

자연살해세포 조작에 따른 전이암의 전이양상 변화와 숙주면역기능에 미치는 영향

연세대학교 의과대학 외과학교실

최 승 훈

= Abstract =

Effects of Natural Killer Cell Manipulation on the Metastatic Cancer and Host Immune Response

Seung Hoon Choi, M.D.

Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

The purpose of this study was to determine the susceptibility of murine C1300 neuroblastoma to in vivo natural killer(NK) cell mediated cytolysis and to determine if NK cells influence metastasis of this tumor. The role of NK cells in controlling the metastasis of C1300 neuroblastoma to the lung was examined in A/J mice. Treatment with Interleukin-2 on days 1 through 5 after C1300 inoculation significantly decreased the tumor growth, inhibited pulmonary metastasis, and enhanced in vitro NK killing of YAC-1. Treatment with gamma Interferon on days 1 through 5 after tumor inoculation significantly inhibited pulmonary metastasis. Antitumor effects of Interleukin-2 was stronger than that of gamma Interferon.

In vivo depletion of NK cells with anti-asialo GM1 significantly enhanced tumor growth and decreased host antitumor activity. These results demonstrated that in vivo elimination of anti-asialo GM1 positive cells increased pulmonary metastasis, and in such mice, there were significant differences in metastatic potential between control and Interleukin-2, gamma Interferon treated groups.

Key Words: Neuroblastoma, Interleukin-2, Gamma interferon, Anti-asialo GM1, Metastasis

서 론

암의 전이는 암세포의 성질과 숙주의 면역기능에 영향을 받는다. 숙주의 면역기능중에서도 자연살해세포가 암의 전이를 방지하는데 중요한 역할을 한다는 것

*본 논문은 1994년도 연세대학교 학술연구비로 이루어졌음.

이 잘 알려졌다^{1,2)} 백서의 신경아세포종인 C1300은 사람의 신경아세포종과 마찬가지로 자연살해세포에 의하여 성장과 전이가 억제되며, 자연살해세포에 감수성이 높은 백서신경아세포종인 C1300은 간, 폐등으로 자연전이가 일어나지 않으나 C1300 세포종의 아종인 TBJ 신경아세포종은 자연살해세포에 감수성이 낮아 원격전이가 현저히 많다^{2,15)}. 이러한 사실을 볼때 자연살해세포는 원격전이에 중요한 역할을 한다는 것을 알

수 있다. 따라서 이러한 자연살해세포의 살해능력을 암치료에 사용하려는 시도가 여러 암치료기관에서 이루어지고 있다. T 림프구중 암세포파괴에 관여하는 것으로 또한 cytotoxic T 림프구를 들수있는데, 이것은 자연살해세포에 비하여 한정된 목표만을 공격하며 다른 물질에는 살해능력이 매우 약하거나 없으나 MHC 항체로 인지된 목표물에 대해서는 자연살해세포보다도 100배 이상의 살해능력이 있음이 알려졌다¹⁵⁾.

1983년 이후 Interleukin-2(IL-2)의 대량생산으로 면역치료가 가능하여진 현재로는 자연살해세포 및 cytotoxic T 림프구의 조작에 따른 암세포의 역동적인 변화와 숙주면역기능의 변화를 규명하는 것이 매우 중요하다고 할 수 있다. 본 연구에서는 백서신경아세포종 C1300을 이용하여 A/J 백서에 폐전이를 만들고 여기에 자연살해세포의 기능을 억제시키는 anti-asialo GM1을 주어 자연살해세포 억제제의 전이양상변화를 관찰하며 동시에 이것이 숙주의 면역기전에 미치는 변화도 아울러 조사하였다. 다음으로는 자연살해세포의 기능을 증강시키는 것으로 알려진 IL-2와 Gamma interferon(INF)을 주사하여 전이양상변화와 숙주면역기능을 조사하여 전이암의 증식에 면역기전과 숙주의 면역계작용을 규명하려 하였다.

