL 2, HD 2)	CR	4	32-62	Post-standard chemotherapy 4
AML	1st CR	10	36 18-62	Post-BMT 1 Post-standard chemotherapy 9
ALL	2nd CR	1	39	Post-standard chemotherapy 1

CML: chronic myelogenous leukemia, ML: malignant lymphoma, NHL: non-Hodgkin's lymphoma, HD: Hodgkin disease, IFN-α: interferon-α, HU: hydroxyurea, PBSCT: peripheral blood stem cell transplantation, AML: acute myelogenous leukemia, ALL: acute lymphoblastic leukemia, CR: complete remission, NR: no remission, BMT: bone marrow transplantation, 1st CR: 1st complete remission, 2nd CR: 2nd complete remission

44, CD49a, CD64, CD80 抗体を用いて 4℃ で 30 分間反応させた(4 カラー染色)。サンプルは固定後、直ちに FACSscan で 3 カラー法あるいは FACSCalibur で 4 カラー法で測定した。

フローサイトメーターは細胞にレーザー光を照射し、細胞の散乱光や標識抗体の蛍光を検知する機器である。前方散乱光(forward scatter; FSC)は細胞の大きさを反映し側方散乱光(side scatter; SSC)は細胞の生物学的性状を表すとされ、FSC/SSC 2 パラメーター表示で細胞集団として各細胞を表示する。樹状細胞は末梢血中では少数の細胞集団であるため、測定時に FSC/SSC 2 パラメーター表示を用いて単核球細胞集団にゲイトを設定し、1 サンプルあたり 10 万個の単核細胞を測定した(Fig. 1-A)。各々の細胞の SSC, FSC, と三種類あるいは四種類の標識色素の蛍光強度が測定され、CellQuest software を使用してこれらのデータを解析した。まず HLA-DR/CD33 2 パラメーター表示で単核球を表示し HLA-DR<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup> 領域にゲイトを設定した(Fig. 1-B)。

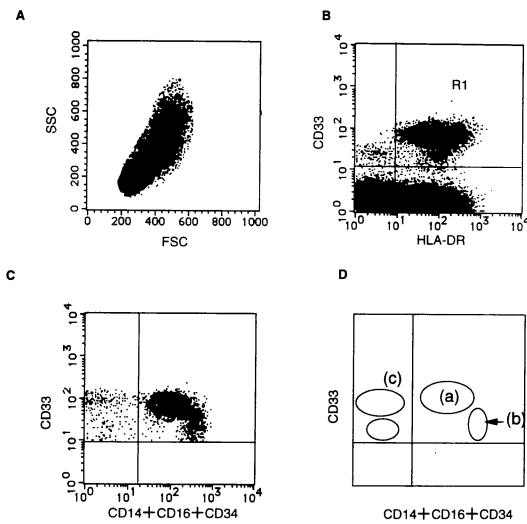


Fig. 1. The method for flow cytometric analysis. One hundred thousands events were acquired using a live gate on mononuclear cells (A). These events were represented in bivariate distribution of HLA-DR and CD33, and analyse gete (R1) was set on HLA-DR positive CD33 positive area (B). Events in the gate (R1) were represented in bivariate distribution of CD33 and CD14+CD16+CD34 (C). CD14<sup>+</sup> monocyte (a). CD16<sup>+</sup> monocyte (b) and CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> cells (c) were clearly identified (C, D). FSC: forward scatter, SSC: side scatter

この領域内の細胞のみをさらに CD14, 16, 34/CD33 の 2 パラメーター表示に展開し(Fig. 1-C, D), HLA-DR<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> の細胞集団を骨髄系樹状細胞として全単核細胞中の比率を算出した。また検体処理前の白血球数と塗抹標本の白血球分画とから単核球数を算出しておき、単核球数と単核球中の樹状細胞比率から樹状細胞数を算出した。樹状細胞の表面形質の検討は、さらに HLA-DR<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> 細胞を CD33 と第四の標識抗体の 2 パラメーター表示に展開し検討した。また表面抗原の発現量の指標として平均蛍光強度(mean fluorescence intensity; MFI)を算出した。

5) 統計学的検討

本研究の統計学的検討は t 検定を用い危険率 5% 未満で有意と判定した。

結 果

1) HLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> 細胞の検討

HLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> 細胞を CD14, 16, 34/CD33 の 2 パラメーター表示に展開すると、CD14<sup>+</sup> 単球の細胞集団と CD16<sup>+</sup> 単球の細胞集団とが表示されたが、10 万個の単核細胞を測定することでさらに HLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> 領域に CD33<sup>bright</sup> と CD33<sup>dim</sup> との 2 個の細胞集団が表示された(Fig. 1-C, D)。この HLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> 領域の細胞を FSC/SSC 2 パラメーター表示に展開すると、リンパ球集団と単球集団との中間の位置に 1 個の細胞集団として表示されたが、これは従来報告されている末梢血骨髄系樹状細胞の特性に合致していた<sup>18)</sup>(Fig. 2)。

4 カラー染色による表面抗原解析で HLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> 領域の CD33<sup>bright</sup> と CD33<sup>dim</sup> との 2 個の細胞集団細胞はそれぞれの標識抗体にほぼ同様の染色性を示した。その表面抗原は、リンパ球の lineage marker である CD3, CD19, CD56 が陰性、CD2, CD4 は陽性、CD5 は弱陽性、接着分子では CD11a, CD11c, CD44, CD18 は陽性、CD11b が陰性~弱陽性、アクセサリー分子として CD80, CD83 は陰性、CD86 は陽性、また CD1a は陰性であった(Fig. 3)。これらは従来報告されている末梢血の骨髄系樹状細胞の表面抗原に合致していた<sup>14,15,17,19,20,21)</sup>。また HLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> 細胞のそれ以外の表面形質は、IL-2 レセプターの CD25 は陰性、接着分子では CD40, CD49a は陰性、CD54, CD62L は弱陽性から陽性、高親和性 Fcγ レセプターである CD64 は弱陽性であった。

