

Pedunculagin의 NK cell에 대한 활성화와 흑색종의 전이 억제 효과

이도익* · 김형근 · 이민원 · 최영욱 · 김하형 · 김은주*

중앙대학교 약학대학, *한국화학연구소

(Received March 13, 2000)

Enhancement of NK Cytotoxicity and Antitumor Effect on Melanoma by pedunculagin

Do Ik Lee[#], Hyung Keun Kim, Min Won Lee, Young Wook Choi,
Ha Hyung Kim and Eun Joo Kim*

College of Pharmacy, Chungang University, Seoul 156-756, Korea

*Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 305-606, Korea

Abstract — Pedunculagin is an ellagitannin purified from *Alnus hirsuta* var. *microphylla*, *Betulaceae*. The effects of pedunculagin on immune system have been characterized to induce enhancement of NK (natural killer) cell cytotoxicities against tumor cells. Here, we report the evaluation of the effects of pedunculagin on the growth of murine B16-F10 melanoma *in vivo*. After the intradermal inoculation of B16-F10 melanoma, B16-F10 tumors grew progressively in immunocompetent syngenic C57BL/6 mice. The mice treated with pedunculagin (10 mg/kg, every 48 hrs) resulted in a significant improvement in survival. Inhibitory effects of pedunculagin on lung metastasis in C57BL/6 mice were also detected. Summarizing treatment with pedunculagin has a significant antitumor effect upon B16-F10 murine melanoma.

Keywords □ Pedunculagin, Melanoma, NK cell, Metastasis.

식물에서 추출된 물질에서 tannin의 항암작용이 알려져 있으며 본 실험에서는 식물에서 정제된 ellagitannin의 일종인 pedunculagin(2,3,4,6,-(s)-HHD(P-hydroxydephenoyl)-D-glucose, M.W.=784.55)의 효과를 측정하였다. Pedunculagin compound는 오리나무(*Alnus hirsuta* var. *microphylla*, *Betulaceae*)에서 정제¹⁾된 ellagitannin으로서 본 연구자가 소속된 연구실에서 몇 년 전부터 항암 및 면역부활작용이 있음을 일부 발표하였다.^{2,3)}

본 연구에서는 pedunculagin이 면역반응 특히 NK cell에 미치는 영향과 melanoma에 대한 직접적 억제 및 전이 억제에 대한 실험을 하였다.

NK cell은 면역학자들이 쥐에서의 tumor-specific CTL을 측정하는 과정에서 아주 우연히 발견되었다.⁴⁾ Control group에서 나타나는 의외의 tumor lysis의 원인으로 지목되었던 큰 과립구성 림프구(large granule lymphocyte : LGL)가 바로 NK cell이다. NK cell은 혈액을 따라 순환하는 림프구의 약 5~10%에 이르며 viral immunity와 암에 대한 방어막의 역할을 한다고 알려져 있다.

NK 세포군의 연구에 의하면, NK 세포는 세포표면 형질에 있어서 다양한 세포 군으로 이루어져 있다고 알려져 있다. NK 세포의 활성화는 말초 혈액에서 뿐만 아니라, spleen에서도 나타나는데 lymph node, bone marrow, thymus에 있어서의 활성화는 훨씬 낮다. NK 세포에 의해 인식되는 표적구조는 아직 동정되고 있지 않지만, 그 중에는 넓은 분포를 보이는 것과 비교적

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-820-5608 (팩스) 02-822-1469

국한해서 발현되고 있는 것이 있는 것으로 추정된다. NK 세포에 대한 감수성은 MHC분자와 같은 정상세포 표면항원의 소실과도 관계되어 있는 것 같다.⁵⁾ 이것은 interferon(IFN)같은 세포 표면의 MHC항원의 발현을 증강하는 물질과 함께 배양된 세포는 NK 세포의 세포독성에 저항성을 보이는 것에 의해 알 수 있다. 이와 같은 NK 세포와 표적세포의 결합에는 membrane structure가 관여하는 것은 틀림없다. NK 세포에 대한 감수성은 세포의 분화상태나 세포막 상해의 복구능력의 정도에 의한 것으로 생각된다.