연구 방법

1) 실험동물

A/J 백서는 원자력병원에서 구입하였으며 6~8주령의 수컷을 사용하였는데 이들은 모두 무게가 20~25 gm 이었고 모두 128마리를 사용하였다. 백서는 모두 구입한 사료와 소독된 수도물을 사용하여 사육하였다.

2) 백서신경아세포종과 종양유도

C1300 신경아세포종은 1940년대에 A/J 백서의 척수에서 자연발생한 것을 계대배양한 것으로 사람의 신경아세포종과 유사한 성질을 가진다. C1300 세포주는 ATCC에서 구입하였으며, 이세포주는 A/J 백서에서 계속적으로 이식되는 방법이나 RPMI 1640에 10% FBS, 0.03% glutamine을 첨가한 배양액으로 계대배양하였다. C1300 신경아세포종은 배양 플라스크에서 수거하여 생존율은 0.16% trypan blue로 판정하

여 95% 이상의 생존세포가 있을때 사용하였다. 100만개의 세포를 주사하여 100%에서 종양을 유도하는 것을 관찰하여 이것을 실험의 기준양으로 삼았다. 128마리의 백서는 두군으로 나누어 64마리에는 C1300 신경아세포종 100만개를 피하에 주사하여 피하종양을 유도하였고, 64마리에는 1 ml 당 500만개의 신경아세포가 되게 만들어서 미정맥(tail vein)을 통하여 26 gauge 바늘로 0.2 ml 즉 100만개씩 주입하여 폐전이된 종양을 유도하였다.

피하종양군과 폐전이종양군은 다시 각각 두군으로 나누어 한군은 in vivo 실험을 위하여 종양의 무게, 사체의 무게, 종양/사체의 비율, 비장무게 등을 비교하였고, 다른 한군은 같은 실험을 반복한후 in vitro 실험을 위하여 21일째 적출한 비장세포를 이용하여 자연살해세포의 살해능력을 측정하였다.

3) 자연살해세포능력의 조작

in vivo 실험과 in vitro 실험을 위하여 동일한 조작을 2회 반복하였다. 각각의 실험에서 피하종양과 폐전이종양의 두군은 각기 네개의 군으로 나누어 대조군, anti-asialo GM1 투여군, IL-2투여군, γ INF 투여군으로 각기 8마리씩 배정하였다. 자연살해세포의 살해능력을 없애기 위하여 백서 자연살해세포의 Monoclonal 항체인 anti-asialo GM1을 주입하는데, 이는 미정맥을 통하여 1:40 용액 0.1 ml씩 주사하였다. 대조군은 anti-asialo GM1 대신 Phosphate buffered saline을 미정맥을 통하여 주사하였다. 두군 모두 종양세포를 주사한날과 이로부터 5일, 10일, 15일째되는날 주사하여 4회 주사하였다. 자연살해세포의 살해능력을 증강시키기위해서는 IL-2와 γ INF을 사용하였다. IL-2는 하루 세차례 8시간간격으로 10만 unit씩 5일간 복강내 주입하며, γ INF은 하루 한번 10만 unit씩 5일간 복강내 주입하였다.

4) 생체실험(in vivo)결과와 분석

전체 실험동물은 종양세포를 주입한지 21일째에 희생시켜 실험결과를 얻었다. 피하종양유도군에서는 종양의 무게, 사체의 무게를 얻어 종양/사체의 비율을 얻었고 비장을 적출하여 무게를 측정하였다. 폐전이종양군에서는 흉곽을 절개하여 기관지와 함께 양측폐를 절제하고 Feket solution을 기관지내로 주입하여 폐

실질은 검은색, 전이된 종양은 흰색으로 착색시켜 육안적인 전이를 보는데, 양측폐를 5개의 소엽으로 분리한후 전이종괴의 수를 세어 통계처리한다. 이때 전 폐엽으로 전이되어 셀 수 없을 경우에는 250개로 처리하였다.