2) 単核球分離法と全血法の比較

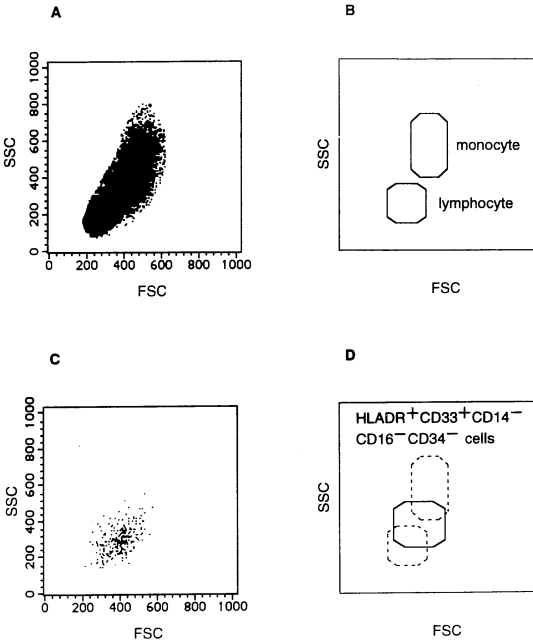


Fig. 2. Panels show bivariate distribution of forward and side scatter intensities of peripheral blood mononuclear cells. Different cells clusters were identified on the display. HLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> cells were represented between lymphocyte cluster and monocyte cluster, FSC: forward scatter, SSC: side scatter

骨髓系樹状細胞の各種表面抗原の陽性率や MFI を単核球分離法と全血法とで比較すると両者間で全ての表面抗原の陽性率や MFI に有意差は認めなかった (Table 2).

3) 健康人の末梢血骨髓系樹状細胞数の検討

本法で測定した健康者の単核球中骨髓系樹状細胞比率は  $0.74 \pm 0.17\%$ 、骨髓系樹状細胞数は  $17.54 \pm 5.80/\mu\text{l}$  であった (Fig. 4, 5).

4) 造血器悪性疾患の末梢血骨髓系樹状細胞数の検討

本法で造血器悪性疾患患者の末梢血骨髓系樹状細胞比率と絶対数とを測定した. 単核球中の比率は, CML 慢性期が  $0.36 \pm 0.11\%$ , 初発と再発との悪性リンパ腫が  $0.32 \pm 0.12\%$ , 自己末梢血幹細胞移植後の悪性リンパ腫が  $1.04 \pm 0.43\%$ , 末梢血幹細胞移植を施行していない寛解後の悪性リンパ腫が  $0.84 \pm 0.16\%$ , 急性白血病の寛解期が  $0.47 \pm 0.11\%$  であった. 絶対数は, CML 慢性期が  $7.09 \pm 2.59/\mu\text{l}$ , 初発と再発との悪性リンパ腫が  $4.01 \pm 1.01/\mu\text{l}$ , 自己末梢血幹細胞移植後の悪性リンパ腫が  $14.87 \pm 4.20/\mu\text{l}$ , 末梢血幹細胞移植を施行していない寛

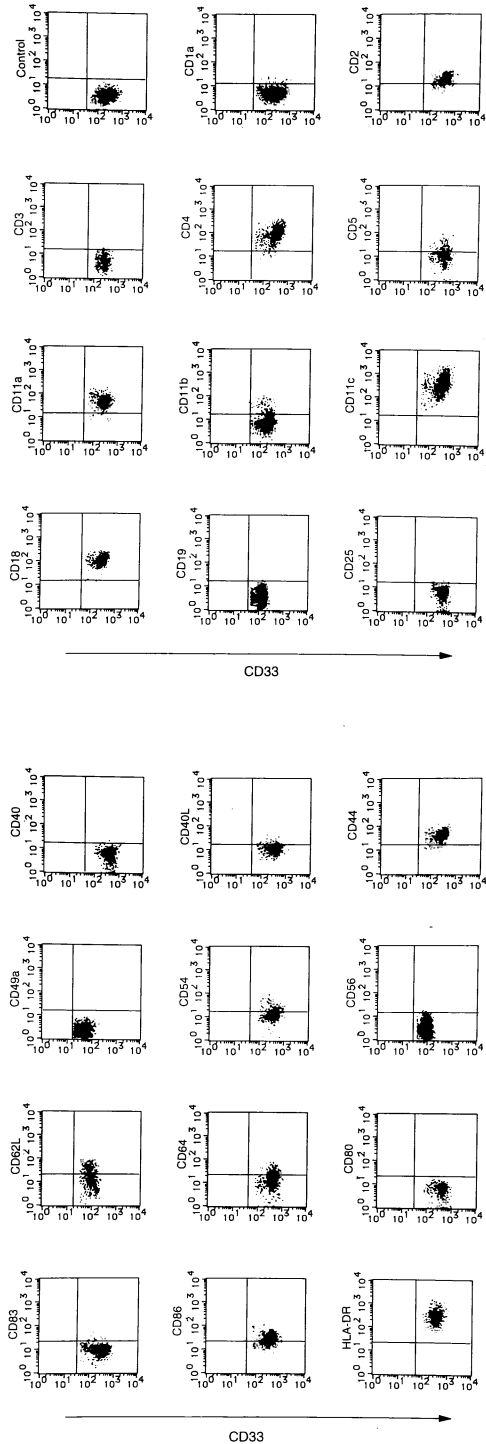


Fig. 3. Flow cytometric analysis of cell surface markers on HLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> cell

Table 2. Surface marker expression of peripheral blood dendritic cells prepared by whole blood method or MNC method.