NK cell은 tumor cell과 virus infected cell을 cytotoxic T lymphocyte(CTL)-mediated lysis와 유사한 과정에 의해 제거한다. NK cell이 표적세포에 부착한 후 perforin-containing granules의 분출이 일어나 표적세포에 상해를 입힌다.⁶⁾ NK cell은 또한 apoptosis에 의한 표적세포 파괴를 중재하는 것처럼 보인다.⁷⁾ NK cell에 의해 분비되는 TNF- α 를 포함하는 많은 독성 물질들이 apoptosis과정을 유발할 지도 모른다.⁸⁾ 이러한 유사점에도 불구하고 NK cell은 몇몇 중요한 방식에서 CTLs와 차이가 난다. NK cell은 antigen-specific-T-cell receptor 혹은 CD3를 분비하지 않으며, 게다가 NK cell의 표적세포 인식은 MHC에 국한되지 않는다는 점이다. 이로 인해 syngeneic과 allogeneic tumor cells에서 같은 수준의 NK cell 활성이 나타난다. 또한 이전의 priming이 CTL활성을 강화한다고 하더라도 같은 tumor cell에 대해 두 번째 이후부터의 투여는 NK cell활성의 증가에 도움을 주지 않는다. 그러므로 NK cell반응은 어떠한 immunologic memory도 일으키지 않는다는 점도 중요한 차이점이다. 그리고 NK cell과 상호작용 하는 암세포의 구조에 관해서도 아직 밝혀지지 않았다.

NK cell은 많은 viral infection에서 초기 며칠 동안 virus-infected cells를 제거하는데 중요한 역할을 한다.⁹⁾ 이러한 활성은 반응의 초기에 나타나며 Tc cell이 functional CTLs로의 활성화, 증식, 분화하는데 필요한 시간동안 방어작용을 나타낸다.

종양의 전이는 환자의 예후를 지배하는 중요한 인자임에도 불구하고 암이 전이되는 기전의 해명, 치료상의 대응 등은 늦게 이루어지고 있다. 그 하나의 이유로써 종양의 전이를 연구하기 위한 적당한 실험계가 없었다는 것이다. 1973년에 이르러서 미국의 Fidler가 B16 melanoma로부터 고전이성의 변이 B16-F10을 단

리 하는데 성공하였다. 1995년 Sugiura에 의해서 Leu's lung cancer cell line의 수립과 Satow에 의한 rat의 복수종양계 세포의 정맥주사에 의한 폐전이 실험 등이 있다. Leu's lung cancer 계는 자발적으로 폐하에서 폐로 전이하는 암으로 이 때부터 널리 현재 까지 이용되고 있다. 그러나 이들 이외에 암전이 실험 계는 거의 없었다. 그 이후의 연구에 의해서 암은 전이능에 있어서 서로 다른 성질을 가진 집단이라고 하는 것이 증명되었으며, 이들을 근거로 하여 현재에 이르기까지 많은 실험종양계로부터 고전이성의 세포주 colon이 단리 되고 있다. 종양의 전이에는 종양세포를 정맥주사 하여 형성시키는 전이(experimental or artificial metastasis)와 종양세포를 혈관 내 이외의 부위에 이식하여 형성시키는 전이(spontaneous metastasis)가 있다. 본 실험에서는 후자를 선택하여 실험하였다.

이에 본 연구자는 면역반응 중 항원에 의존하지 않는 자연면역반응과 종양의 전이를 억제하는 효과에 초점을 맞추어 실험을 하였다.

실험방법

실험동물 - 본 연구의 실험동물로는 5주령된 C57BL/6 mouse(18~22g ♂)와 6주령된 ICR mouse(20~25g ♂)를 사용하였다. C57BL/6 mouse는 대덕 화학연구소에서 4주령된 것을 분양 받아 1주의 적응기를 거친 후 사용하였고, ICR mouse는 중앙동물에서 5주령된 것을 구입하여 역시 1주의 적응기를 거친 후 사용하였다.

재료 및 시약 - Pedunculagin($C_{34}H_{24}O_{22}$ M.W.=784.55)은 오리나무(*Alnus hirsuta* var. *microphylla*, *Betulaceae*)에서 정제한 ellagitannin으로 그 구조는 2,3,4,6-(s)-HHDP(Hexahydroxydephenoyl)-D-glucose로 되어있으며, 중앙대학교 약학대학 생약학 교실에서 제공받아 사용하였다.