5) 림프구의 살해능력측정

비장은 무균적으로 적출하여 complete medium (CM)에 넣고 glass slide의 거친면을 이용하여 비장의 림프구를 추출하였다. 10 ml 의 주사기에 천천히 흡입하여 10분간 세워두어 비장의 표면 및 거친조직을 분리하였다. 분리한 비장림프구는 CM을 이용하여 3회 세척한후 2.5×10^5 이 되게 조정하였다. CM은 RPMI 1640에 10% fetal calf serum, 5×10^{-3} M의 2-Mercaptoethanol, 2 mM Glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM Noessential amino acid, 100 ug/mL Penicillin-streptomycin으로 구성되었다.

자연살해세포의 살해능력을 알기 위하여 YAC-1을 이용하여 4시간 Chromium release assay를 시행하였다. Chromium으로 labeling된 YAC-1 세포 10,000개에 비장림프구가 각각 100배, 20배, 4배, 0.8배가 혼합된 것을 96 well plate에 조성하고 4시간 동안 37°C, 5% CO₂의 조건에서 반응시킨후 상층액을 추출하여 gamma counter로 배출된 Chromium을 측정하여 살해능력을 계산하였다. 한 well당 최고치는 0.1 N triton X를 넣어 얻고 background는 CM을 넣어 얻었다.

% cytotoxicity의 계산방법은 다음과 같다.

$$\frac{\text{Sample counts-Background counts}}{\text{Total counts-Background counts}} \times 100$$

결 과

주사후 21일에 희생시킨 백서의 피하종양을 적출하여 종양무게와 사체무게, 종양/사체무게비율을 구하였다(Table 1). 종양의 무게는 IL-2와 anti-asialo GM1으로 치료한 군에서 $p < 0.05$ 로 유의있게 대조군에 비하여 차이가 있었다. 즉 IL-2로 치료한 군에서는 종양의 무게가 감소하였고 anti-asialo GM1을 투여한 군에서는 종양의 무게가 증가하였다. γ INF으로 치료한 군에서는 종양의 무게는 감소하였으나 통계적으로 유의있는 차이를 보이지는 않았다.

각각의 치료가 면역계에 작용하는 효과를 비교하기 위하여 희생시킨 백서의 비장을 추출하여 무게를 비교하였다(Table 2). 자연살해세포의 기능을 증가시키는 IL-2와 γ INF으로 치료한 군에서는 비장의 무게가 증가하여 이를 입증하였는데 IL-2 투여군에서 $p = 0.03$ 으로 의의가 있게 증가하였다. anti-asialo GM1 투여군에서는 $p = 0.023$ 으로 의의있게 비장의 무게가 감소하여 자연살해세포를 억제할 경우 비장의 무게가 감소함을 보였다.

폐전이를 만든 실험군에서 21일째에 희생시켜 전이부위의 수를 비교하였다(Table 3). IL-2 투여군과 γ INF 투여군에서는 전이숫자가 유의있게 감소하였다($p = 0.000$). 여기에서도 IL-2 투여군이 γ INF 투여군보다 통계적 의의는 없으나 전이수가 적음을 보였다. anti-asialo GM1 투여군에서는 전이숫자가 증가하였으나 통계적의의는 없었다.