	% positive													
	CD1a	CD11c	CD18	CD40	CD40L	CD44	CD49a	CD54	CD62L	CD64	CD80	CD83	CD86	
Whole blood method	5.9	93.1	95.2	0.2	0	50.5	0.3	20.7	80.2	26.2	0.7	0	19.2	
MNC method	4.0	91.7	98.6	0.5	0.3	74.4	0	17.6	90.5	23.7	0.6	0.6	26.9	

	MFI													
	CD1a	CD11c	CD18	CD40	CD40L	CD44	CD49a	CD54	CD62L	CD64	CD80	CD83	CD86	
Whole blood method	2.6	149.2	89.8	2.8	2.7	10.7	4.8	34.9	37.8	9.5	2.8	3.0	7.8	
MNC method	3.3	147.9	45.4	4.0	3.0	16.5	3.0	7.6	29.1	8.6	2.9	2.5	5.5	

The difference was not statistically significant between whole blood and MNC method.

MFI: mean fluorescence intensity MNC: mononuclear cells

解後の悪性リンパ腫が  $12.06 \pm 5.01/\mu\text{l}$ , 急性白血病の寛解期が  $10.11 \pm 3.24/\mu\text{l}$  であった (Fig. 4, 5).

## 考 察

樹状細胞は細胞質突起を樹枝状に伸ばす特徴的な形態を呈し、一次免疫応答で未感作T細胞を活性化することのできる唯一強力な抗原提示細胞であることが知られている<sup>1)</sup>が、最近の研究の進歩はさらにその体内動態や詳細な機能を明らかにしている。樹状細胞は骨髄造血幹細胞に由来し<sup>22)</sup> 血行性に全身に分布する。この末梢血中樹状細胞は小型類円形単核球で、MHC class II抗原や接着分子を発現するが貪食能や抗原提示能はなく樹状前駆細胞とも呼ばれている<sup>14)</sup>。末梢血樹状細胞は血管壁を越えて組織内に分布すると一過性に貪食能を発揮し、微生物や異常細胞などの抗原を貪食する。抗原情報を取り込んだ樹状細胞は成熟し、樹状細胞特異抗原やケモカイン受容体、costimulatory分子などの発現が増強する。その後成熟樹状細胞の多くはリンパ組織で作られるケモカインの誘導でリンパ行性に所属リンパ節へ遊走するが、リンパ節内のT細胞領域にたどり着くと細胞質突起を四方八方に伸ばし、貪食してきた抗原を多数のリンパ球に提示し抗原特異的T細胞を活性化する。樹状細胞は貪食した抗原をMHC class IIに提示することで抗原特異的ヘルパーT細胞を誘導するだけでなく、MHC class Iにも提示することで抗原特異的CTLを直接誘導する<sup>23-26)</sup>。活性化されたこれらの抗原特異的T細胞は増殖し、輸出リンパ管から組織に再循環して免疫応答に働く。このように各臓器の組織は絶えず樹状細胞の監視下にあり、免疫応答の調節は主として樹状細胞が司っていることが明らかになっている。腫瘍免疫でも局所で腫瘍抗原を貪食した樹状細胞が所属リンパ組織で腫瘍抗原特異的CTLを誘

導し腫瘍細胞の排除に主要な役割を果たしているとされている。しかし腫瘍由来のサイトカインの中には樹状細胞の動員や樹状細胞の成熟を阻害するものが含まれていることが報告され<sup>27,28)</sup>、担癌患者で腫瘍が排除されない理由の一つと考えられる。近年、分子生物学の進歩によりCTLの認識する腫瘍抗原が多数同定され、これらを免疫療法に利用することが可能となっている。そこでこれらの腫瘍特異抗原を用いて樹状細胞を体外で感作し活性化した樹状細胞を生体に戻して、腫瘍による免疫抑制を回避して腫瘍特異的CTLの効率的な誘導を期待するDC therapyが考案されている。1996年Hsu<sup>29)</sup>らは治療抵抗性B細胞リンパ腫患者を対象に、末梢血からアフェレーシスした白血球から末梢血樹状細胞を分離し、腫瘍抗原にはリンパ腫細胞の産生するイディオタイプ蛋白を用いて、初めてDC therapyをおこない治療効果を得ることに成功している。末梢血樹状細胞は抗原貪食能のない前駆細胞ではあるが、短時間の培養で貪食能が発現し治療に利用可能となっている。以来多くの施設でDC therapyの研究が進められているが、DC therapyは未だ開発途上の治療で標準的手法は確立されていない。樹状細胞調整法や腫瘍抗原感作法なども様々な方法が考案され、今後の詳細な検討が必要とされている。

