

(図2) 月別の再発率 (再発回数/追跡人数)

白：花粉症なし (13人)

黒：花粉症あり (19人)

花粉症がある対象MS患者は、花粉症がない対象MS患者よりも、3月の再発が多い。一方、9月、10月、11月、12月は、差がない。

厚生科学研究費補助金（特定疾患研究事業）  
分担研究報告書

「インターフェロンによる多発性硬化症治療における免疫調節細胞の関与についての検討」

分担研究者 三宅 幸子 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部室長  
研究要旨

多発性硬化症 (MS) の実験モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) の病態は、様々な調節細胞によってコントロールされている。タイプ I インターフェロンによる EAE の抑制機序の一つに、これら調節性細胞の活性化が関与していると考えられる。そこで、タイプ I インターフェロンによって活性化される調節性細胞の一つである NK 細胞が、EAE の病態にどのように関与するかを検討した。NK 細胞を抗 asialoGM1 抗体を用いて除去すると、EAE は悪化した。また、IL-2 で活性化した NK 細胞を effector phase で移入すると、EAE は改善し、NK 細胞が EAE の effector phase に抑制的にはたらくことが明かとなった。さらに、タイプ I インターフェロンによって NK 細胞上に TRAIL 分子の発現が誘導されるため、TRAIL 分子が EAE にどのように関与するかを検討したところ、effector phase で抗 TRAIL 抗体（ブロッキング抗体）を投与すると EAE は悪化し、TRAIL 分子が EAE の effector phase で疾患抑制的に作用していることがわかった。

A. 研究目的

これまで我々は、MS の動物モデルである EAE において、NK 細胞が重要な調節機構を持つことを報告してきた (J.Exp.Med. 186:1667, 1997)。NK 細胞は、タイプ I インターフェロンによって活性化されることから、インターフェロンの MS 抑制効果の機序の一つに、NK 細胞の活性化が重要なのではないかと考え、NK 細胞の EAE への病態への関与について検討した。

B. 研究方法

C57BL/6J マウスに髄鞘蛋白である Myelin oligodendrocyte glycoprotein 由来 MOG35-55 ペプチドを免疫し、EAE を誘導した。NK 細胞の EAE に対する影響を検討するため、

C57BL/6 もしくは、NKT ノックアウトマウスより脾細胞を調整し、IL-2 (1000U/ml) にて 48 時間刺激し、接着性の細胞のみを回収した。さらに IL-2 存在下で 72 時間培養した NK 細胞（純度 90%以上） ( $1 \times 10^6$ ) を抗原感作時、もしくは症状出現期から週 1 回の頻度で経静脈的ないしは、皮下に投与し臨床症状を観察した。NK-LAK 細胞の純度の確認は、フローサイトメトリーを用いて行った。GFP トランスジェニックマウスより NK-LAK を調整し、EAE を誘導したマウスに誘導 10 日後に静注し、各組織への分布をフローサイトメトリーを用いて行った。また、抗 asialoGM1 抗体の投与により、NK 細胞の除去を行い、EAE に与える影響を検討した。

0.5mg/匹の抗TRAIL抗体をEAEのinduction phase (Day 0 and 3), effector phase (Day 7, 10 and 13)に、経腹腔投与し、EAEに与える影響を検討した。

### C. 研究結果

上記方法で誘導したIL-2活性化NK-LAK細胞は、フローサイトメトリーによる測定で90%以上の純度でNK1.1陽性、CD3陰性のNK細胞であった。NK-LAK細胞を症状出現期移入すると、EAEの臨床症状は軽快した。この効果は、NKTノックアウトマウスから分離した脾細胞から誘導したNK-LAK細胞で顕著であった(図1)。抗原感作時からNK-LAK細胞の投与を開始するとEAEの抑制効果はみられなかった(図2)。また、NK-LAK細胞の投与方法を皮下注射としたところ、EAEは抑制されず、むしろ増悪した(図3)。

GFPトランスジェニックマウスから分離した脾細胞から誘導したNK-LAK細胞を用いて、各臓器へのNK-LAK細胞の移行を追跡した。NK-LAKは、肝臓への移行が多かったが、中枢神経系への移行もみられた(図4)。

抗AsialoGM1抗体でNK細胞を除去すると、EAEの増悪がみられた。抗TRAIL抗体をEAEのinduction phase (Day 0 and 3)に投与すると、EAEは増悪した(図5A)。抗TRAIL抗体をEAEのeffector phase (Day 7, 10 and 13)に投与すると、EAEは抑制された(図5B)。

### D. 考察

NK細胞は、抗原感作時の投与では疾患抑制効果はみられず、症状出現後に強い疾患抑制効果があり、effector phaseにおいてEAEからの回復期に重要な役割があることが示唆

された。また、皮下注ではむしろ疾患増悪効果があること、GFPマウスを用いた実験から、静注したNK-LAKが中枢神経内へ浸潤していることから、病変局所での作用が示唆された。今後、病理学的検索によるGFP由来NK-LAK細胞の局在などについての検討が必要と考えられた。また、今後は、NK-LAK細胞がEAE回復過程で、どのような機序で作用するかについて検討をすすめていくことが重要であると考えられた。その一つの候補として、TRAIL分子を介した、機序が考えられる。NK細胞は、抗原提示細胞を傷害する作用が報告されている。一方、IL-2活性化NK細胞上には、TRAIL分子が高発現し、ブロッキング作用のある抗TRAIL抗体を用いると、EAEはeffector phaseで抑制されることとあわせて考えると、NK細胞が、TRAIL分子を介して、抗原提示細胞を傷害し、炎症を終焉させるという可能性があると考えられる。インターフェロン添加により、NK細胞上にはTRAILの発現が誘導されるという報告があり、インターフェロン投与により、NK細胞が活性化され、TRAIL分子を介して、MSに抑制的にはたらくことも考えられ、今後詳細な検討が必要である。

### E. 結論

NK細胞は、EAEに抑制的に作用することがわかった。今後は、インターフェロンがNK細胞に与える影響についての検討が重要である。

### F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### I 論文発表

1. Miyake S\*, Miyamoto K\*, Yamamura T. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 of natural killer T cells. **Nature** Vol. 413 : 531-534, 2001
2. Gumpez J, Miyake S, Yamamura T and Brenner MB. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 of natural killer T cells. **J.Exp. Med.** (in press)
3. Miyamoto K, Oka N, Kawasaki T, Miyake S, Yamamura T, and Akiguchi I. New cyclooxygenase-2 inhibitors for treatment of experimental autoimmune neuritis. **Muscle & Nerve** Vol.25 : 280-282, 2002
4. 三宅幸子、宮本勝一、山村隆：NKT細胞の新規リガンドによる多発性硬化症モデルの抑制：細胞工学、20(12) 1666-1667, 2001
5. 三宅幸子、宮本勝一、山村隆：NKT細胞の新規リガンドによる多発性硬化症モデルの抑制：実験医学、20(1) 76-78, 2001
6. 三宅幸子：NKT細胞：医学のあゆみ別冊 (印刷中)
7. 三宅幸子、山村隆：NKT細胞と実験的自己免疫性脳脊髄炎：Mebio、(印刷中)
8. 三宅幸子：Cblによる免疫調節機構；*Immunology Frontier*, 11:73-79, 2001
9. 三宅幸子：Cblと自己免疫疾患；炎症

と免疫、9：463-470、2001

10. 三宅幸子：Cblと自己免疫疾患；リウマチ科、26：260-267、2001
11. 三宅幸子：Cblによる免疫調節機構；臨床免疫、(印刷中)