적출한 비장림프구를 이용하여 21일째의 자연살해세포기능을 측정하였다(Table 4). 대조군, anti-asialo GM1 투여군, IL-2 투여군, γ INF 투여군에

Table 1. Results of tumor weight, carcass weight, tumor/carcass ratio

	Tumor(g)	Carcass(g)	Tumor/Carcass
Control*	2.057+/-1.335	20.36+/-2.928	0.107+/-0.071
IL-2	0.668+/-0.692**	26.68+/-1.581*	0.026+/-0.27*
γ INF	1.77+/-0.761	19.836+/-1.794	0.091+/-0.044
anti-asialo GM1	4.672+/-2.579*	20.575+/-2.276	0.238+/-0.146

* n=8 in each group

** $p < 0.05$ (vs control) * $p < 0.01$ (vs control)

Table 2. Spleen weight of each group

	Spleen weight(g)	p value (vs control)
Control*	0.204+/-0.076	
IL-2	0.293+/-0.065	0.03
γINF	0.234+/-0.050	0.259
anti-asialo GM1	0.134+/-0.023	0.023

* n=8 in each group

Table 3. Number of lung metastasis

	Metastasis	p value (vs control)
Control*	216.00+/-34.57	
IL-2	90.33+/-36.13	0.000
γINF	118.67+/-30.00	0.000
anti-asialo GM1	240.00+/-17.25	0.159

* n=8 in each group

Table 4. % cytotoxicity of natural killer cells in each group

	100:1	20:1	4:1	0.8:1
Control*	12.31+/-5.15	8.00+/-5.73	3.60+/-4.50	0.33+/-0.75
IL-2	34.08+/-15.82 ⁺	15.63+/-9.88	3.75+/-3.67	0.65+/-0.84
γINF	28.10+/-18.39	9.22+/-4.07	6.99+/-5.10	3.23+/-4.47
anti-asialo GM1	2.38+/-2.53 ⁻	0.45+/-0.52 ^{**}	0.23+/-0.26	0.20+/-0.40

* n=16 in each group

** p<0.05(vs control) ⁺p<0.01 (vs control)

서 투여군내에서는 피하종양군과 폐전이종양군간의 차이는 없어 통계처리상 각 약물투여군에 따른 차이만을 비교하였다. Effector와 Target의 비율이 100:1인 실험군에서 보면 IL-2 투여군과 γINF 투여군에서 자연살해세포의 기능은 각각 34%, 28%로 대조군의 12%에 비해서 증가하였는데 IL-2 투여군의 증가가 통계적으로 의의가 있었다. anti-asialo GM1 투여군에서는 통계적으로 의의있게 자연살해세포의 살해능력이 감소하였다. 20:1의 비율에서도 IL-2와 γINF 투여군에서는 증가하고 anti-asialo GM1 투여군에서는 감소하였으나 anti-asialo GM1 투여군에서만 통계적으로 의의가 있었다.

고 찰

1970년 이전에는 림프구는 T 림프구와 B 림프구로 나뉘었으나 자연적인 살해기능을 갖는 세포가 밝혀짐에 따라 1975년 Sweden의 Roif Keissling에 의하여 자연살해세포라는 명칭이 붙게 되었으며, 이후 여러연구와 관찰에 의하여 자연살해세포는 흑색종, 임파종, 신장암, 육종, 후두암, 대장암등의 원격전이에 중

요한 역할을 하는 것이 알려졌다⁵⁻¹⁰⁾. 사람과 백서의 신경아세포종에서 각각 MHC Class I 항원이 적어 cytotoxic T 림프구에 의한 종양파괴는 적고 자연살해세포가 종양살해에 중요함이 밝혀졌다^{1,2,13,14)}.

자연살해세포의 기능을 증가시키는 것으로는 Poly I: C, γINF, IL-2, OK4³²⁾ 등이 있으며, 이의 기능을 없애는 방법으로는 Monoclonal 항원인 anti-asialoGM1과 5-FU, methotrexate, adriamycin, cyclophosphamide 등의 항암제, tamoxifen 등의 호르몬제제가 있으며 종양에서 분비되는 ganglioside 도 자연살해세포의 기능을 약화시킨다^{8,10-12,17-19)}.