본 연구에서 투여한 pedunculagin은 PBS(pH 7.2) 용액에 넣어 완전히 용해시킨 후 0.22 μ m filter로 여과 멸균하여 사용하였다.

BSA(Sigma Chem. Co., U.S.A.), DMSO(Sigma Chem. Co., U.S.A.), FBS(Gibco BRL, U.S.A.), Ficoll(Pharmacia, U.S.A.), Griess Reagent(Sigma Chem. Co., U.S.A.), MTT(Sigma Chem. Co., U.S.A.), Nylon wool(Wako, Japan.), Penicillin-Streptomycin(Gibco

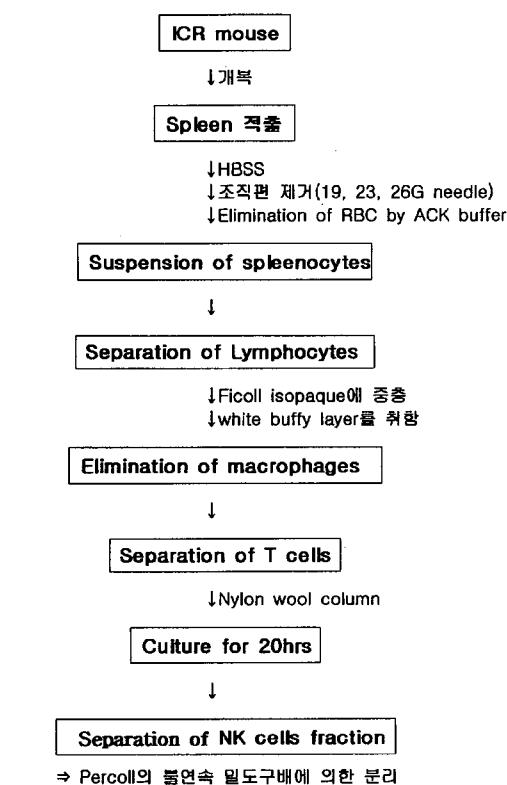
BRL, U.S.A.), Percoll(Pharmacia, U.S.A.), Recombinant IL-2(Genzyme, U.S.A.), RPMI 1640(Sigma Chem. Co., U.S.A.), Sodium nitrite(Sigma Chem. Co., U.S.A.), thioglycolate broth(Difco, U.S.A.), Trypan Blue(Sigma Chem. Co., U.S.A.), Trypsin-EDTA(Gibco BRL, U.S.A.)를 구입하여 사용하였다.

세포주 - mouse lymphoma인 Yac-1, mouse melanoma인 B16-F10 등, 총 2개의 tumor cell line을 실험에 사용하였다.

세포배양 - 위 모든 세포주는 Fetal Bovine Serum (FBS) 10%가 보완된 RPMI 1640 medium에서 1일에 2회 계대배양하였으며, 37°C, 5% CO₂, 95% air로 맞춘 CO₂-incubator에서 배양하였다. FBS는 사용 전 56°C에서 30분간 heat-inactivation시켰다.

세포현탁액 조제 - 실험에 사용되는 logarithmic phase에 도달한 tumor cells의 배양은 실험하기 24시간 전에 75 cm² screw-capped culture flask에 2~3×10⁵ cells/ml의 농도로 tumor cell을 넣어 배양시켰다(Spinner culture). 이렇게 배양한 배양액의 세포수는 24시간 후에 보통 0.8~1.0×10⁶ cells/ml이 된다. 이 세포현탁액을 신선한 medium으로 희석하여 최종농도 1~5×10⁵ cells/ml이 되도록 하였다(Run bottle).