### II 学会発表

1. Kazuya Takahashi, Sachiko Miyake, Takayuki Kondo, Takashi Yamamura. NK type 2 bias in remission of multiple sclerosis: insights into the regulation of pathogenic autoimmune T cells. VIth international neuroimmunology congress, Edinburgh, Scotland, September 5, 2001
2. Kazuya Takahashi, Sachiko Miyake, Takayuki Kondo, Takashi Yamamura. NK type 2 (NK2) bias in remission of multiple sclerosis. FOCIS 1<sup>st</sup> annual meeting, Boston, MA, May 5, 2001
3. Kazuya Takahashi, Sachiko Miyake, Takayuki Kondo, Keiji Terao, Megumi Hatakenaka, Shuji Hashimoto, and Takashi Yamamura. Type 2 cytokine bias of natural killer cells defines remission of multiple sclerosis. *Experimental Biology* 2001, Orlando, FL, April 3, 2001
4. Katsuichi Miyamoto, Sachiko Miyake, Melitta Schachner and Takashi Yamamura. Higher susceptibility of heterozygous P0 knockout mice to P0-induced experimental autoimmune neuritis (EAN): lower P0 expression in the thymus may be a cause. *Experimental Biology* 2001, Orlando, FL, April 3, 2001
5. Sachiko Miyake, Katsuichi Miyamoto and Takashi Yamamura. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 bias of natural killer T cells. The 7<sup>th</sup> international workshop on autoantibodies and autoimmunity. September 26-29, 2001, Awaji island, Japan

6. Sachiko Miyake. Regulatory cells in autoimmune diseases : A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 bias of natural killer T cells , International symposium on NK/NKT cells and autoimmunity, Dec.14, 2001, Tokyo

1. 三宅幸子 : Cbl ファミリーによる免疫調節機構、第 45 回日本リウマチ学会、平成 13 年、5 月 14-16 日、東京
2. 高橋和也、三宅幸子、山村隆 : Natural Killer (NK) 2 細胞による Th1 細胞の抑制、第 29 回日本臨床免疫学会、平成 13 年 12 月 11-13 日、大阪
3. 三宅幸子、長山成美、宮本勝一、千葉麻子、山村隆 : NK-LAK 細胞移入による自己免疫疾患の治療効果の検討、第 29 回日本臨床免疫学会、平成 13 年 12 月 11-13 日、大阪
4. 宮本勝一、三宅幸子、山村隆 : 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)における COX-2 阻害剤の効果、第 29 回日本臨床免疫学会、平成 13 年 12 月 11-13 日、大阪
5. 三宅幸子、宮本勝一、山村隆 : 新規 NKT 細胞糖脂質リガンド MMY による実験的自己免疫性脳脊髄炎の抑制、第 31 回日本免疫学会、平成 13 年 12 月 11-13 日、大阪
6. 宮本勝一、三宅幸子、山村隆 : P0+/-マウスにおける胸腺内 P0 発現低下と実験的自己免疫神経炎感受性の亢進、第 31 回日本免疫学会、平成 13 年 12 月 11-13 日、大阪
7. 長山成美、三宅幸子、山村隆 : 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)における NK 細胞/NK-LAK 細胞の体内動態および疾患抑制性の検討、第 14 回日本神経免疫学会、平成 14 年 2 月 7-8 日、東京
8. 宮本勝一、三宅幸子、水野美歩、岡伸幸、

山村隆 : 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE) の治療における選択的 COX-2 阻害剤の効果、第 14 回日本神経免疫学会、平成 14 年 2 月 7-8 日、東京

9. 林幼偉、三宅幸子、山村隆 : CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞による実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の調節、第 14 回日本神経免疫学会、平成 14 年 2 月 7-8 日、東京
10. 山村隆、宮本勝一、三宅幸子 : 自己免疫性脳脊髄炎 に対する NKT 細胞糖脂質リガンド療法、第 14 回日本神経免疫学会、平成 14 年 2 月 7-8 日、東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

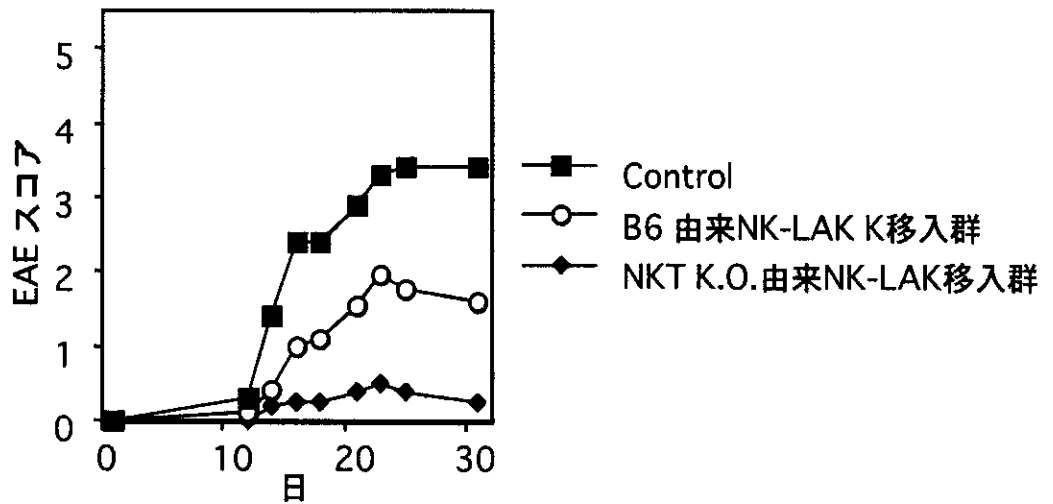


図1. Effector phaseにおけるNK-LAK移入によるEAE抑制効果  
 B6マウスにMOG<sub>35-55</sub>ペプチドでEAEを誘導した。B6マウスないしは、NKTノックアウト由来のNK-LAK細胞を誘導7日めから毎週投与すると、EAEは抑制された。

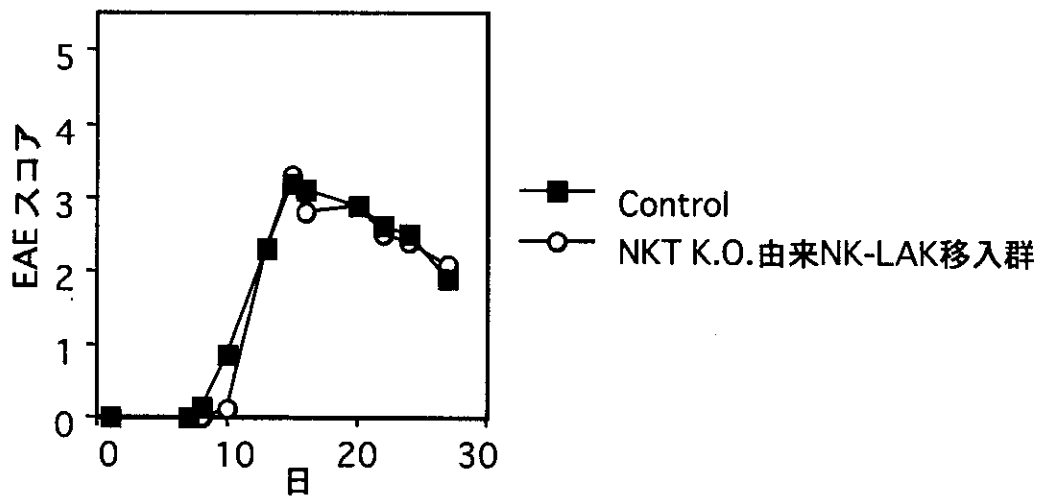


図2. Induction phaseにおけるNK-LAK移入によるEAE抑制効果  
 B6マウスにMOG<sub>35-55</sub>ペプチドでEAEを誘導した。NKTノックアウト由来のNK-LAK細胞を誘導1日めから毎週投与すると、EAEは抑制されなかった。