생체내에서 INF 이나 IL-2를 주면 자연살해세포의 기능이 강해지고 숙주의 생존이 길어짐이 관찰되었고, anti-asialo GM1을 이용하여 자연살해세포를 억제하면 C1300 신경아세포종의 생장이 촉진됨이 증명되었다²⁰⁾. 본 연구에서는 in vivo 연구에서 생존기간만을 조사하여 비교한 방법보다 객관적이고 통계처리가 용이한 방법을 이용하였다. 즉 피하종양을 유도하여 종양의 크기와 비장과의 관계를 보고, 폐전이종양을 유도하여 전이병소를 측정함으로써 여러가지 약제의 암억제효과를 판정하였다. 자연살해세포의 기능을 중

가시키는 방법으로 널리쓰이는 IL-2와 γ INF을 이용하였고 자연살해세포의 기능을 없애기 위해서는 anti-asialo GM1을 이용하였다. 이외에도 histamine은 자연살해세포의 기능을 증가시켜 원격전이를 방지하며, IL-2와 같이 투여하여도 자연살해세포의 기능이 더욱 증가됨이 보고되었고²¹⁾, 알코올이나 스트레스도 자연살해세포의 세포독성을 떨어뜨린다는 보고가 있다^{22, 23)}. 수혈은 자연살해세포의 독성을 감소시켜 원격전이가 잘 일어나게 한다⁸⁾. 최근의 국제회의에서 합의된 staging 및 치료효과판정 기준에 의하면 조직검사, 대사산물검사뿐 아니라 N-myc, 염색체 1의 이상, H-ras, MDR, TRK-A 등의 유전자 및 수용체도 진단 및 예후판정에 이용될 것이 권장된다²⁴⁾. 진행암환자에서는 자연살해세포의 세포독성이 떨어져 있는데 이것이 불량한 예후의 지표가 될수있다. 그러나 이것이 진행된 암의 결과에 의한 것인지 이것에 의하여 암이 진행되는 것인지는 알려져 있지 않다²⁵⁾.

종양의 면역치료는 숙주의 면역계기능뿐아니라 종양의 면역성에 의하여 성패가 좌우된다.

C1300 백서신경아세포종은 면역계에 인지가 잘되어 전이가 잘 일어나지 않는데 비하여, 이것의 아종인 TBJ 백서신경아세포종은 면역계에 인지가 되지 않으며 전이가 일어나서 원격전이에는 종양의 면역성이 중요하다²⁾. 재발된 종양에서는 MHC class I의 표현이 감소되어 있어 이것으로 인하여 숙주가 종양을 인지하는 것이 감소되는 것으로 보인다²⁶⁾. 본 실험에서 자연살해세포의 기능과 이에따른 종양의 성장이나 원격전이가 변화되는 것을 측정하는 것은 이들 보고에 의한 결과로 사람의 신경아세포종과 같이 C1300 백서신경아세포종이 주로 자연살해세포의 독성에 의하여 성장과 원격전이가 억제되는 것을 이용하였다^{1, 2, 14, 26)}. cyclophosphamide를 이용하여 suppressor cell의 기능을 없앴을 경우에 종양의 성장이 억제되며 숙주의 생존기간이 증가됨을 관찰하였다²⁷⁾. 저용량 cyclophosphamide, IL-2, 비타민 A 등에 의하여 신경아세포종의 Class I 항원을 증가시켜 주변 cytotoxic T 림프구에 의하여 Class I 항원의 인지가 가능하여져 면역치료가 유도된다²⁸⁾.

