

## 脈絡膜悪性黒色腫浸潤リンパ球の解析 (予報)

太田 浩一<sup>1)</sup>, 野呂瀬一美<sup>1)</sup>, 石井 恵子<sup>2)</sup><sup>1)</sup>信州大学医学部眼科学教室, <sup>2)</sup>信州大学医学部附属病院中央検査部

## 要 約

78歳, 男性の脈絡膜悪性黒色腫における腫瘍浸潤リンパ球に対し, 免疫染色を行った. 試料から得た腫瘍浸潤リンパ球浮遊液と末梢血リンパ球を抗CD3, CD4, CD8, CD29, CD45RA, およびヒト主要組織適合抗原 (human leukocyte antigen: 以下, HLA)-DR抗体にて三重染色し, フローサイトメトリーで解析した. 病理組織学的には, 腫瘍の周辺部にごく少数のリンパ球浸潤が認められた. 免疫染色ではBリンパ球に比し, Tリンパ球が優位であった. フローサイトメトリーでは腫瘍浸潤リンパ球は, CD3<sup>+</sup>細胞中, CD4<sup>+</sup>細胞よりCD8<sup>+</sup>細胞が優位であり, それらの多くがHLA-DR<sup>+</sup>であった. 腫瘍

浸潤CD4<sup>+</sup>細胞サブセットでは末梢血に比し, CD29<sup>+</sup> (メモリー)細胞の増加, CD45RA<sup>+</sup> (ナイーブ)細胞の減少が認められた. 活性化メモリー細胞が増加し, ナイーブ細胞が減少していることから, 脈絡膜悪性黒色腫においてTリンパ球の抗原特異的な局所免疫が関与していることが示唆された. (日眼会誌 99: 1277-1282, 1995)

キーワード: 脈絡膜悪性黒色腫, 腫瘍浸潤リンパ球, メモリー細胞, ナイーブ細胞, フローサイトメトリー

## Analysis of Infiltrating Lymphocytes in Choroidal Melanoma

Kouichi Ohta<sup>1)</sup>, Kazumi Norose<sup>1)</sup> and Keiko Ishii<sup>2)</sup><sup>1)</sup>Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine<sup>2)</sup>Central Clinical Laboratory, Shinshu University Hospital

## Abstract

We performed immunohistochemistry on tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in a 78-year-old man with choroidal malignant melanoma. Cell suspensions of TILs from fresh specimens and peripheral blood lymphocytes (PBLs) were stained with anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD29, anti-CD45RA, and anti-human leukocyte antigen (HLA)-DR monoclonal antibodies and analyzed using three-color flow cytometry. In light microscopy, the number of infiltrating lymphocytes around the tumor was very small. Immunohistochemically, T lymphocytes were more numerous than B lymphocytes. Flow cytometric analysis showed that CD8<sup>+</sup> cells were more numerous than CD4<sup>+</sup> cells in

CD3<sup>+</sup> cells in TILs, and most of these cells also expressed HLA-DR antigen. CD29<sup>+</sup> (memory) cells were increased and CD45RA<sup>+</sup> (naive) cells were decreased in CD4<sup>+</sup> cells in TILs as compared with PBLs. We concluded that the increase in the percentage of activated memory T lymphocytes and the decrease of naive T lymphocytes may reflect a localized antigen-specific immunological response in choroidal malignant melanoma. (J Jpn Ophthalmol Soc 99: 1277-1282, 1995)

Key words: Choroidal malignant melanoma, Tumor infiltrating lymphocyte, Memory cell, Naive cell, Flow cytometry

## I 緒 言

悪性腫瘍組織中やその周囲に集合したリンパ球群は, 生体の腫瘍細胞に対する免疫反応の一つとされている<sup>1)</sup>. 脈絡膜悪性黒色腫は, 皮膚の悪性黒色腫と同様に,

自然寛解がみられること<sup>2)3)</sup>や眼球摘出後, 数十年経過してからの転移がみられる<sup>4)</sup>ことから, 免疫の影響を比較的受けやすいとされている<sup>4)</sup>. しかし, 眼球が所属リンパ組織を欠いている点<sup>5)</sup>や, 眼内には皮下からも容易に黒色腫が移植され得る点<sup>6)</sup>など, 眼球には皮膚とは異なる

別刷請求先: 390 長野県松本市旭3-1-1 信州大学医学部眼科学教室 太田 浩一

(平成7年5月22日受付, 平成7年8月2日改訂受理)

Reprint requests to: Kouichi Ohta, M.D. Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine.