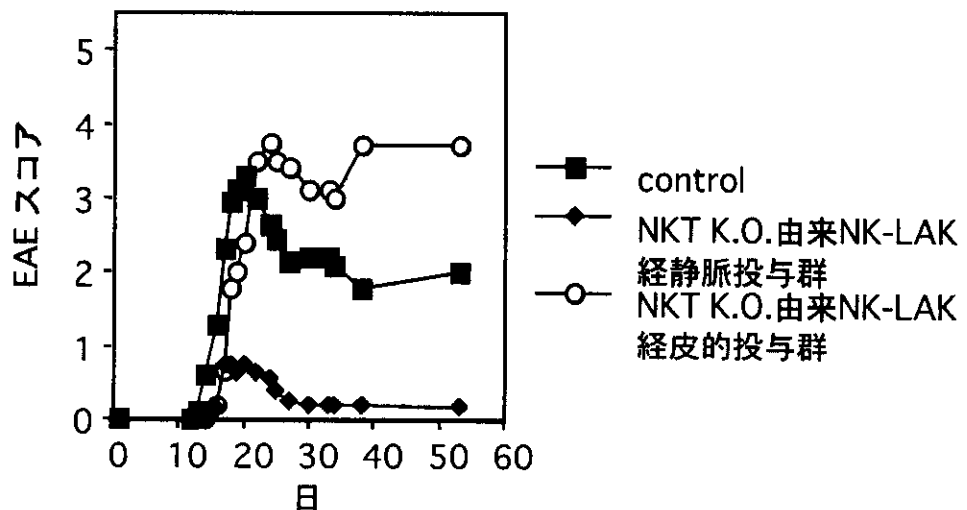


図3. 投与経路におけるNK-LAK移入によるEAE抑制効果の違い  
 B6マウスにMOG<sub>35-55</sub>ペプチドでEAEを誘導した。NKTノックアウト由来のNK-LAK細胞を誘導7日めから毎週投与すると、経静脈投与でのみEAEを抑制した。

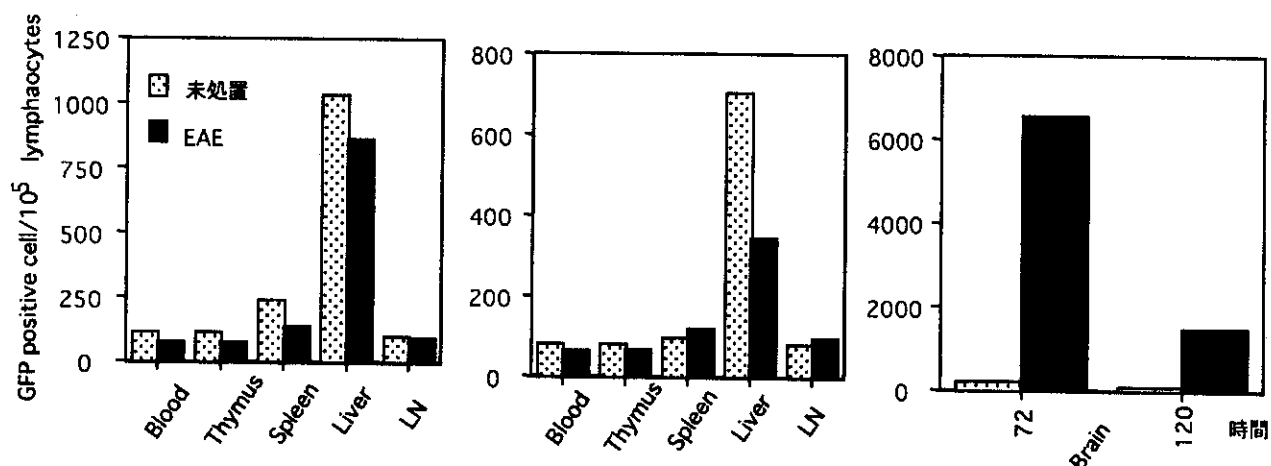


図4. GFPトランスジェニックマウス由来NK-LAK細胞の組織移行  
 未処置B6マウスもしくはEAEを誘導したB6マウスに、GFPトランスジェニックマウスより調整したNK-LAK細胞を移入し、時間経過を追って各組織への移行をフローサイトメトリーを用いて検出した。EAEを誘導したB6マウスでは、特に中枢神経内への浸潤がみられた。

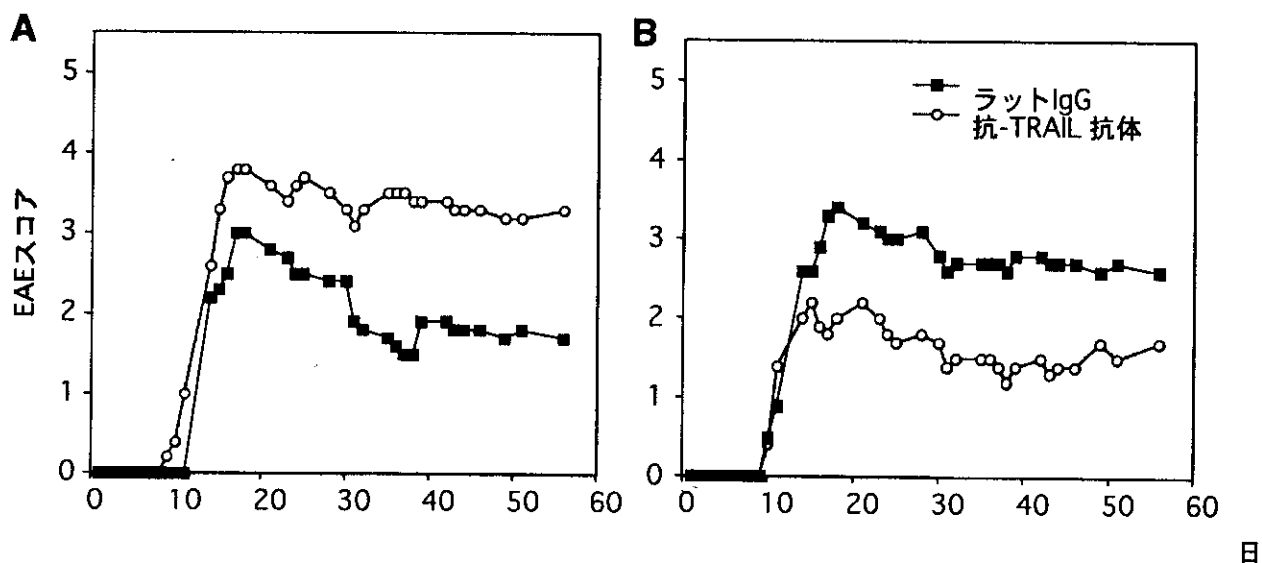


図5. Effector phaseにおける抗TRAIL抗体投与によるEAE抑制効果  
 B6マウスにMOG<sub>35-55</sub>ペプチドでEAEを誘導した。  
 A: 抗-TRAIL抗体を誘導日、3日後に投与すると、EAEは増悪した。  
 B: 抗-TRAIL抗体を誘導7日、10日、13日後に投与すると、EAEは抑制された。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

分担研究報告書

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ )特異的リガンド, troglitazone  
による実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) 抑制

分担研究者 菊地 誠志

北海道大学大学院医学研究科脳科学専攻神経病態学講座神経内科学 助手

**研究要旨** 核内受容体の一つである, PPAR- $\gamma$ は脂肪代謝や糖代謝において重要な働きを示し, そのリガンドのいくつかはインスリン非依存性糖尿病の治療に用いられてきた. 一方で, この受容体を介した免疫系の調節作用も最近報告されている. PPAR- $\gamma$ は activated macrophage で発現が認められ, proinflammatory cytokine や iNOS の発現を抑制することが示された. 我々は, PPAR- $\gamma$ 特異的リガンドの一つである troglitazone の投与による, 多発性硬化症 (MS) の動物モデル, EAE の発症, 進展への効果を検討した. その結果, troglitazone 投与により EAE の臨床症状は軽快し, また発症を遅らせることが判明した. また, その抑制効果は TNF- $\alpha$ や IL-1 $\beta$ などの proinflammatory cytokine 発現抑制によることが示唆された. PPAR- $\gamma$ のリガンドは EAE 抑制効果があり, 今後の MS への臨床応用が期待される.