NK Cell Separation - 6주령(20~25g ♂)된 ICR mouse를 경구 탈취로 급살 시킨 후, 무균적으로 비장을 취한다. Rushed-ice위에 정치시킨 HBSS 5 mL를 넣은 60 mm petri dish에 옮긴 후 잘게 부수어 균일한 부유액을 만들고, 비장 한 개 분에 대해 ACK buffer 5 mL를 가하여 RBC를 제거한다. 500g에서 20분간 원심분리하고 washing하여 비장세포 현탁액을 만들어 PBS로 일정한 농도가 되도록 조절한다. 이 비장세포 현탁액을 인간 임파구용 ficoll isopaque를 이용하여 lymphocyte를 분리하고, 이것을 다시 T cell 분리용 nylon wool column으로 T lymphocyte를 분리한다. 이렇게 분리된 T lymphocyte의 농도를 8×10⁷ cell/mL로 조절하고 percoll의 불연속 밀도 구배를 이용하여 NK cell들을 분리한다. 이 때 T lymphocyte 현탁액은 자발적인 aggregation을 막기 위해 적어도 4시간동안 4°C를 유지시켜야 한다. Percoll의 불연속 밀도 구배는 100% percoll을 10%-FBS를 포함한 RPMI 1640 배지로 각각 70, 65, 60, 57.5, 55, 50%로 희석한다. 희석된 percoll 용액을 15 mL



Scheme 1 - Separation step of NK cells form mouse spleen.

튜브에 70%를 제일 먼저 넣고 차례로 살며시 넣는다. 이때 50% 용액이 제일 위층에 오게 된다. Nylon wool을 통과시킨 세포액을 불연속 밀도 구배 제일 위층에 살며시 넣고 550g에서 30분간 원심분리한다. NK cell은 두 번째(55%) 층과 세 번째(57.5%) 층에 풍부하므로 그 부분을 살며시 떠낸다. 여기에 배지를 첨가하여 200g에서 10분 원심분리하고 resuspension 시킨다.

이것을 원하는 농도로 희석하여 실험에 사용하였다 (Scheme 1).

NK cell Antitumor Activity - ICR mouse의 spleen으로부터 위에 기술한 방법으로 NK cell을 추출하여 원하는 농도로 희석하고 희석된 세포를 96 well plate에 well당 1×10⁵개의 cell을 넣은 후 약물을 대조군은 D-PBS buffer, 실험군은 1, 10, 100 µg/mL의 농도로 투여하였으며, positive control로는 IL-2가 1000 U/mL가 되도록 처리하였다. 이것을 effector cell로 사용하였다. 이렇게 처리한 NK cell과 target cell인 Yac-1의 비율을 20 : 1이 되도록 하였고

이때 Yac-1은 미리 배양하여 log phase에 도달된 것을 사용하였다. 이 때 각 well의 총 부피를 200 μ L로 하였다. 이것을 함께 20시간 동안 CO₂ incubator에서 배양한 다음 MTT assay로 NK cell의 활성을 측정하였다.

MTT Assay - MTT assay는 세포의 생존 능력, 증식성, 활성 등을 측정할 수 있는 분석방법으로 감도가 뛰어나고 정량이 가능하며 믿을 수 있는 색조 측정 분석법이다.¹⁰⁾ 이 분석법은 노란색의 수용성 기질인 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 진청색의 비수용성인 Formosan 물질로 변화시킬 수 있는 살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase의 능력을 이용한 방법이다. 생성된 formazan의 양은 살아있는 세포 수에 비례한다.¹⁰⁻¹³⁾ MTT로 얻은 결과는 ³[H]-thymidine uptake 분석법에서 얻은 결과와 동일하다. MTT 분석법은 분화는 하지 않지만 여전히 살아있는 세포의 검출에 특히 유용하다. 그러므로 이 분석법은 증식과 세포 활성을 구분하는 데에도 사용할 수 있다.¹³⁾ 이 기술은 multiwell scanning spectrophotometer(microELISA reader)를 사용할 경우 매우 정확하게 많은 양의 시료를 처리할 수도 있다.

MTT 분석법은 반응의 최고 속도를 측정함으로써 세포활성을 정량화 하는 데에도 사용될 수 있다.¹³⁾ 주어진 세포 활성의 두 상을 비교하기 위한 다른 방법으로는 살아있는 세포와 같은 양만큼 생성된 MTT formazan의 측정으로 가능하다.