3-1-1 Asahi, Matsumoto-shi, Nagano-ken 390, Japan

(Received May 22, 1995 and accepted in revised form August 2, 1995)

免疫学的特徴がある。

近年、モノクローナル抗体やフローサイトメトリーの進歩により、リンパ球の詳細なサブセットの解析が可能となっている。これらを用い、悪性新生物への浸潤リンパ球の解析が行われている<sup>5)7)~18)</sup>。悪性新生物に浸潤しているリンパ球の多くはTリンパ球とされているが<sup>10)~18)</sup>、眼科領域、特に、眼内腫瘍における浸潤リンパ球の解析に関する報告<sup>5)7)~9)</sup>は少ない。今回、三重染色フローサイトメトリーを用い、脈絡膜悪性黒色腫における浸潤リンパ球の解析を行ったので報告する。

## II 対象と方法

### 1. 症 例

78歳、男性。右眼視力、視野障害を主訴に前医を受診後、1994年3月11日、精査、加療目的で当科紹介になった。視力は右眼20 cm 指数弁(矯正不能)、左眼0.5(0.6×-1.0 D=cyl-0.75 D Ax 110°)。眼圧は右眼14 mmHg、左眼16 mmHg。両眼中等度の核白内障を認めた。右眼眼底には下方約1/3を占める黒色の隆起病変および周囲の網膜剥離を認めた。左眼眼底にはドレーゼンを伴う加齢性黄斑変性を認めた。蛍光眼底造影検査では、腫瘍内血管からの蛍光漏出を認めた。

既往歴：陳旧性心筋梗塞、心不全、慢性副鼻腔炎。

家族歴：特記すべきことなし。

経過：入院後、X線コンピューター断層撮影(CT)、核磁気共鳴画像(MRI)、<sup>67</sup>Ga、<sup>123</sup>I脳血流シンチグラフィの精査および全身的な悪性腫瘍の有無の検査を行った。腫瘍はMRI T1強調画像で高信号、T2強調画像で低信号を示し、ガドリニウムで軽度造影された(図1)。各シンチグラフィとも陽性であった。全身的には他の悪性腫瘍を疑わせる所見は認められず、4月12日全身麻酔下で右眼球摘出術を施行した。

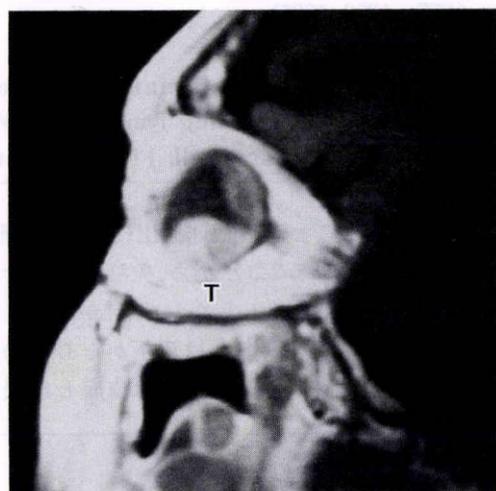


図1 核磁気共鳴画像所見。  
ガドリニウム造影によるT1強調画像で、下方の腫瘍(T)は増強された。

### 2. 実験方法

組織学的観察：眼球摘出後、速やかに腫瘍も含め、矢状断に半切し、ホルマリン固定、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(H・E)染色の他、免疫染色としてS-100蛋白染色を行った。残りの半切部の腫瘍の一部は凍結切片を作製し、腫瘍浸潤リンパ球に対し、CD3、UCHL-1(T細胞)、L-26(B細胞)、T細胞サブセットであるCD4、CD8(以上すべてDako社)で免疫組織染色を行った。なお、今回はメラニン顆粒の褐色と区別するため、免疫染色の発色はアルカリフォスファターゼを用い、赤色で行った。また、腫瘍の一部はグルタルアルデヒド固定、エポン包埋後、酢酸ウランおよびクエン酸鉛染色を行い、透過型電子顕微鏡で観察した。

### 3. フローサイトメトリー

腫瘍部から一部(3×5×3 mm)を切り出し、細切してリン酸緩衝液を加え、混和静置後、上清をメッシュでこして細胞浮遊液を作成した。また、術前に末梢静脈血を採取し、Ficoll-Conray法でリンパ球を遠心分離し末梢血リンパ球を得た。