IL-2를 단독으로 사용하여도 C1300 백서신경아세포종에서 종양의 감소와 생존율이 증가되며, IL-2는 LAK 세포를 생체내에서 만들뿐아니라 $Lyt-2^+$ T 세

포를 자극하여 항암효과를 나타낸다²⁶⁾. 본 연구에서도 사체의 무게와 종양/사체무게비율을 보면 대조군, γ INF 투여군, anti-asialo GM1 투여군에 비하여 IL-2 투여군에서 $p < 0.01$ 의 의의있는 증가가 있었는데 이는 IL-2 투여군의 치료효과가 높음을 보이는 결과였다. IL-2와 γ INF을 같이 쓰는 것이 IL-2 단독으로 사용하는 것에 비하여 호산구의 증가외에는 면역계에 별다른 차이를 보이지 않는다는 보고가 있는 반면⁶⁾, IL-2는 MHC Class I을 transfection 시켰을 때 항암효과가 증가하여 γ INF을 준후 IL-2를 주었을 때 상승작용을 기대할수 있다는 보고도 있다. γ INF 보다 자연살해세포에 강한작용을 보이는 γ INF를 IL-2와 같이 사용하여도 상승작용을 보이며 이것은 많은 동물실험에서 사용되고 있는 중이다²⁹⁾.

실험동물과 인체의 신경아세포종에서 저용량 γ INF 주사시에도 고용량을 주는 것과 같이 MHC class I 항체가 증가하는 것이 증명되었다²⁹⁾. IL-2를 투여하면 Interferon의 활성이 증가하여 MHC class I의 표현이 증가됨을 보인다. 또한 실험동물에서 Interferon을 투여하여도 Tumor necrosis factor를 투여한 경우와 같이 종양의 피사를 관찰할 수 있었으며²⁶⁾ 25,000 Unit 정도 저용량의 γ INF는 자연살해세포에 영향이 없으나 100,000 Unit 정도에서는 자연살해세포의 기능을 증강시키는 것으로 백서의 실험에서 증명되었다²⁹⁾. retinoid는 악성종양의 분화를 촉진하며 cAMP의 증가가 이와 synergistic 작용을 하는 것으로 알려졌는데, cAMP의 증가는 종양세포의 성장을 억제한다²⁰⁾. arginine, ornithine, 3-omega fatty acids, vitamin A, nucleotides, zinc 등의 영양소들은 면역계에 자극을 주어 면역작용이 활발하게 만든다³¹⁾. C1300신경아세포종에서 arginine은 IL-2의 작용을 증가시킨다³¹⁾. C1300 신경아세포종은 면역성이 강하며 원격전이가 없으나 이의 아종인 TBJ는 면역성이 약하고 원격전이가 있다. 이 두종류의 신경아세포종을 이용하여 실험한 결과 arginine이 C1300에는 도움이 되었으나 TBJ에는 면역작용을 보이지 않았다. 따라서 arginine은 영양소로서의 역할이 아니라 면역작용에 의한 항암작용을 나타냄이 증명되었다¹⁵⁾. arginine이 종양이 없는 백서에서도 γ INF에 의한 자연살해세포의 기능을 증가시키는 것이 알려졌고 LAK 세포와 macrophage의 기능도 증가시키

는 것으로 판명되었다³²⁾. 본 연구는 종래의 생존기간의 비교만으로 약제의 효과를 비교한 방법에서 진일보하여 통계처리에 의한 객관적인 검사결과를 분석하였다. IL-2에 의한 종양억제효과는 종양무게, 비장무게, 폐전이숫자, 자연살해세포의 살해능력등 검사항목 모두에서 대조군과 통계적으로 유의있는 차이를 보인 반면, γ INF에 의한 종양의 억제효과는 폐전이숫자에서만 통계적으로 차이를 보여서 신경아세포종에서 IL-2의 종양억제가 γ INF의 종양억제에 비하여 현저히 탁월함을 보였다. anti-asialo GM1을 이용하여 자연살해세포의 기능을 억제하였을 경우에는 대조군에 비하여 종양의 무게, 비장의 무게, 자연살해세포의 살해능력등에서 통계적인 차이를 보여 자연살해세포가 신경아세포종의 성장과 전이에 중요한 역할을 함을 알 수 있었다. 폐전이숫자에서 대조군과 anti-asialo GM1투여군의 통계적 차이가 없었던 것은 대조군에서 많은 전이를 보였고 전이숫자가 250개를 넘을 경우에 모두 250개로 처리하였던 방법에서 기인하였다고 생각된다.