細胞療法の臨床研究では、使用する細胞を検出し測定する方法は必要不可欠な基本技術である。例えば造血幹細胞はCD34陽性細胞として検出できるが、末梢血幹細胞移植では末梢血中のCD34陽性細胞率の推移を検討することで幹細胞採取の至適時期を明らかにしている<sup>8)</sup>。また採取幹細胞数の測定で十分量の幹細胞を移植前に準備可能としている。DC therapyでも同様に正確な樹状細胞検出法が必要であるが、現在は簡便な検出法は見い出されていない。採取する末梢血中に樹状細胞はごくわ

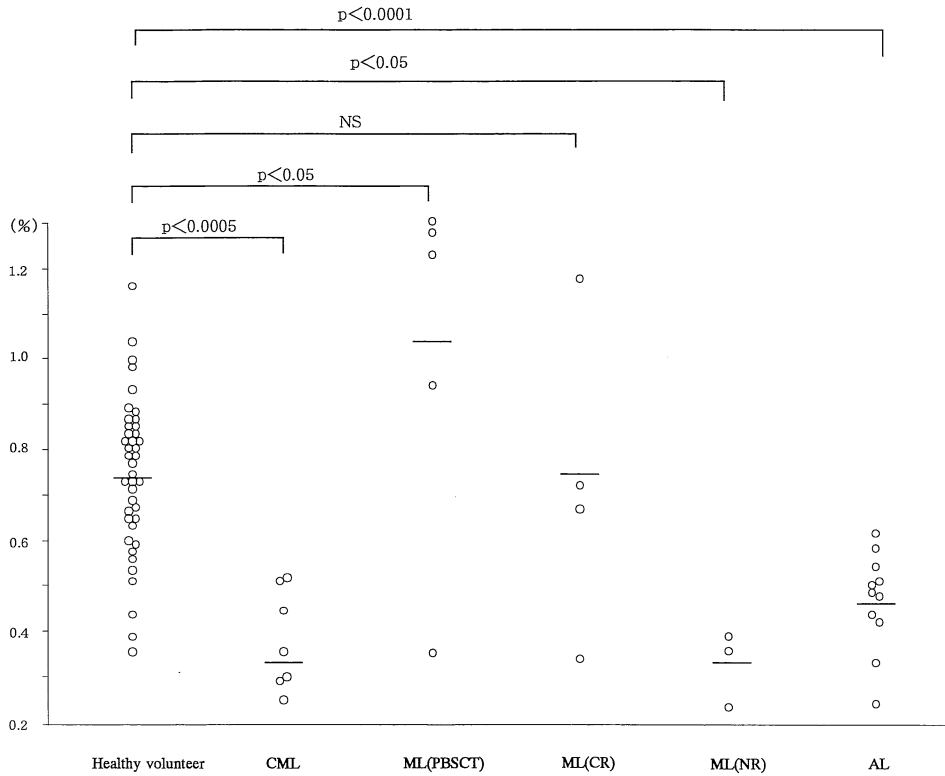


Fig. 4. Frequency of peripheral blood dendritic cells  
 CML : chronic myelogenous leukemia, ML : malignant lymphoma, AL : acute leukemia, PBSCT : peripheral blood stem cell transplantation, CR : complete remission, NR : no remission

ずかしか存在しないため、以前は付着法<sup>1,29)</sup>、比重遠心法<sup>30-34)</sup>、panning 法<sup>16)</sup>などで末梢血樹状細胞をまず濃縮したうえで採取細胞数を測定している。また樹状細胞の特異マーカーとしてはCD83<sup>9)</sup>やCMRF-44<sup>10,11)</sup>、CMRF-56<sup>12)</sup>などが知られているが、末梢血樹状細胞ではいずれも細胞培養後に発現する表面抗原であるため測定前に培養操作が必要となる。これらの方法は煩雑で操作中の細胞喪失も考えられ実用的で正確な検出法とはいえない。このため最近の報告では特異マーカーでない表面抗原を組み合わせて測定することが多い<sup>18,35,36)</sup>が、正確な検出法は未だ確立されていない。

そこで著者はDC therapyに必要な骨髄系樹状細胞の表面形質に関して従来の知見<sup>13,14,15,19)</sup>を検討したところ、骨髄系樹状細胞はHLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup>細胞として同定できると考えた。本研究は簡便で正確な末梢血骨髄系樹状細胞検出法としてHLA-DR/

CD33/CD14・CD16・CD34染色法を考案しその有用性を検討した。

まずフローサイトメトリー法では通常1万個程度の細胞測定で解析されることが多いが、本法では少数の細胞集団である末梢血樹状細胞を同定するために、1サンプルあたり10万個の単核細胞を測定した。HLA-DR/CD33/CD14・CD16・CD34染色法でHLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup>の大半を占めるCD14<sup>+</sup>単球とCD16<sup>+</sup>単球とを同定できたが、10万個の単核細胞を測定することでさらにHLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup>領域に細胞集団を同定できた。このように測定細胞数を増加することで少数細胞の同定を可能にしたが、測定細胞数の増加は同定細胞集団中に細胞片や他細胞の混入を増加させる可能性も考えられるので同定細胞集団をさらに詳細に検討した。まずHLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup>領域の細胞をFSC/SSC 2パラメーター表示に展開すると、HLA