これらの細胞浮遊液および末梢リンパ球をFITC(fluorescein isothiocyanate)標識の抗CD3、抗CD16抗体(Becton-Dickinson社)、PE(phycoerythrin)標識の抗CD29、抗CD45 RA抗体(以上Coulter社)、抗human leukocyte antigen(HLA)-DR抗体(Becton-Dickinson社)、およびPerCP(peridimin chlorophyll protein)標識の抗CD4、抗CD8抗体(Becton-Dickinson社)を用い、4°Cで30分インキュベートした。三重染色の組み合わせはCD3/HLA-DR/CD4、CD3/HLA-DR/CD8、CD3/CD29/CD4、CD3/CD45 RA/CD4で行った。染色後、FACScan(Becton-Dickinson社)を用い、解析した。解析用ソフトのPaint-A-Gate(Becton-Dickinson社)を用い、リンパ球中のCD3陽性細胞(成熟T細胞)を選択し、さらにその細胞をLysis II(Becton-Dickinson社)ソフトによりサブセットに分け、比率を解析した。なお、陽性細胞はサブクラスを一致させた陰性対照に対しての陽性としたが、抗CD29抗体によりほとんどのT細胞に陽性となるので、強陽性の細胞群をCD29<sup>+</sup>細胞とした。

## III 結 果

### 1. 病理組織学的所見

光学顕微鏡所見では、脈絡膜由来のメラニン顆粒の豊富な腫瘍で、半切部付近の標本では眼球の下方からドーム状に突出し、最大15 mm径であった(図2)。腫瘍細胞は核小体が明瞭な大型の類上皮型の細胞が主体で、充実巣状に配列し(図3)、S-100蛋白陽性であり、類上皮型の悪性黒色腫と診断した。視神経および強膜外への浸潤は認められなかった。標本上、壊死はほとんど認められなかった。腫瘍内部には、リンパ球やマクロファージおよび好中球などの白血球は少なく、腫瘍の周辺部にわずかに認

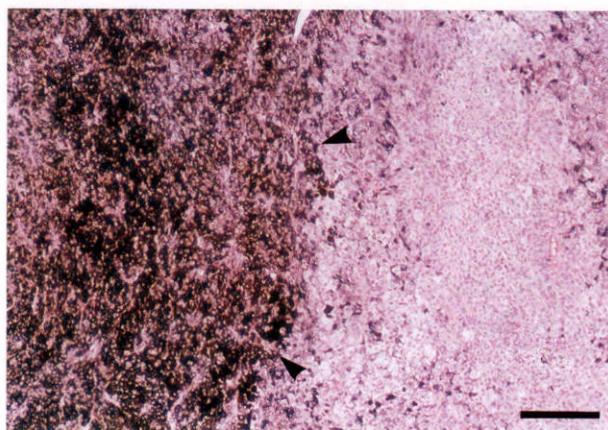


図2 腫瘍の組織像.

豊富なメラニンを認めた(矢じり).ヘマトキシリン・エオジン(H・E)染色.バーは25  $\mu$ m

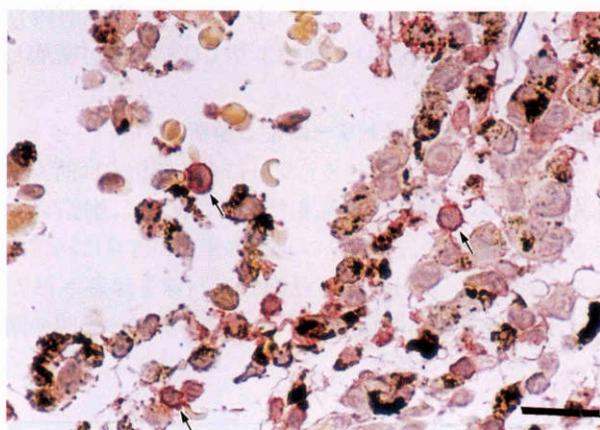


図5 免疫染色.