Inhibitory effects on Melanoma metastasis - C57BL/6 mouse(5weeks, ♂)를 각 실험군 당 5마리씩을 준비하고 이식시킬 세포인 B16-F10 mouse melanoma cell을 log phase로 배양하여 이식하기 36~48시간 전에 세포 배양액을 새로운 배지와 1:1(volume:volume)로 만들어 세포의 성장을 최적화시켰다. 이식시킬 C57BL/6 mouse는 weight를 측정하여 기록하고 최적화된 B16-F10을 PBS 용액으로 적당한 농도로 희석하여 5×10^5 cells/mouse를 C57BL/6 mouse(5weeks, ♂)의 이식부위인 오른쪽 앞발바닥에 injection하여 이식하였다. 이식하는 세포의 총 부피는 0.02 mL가 되도록 조절하였다. 암세포를 이식한 후 발바닥에 종양의 크기가 7~8 mm(보통 18~20일 후)가 되었을 때 발목을 절단하고 70% EtOH 습으로 세계 눌러 지혈을 시켰다. 이 후 약물

은 복강주사로 하였으며, 대조군은 D-PBS buffer를 0.1 mL 투여하였고 실험군은 각각 1, 5, 10 mg/kg을 72시간 간격으로 3주간 투여하였다. 약물의 양은 0.1 mL이 되도록 조정하였다. 마지막 약물 투여 3일 후 mouse의 무게를 측정한 후 흉부를 절개하여 폐를 적출 하여 폐에 전이되어 나타나는 종양 colony의 수를 측정하였다.

통계처리 - 실험 결과는 평균치와 실험에 대한 standard error를 계산하였고, 대조군과의 차이를 student T-test를 사용하여 효력을 검증하였으며, p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

실험결과 및 고찰

자연 면역반응에 관여하는 NK cell은 tumor cell을 사멸하는 immunosurveillance에 주요한 역할을 하며, 1984년 Ortaldo와 Herberman에 의하면 virus 감염 초기단계에서 virus-infected cell을 제거한다. 또한 1989년 Blanchard 등에 의하면 microbe에 대한 early defense도 가지고 있어 intracellular bacteria를 함유하는 autologous monocyte를 lysis 시킨다는 보고도 있다. 이러한 NK cell의 활성은 early defense로 7~10일 정도 후에 나타나는 T cell immunity response 전까지의 면역반응에 매우 중요한 역할을 담당한다.

본 실험은 pedunculagin이 NK cell에 미치는 영향을 알아보기 위하여 NK cell의 antitumor activity를 측정하였다.

Mouse의 spleen으로부터 NK cell을 분리하여 pedunculagin을 각각 1, 10, 100 μ g/mL의 농도로 20시간을 처리하고 여기에 NK cell과 sensitive하게 반응하는 Yac-1 cell을 target cell로 20:1이 되도록 하여 96 well plate에 함께 배양하여 antitumor activity를 MTT-assay 방법으로 측정하였다. 그 결과, 10, 100 μ g/mL의 농도에서 대조군에 비해 각각 20.81, 24.76%의 cytotoxicity가 유의성 있게 증가하였다. 이는 pedunculagin이 NK cell에도 직접적으로 영향을 미쳐 antitumor activity를 증강시킨다는 것을 의미한다(Fig. 1).

Pedunculagin이 *in vivo*에서는 NK cell에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해서 pedunculagin을 각

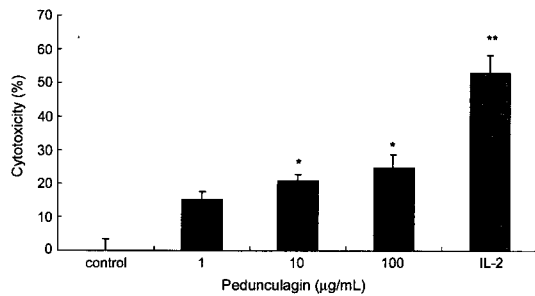


Fig. 1 – Effects of pedunculagin on cytolytic activity of NK cells *in vitro*. NK cells were cultured with Yac-1 target cells in the presence or absence of pedunculagin for 20 hr at 37°C in humidified, 5% CO₂ incubator. After culture, NK cytotoxicity was evaluated using a MTT assay as described Materials and Methods. The Effect cell : Target cell ratio was 20 : 1 (**p<0.01, *p<0.05)

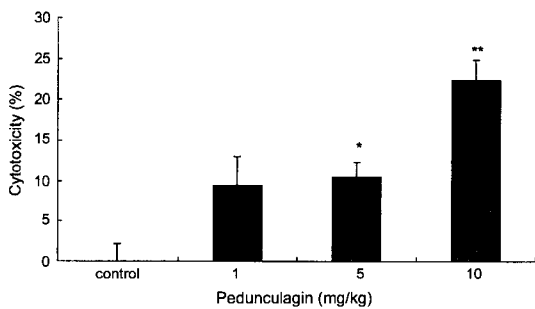


Fig. 2 – Enhancement of NK cytotoxicity in mice treated with pedunculagin. To examine NK activity *in vivo*, various concentrations of pedunculagin were injected i.p.. After 20 hrs later, NK cells were isolated from spleen and used to determine NK cytotoxicity. The Effect cell : Target cell ratio was 20 : 1 (**p<0.01, *p<0.05).