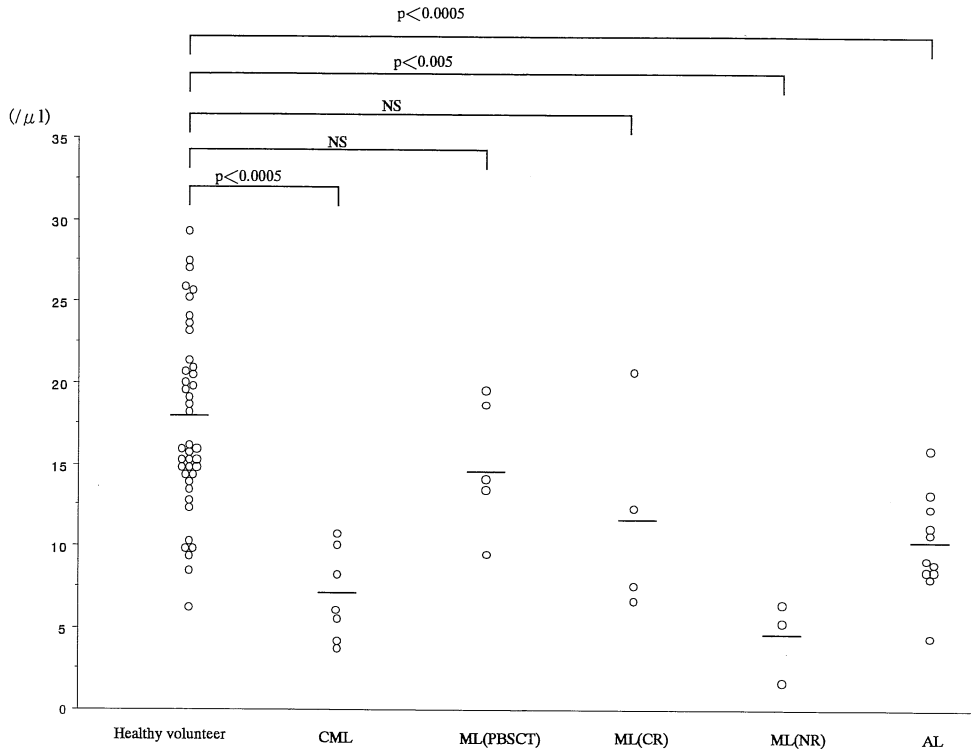


Fig. 5. Absolute numbers of peripheral blood dendritic cells  
 CML : chronic myelogenous leukemia, ML : malignant lymphoma, AL : acute leukemia, PBSCT : peripheral blood stem cell transplantation, CR : complete remission, NR : no remission

-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> 細胞はリンパ球集団と単核球集団との中間の位置に表示された。これは従来から報告されている末梢血骨髓系樹状細胞の形態学的な特性に合致していた。また測定細胞中に赤血球や細胞片が存在すればFSC値の小さい領域にドットとして表示されるが、このようなドットは表示されず赤血球や細胞片の混入はほとんどないと考えられた。またHLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> 領域の細胞はCD33<sup>bright</sup>とCD33<sup>dim</sup>との2個の細胞集団として表示されたが、Thomasら<sup>20)</sup>は末梢血中にはCD33<sup>bright</sup>樹状細胞とCD33<sup>dim</sup>樹状細胞とがあると報告しており、それらの細胞に相当する細胞集団と考えられた。そこでこれらの細胞集団の表面形質を検討し従来から知られている骨髓系樹状細胞の表面形質と比較すると、リンパ球のlineage markerであるCD3, CD19, CD56が陰性、CD2, CD4は陽性、CD5は弱陽性、接着分子ではCD11a, CD11c,

CD44, CD18は陽性、CD11bが陰性~弱陽性、アクセサリ分子としてCD80, CD83は陰性、CD86は陽性、またCD1aは陰性で、従来報告されている末梢血骨髓系樹状細胞の特性に合致していた<sup>14,15,17,19,20,21)</sup>。以上から本法で測定されるHLA-DR<sup>+</sup> CD33<sup>+</sup> CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup>細胞は末梢血骨髓系樹状細胞と考えられた。

次に免疫染色のサンプル処理法の単核球分離法と全血法とを検討した。単核球分離法は単核球を分離した後わずかに混入する赤血球を溶血し、単核球のみを免疫染色する方法であるが、免疫染色前の分離操作や溶血操作で表面抗原が影響を受ける可能性が考えられる。全血法では全血を免疫染色後に赤血球を溶血するためそのような影響はないが、大量の赤血球を溶血するため赤血球やその細胞片が残存しやすいという欠点がある。赤血球や細胞片の混入は測定誤差の原因になり、特に樹状細胞のような少数細胞の測定時には影響が大きい。従来末梢血樹



状細胞比率は0.75~3%<sup>18,21,35,36)</sup>とされているが、赤血球や細胞片などが混入するためのみかけ上の増加による測定誤差があると考えられる。そこでFicoll比重液を用いた単核球分離操作の樹状細胞表面抗原に対する影響を調べるため、骨髄系樹状細胞の各種表面抗原の陽性率やMFIを単核球分離法と全血法とで比較した結果、二つの方法で検討した全ての表面抗原の陽性率やMFIに有意差は認めず、単核球分離操作による表面抗原への影響はみられなかった。従って骨髄系樹状細胞測定時の免疫染色には赤血球や細胞片の混入が少なくより正確な測定が可能な単核球分離法を使用すべきであると考えられた。