UCHL-1+細胞(矢印).バーは5  $\mu$ m

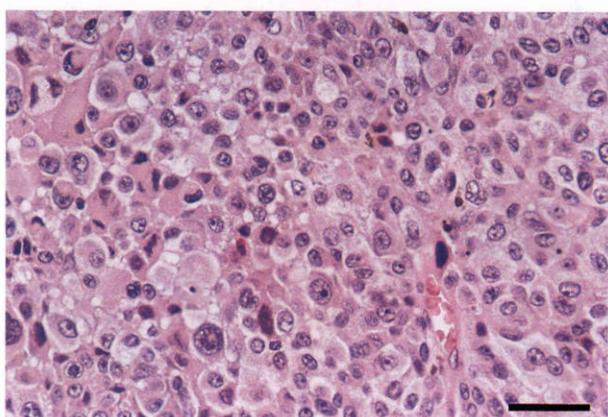
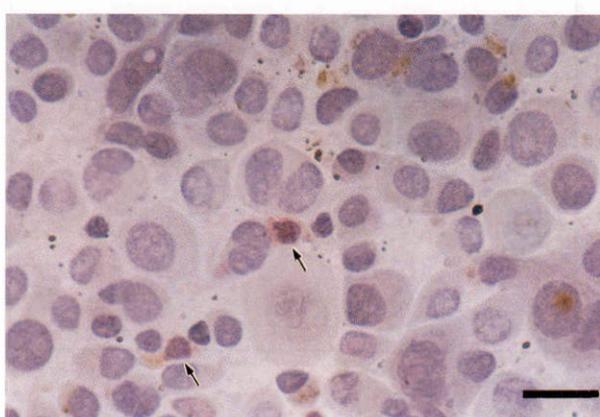
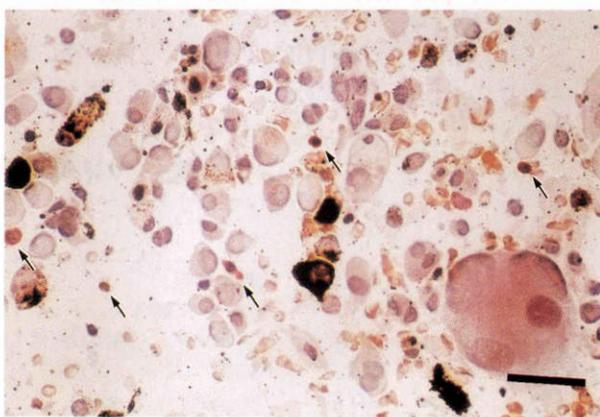


図3 腫瘍の組織像.

大型の類上皮型の細胞が主体である.腫瘍内にリンパ球はほとんど認められない.H・E染色.バーは5  $\mu$ m



a



b

図6 免疫染色.

a: CD4+細胞(矢印).バーは2.5  $\mu$ m. b: CD8+細胞(矢印).バーは5  $\mu$ m

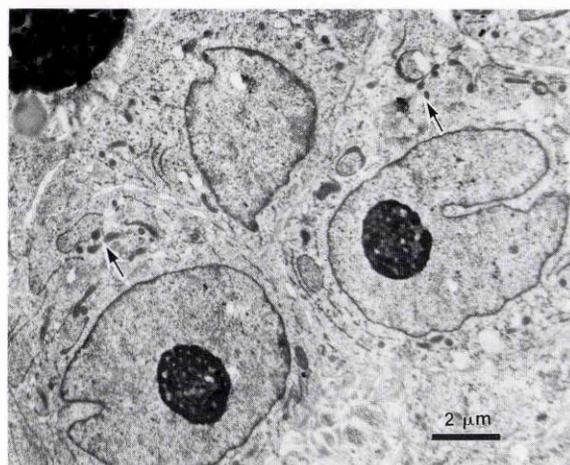


図4 透過型電子顕微鏡所見.

腫瘍細胞は核の切れ込みを有する.細胞質にプレメラノゾーム(矢印)を認める.バーは2  $\mu$ m

められるのみであった.電子顕微鏡所見では腫瘍細胞の核は切れ込みを有していた.またメラニンの他,細胞質にプレメラノゾームを認めた(図4).

## 2. 免疫染色

パラフィン切片では,腫瘍の周辺部にわずかに浸潤しているリンパ球は,Tリンパ球を認識するCD3,UCHL-1(図5)に陽性であったが,Bリンパ球を認識するL-26にはほとんど陽性とならなかった.さらに凍結切片で,T

リンパ球のサブセットである CD4 および CD8 が陽性となった(図 6 a, b). CD 4<sup>+</sup>細胞より CD 8<sup>+</sup>細胞が増加していた。

3. フローサイトメトリーによる解析

末梢血のフローサイトメトリーによる解析では前方散乱光(FSC)および側方散乱光(SSC)に従って,細胞の大きさや内容物から,通常,リンパ球の集団が容易に同定できるが(図 7 a の R1),腫瘍浸潤リンパ球を浮遊させた液は,濾過後も腫瘍細胞などを含み,リンパ球の集団の同