**A. 研究目的**

核内受容体の一つである, PPAR- $\gamma$ は脂肪代謝や糖代謝において重要な働きを示し, そのリガンドのいくつかはインスリン非依存性糖尿病の治療に用いられてきた. 一方で, この受容体を介した免疫系の調節作用も最近報告されている. 即ち, PPAR- $\gamma$ は活性化 macrophage で発現が認められ, AP-1 や NF- $\kappa$ B などの transcription factor を抑制することにより, proinflammatory cytokine や iNOS の発現を抑制することが示された. 我々は, これらの PPAR- $\gamma$ を介した働きに注目し, PPAR- $\gamma$ 特異的リガンドの一つである troglitazone の投与による多発性硬化症

(MS) の動物モデル, EAE の発症, 進展への効果を検討した.

**B. 研究対象・方法**

EAE は MOG35-55 ペプチドを用いて 8~10 週齢の B6 マウス (♀) に誘導した. troglitazone は 0.5% の carboxymethyl cellulose (CMC) 液に溶解し, 1 日 1 回金属ゾンデにて強制経口投与した. コントロール群には, CMC 液のみを投与した. 臨床症状は連日観察し, 以下の clinical score に従って記録した. no detectable signs of EAE, 0; complete loss of tail tonicity, 1; flaccid tail and abnormal gait (ataxia and/or paresis of hind limbs), 2; hind limbs paralysis, 3; hind limbs paralysis with hind body paresis, 4; hind and forelimbs paralysis, 5; death, 6



### C. 研究結果

まず、はじめに、troglitazone の濃度を 0, 50, そして、100mg/kg/day の濃度に分け、MOG 初回免疫前日より、一日一回投与し、clinical score が 0 になるまで投与した時の経過を追跡した。その結果、troglitazone 投与群では、一日あたりの量が 50mg/kg, 100mg/kg のいずれでも maximum clinical score は control 群より有意に改善していた。一方、発症するまでの日数においては、50mg/kg 投与群は control 群と差がなく、100mg/kg 投与群は control 群より有意に発症が遅くなった。このことから、以後の実験は、一日あたりの投与量をすべて 100mg/kg とした (Fig.1)。

次に、troglitazone は induction phase と effector phase のいずれに有効であるのかをみるため、発症日近傍の MOG 免疫 9 日目までと MOG 免疫 9 日目以降から troglitazone を投与したグループに分けて検討した。その結果、9 日目までのグループでは、発症日が遅くなるものの、その後の maximum clinical score には影響を与えなかった。一方、9 日目以降に troglitazone を投与したグループでは、maximum clinical score は有意に改善していたことから、troglitazone は主に、effector phase に作用すると考えられた。

次に、troglitazone の臨床上的効果を検証するため、病理学的を検討をおこなった。MOG 投与 25-30 日目に、下位腰髄を取り出し、H&E 染色を行い、炎症部位を比較検討した。その結果、troglitazone 投与群で著明に炎症が抑制された。

次に、troglitazone の効果の機序を検討するため、まず、T cell proliferation を control 及び troglitazone 投与群で行った。troglitazone 投与群と control 群で、それぞれ、MOG 投与 10 日目のマウスの所属リンパ節

から T 細胞を取り出し、in vitro において MOG を再刺激し、増殖能をみた。その結果、T 細胞の増殖能には差は認められなかった。また、この実験の際の培養上清液を ELISA にて IFN- $\gamma$  と IL-4 を調べたが、IFN- $\gamma$  の濃度は troglitazone 投与群と control 群で差はなく、IL-4 は両者とも検出感度以下であった。

次に、troglitazone の治療効果の機序に関して、最近 PPAR- $\gamma$  の抗炎症作用として注目されている、マクロファージにおける各種サイトカインなどの発現抑制効果について検討するため、初回の MOG 投与から 25 日前後に、全脊髄を取り出し、RT-PCR を行った。その結果、脂肪組織に特異的に発現しているとされる PPAR- $\gamma$ 2 は発現がみられなかったが、マクロファージなどに発現している PPAR- $\gamma$ 1 は troglitazone 投与群で発現が増強していた。さらに、IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  の発現は troglitazone 投与群で抑制されていた。以上の結果を EF-1 との比較により、半定量的に評価したところ、proinflammatory cytokine、特に TNF- $\alpha$  の発現が有意に troglitazone 投与群で抑制されていた。一方、troglitazone で発現が抑制されるといわれている iNOS は troglitazone 投与群と control 群で差はなかった。

### D. 考察

核内レセプターの一つである PPAR- $\gamma$  の特異的リガンド、troglitazone は MS の動物実験モデルである EAE において、proinflammatory cytokine の発現を抑制することにより、EAE 抑制効果を示すことが考えられた。これらのことから、PPAR- $\gamma$  アゴニストの MS 治療への応用が期待される。しかし、troglitazone は糖尿病治療薬として、臨床的に使用されたものの、重篤な肝障害を惹起することがあるとの理由で使用

止となったため、臨床応用という点から現時点では困難である。しかし、PPAR- $\gamma$ のligandはこれまでにいくつか開発されてきており、今後、より副作用が少なく、抗炎症作用が強い薬剤が開発されれば、多発性硬化症への臨床応用の可能性が出てくるものと思われる。

## E. 結論

核内レセプターの一つである PPAR- $\gamma$ の特異的リガンド、troglitazoneがMSの動物実験モデルであるEAEにおいて、proinflammatory cytokineの発現を抑制することにより、EAE抑制効果を示すことが明らかになった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Niino M, Iwabuchi K, Kikuchi S, Ato M, Morohashi T, Ogata A, Tashiro K, Onoe K. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice by an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Neuroimmunol* 2001; 116: 40-48.
- 2) Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Sasaki H, Tashiro K. Genetic polymorphisms of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist in association with multiple sclerosis in Japanese patients. *J Neuroimmunol* 2001; 118: 295-299.
- 3) Niino M, Kikuchi S, Fukazawa T, Yabe I, Sasaki H, Tashiro K. Heat shock protein 70 gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *Tissue Antigens*. 2001; 58: 93-96.
- 4) 新野 正明, 菊地 誠志, 深澤 俊行, 田代 邦雄: 多発性硬化症の病型-脊髄型に焦点をあてて, 脊椎脊髄ジャーナル, 2001; 14: 180-183.
- 5) 菊地 誠志, 深澤 俊行, 新野 正明, 宮岸 隆司, 田代 邦雄. 疫学および免疫学的側面からみた候補遺伝子の検討. *神経免疫学* 2002; 10: 21-22.
- 6) 輿水 修一, 菊地 誠志, 深澤 俊行, 新野 正明, 田代 邦雄. 多発性硬化症における TNF- $\beta$ 遺伝子多型についての検討. *神経免疫学* 2002; 10: 48-49.
- 7) 宮岸 隆司, 新野 正明, 深澤 俊行, 菊地 誠志, 濱田 毅, 田代 邦雄. 北海道在住の MS における DRB1\*1501, DPB1\*0301, DPB1\*0501 の再検討. *神経免疫学* 2002; 10: 50-51.
- 8) 新野 正明, 岩淵 和也, 菊地 誠志, 阿戸 学, 諸橋大樹, 緒方昭彦, 小野江和則, 田代邦雄. ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ )特異的リガンド, troglitazoneによる実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)抑制. *神経免疫学* 2002; 10: 110-111.

### 2. 学会発表

#### a. 国際学会

- 1) Niino M, Iwabuchi K, Kikuchi S, Ato S, Morohashi T, Ogata A, Tashiro K, Onoe K. Amelioration of experimental

autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice by an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . 126<sup>th</sup> Annual Meeting American Neurological Association, Chicago, 2001.