以上から単核球分離法と5種類のモノクローナル抗体とを同時に使用した3カラーフローサイトメトリー法を用い1サンプルあたり10万個の単核細胞を測定すればDC therapyに必要な末梢血骨髄系樹状細胞を正確に検出できると考えられた。そこで実際に本法を用いて健常人と今後DC therapyの対象疾患となる各種造血器悪性疾患患者とを対象に末梢血骨髄系樹状細胞数を測定した。健常人41例を検討したところ、末梢血骨髄系樹状細胞の比率は $0.74 \pm 0.17\%$ 、絶対数は $17.54 \pm 5.80$ 個/ $\mu\text{l}$ であった。この値を正常値として各種造血器悪性疾患患者の末梢血骨髄系樹状細胞を検討した。従来、固形腫瘍患者や造血幹細胞移植後では末梢血樹状細胞比率が減少していると報告<sup>18,36,37)</sup>されていたが、本法を用いた検討でも造血器悪性疾患で減少傾向がみられた。慢性期CMLで有意に比率と絶対数とが減少していた。CMLは造血幹細胞レベルでの腫瘍で骨髄系の各細胞に分化するが、患者末梢血樹状細胞はCML細胞であることが報告<sup>3)</sup>されており、ヒドロキシウレアやインターフェロンによる治療の影響も減少の理由として考えられた。悪性リンパ腫の初発や再発例でも従来の固形腫瘍の報告に合致して末梢血樹状細胞は減少していたが、寛解例では増加傾向がみられた。さらに自己末梢血幹細胞移植後寛解を維持している悪性リンパ腫では経過中に無菌性髄膜炎を合併した1例を除き比率は高値であった。最近、造血幹細胞移植は免疫療法の見地から再評価<sup>38,39)</sup>されているが、自己末梢血幹細胞移植後の末梢血樹状細胞の増加は残存微小腫瘍の排除に寄与している可能性も考えられ、末梢血幹細胞移植の免疫療法としての意義を示唆するものと考えられた。これに対し急性白血病では寛解例でも明らかな減少がみられ、治療後の免疫抑制が遷延している可能性が考えられた。今後DC therapyに多数の樹状細胞を使用するには血液成分分離装置を用いて患者末梢血から多数の単核球をアフレーションする必要があるが、末梢血樹状細胞の減少がみられるこれらの患者ではより多く

の末梢血を処理する必要性が示唆された。したがって今後より詳細に末梢血骨髄系樹状細胞数の臨床経過にともなう変動を検討し、採取至適時期を明らかにしていく必要があると考えられた。

さらに本法を用いた4カラー染色で健常末梢血骨髄系樹状細胞の表面抗原を解析したが、従来報告されている表面抗原に加えCD25、CD40、CD40L、CD49a、CD54、CD62L、CD64抗原の発現を検討した。CD25はインターロイキン2受容体で $\alpha$ 鎖であるが陰性であった。CD40は成熟樹状細胞に発現し、CD40リガンド(CD40L)刺激でインターロイキン12の産生を促すことが知られているが、末梢血樹状細胞は陰性であった。接着分子であるCD49aは陰性、CD54、CD62Lは弱陽性から陽性、高親和性Fc $\gamma$ レセプターであるCD64は弱陽性であった。今後、本法を用いてさまざまな病態での樹状細胞の表面形質を比較検討していく必要があると考えられた。

以上、本研究は簡便で正確な末梢血骨髄系樹状細胞検出法の確立を目的にフローサイトメトリー法を用いた樹状細胞検出法を考案した。特異マーカーのない末梢血樹状細胞であるが、本法では複数のマーカーを組み合わせることで正確な測定を可能にした。今後本法を用いて樹状細胞数を測定することでよりきめの細かい免疫療法が可能になると考えられた。また本法は正確な末梢血骨髄系樹状細胞数を簡便に測定するだけでなく、4カラーフローサイトメトリー法を用いて骨髄系樹状細胞の表面形質の詳細な検討を可能にした。今後は各種病態の骨髄系樹状細胞の詳細な検討にも利用できると考えられた。末梢血樹状細胞の研究は現在盛んで、DC therapyも今後広く行われるものと考えられるが、本法は今後の樹状細胞研究やDC therapyの発展に貢献するものと考えた。

## 結 語

本研究はフローサイトメトリー法による末梢血骨髄系樹状細胞の簡便で正確な検出法を確立する目的で行った。

1. 3カラーフローサイトメトリー法を用いてHLA-DR<sup>+</sup>/CD33<sup>+</sup>/CD14<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup>細胞にゲートを設定し、10万個の採取細胞を測定することにより、骨髄系樹状細胞と考えられる細胞集団を明確に同定し測定することができた。

2. この細胞集団の表面形質はCD1aが陰性、リンパ球のlineage markerであるCD3、CD19、CD56が陰性、CD2、CD4は陽性、CD5は弱陽性、接着分子ではCD11a、CD11c、CD44、CD18は陽性、CD11bが陰性~弱陽性、アクセサリー分子ではCD80、CD83は陰性、CD86は陽性であり、従来報告されている末梢血骨髄系

樹状細胞の特性に合致していた。またそれ以外の表面形質では CD25, CD40, CD40a は陰性, CD54, CD62L は弱陽性から陽性, CD64 は弱陽性であった。

3. 骨髄系樹状細胞の各種表面抗原の陽性率や MFI を単核球分離法と全血法とで比較した。両者間で全ての表面抗原の陽性率や MFI に有意差は認めず, サンプル処理には細胞片等の混入が少なくより正確に測定が可能な単核球分離法を使用すべきであると考えられた。

4. 本法で健常者 41 例の末梢血骨髄系樹状細胞を測定した。結果, 比率は  $0.74 \pm 0.17\%$ , 絶対数は  $17.54 \pm 5.80$  個/ $\mu\text{l}$  であった。