定が困難であった(図 7 b).末梢血リンパ球の R1 に相当する範囲での CD 3<sup>+</sup>,CD 4<sup>+</sup>,CD 8<sup>+</sup>,およびナチュラルキラー細胞のマーカの CD 16<sup>+</sup>細胞の比率を示す(表 1).得られたリンパ球細胞数は少ないが,サブセットでは T リンパ球が最も多かった.このリンパ球の集団から CD 3<sup>+</sup>細胞,つまり成熟 T 細胞を選択し,それについてのサブセットである CD 4<sup>+</sup>,CD 8<sup>+</sup>,CD 29<sup>+</sup>,CD 45 RA<sup>+</sup>,HLA-DR<sup>+</sup>細胞を解析した(表 2).通常,健常者では末梢血リンパ球において,CD 4<sup>+</sup>細胞は CD 8<sup>+</sup>細胞より優位

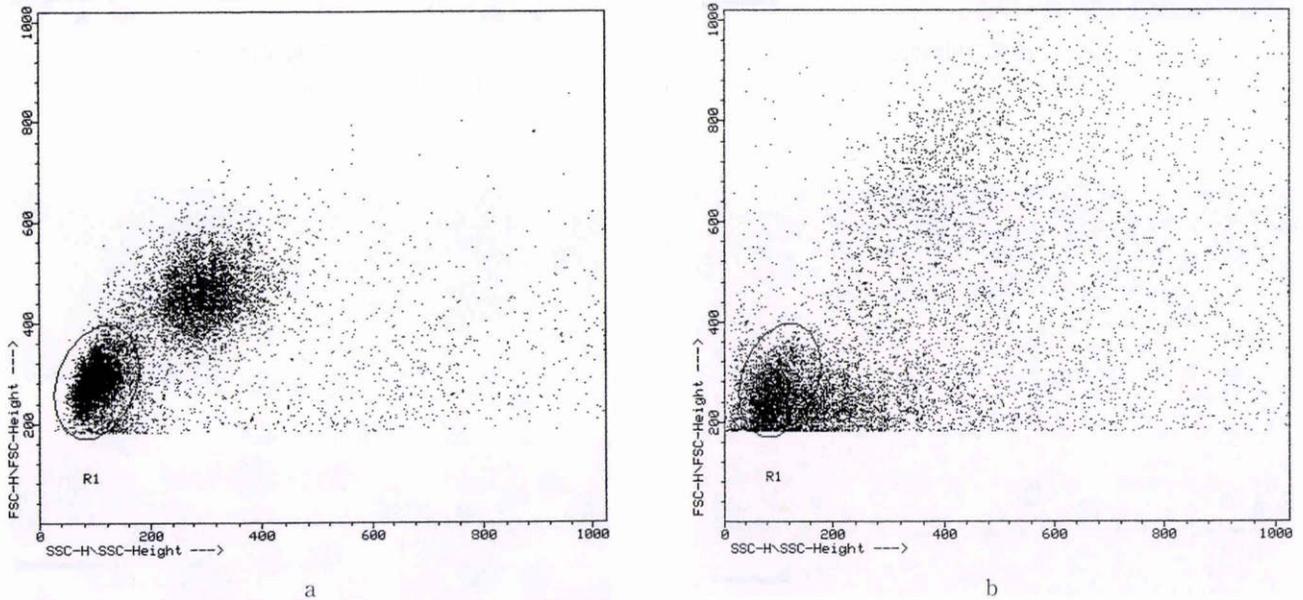


図7 フローサイトメトリーによる測定の原表示.

FSC/FSC-Height は前方散乱光の,SSC/SSC-Height は側方散乱光のパルスの高さを示し,ドットプロットで表示した.

a : 末梢リンパ球(PBL),R1 はリンパ球が多い集団. b : 腫瘍浸潤リンパ球(TIL).