彦, 小野江 和則, 田代 邦雄. ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) 特異的リガンド, troglitazone による実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)抑制. 第 14 回日本神経免疫学会, 東京, 2002.

#### b. 国内学会

- 1) 新野 正明, 緒方 昭彦, 菊地 誠志, 田代 邦雄, 西平 順. 多発性硬化症及び神経ベーチェット病患者における髄液中の macrophage migration inhibitory factor (MIF) についての検討. 第 42 回日本神経学会総会, 東京, 2001.
- 2) 新野 正明, 岩渕 和也, 阿戸 学, 諸橋 大樹, 小野江 和則, 菊地 誠志, 緒方 昭彦, 田代 邦雄. ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体  $\gamma$  特異的リガンド, トログリタゾンによる実験的自己免疫性脳脊髄炎抑制. 第 31 回日本免疫学会総会, 大阪, 2001.
- 3) 輿水 修一, 菊地 誠志, 深澤 俊行, 新野 正明, 田代 邦雄. 多発性硬化症における TNF- $\beta$  遺伝子多型についての検討. 第 14 回日本神経免疫学会, 東京, 2002.
- 4) 宮岸 隆司, 新野 正明, 深澤 俊行, 菊地 誠志, 濱田 毅, 田代 邦雄. 北海道在住の MS における DRB1\*1501, DPB1\*0301, DPB1\*0501 の再検討. 第 14 回日本神経免疫学会, 東京, 2002.
- 5) 新野 正明, 岩渕 和也, 菊地 誠志, 阿戸 学, 諸橋 大樹, 緒方 昭

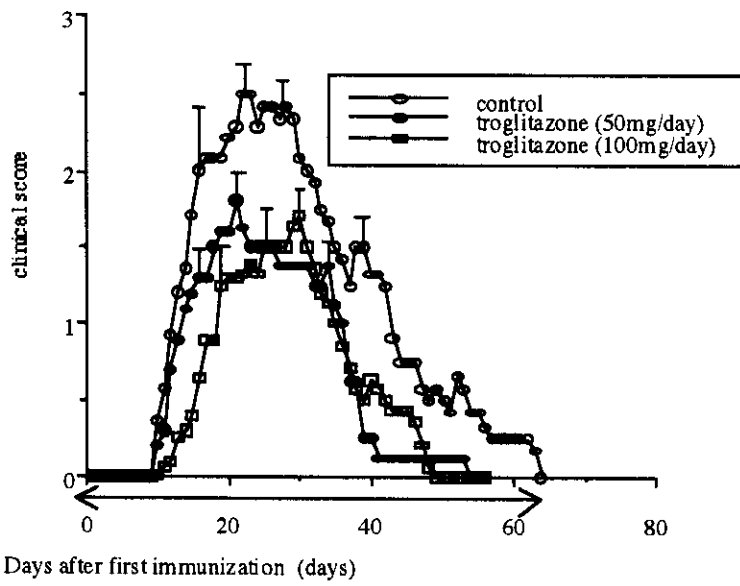
#### c. 招待講演

- 1) Niino M, Iwabuchi K, Kikuchi S, Ato S, Morohashi T, Ogata A, Tashiro K, Onoé K. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice by an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . International Symposium on NK/NKT cells in autoimmunity, Tokyo, 2001.
- 2) 菊地 誠志, 深澤 俊行, 新野 正明, 宮岸 隆司, 田代 邦雄. 疫学および免疫学的側面からみた多発性硬化症における候補遺伝子の検討. 第 14 回日本神経免疫学会, 東京, 2002.

#### H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

Fig.1



The mark ↔ shows the duration of the administration with troglitazone or vehicle once a day.

## 研究報告書

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

## 分担研究報告書

アミノ酸代謝阻害剤による実験的自己免疫性脳脊髄炎の抑制及びインターフェロン $\beta$ のもつ役割

分担研究者 横山和正 順天堂大学脳神経内科助手

### 研究要旨

必須アミノ酸であるトリプトファンの酸化酵素である indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)は、酵素は トリプトファンを分解することで生理的免疫寛容に重要な役割を持っている。本研究では IDO 代謝阻害剤の抗原特異的 T 細胞に対する影響、実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE) に対する治療、予防効果を in vitro, in vivo に於いて検討した。その結果予想に反して IDO 代謝阻害剤は EAE を導入期において抑制し生体内で利用されている免疫寛容のメカニズムが自己免疫疾患においてそのまま利用されている訳ではないことを発見した。アミノ酸代謝阻害剤を利用することで将来自己免疫疾患における寛容を誘導することが実現可能と考えられた。

### A. 研究目的

インターフェロン療法は多発性硬化症の再発予防の標準治療となりつつある。しかしその効果の発現は個人差がありまたその抑制機序も多種多様である。本研究では多発性硬化症におけるインターフェロン療法の効果の発現の解析をすべく実験的自己免疫性脳脊髄炎を利用し、必須アミノ酸代謝を介した生理的免疫寛容機構とインターフェロン $\beta$ との関連性を解明することをその目的とする。そのためまず本年はアミノ酸代謝阻害剤の実験的自己免疫性脳脊髄炎に対する影響を研究した。

### B. 研究方法

MBP TCR transgenic マウスの脳炎惹起性 T 細胞を in vitro の系で使用した。また SWR マウスにミエリンベースックプロテイン(MBP)の 83-99 残基に

相当するペプチドを用いて感作 EAE を誘導した。脾 T 細胞の MBP ペプチドに対する反応性は、96-well 平底プレートを用い( $4 \times 10^5$  cells/well), ペプチドと共に IDO 代謝阻害剤を添加後 72 時間培養し、最終 24 時間のチミジン取込みで評価した。IDO 代謝阻害剤直接投与実験では除放剤をマウス皮下に埋め込み行った。EAE の誘導は足底にペプチドをコンプリートフロイントアジュバントと共に免疫し百日咳毒素を 2 度静脈内投与した。EAE の評価はダブルブラインドで行った。

### C. 研究の結果

1) in vitro における脳炎惹起細胞に対するトリプトファン、IDO 代謝阻害剤の作用。

MBPAc1-11 TG マウスの T 細胞は脳炎惹起性であり *in vitro* では免疫を行わなくても MBP Ac1-11 peptide をリンパ球に加えた **proliferation assay** で濃度依存的に著明な細胞増殖を認める。この系に、IDO 代謝阻害剤を異なる濃度で加えたが、高濃度以外では明かな細胞増殖の抑制は認めなかった。またトリプトファンを除去した培養液中では細胞増殖は認めず細胞死に落ち込んだ。

2) 次に *in vivo* におけるトリプトファン、IDO 代謝阻害剤の作用について検討した。SWR マウスは MBP peptide 83-99 をコンプリートフロイントアジュバントとともにマウスの足底に免疫し百日咳毒素を注射することで 80-100% のマウスに於いて実験的自己免疫性脳脊髄炎を再現することができる。そこでこの系を使ってトリプトファンを毎日腹腔内注射する群、IDO 代謝阻害剤もしくは **placebo control** を含有した徐放剤を免疫前から皮下に埋め込んだ群（導入期群）、と免疫後 7 日後に埋め込んだ群（効果期群）とを **double blind** で症状を解析した。

トリプトファン投与群では明らかな臨床スコアの変化は認められなかった。IDO 代謝阻害剤埋め込み群では導入期群のみに有意な脳炎抑制効果を認めた。効果期投与群ではプラセボ群との差は認めなかった。

上記実験マウスの脳及び脊髄の細胞浸潤の度合いを組織学的に検討した。細胞浸潤は IDO 代謝阻害剤導入期投与群で有意に減少していた。以上のことから IDO 代謝阻害剤は導入期において脳脊髄炎抑制効果を持ち病的にも