결 론

백서의 신경아세포종 C1300을 이용하여 자연살해세포의 원격전이 억제능력을 검사하였다. IL-2와 γ INF은 자연살해세포의 기능을 증가시켜 C1300 신경아세포종의 성장과 폐전이를 억제하였는데 IL-2에 의한 종양억제효과가 γ INF에 비하여 탁월하였다. anti-asialo GM1을 이용한 실험에서 자연살해세포를 억제하였을 경우에 종양의 성장과 전이가 모두 증가함을 보여 자연살해세포가 백서의 C1300 신경아세포종의 성장과 전이에 중요한 역할을 함을 보였다.

참 고 문 헌

- 1) Lampson LA, Fisher CA, Whelan JP: Striking paucity of HLA-A, B, C and B₂-microglobulin on human neuroblastoma cell lines. *J Immunol* **130**: 2471, 1983
- 2) Choi SH, Reynolds JV, Ziegler MM: Systematic analysis of the immunoregulation of murine neuroblastoma. *J Pediatr Surg* **24**: 15, 1989
- 3) Cheung NKV: Immunotherapy; neuroblastoma as

- a model. *Pediatr Clin North Am* **38**: 425, 1991
- 4) Breenberg AH: The origins of the NK cell, or a Canadian in King Ivan's court. *Clin Inves Med* **17**: 626, 1994
- 5) Ma D, Luyten GP, Luider TM, Niederkorn JY: Relationship between natural killer cell susceptibility and metastasis of human uveal melanoma cells in a murine model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**: 435, 1995
- 6) VandenDriessche T, Geldhof A, Bakkus M, Toussaint-Demyelle D, Brijs L, Thielemans K, Verschuereen H, De-Baetselier P: Metastasis of mouse T lymphoma cells is controlled by the level of major histocompatibility complex class I H-2DK antigens. *Int J Cancer* **15**: 217, 1994
- 7) Farace F, Pallardy M, Angevin E, Hercend T, Escudier B, Triebel F: Metastatic renal cell carcinoma patients treated with interleukin-2 or interleukin-2 plus interferon gamma: immunological monitoring. *Int J Cancer* **15**: 814, 1994
- 8) Clarke PJ, Burton RC, Wood KJ: Allogeneic blood transfusion reduces murine pulmonary natural killer activity and enhances lung metastasis of a syngeneic tumour. *Int J Cancer* **55**: 996, 1993
- 9) Gonzalez FM, Vargas JA, Lacoma F, Gea-Banacloche JC, Vergara J, Fernandez-Corugedo A, Durantez A: Natural killer cell activity in laryngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **119**: 69, 1993
- 10) Shiratori Y, Nakata R, Okano K, Komatsu Y, Shiina S, Kawase T, Sugimoto T, Omata M, Tanaka M: Inhibition of hepatic metastasis of colon carcinoma by asialo GM1-positive cells in the liver. *Hepatology* **16**: 469, 1992
- 11) Markovic SN, Murasko DM: Role of natural killer and T-cells in interferon induced inhibition of spontaneous metastases of the B16F10L murine melanoma. *Cancer Res* **51**: 1124, 1991
- 12) Cohen SA, Tzung SP, Doerr RJ, Goldrosen MH: Role of asialo-GM1 positive liver cells from athymic nude or polyinosinic-polycytidylic acid treated mice in suppressing colon derived experimental hepatic metastasis. *Cancer Res* **50**: 1834, 1990
- 13) Katsanis E, Blazar BR, Bausero MA, Gunther R, Anderson PM: Retroperitoneal inoculation of murine neuroblastoma results in a reliable model