表1 リンパ球集団内の表面マーカの解析

マーカ	末梢血リンパ球 (%)	腫瘍浸潤リンパ球 (%)
CD 3 <sup>+</sup> 成熟T細胞	66.8	13.0
CD 4 <sup>+</sup> ヘルパーT細胞	38.0	4.4
CD 8 <sup>+</sup> サプレッサー・細胞障害性T細胞	23.9	7.5
CD 20 <sup>+</sup> B細胞	3.0	NT
CD 16 <sup>+</sup> ナチュラルキラー細胞	29.2	2.4

NT : 未測定

表2 成熟Tリンパ球表面マーカの解析

マーカ	末梢血リンパ球 (%)	腫瘍浸潤リンパ球 (%)
CD 3 <sup>+</sup> CD 4 <sup>+</sup> ヘルパーT細胞	57.6	32.9
CD 3 <sup>+</sup> CD 8 <sup>+</sup> サプレッサー・細胞障害性T細胞	36.1	60.8
CD 4 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> 活性化ヘルパーT細胞	22.8	25.7
CD 8 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> 活性化サプレッサー・細胞障害性T細胞	20.8	51.6
CD 4 <sup>+</sup> CD 29 <sup>+</sup> メモリー細胞	40.3	27.2
CD 4 <sup>+</sup> CD 45 RA <sup>+</sup> ナイーブ細胞	18.5	3.7

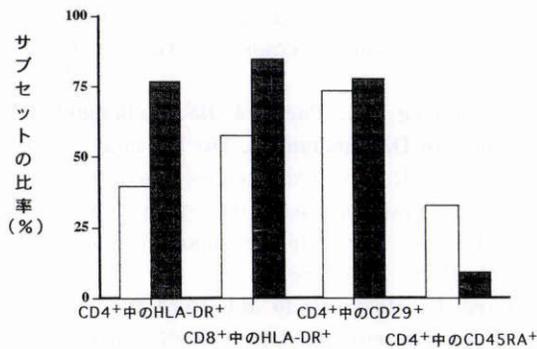


図8 CD3<sup>+</sup>細胞のサブセットの比率(%)。

□：末梢血リンパ球，■：腫瘍浸潤リンパ球

であり、本症例も同様であった。一方、腫瘍浸潤リンパ球ではCD8<sup>+</sup>細胞の割合が増加していた。また、腫瘍浸潤リンパ球のCD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>細胞の多くは活性化のマーカーであるHLA-DR抗原を末梢血リンパ球に比し強く発現していた。さらに、CD4<sup>+</sup>細胞中のHLA-DR<sup>+</sup>細胞の割合(CD4<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>)およびCD8<sup>+</sup>細胞中のHLA-DR<sup>+</sup>細胞の割合(CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>)は末梢血に比し、より増加していた(図8)。また、腫瘍浸潤リンパ球では、末梢血に比し、メモリー細胞であるCD4<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>細胞のわずかな増加およびナイーブ細胞であるCD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>細胞の著明な減少が認められた。さらに、CD4<sup>+</sup>細胞中のCD29<sup>+</sup>細胞の割合(CD4<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>)の増加およびCD45RA<sup>+</sup>細胞の割合(CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>)の減少が認められた(図8)。

#### IV 考 按

免疫組織学的手法<sup>10)11)</sup>やフローサイトメトリーによる解析<sup>12)~16)</sup>により、悪性新生物における腫瘍浸潤リンパ球にはナチュラルキラー細胞やB細胞は少なく、大部分はT細胞から成るという報告が多い。T細胞のサブセットについては、CD8<sup>+</sup>細胞(cytotoxic/suppressor T細胞)優位との報告<sup>11)12)</sup>がある一方、症例によりCD4<sup>+</sup>細胞(helper T細胞)優位との報告<sup>13)~16)</sup>もある。皮膚メラノーマでも腫瘍浸潤リンパ球はT細胞が主体であるとされるが<sup>17)~19)</sup>、サブセットに関しては諸説がある。ぶどう膜メラノーマにおいては5~12%で腫瘍浸潤リンパ球を同定できるとされており<sup>20)</sup>、T細胞から成るという報告<sup>5)7)~9)</sup>が多い。ぶどう膜メラノーマではCD8<sup>+</sup>細胞優位との報告<sup>5)8)</sup>が多い。今回の解析では、免疫染色およびフローサイトメトリーの結果ともに、脈絡膜悪性黒色腫浸潤リンパ球はナチュラルキラー細胞やB細胞に比べ、T細胞が多く、サブセットではCD8<sup>+</sup>細胞の増加が認められた。

活性化状態にあるリンパ球は膜表面にインターロイキン(IL)-2受容体やクラスII主要組織適合抗原であるHLA-DR抗原を表出してくる<sup>5)7)8)12)~14)16)18)</sup>。本研究においては、IL-2受容体の解析は行ってないが、HLA-DR抗

原は腫瘍浸潤Tリンパ球に高い比率で認められ、局所において活性化状態にあると考えられる。特にCD4<sup>+</sup>細胞は抗原認識にクラスII主要組織適合抗原を有する抗原提示細胞が必要であり<sup>5)</sup>、局所での抗原提示細胞の存在も推測される。