脳への細胞浸潤を抑制していることが判明した。

#### D. 考察

生理的免疫寛容に重要なトリプトファンの分解酵素である IDO の阻害により実験的自己免疫性脳脊髄炎を抑制できることが明らかとなった。IDO の阻害がなぜ実験的自己免疫性脳脊髄炎を抑制するかについての過程は依然不明のままであり引き続き研究を必要とする。*in vitro* の実験で IDO 代謝阻害剤は低濃度では細胞増殖には影響を与えないことから IDO 代謝阻害剤の抑制効果は近年注目を集めている

**regulatory T** 細胞の誘導を介した可能性、さらにはインターフェロン $\beta$  の誘導を介している可能性も考えられる。

#### E. 結論

生体内で利用されている免疫寛容のメカニズムが自己免疫疾患においてそのまま利用されている訳ではないことが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

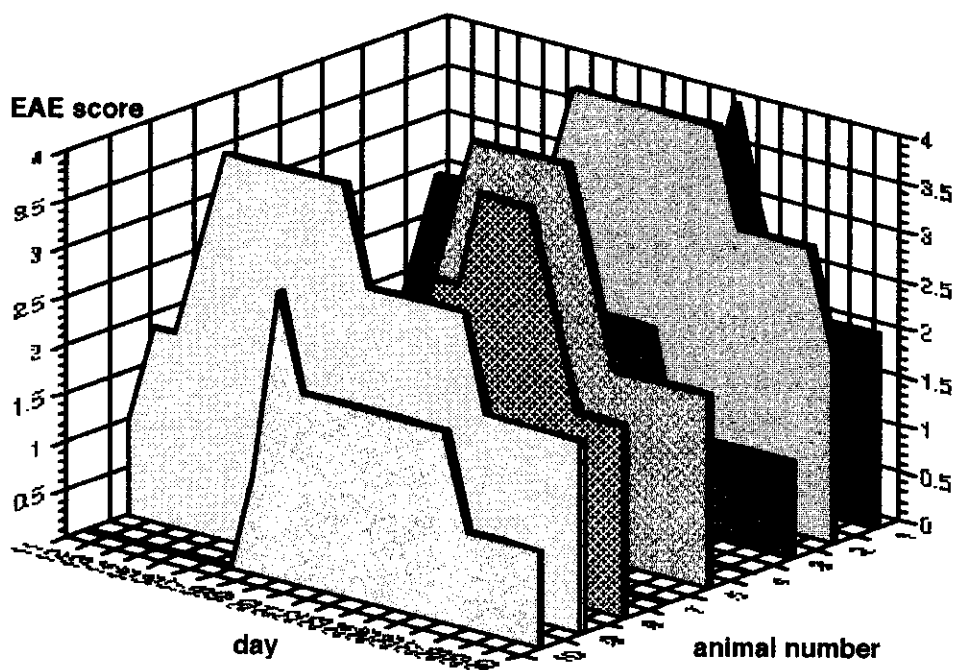
##### 2. 実用新案登録

なし

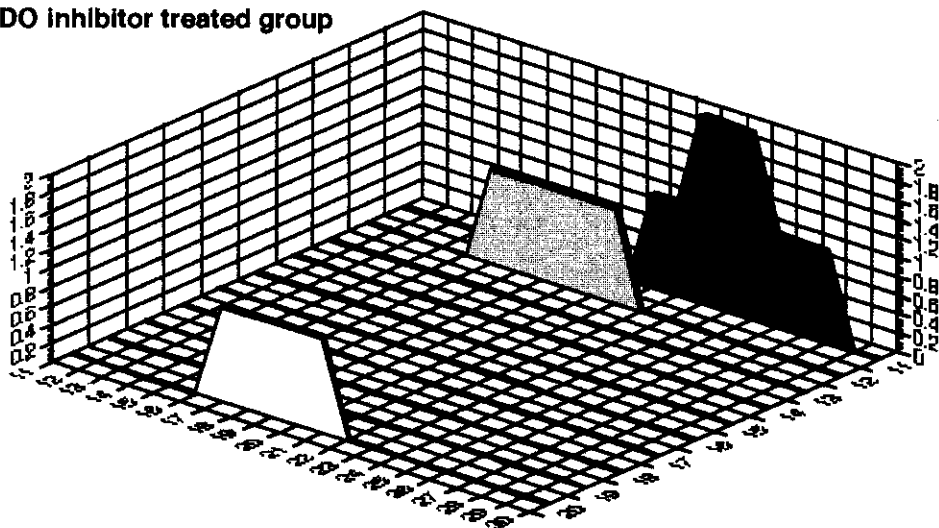
##### 3. その他

なし

**Placebo group**



**IDO inhibitor treated group**



**図の説明**

SWR マウスは MBP peptide 83-99 をコンプリートフロイントアジュバントとともにマウスの足底に免疫し百日咳毒素を注射した。IDO 代謝阻害剤もしくは placebo control を含有した徐放剤を免疫前から皮下に埋め込んだ群（導入期群）、と免疫後7日後に埋め込んだ群（効果期群）double blind で症状を解析した。

## ONO2506の経口投与はCR-EAEを予防する

分担研究者 野村恭一 埼玉医科大学神経内科 神経免疫部門  
研究協力者 大貫 学, 滝澤功一

研究要旨 ONO-2506 (2R-プロピルオクタン酸) はastrocyteのS-100 $\beta$ 蛋白の増加抑制作用を有し, astrocyteの活性化を抑制することが報告されている. astrocyteはT細胞に対して抗原提示機能を有し, 免疫性神経疾患の発病に重要な役割を果たしている. 今回われわれは, このONO-2506の免疫調節機能に着目し, 多発性硬化症 (MS) の動物モデルである慢性再発性自己免疫性脳脊髄炎 (CR-EAE) を作成し, ONO-2506経口投与による神経症候の抑制, 再発予防効果について検討した. その結果, ONO-2506の経口投与 (50mg/kg/匹) によりEAE神経症候を軽減し, また再発時の神経症候の抑制効果を認めた. 今後, ONO-2506経口投与によるMS再発予防のメカニズムの解明が重要である.

### A. 研究目的

われわれはこれまでに, ONO-2506の腹腔内投与によりGuillain-Barre症候群 (GBS) の動物モデルである実験的自己免疫性神経炎 (EAN) の治療および抑制効果を示すことを報告した. さらに最近, ONO-2506の腹腔内投与により多発性硬化症 (MS) の動物モデルである慢性再発性自己免疫性脳脊髄炎 (CR-EAE) の再発を予防することを報告した.

本研究では, ONO-2506を経口投与することにより腹腔内投与と同様に, CR-EAEの再発予防効果を認めるかどうかを検討した. この研究により, 今後, MSの再発予防経口薬としてONO-2506の進展の可能性を検討した.

### B. 研究方法

#### ① 動物:

- 1) NODLTマウス (再発性EAEマウス) 30匹
- 2) C57BL6マウス (単相性EAEマウス) 40匹を使用した.

#### ② EAEモデルの作成:

抗原としてミエリン・オリゴデンドロサイト

糖蛋白 (MOG) の35-55残基に相当するペプチド (MOG35-55, クラボウ社製) を用いて感作EAEを誘導した. 100  $\mu$ g/マウスを一側足底および後頸部皮下に分注, 接種した. 神経症候の発現を確実に安定させるために同日にPertussis toxinを尾静脈から注入した. 神経症候は抗原接種当日より60日間連日で観察した.

#### ③ ONO-2506の経口投与方法:

抗原接種日から連日ONO-2506を経口投与した. 胃ゾンデをセットした注射器にONO-2506を必要量とり, 確実に固定したマウスの口腔内に胃ゾンデを十分深く挿入し, 注射した. 経口注入が安定, 可能となるまで, 予備実験にてこの方法を繰り返し施行した.