5. 各種造血器悪性疾患患者では慢性期 CML, 初発もしくは再発の悪性リンパ腫, 急性白血病の寛解期の骨髄系樹状細胞比率が減少し, 免疫監視機能の低下が示唆された。また自己末梢血幹細胞移植後の悪性リンパ腫患者では骨髄系樹状細胞比率は増加し, 末梢血幹細胞移植の免疫療法としての意義が示唆された。

以上, フローサイトメトリー法を用いた末梢血骨髄系樹状細胞検出法を新たに考案した。本法を用いて健常人での骨髄系樹状細胞の正常値を明らかにし, さらに造血器悪性疾患患者末梢血では骨髄系樹状細胞比率が減少していること, また自己末梢血幹細胞移植後の寛解例では骨髄系樹状細胞の割合が増加しているという新しい知見を得た。本法は正確な末梢血骨髄系樹状細胞数を簡便に正確に測定可能で, 今後の樹状細胞研究や DC therapy の発展に貢献するものと考ええる。

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を戴いた内科学第 2 講座成田亘啓教授に心から感謝の意を表しますとともに, 御校閲を賜りました小児科学講座吉岡章教授ならびに泌尿器科学講座平尾佳彦教授に深謝申し上げます。さらに本研究の遂行にあたって終始御指導戴いた内科学第 2 講座森井武志博士に心から感謝いたします。また御協力を賜った第 2 内科学教室諸兄姉に感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) Steinman, R. M. : The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9** : 271-296, 1991.
- 2) Hsu, F. J., Benike, C., Fagnoni, F., Liles, T. M., Czerwinski, D., Taidi, B., Engleman, E. G. and Levy, R. : Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Med.* **2** : 52-58, 1996.
- 3) Choudhury, A., Gajewski, J. L., Liang, J. C., Popat, U., Claxton, D. F., Kliche, K. O., Andreeff, M. and Champlin, R. E. : Use of leukemic dendritic cells for the generation of antileukemic cellular cytotoxicity against Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* **89** : 1133-1142, 1997.
- 4) Fujii, S., Shimizu, K., Fujimoto, K., Kiyokawa, T., Shimomura, T., Kinoshita, M. and Kawano, F. : Analysis of a vaccinated chronic myelogenous leukemia patient with leukemic dendritic cells following autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Jpn. J. Cancer Res.* **90** : 1117-1129, 1999.
- 5) Nestle, F. O., Aljagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G. and Schadendorf, D. : Vaccination of melanoma patients with peptide-or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nature Med.* **4** : 328-332, 1998.
- 6) Reichardt, V. L., Okada, C. Y., Liso, A., Benike, C. J., Stockerl-Goldstein, K. E., Engleman, E. G., Blume, K. G. and Levy, R. : Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma a feasibility study. *Blood* **93** : 2411-2419, 1999.
- 7) Wen, Y. J., Ling, M., Bailey-Wood, R. and Lim, S. H. : Idiotypic protein pulsed adherent peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells prime immune system in multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* **4** : 957-962, 1998.
- 8) Siena, S., Bregni, M., Brando, B., Belli, N., Ravnani, F., Gandola, L., Stern, A. C., Landsdrop, P. M., Bonadonna, G. and Gianni, A. M. : Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood* **77** : 400-409, 1991.
- 9) Zhou, L. J. and Tedder, T. F. : Human blood dendritic cells selectively express CD83, member of the immunoglobulin superfamily, *J. Immunol.* **154** : 3821-3835, 1995.
- 10) Fearnley, D. B., McLellan, A. D., Mannering, S. I., Hoek, B. D. and Hart, D. N. J. : Isolation of