近年、モノクローナル抗体、およびフローサイトメトリーの進歩に伴い、MorimotoらはCD4<sup>+</sup>細胞、つまりヘルパーT細胞をサブタイプに分け、CD29<sup>+</sup>細胞をヘルパー・インデューサー細胞<sup>21)</sup>、CD45RA<sup>+</sup>細胞をサプレッサー・インデューサー細胞<sup>22)</sup>とし、異なった機能を有する細胞とした。CD4<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>細胞は主にB細胞の分化、増殖に関与するとされたが、その後、過去に認識した抗原に対し素早い反応をするメモリー細胞と称されるようになった<sup>23)</sup>。一方、CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>細胞は、CD8<sup>+</sup>細胞などの増殖を誘導するとされたが、抗原にまだ暴露されていないナイーブ細胞とされている<sup>24)</sup>。慢性関節リウマチ患者の関節液<sup>25)</sup>、サルコイドーシス患者の肺胞洗浄液<sup>26)</sup>、多発性硬化症患者の脳脊髄液<sup>27)</sup>など自己免疫性疾患患者の炎症局所においては浸潤CD4<sup>+</sup>リンパ球中、CD29<sup>+</sup>細胞の著明な集積またはCD45RA<sup>+</sup>細胞の減少が認められている。これらの局所炎症においてはCD45RA<sup>-</sup>細胞が特異的に血管内皮に接着する説やCD45RA<sup>+</sup>細胞が抗原を認識し、局所に浸潤する際にその抗原性を失うという説<sup>25)</sup>が唱えられている。

悪性新生物<sup>10)13)~16)</sup>や皮膚悪性黒色腫<sup>18)</sup>における浸潤リンパ球は炎症局所での反応と同様に、メモリー細胞が大部分を占めるとされる。これらのリンパ球は腫瘍に関連した抗原に刺激され、CD45RA抗原を失い、CD29抗原のようなメモリー細胞を特徴づける抗原を表出すると考えられている<sup>10)13)~16)</sup>。本研究においては、三重染色フローサイトメトリーの解析により、末梢血に比し、CD29<sup>+</sup>細胞の増加とCD45RA<sup>+</sup>細胞の明らかな減少が確認された。活性化の高いメモリー細胞の存在により、腫瘍における抗原特異的な局所免疫が生じていると考えられた。

本研究では腫瘍へのリンパ球浸潤が少なく、他の解析などは行ってないが、今後、多角的な解析を行うことにより、脈絡膜悪性黒色腫の抗原の解明および養子免疫など<sup>17)</sup>の治療の発展につながると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師、瀬川雄三教授、ならびに附属病院輸血部、伊藤進技官に深謝いたします。本論文の要旨は第99回日本眼科学会総会において講演した。

#### 文 献

- 1) Underwood JCE: Lymphoreticular infiltration in human tumors: Prognostic and biological implications: A review. *Br J Cancer* 30: 538-548, 1974.
- 2) Jensen OA, Andersen SR: Spontaneous regression of a malignant melanoma of the choroid.