각 1, 5, 10 mg/kg의 용량으로 투여하고 20시간 후에 NK cell을 분리하여 Yac-1 cell과 20:1이 되도록 하여 96 well plate에 함께 20시간을 더 배양하여 antitumor activity를 MTT-assay 방법으로 측정하였다. 그 결과 *in vitro*에서와 마찬가지로 5, 10 mg/kg에서 대조군에 비해 각각 10.34%, 22.41%씩 cytotoxicity가 유의성 있게 증가하였다(Fig. 2).

이렇게 활성화된 NK cell은 직접적으로 tumor cell에 작용하기도 하지만 특별한 cytokine을 분비하여 다른 면역세포에도 영향을 미친다. 특히 NK cell이 분비하는 것으로 알려진 IL-1과 INF-γ 등은 macrophage를 활성화시키며, macrophage는 이에 자극을 받아 INF-α, β 등을 분비하여 다시 NK cell을 활성화시키는

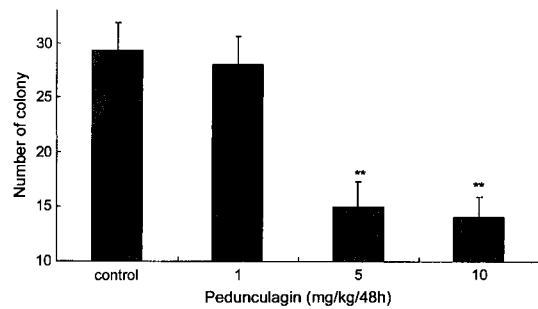


Fig. 3 – Inhibition of lung metastasis in mice treated with pedunculagin. Mice were injected s.c. with 5×10^5 B16-F10 melanoma cells. After treatment with pedunculagin in various doses (every 48 hr), each group of mice was killed on day 21, and the lung metastasis were evaluated. Suppression of metastasis was detected (**p<0.01).

cytokine network를 형성하게 되는 것으로 보인다.

본 실험에서는 pedunculagin이 고형종양의 생명연장 효과 검색에서 매우 뛰어난 효과를 보임으로써 pedunculagin의 종양의 전이억제 효과를 검색해 보기로 하고, mouse의 우측 앞발에 B16-F10을 이식한 후 위에 기술한 방법으로 pedunculagin을 농도별로 복용 투여 해 봄으로써 전이억제력을 알아보았다.

그 결과, 1 mg/kg에서는 별 효과가 나타나지 않았으나 5 mg/kg과 10 mg/kg에서는 대조군에 비해 각각 48.6, 52.05%의 전이 억제력이 유의성 있게 증가된 것으로 나타났다(Fig. 3).

또한 위의 생명 연장 효과 검색 실험 및 NK cell 활성 실험에서 나타나는 결과로 보아 pedunculagin은 B16-F10의 전이를 억제함으로써 고형종양이 다른 장기나 기관으로 전이되지 못하게 함으로써 생명을 연장시키는 것으로 판단된다.

결 론

NK cell의 antitumor activity 실험에서 *in vivo*와 *in vitro*에서 모두 활성의 증가가 나타났으며 metastasis를 억제하는데도 NK cell의 활성 증가가 중요한 역할을 담당하는 것으로 보인다.

Melanoma의 metastasis 저해 실험에서도 생명연장 효과에서와 마찬가지로 1 mg/kg을 투여 시 유의성이 없는 것으로 나타났고, 5, 10 mg/kg 투여 시에는 melanoma의 폐로의 전이에 대해 유의성 있는 저해

효과가 나타났다. 이 결과도 역시 위의 실험 결과와 무관하지 않은 것으로 판단된다. 이는 pedunculagin이 생체 내에서 암세포의 성장을 직접 억제하기도 하지만 NK cell들을 비롯한 면역계의 세포들에 영향을 미쳐 면역을 증강시킴으로써 면역계 세포로 하여금 암세포의 성장을 저해하거나 다른 장기로의 고착을 막아 전이를 억제하는 것으로 보인다.