- for evaluation of the antitumor immune response. *J Pediatr Surg* **29**: 538, 1994
- 14) Foreman NK, Rill DR, Coustan SE, Douglass EC, Brenner MK: Mechanisms of selective killing of neuroblastoma cells by natural killer cells and lymphokine activated killer cells. Potential for residual disease eradication. *Br J Cancer* **67**: 933, 1993
 - 15) Reynolds JV, Thom AK, Zhang SM, Ziegler MM, Naji A, Daly JM: Arginine, protein malnutrition and cancer. *J Surg Res* **45**: 513, 1988
 - 16) Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, Simpson C, Carter C, Bock S, Schwarzentruher D, Wei JP, White DE: Use of tumor infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* **319**: 1976, 1988
 - 17) Kelly SA, Gschmeissner S, East N, Balkwill FR: Enhancement of metastatic potential by gamma interferon. *Cancer Res* **51**: 4020, 1991
 - 18) Brenner BG, Margolese RG: The relationship of chemotherapeutic and endocrine intervention on natural killer cell activity in human breast cancer. *Cancer* **68**: 482, 1991
 - 19) Grayson G, Ladisch S: Immunosuppression by human gangliosides. II. Carbohydrate structure and inhibition of human NK activity. *Cell Immunol* **139**: 18, 1992
 - 20) Reynolds JV, Shou J, Choi SH, Sigal R, Ziegler MM, Daly JM: The influence of natural killer cells in neuroblastoma. *Arch Surg* **124**: 235, 1989
 - 21) Hellstrand K, Asea A, Hermodsson S: Role of histamine in natural kill cell mediated resistance against tumor cells. *J Immunol* **145**: 4365, 1990
 - 22) Yirmiya R, Ben-Eliyahu S, Gale RP, Shavit Y, Liebeskind JC, Taylor AN: Ethanol increases tumor progression in rats; possible involvement of natural killer cells. *Brain Behav Immun* **6**: 74, 1992
 - 23) Hoffman GL, MacNeil B, Arumugam Y: Effect of differential housing in mice on natural killer cell activity, tumor growth, and plasma corticosterone. *Proc Soc Exp Biol Med* **199**: 337, 1992
 - 24) Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F et al: Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* **11**: 1466, 1993
 - 25) Pross HF, Lotzova E: Role of natural killer cells in cancer. *Nat Immun* **12**: 279, 1993
 - 26) Fowler CL, Brooks SP, Rossman JE, Cooney DR: Combined preoperative and postoperative immunotherapy for murine C1300 neuroblastoma. *J Pediatr Surg* **28**: 420, 1993
 - 27) Fowler CL, Brooks SP, Rossman JE, Cooney DR: Postoperative immunotherapy of murine C1300-neuroblastoma. *J Pediatr Surg* **25**: 229, 1990
 - 28) Fowler CL, Brooks SP, Squire R, Rich GA, Rossman JE, Finegold MJ, Allen JE, Cooney DR: Enhanced resection and improved survival in murine neuroblastoma(C1300) after preoperative immunotherapy. *J Pediatr Surg* **26**: 381, 1991
 - 29) Sigal RK, Lieberman MD, Reynolds JV, Shou J, Ziegler MM, Daly JM: Low dose interferon gamma renders neuroblastoma more susceptible to interleukin-2 immunotherapy. *J Pediatr Surg* **26**: 389, 1991
 - 30) Abemayer E: The effects of retinoic acid on the in vitro and in vivo growth of neuroblastoma cells. *Laryngoscopy* **102**: 1133, 1992
 - 31) Liberman MD, Nishioka K, Redmond P, Daly JM: Enhancement of Interleukin-2 immunotherapy with L-arginine. *Ann Surg* **215**: 157, 1992
 - 32) Reynolds JV, Daly JM, Shou J, Sigal R, Ziegler MM, Naji A: Immunologic effects of arginine supplementation in tumor bearing and nontumor bearing hosts. *Ann Surg* **211**: 202, 1990