- Acta Ophthalmol 52 : 173—182, 1974.
- 3) **Reese AB, Archila EA, Jones IS, Cooper WC** : Necrosis of malignant melanoma of the choroid. *Am J Ophthalmol* 69 : 91—104, 1970.
  - 4) **Newton FH** : Malignant melanoma of choroid : Report of a case with clinical history of 36 years and follow-up of 32 years. *Ophthalmology* 73 : 198—199, 1965.
  - 5) **Durie FH, Campbell AM, Lee WR, Damato BE** : Analysis of lymphocytic infiltration in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31 : 2106—2110, 1990.
  - 6) **Niederhorn JY, Streilein JW** : Adoptive transfer of immunity to intraocular tumors in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25 : 336—342, 1984.
  - 7) **Ksander BR, Rubsamens PE, Olsen KR, Cousins SW, Streilein JW** : Studies of tumor-infiltrating lymphocytes from a human choroidal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32 : 3198—3208, 1991.
  - 8) **Tobal K, Deuble K, McCartney A, Lightman S** : Characterization of cellular infiltration in choroidal melanoma. *Melanoma Research* 3 : 63—65, 1993.
  - 9) **Whelchel JC, Farah SE, McLean IW, Burnier MN** : Immunohistochemistry of infiltrating lymphocytes in uveal malignant melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34 : 2603—2606, 1993.
  - 10) **Kuppner MC, Hamou M-F, de Tribolet N** : Activation and adhesion molecule expression on lymphoid infiltrates in human glioblastomas. *J Neuroimmunol* 29 : 229—238, 1990.
  - 11) **Dietl J, Horny H-P, Ruck P, Kaiserling E** : Dysgerminoma of the ovary. *Cancer* 71 : 2562—2568, 1993.
  - 12) **Viale M, Ferrini S, Serrano S, Serrano D, Ardizzoni A, Nicolin A** : Peripheral blood and tumor infiltrating lymphocytes in non-small cell lung cancer : Analysis at the population and clonal level. *Tumori* 76 : 488—494, 1990.
  - 13) **Yoshino I, Yano T, Murata M, Ishida T, Sugimachi K, Kimura G, et al** : Tumor-reactive T-cells accumulate in lung cancer tissues but fail to respond due to tumor cell-derived factor. *Cancer Res* 52 : 775—781, 1992.
  - 14) **Shimizu Y, Watanabe A, Whiteside TL** : Memory T-lymphocytes are the main population of tumor-infiltrating lymphocytes obtained from human primary liver tumors. *J Hepatol* 16 : 197—202, 1992.
  - 15) **Nguyen QH, Moy RL, Roth MD, Yamamoto R, Tomono S, Dubinett SM** : Expression of CD45 isoforms in fresh and IL-2-cultured tumor-infiltrating lymphocytes from basal cell carcinoma. *Cell Immunol* 146 : 421—430, 1993.
  - 16) **Ostenstad B, Lea T, Schlichting E, Harboe M** : Human colorectal tumor infiltrating lymphocytes express activation markers and the CD45RO molecule, showing a primed population of lymphocytes in the tumor area. *Gut* 35 : 382—387, 1994.
  - 17) **Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, et al** : Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 319 : 1676—1680, 1988.
  - 18) **Cardi G, Mastrangelo MJ, Berd D** : Depletion of T-cells with the CD4<sup>+</sup>CD45R<sup>+</sup> phenotype in lymphocytes that infiltrate subcutaneous metastases of human melanoma. *Cancer Res* 49 : 6562—6565, 1989.
  - 19) **Darrow TL, Wahab Z, Quinn-Allen MA, Seigler HF** : Human melanoma-mediated inhibition of autologous CD4<sup>+</sup> helper tumor-infiltrating lymphocyte growth *in vitro*. *Cancer* 69 : 1843—1849, 1992.
  - 20) **Lang JR, Davidorf FH, Baba N** : The prognostic significance of lymphocytic infiltration in malignant melanoma of the choroid. *Cancer* 40 : 2338—2394, 1977.
  - 21) **Morimoto C, Letvin NL, Distaso JA, Aldrich WR, Schlossman SF** : The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. *J Immunol* 134 : 1508—1515, 1985.
  - 22) **Morimoto C, Letvin NL, Boyd AW, Hagan M, Brown HM, Kornacki MM, et al** : The isolation and characterization of the human helper inducer T cell subset. *J Immunol* 134 : 3762—3769, 1985.
  - 23) **Sanders ME, Makgoba MW, Shaw S** : Human naive and memory T cells : Reinterpretation of helper-inducer and suppressor-inducer subsets. *Immunol Today* 9 : 195—199, 1988.
  - 24) **Morimoto C, Steinberg AD, Letvin NL, Hagan M, Takeuchi T, Daley J, et al** : A defect of immunoregulatory T cell subsets in systemic lupus erythematosus patients demonstrated with anti-2H4 antibody. *J Clin Invest* 79 : 762—768, 1987.
  - 25) **Pitzalis C, Kingsley G, Murphy J, Panayi G** : Abnormal distribution of the helper-induced and suppressor-inducer T-lymphocyte subsets in the rheumatoid joint. *Clin Immunol Immunopathol* 45 : 252—258, 1987.
  - 26) **Mukae H, Kohno S, Morikawa T, Kusano S, Kadota J, Hara K** : Two-color analysis of lymphocyte subsets of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood in Japanese patients with sarcoidosis. *Chest* 105 : 1474—1480, 1994.
  - 27) **Chofflon M, Gonzalez V, Weiner HL, Hafler DA** : Inflammatory cerebrospinal fluid T cells have activation requirements characteristic of CD4<sup>+</sup>CD45RA-T cells. *Eur J Immunol* 19 : 1791—1795, 1989.