#### ④ C57BL6マウスのONO-2506経口投与量:

ONO-2506の経口投与量を, 10mg, 30mg, 50mg/kg/匹の3グループに分け, それぞれの投与量において神経症候の抑制効果を検討した.

#### ⑤ NODLTマウスCR-EAEの再発抑制効果:

CR-EAEの再発抑制効果を検討するために, EAEコントロール群, 予防群 A (抗原接種後28



日までONO-2506を経口投与，その後投与を中止し，経過を観察する），予防群B（抗原接種後60日間，連日，ONO-2506を経口投与を継続，観察する）の3群に分けて経過を観察した．なお，ONO-2506の経口投与量は50mg/kg/匹とした．

### C. 研究結果

C57BL6マウスの単相製EAEモデルの検討では，コントロール群では平均13.8日に神経症候を呈しはじめ，19.5日に神経症候のピークを迎え，30日目にはほぼ全例において神経症候は消失した．なお，ピーク時の臨床スコアは平均3.0であった．

ONO-2506経口投与量の検討では，50mg/kg/匹投与群において最も神経症候を抑制を認めた（図1）．10mg投与群では，14.0日目に発症，神経症候のピークは19.9日，ピーク時の臨床スコアは平均3.0で，30日目に神経症候は消失した．30mg投与群では，14.9日目に発症，神経症候のピークは18.8日，ピーク時の臨床スコアは平均1.8で，28日目に神経症候は消失した．

50mg投与群では，15.0日目に発症，神経症候のピークは19.1日，ピーク時の臨床スコアは平均1.2で，27日目に神経症候は消失した．

NODLTマウスによる再発性EAEマウスの検討では（図2），EAEコントロール群で1回目の神経症候の発症は平均14.2日，神経症候のピークは20.1日目，ピーク時の臨床スコアは平均3.6で，29日目には神経症候はほぼ消失した．2回目の神経症候は43.7日目に発現し，神経症候のピークは49.8日目，ピーク時の臨床スコアは平均3.8で，59日目には神経症候はほぼ消失した．

予防群Aでは，1回目の神経症候は15.4日目に出現，神経症候のピークは20.7日，ピーク時の

臨床スコアは平均1.4で，27日目には神経症候は消失した．2回目の神経症候は44.8日目に発現し，神経症候のピークは50.7日，ピーク時の臨床スコアは平均3.4で，59日目には神経症候は消失した．

予防群Bでは，1回目の神経症候は15.6日目に出現，神経症候のピークは20.4日，ピーク時の臨床スコアは平均1.3で，26日目には神経症候は消失した．2回目の神経症候は45.6日目に発現し，神経症候のピークは50.5日，ピーク時の臨床スコアは平均1.1で，57日目には神経症候は消失した．

### E. 結論

1) C57BL6マウスの単相製EAEモデルにおけるONO-2506の経口投与量の検討では，投与量に比例して神経症候の抑制効果を認めた．

2) NODLTマウスのCR-EAE再発抑制効果の検討では，ONO-2506の経口投与（50mg/kg/匹）により1回目のEAE神経症候を軽減し，また再発時の神経症候の抑制効果を認めた．

### F. 健康危険情報 なし

### G. 研究発表

#### 1. 発表論文

##### a. 雑誌

1) 木下俊介、富岳 亮、野村恭一、井口貴子、高濱美里、三井隆男、金子 厚、大野良三、濱口勝彦、島津邦男：多発性硬化症の非活動期におけるCD8系抑制T細胞．神経免疫学 7（1）：62-63，1999

2) 古川千湖、野村恭一、高岡正敏、小川恵弘、加賀井和彦、高砂子由佳子、木澤英樹、細川武、濱口勝彦、島津邦男：P2蛋白と相同性のダ

- ニ合成ペプチドはEAN 抗原性を有する. 神経免疫学 7 (1) : 84-85, 1999
- 3) 金子 厚, 古屋大典, 山元敏正, 野村恭二, 島津邦男: Stiff-man症候群における抗ラ氏島抗体. 神経内科 50 : 407-409, 1999
- 4) Kaneko A, Nomura K, Mitui T, Takasago Y, Kokawa C, Kinoshita S, Kizawa H, Iguchi T, Takamama M, Yamamoto T, Matsumura M, Maruki T, Hamaguchi K and Shimazu K.: Correlation between clinical symptoms and extracranial vertebral arterial flow in subclavian steal syndrome. J Saitama Med School 26:137-144, 1999
- 5) 野村恭二, 古川千湖, 木澤英樹, 高岡正敏, 小川恵弘, 濱口勝彦, 島津邦男: ダニ感染と Guillain-Barre症候群との関連性. Neuro・infection 4 : 134-135, 1999
- 6) 野村恭二: AIDPをめぐる最近の話題- 免疫グロブリンによる Guillain-Barre症候群の治療. 神経免疫学 7(2): 31-37, 1999
- 7) 木澤英樹, 野村恭二, 富岳 亮, 大貫 学, 古川千湖, 三井隆男, 金子 厚, 大野良三, 濱口勝彦, 島津邦男: 実験的アレルギー性神経炎に対するONO-2506の予防および治療効果. 神経免疫学 8 (1) : 92-93, 2000
- 8) 井口貴子, 富岳 亮, 野村恭二, 三井隆男, 加賀井和幸, 柴木謙治, 細川 武, 大野良三, 濱口勝彦, 島津邦男: Guillain-Barre症候群におけるCD4+CD29+細胞とCD8+CD11b dull細胞. 神経免疫学 8 (1) : 114-115, 2000
- 9) 金子 厚, 武井和夫, 榎本享子, 三井隆男, 野村恭二, 岩崎慎一, 丸木多恵子, 島津邦男: 病初期にアテトーゼ様運動が出現したCreutzfeldt-Jakob病の1例. Brain Nerve 51:887-890, 1999
- 10) 野村恭二, 井口貴子, 金子 厚, 大野良三, 高岡正敏: P2蛋白特異T細胞を認めた Guillain-Barre症候群の臨床的特徴とダニ感染との関連. 平成11年度 厚生省免疫性神経疾患調査研究班 印刷中 1999
- 11) 加賀井和幸, 野村恭二: 実験的自己免疫性神経炎における免疫グロブリン療法予防および治療効果. 埼玉医大誌 27 : 171-182, 2000
- 12) 野村恭二, 富岳 亮, 井口貴子, 島津邦男: 実験的アレルギー性神経炎に対する人參養榮湯の抑制作用-臨床経過とリンパ球サブセットの変動. 漢方と免疫アレルギー 14 : 68-74, 2000
- 13) 井口貴子, 野村恭二, 富岳 亮, 島津邦男: 多発性硬化症に対する人參養榮湯投与によるCD8系T細胞の増加と再発予防効果. 漢方と免疫アレルギー 14 : 75-83, 2000
- 14) 高濱美里, 野村恭二, 島津邦男: 脳梗塞における白血球接着分子LFA-1と血管内皮接着分子ICAM-1の経時的変動. 脳卒中 22 : 487-494, 2000
- 15) 木澤英樹, 野村恭二, 島津邦男: ONO-2506の実験的自己免疫性神経炎に対する予防および治療効果. 神経治療 18 : 259-266, 2001
- 16) 井口貴子, 野村恭二, 富岳 亮, 島津邦男: Guillain-Barre症候群の臨床病期, 臨床症候と末梢血リンパ球サブセット. 臨床神経 41 : 11-17, 2001
- 17) 柴木謙次, 野村恭二, 富岡 亮, 島津邦男, 井上 勉, 岡田浩一: Guillain-Barre症候群と膜性腎症によるネフローゼ症候群を併発した1例. 末梢神経 11 : 1-6, 2001
- 18) 野村恭二, 濱口勝彦, 細川 武ら Guillain-Barre症候群に対するグロブリンS静脈内投与と血漿交換療法とのランダム割り付け比較試験. 神