위와 같은 실험들을 종합해 볼 때 pedunculagin이 mouse melanoma에 대해 항암효과를 나타낸다는 것은 확실하며, 그 기전은 면역계의 활성화도 깊은 관련이 있는 것 같다. 정확한 기전은 앞으로 더 세밀한 연구가 이루어져야 할 것이다.

Pedunculagin의 효과는 *in vitro*에서와 마찬가지로 *in vivo*에서도 작용하며 이는 pedunculagin이 직접 · 간접으로 면역세포에 영향을 주어 다양한 면역 조절 물질 분비를 유도하여 면역 세포들간의 상호작용에 영향을 주는 것으로 생각된다.

위의 결과로부터 pedunculagin이 직접적인 항암제로서의 가능성이 충분한 것으로 사료된다. 본 연구는 pedunculagin의 면역학적 활성화기전을 규명하고 임상적 활용에 기초 자료로 이용될 수 있을 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 보건과학기술연구개발사업의 지원과 중앙대학교 연구기자재 구입 지원 프로그램의 도움을 받은 결과로 이루어졌으며 이에 깊이 감사드립니다.

문 헌

- 1) Lee, M. W., T. Tanaka, G. Nonaka, and I. Nishioka. : Hirsutin, an ellagitannin with diarylheptanoid moiety, from *Alnus hirsuta* var. *microphylla*. *Phytochemistry* **31**, 967(1992).
- 2) 장지훈, 조장현, 김하형, 이민원, 이광표, 이도익. : Condensed Tannin (+)-Catechin의 배양 암세포주에 대한 항암효과. *Chung-Ang J. Pharm. Sci.* **8**, 85 (1994).
- 3) Chang, J. H., J. H. Cho, H. H. Kim, M. W. Lee, S. S. Han, D. I. Lee. : Antitumor Activity of Pedunculagin, One of the Ellagitannin. *Arch. Pharm. Res.* **18**, 396 (1995).
- 4) Halary, F., Peyrat, M. A., Champagne, E., Lopez, Botet, M., Moretta, A., Moretta, L., Vié, H., Fournié, J. and Bonneville, M. : Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2812 (1997).
- 5) Petersson, M., Charo, J., Salazar-Onfray, F., Noffz, G., Mohaupt, M., Qin Z, Klein, G., Blankenstein, T. and Kiessling, R. : Constitutive IL-10 production accounts for the high NK sensitivity, low MHC class I expression, and poor transporter associated with antigen processing(TAP)-1/2 function in the prototype NK target Yac-1. *J. Immunol.* **161**, 2099 (1998).
- 6) Dao, T., Mehal, W. Z. and Crispe, I. N. : IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells. *J. Immunol.* **161**, 2217 (1998).
- 7) Ross, M. E. and Caligiuri, M. A. : Cytokine-induced apoptosis of human natural killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. *Blood* **89**, 910 (1997).
- 8) Jewett, A., Cavalcanti, M. and Bonavida, B. : Pivotal role of endogenous TNF-alpha in the induction of functional inactivation and apoptosis in NK cells. *J. Immunol.* **159**, 4815 (1997).
- 9) Orange, J. S. and Biron, C. A. : An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-gamma production and antiviral defense. Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. *J. Immunol.* **156**, 1138 (1996).
- 10) J. Kuby : Cell-Mediated Immunity. : Immunology 2nd ed., W. H. Freeman and Company, New York, p. 347 (1994).
- 11) Adams, D. O. and Hamilton, T. A. : The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* **2**, 283 (1984).
- 12) Van Furth, R. : Current view on the mononuclear phagocyte system. *Immunobiology* **161**, 178 (1982).
- 13) Goud, Th. J. L. M., Schotto, C. and Furth, R. van. : Identification and characterization of the monoblast in mononuclear phagocyte colonies grown *in vitro*. *J. Exp. Med.* **142**, 1180 (1975).