- human blood dendritic cells using the CMRF-44 monoclonal antibody : implications for studies on antigen-presenting cell function and immunotherapy. *Blood* **89** : 3708-3716, 1997.
- 11) **Fearnley, D. B., Whyte, L. F., Carnoutsos, S. A., Cook, A. H. and Hart, D. N. J.** : Monitoring human blood dendritic cells numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* **93** : 728-736, 1999.
  - 12) **Hock, B. D., Fearnly, D. B., Boyce, A. McLellan, A. D., Sorg, R. V., Summers, K. L. and Hart, D. M.** : Human dendritic cells express a 95 kDa activation/differentiation antigen defined by CRMF-56. *Tissue Antigens* **53** : 320-334, 1999.
  - 13) **Thomas, R., Davis, L. S. and Lipsky, P. E.** : Isolation and characterization of human peripheral blood dendritic cells : *J. Immunol.* **150** : 821-834, 1993.
  - 14) **Takamizawa, M., Rivas, A., Francesco, F., Benike, C., Kosek, J., Hyakawa, H. and Engleman, E. G.** : Dendritic cells that process and present nominal antigens to native T lymphocytes are derived from CD2<sup>+</sup> precursor. *J. Immunol.* **158** : 2134-2142, 1997.
  - 15) **O'doherty, U., Peng, M., Gezelter, S., Swiggrd, W. J., Betjes, M., Bhardwaj, N. and Steinman, R. M.** : Human blood contains two subsets of cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* **82** : 487-493, 1994.
  - 16) **Fanger, N. A., Voigtlaender, D., Liu, C., Swink, S., Wardwell, K., Fisher, J., Graziano, R. F., Pfefferkorn, L. C. and Guyre, P. M.** : Characterization of expression, cytokine regulation, and effector function of the high affinity IgG receptor function of the high affinity IgG receptor Fc  $\gamma$  RI(CD64) expressed on human blood dendritic cells. *J. Immunol.* **158** : 3090-3098, 1997.
  - 17) **Strobl, H., Scheinecker, C., Riedl, E., Csmarits, B., Bello-Fernandez, C., Pickl, W. F., Majdic, O. and Knapp, W.** : Identification of CD68<sup>+</sup> lin<sup>-</sup> peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics. *J. Immunol.* **161** : 740-748, 1998.
  - 18) **Savary, C. A., Graziutti, M. L., Melichar, B., Przepiorka, D., Freedman, R. S., Cowart, R. E., Cohen, D. M., Anaissie, E. J., Woodside, D. G., McIntyre, B. W., Pierson, D. L., Pellis, N. R. and Rex, J. H.** : Multidimensional flow - cytometric analysis of dendritic cells in peripheral blood of normal donors and cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* **45** : 234-240, 1998.
  - 19) **Hart, D. N. J.** : Dendritic cells : unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* **90** : 3245-3287, 1997.
  - 20) **Thomas, R. and Lipsky, P. E.** : Human peripheral blood dendritic cell subsets ; Isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells. *J. Immunol.* **153** : 4016-4028, 1994.
  - 21) **McCarthy, D. A., Macey, M. G., Bedford, P. A., Knight, S. C., Dumonde, D. C. and Brown, K. A.** : Adhesion molecules are upregulated on dendritic cells isolated from human blood. *Immunology* **92** : 244-251, 1997.
  - 22) **Reid, C. D. L., Stackpole, A., Meager, A. and Tikerpae, J.** : Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34<sup>+</sup> progenitors in human bone marrow. : *J. Immunol.* **149** : 2681-2688, 1992.
  - 23) **Inaba, K., Young, J. W. and Steinman, R. M.** : Direct activation of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. *J. Exp. Med.* **166** : 182-194, 1987.
  - 24) **Brossart, P. and Bevan, M. J.** : Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells : Pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* **90** : 1594-1599, 1997.
  - 25) **Nieda, M., Nicol, A., Kikuchi, A., Kashiwase, K., Taylor, K., Suzuki, K., Tadokoro, K. and Juji, T.** : Dendritic cells stimulate the expansion of bcr-abl specific CD8<sup>+</sup> T cells with cytotoxic activity against leukemic cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* **91** : 977-983, 1998.
  - 26) **Shurin, M. R.** : Dendritic cells presenting tumor

- antigens. *Cancer Immunol. Immunother.* **43** : 158-164, 1996.
- 27) **Gabrilovich, D. I., Chen, H. L., Girgis, K. R., Cunningham, H. T., Meny, G. M. M., Nadaf, S., Kavanaugh, D. and Carbine, D. P.** : Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nature Med.* **2** : 1096-1103, 1996.
- 28) **Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravsov, V., Nadaf, S. and Carbone, D. P.** : Vascular endothelial growth factor affects dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineage in vivo. *Blood* **92** : 4150-4166, 1998.
- 29) **Steinman, R. M. and Cohn, Z. A.** : Identification of novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* **137** : 1142-1162, 1973.
- 30) **Freudenthal, P. S. and Steinman, R. M.** : The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** : 7698-7702, 1990.
- 31) **McLellan, A. D., Starling, G. C. and Hart, D. N. J.** : Isolation of human blood dendritic cells by Nycodenz discontinuous gradient centrifugation. *J. Immunol. Methods* **184** : 81-89, 1995.
- 32) **Young, J. W. and Steinman, R. M.** : Accessory cell requirements for the MLR and polyclonal mitogens, as studied with a new technique for enriching blood dendritic cells. *Cell. Immunol.* **111** : 167-182, 1988.
- 33) **Van, V. W. C., Hair, L. S., Steinman, R. M. and Kaplan, G.** : Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *J. Exp. Med.* **155** : 1172-1187, 1982.
- 34) **Patterson, S., Helbert, M., English, N. R., Pinching, A. J. and Knight, S. C.** : The effect of AZT on dendritic cell number and provirus load in the peripheral blood of AIDS patients : A preliminary study. *Res. Virol.* **147** : 109-114, 1996.
- 35) **Macey, M. G., McCarthy, D. A., Vogiatzi, D., Brown, K. A. and Newland, A. C.** : Rapid flow cytometric identification of putative CD14<sup>-</sup> and CD64<sup>-</sup> dendritic cells in whole blood. *Cytometry* **31** : 199-207, 1998.
- 36) **Melichar, B., Savary, C., Kudelka, A. P., Verschraegen, C., Kavanagh, J. J., Edwards, C. L., Platsoucas, C. D. and Freedman, R. S.** : Lineage-negative human leukocyte antigen-DR<sup>+</sup> cells with the phenotype of undifferentiated dendritic cells on patients with carcinoma of the abdomen and pelvis. *Clin. Cancer Res.* **4** : 799-809, 1998.
- 37) **Gabrilovich, D. I., Corak, J., Ciernik, I. F., Kavanaugh, D. and Carbone, D. P.** : Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **3** : 483-490, 1997.
- 38) **Passweg, J. R., Tiberghien, P. and Cahn, J. Y.** : Graft-versus-leukemia effects in T lineage and B lineage acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* **21** : 153-158, 1998.
- 39) **Eilb, B., Schwaighofer, H., Nachbaur, D., March, C., Gachter, A., Knapp, R., Bock, G., Gassner, C., Schiller, L., Petersen, F. and Niederwieser, D.** : Evidence for a graft-versus-tumor effect in a patient treated with marrow ablative chemotherapy and allogeneic bone marrow transplantation for breast cancer. *Blood* **88** : 1501-1508, 1996.