経治療 18:69-81, 2001

- 19) 野村恭一, 木澤英樹, 柴木謙次, 滝澤功一, 高砂子由佳子, 三井隆男, 大貫 学, 富岳亮, 大野良三: ONO-2506によるEAN抑制作用の検討. 平成12年度 厚生省免疫性神経疾患調査研究班 印刷中 2001
- 20) 柴木謙次, 野村恭一, 井口貴子, 三井隆男, 大貫 学, 島津邦男, 濱口勝彦, 大野良三: 人参養栄湯によるEAE予防効果. 神経免疫学 9 (1):70-71, 2001
- 21) 野村恭一: 脳血管障害と膝蓋腱反射. ドクターサロン 43 (6):441-445, 1999
- 22) 野村恭一, 濱口勝彦: 風疹ウイルス 神経症候群 その他の神経疾患を含めて I 日本臨床 別冊 26:458-464, 1999
- 23) 野村恭一, 大野良三: 抗腫瘍薬 (ビンクリスチンなど) 神経症候群 その他の神経疾患を含めて I I 日本臨床 別冊 27:576-581, 1999
- 24) 野村恭一, 二見俊郎, 齋藤豊和: 末梢神経障害の治療 -現況と問題点- 今月の治療 8:7-23, 1999
- 25) 野村恭一: 標準治療と最新治療-メリット・デメリット Guillain-Barre症候群 Clinical Neuroscience 18; 114-115, 2000
- 26) 三井隆男, 野村恭一: 脳血管障害と腱反射. 外科治療 11:613-614, 2000
- 27) 二見俊郎, 野村恭一, 齋藤豊和: ニューロパチーの治療法をめぐって. 今月の治療 8:7-23, 2000
- 28) 大貫 学, 野村恭一: Guillain-Barre症候群. 主なニューロパチーの最近の知見. Clinical Neuroscience 19; 40-42, 2001
- 29) 大貫 学, 野村恭一: Aschner反射 Clinical Neuroscience 19; 599, 2001

30) 三井隆男, 野村恭一: Guillain-Barre 症候群, EBMに基く臨床データブック 臨床医 27 (増加号):1610-1617, 2001

b. 単行本

- 1) 富岳 亮, 野村恭一: 頭痛 図解 高齢者介護実践ガイド, 1999, 384-391, 文光堂
- 2) 野村恭一, 大野良三: リンパ球サブセットと神経疾患. 神経精神疾患 state of arts ver. 1 医学のあゆみ 262-265, 1999
- 3) 野村恭一: 脳血管障害, 糖尿病療養指導, 知識の総まとめ 片山茂裕, 河津捷二 監修 総合医学社, 73-76, 2001
- 4) 野村恭一: ガラクトセレブロシド, P0糖蛋白, P2蛋白 (印刷中) 医学書院

2. 学会発表

a. 国際学会

- 1) Nomura K, Kokawa C, Takasago Y, Iguchi T, Takizawa K, Ohonuki M, Hamaguchi K, Shimazu K.: Relationship between mite infection and Guillain-Barre syndrome. 第XVII回 世界神経学会 (ロンドン) 6/17-22 2001

b. 国内学会

- 1) 木下俊介, 富岳 亮, 野村恭一, 井口貴子, 高濱美里, 三井隆男, 金子 厚, 大野良三, 濱口勝彦, 島津邦男: 多発性硬化症の非活動期におけるCD8系抑制T細胞. 第11回 日本神経免疫学会 (東京) 2/16-17 1999
- 2) 古川千湖, 野村恭一, 高岡正敏, 小川恵弘, 加賀井和彦, 高砂子由佳子, 木澤英樹, 細川武, 濱口勝彦, 島津邦男: P2蛋白と相同性のダニ合成ペプチドはEAN 抗原性を有する. 第11回

日本神経免疫学会(東京) 2/16-17 1999

3) 木澤英樹、野村恭一、富岳 亮、古川千湖、井口貴子、布袋屋 恵、栗原一浩、金子 厚、島津邦男：ONO-2506は実験的アレルギー性神経炎の治療薬となる。第40回日本神経学会総会(東京)

4) 高砂子由佳子、富岳 亮、野村恭一、木下俊介、井口貴子、木澤英樹、高濱美里、濱口勝彦、島津邦男：脳梗塞におけるリンパ球および血管内皮接着分子。第40回日本神経学会総会(東京)

5) 富岳 亮、野村恭一、木下俊介、高砂子由佳子、柴木謙次、辻 肇一、大野良三、濱口勝彦、島津邦男：多発性硬化症の非活動期における suppressor-effector、NK、CTL、 $\gamma/\delta$ T細胞。第40回 日本神経学会総会(東京)

6) 野村恭一、古川千湖、木澤英樹、高濱美里、加賀井和幸、吉田 裕、大貫 学、細川 武、島津邦男：ダニ由来合成ペプチドによるEAN -P2 蛋白に対する細胞性免疫と病理組織所見- 1999 第40回 日本神経学会総会(東京)

7) 三井隆男、徳永大道、野村恭一、入野誠郎、古屋大典、富岳 亮、岩崎 章、島津邦男：高IgE血症を伴うニューロパチーの臨床的検討。1999 第40回 日本神経学会総会(東京)

8) 高濱美里、富岳 亮、野村恭一、高砂子由佳子、濱口勝彦、島津邦男：急性期脳梗塞における単球、リンパ球、顆粒球および血管内皮接着分子の経時的変動。1999 第24回 日本脳卒中学会総会(横浜)

9) 木澤英樹、野村恭一、富岳 亮、柴木謙次、高濱美里、古川千湖、布袋屋 恵、金子 厚、細川 武、濱口勝彦、島津邦男：ONO-2506は実験的アレルギー性神経炎を治療する。1999 第17回 日本神経治療学会総会(横浜)

10) 井口貴子、富岳 亮、野村恭一、木下俊

介、高砂子由佳子、三井隆男、武井和夫、大野良三、濱口勝彦、島津邦男：人参養栄湯はCD8系抑制性T細胞を増加させ多発性硬化症の再発を予防する。1999 第17回 日本神経治療学会総会(横浜)

11) 高濱美里、野村恭一、富岳 亮、高砂子由佳子、布袋屋 恵、木澤英樹、井口貴子、島津邦男：脳梗塞における白血球接着分子LFA-1、Mac-1の経時的検討。1999 第11回 日本脳循環代謝学会総会(秋田)

12) 古屋大典、野村恭一、島津邦男、山田聖一、松谷雅生：MRIで脊髄腫瘍との鑑別を要した脊髄結核腫の1例。1999 第13回 埼玉脊髄シンポジウム

13) 野村恭一、古川千湖、木澤英樹、高岡正敏、小川恵弘、濱口勝彦、島津邦男：ダニ感染とGuillain-Barre症候群との関連性。1999 第4回 日本神経感染症学会(仙台)

14) 野村恭一、古川千湖、高岡正敏、松本克彦：ダニ感染とGuillain-Barre症候群との関連。1999 第51回 日本衛生動物学会(浦和)

15) 柴木謙次、富岳 亮、岩崎 章、野村恭一、島津邦男：CIDPとの鑑別を要した血管炎性多発ニューロパチーの1例。1999 第150回 日本神経学会関東地方会

16) 高濱里美、浅野賀雄、金 浩澤、金 浩澤、荒木信夫、野村恭一、島津邦男：Migraine with auraの発作間欠期における接着分子動態の検討。1999 第27回 日本頭痛学会総会

17) 野村恭一、富岳 亮、井口貴子、島津邦男：人参養栄湯は実験的アレルギー性神経炎を抑制する。-臨床経過とリンパ球サブセットの変動- 第19回 漢方免疫アレルギー研究会学術集会(東京) 1/22 2000

18) 井口貴子、野村恭一、富岳 亮、島津邦