

学内グラント 終了時報告書

平成18年度 学内グラント報告書

悪性高熱症素因者新規同定法の開発

研究代表者 水上 智 (埼玉医科大学 麻酔科学)

共同研究者 菊地 博達¹⁾, 岩瀬 良範¹⁾, 植村 靖史²⁾,
劉 天懿²⁾, 松下 祥²⁾

緒言

悪性高熱症 (malignant hyperthermia; MH) は、全身麻酔時に使用する揮発性の吸入麻酔薬や脱分極性筋弛緩薬の使用により発症する筋疾患である。臨床症状は高熱、筋強直、呼吸性・代謝性アシドーシス、頻脈、不整脈、高カリウム血症や高CK血症、ミオグロビン尿等を呈する^{1,2)}。この疾患は常染色体優性遺伝を示すが、日常生活上は全く問題がなく、全身麻酔を受けた場合にのみ発症するため、患者は悪性高熱症素因者 (malignant hyperthermia susceptible; MHS) と表現される。発症した場合には重篤で、適切な治療が行なわれなかった場合には死に至ることもある²⁾。疾患の本態は骨格筋細胞内のカルシウムイオン (calcium ion; Ca^{2+}) 動態異常に起因する代謝亢進であり、MHに特異的な臨床症状はなく、世界的に統一された臨床診断基準は今のところ存在しない。

現在のMHの確定診断は、局所麻酔下に筋生検を行い、骨格筋の Ca^{2+} 動態異常を直接観察することにより行われている。しかしこの方法にはいくつかの問題点がある。1. 素因者への侵襲性が高いこと、2. CICR(Ca^{2+} induced Ca^{2+} release)速度の測定を行っている施設が少ないこと、3. 筋肉採取後、48時間以内に検査を終了する必要があること、4. 測定に時間がかかり、同時に何例も検査をすることが不可能である等が挙げられる²⁾。原因遺伝子が1型リアノジン受容体 (Type 1 ryanodine receptor; RyR1) と判明していることから、遺伝子の変異点を検索する方法も試みられてきた。しかし、人種による変異点の差や、変異点の不明な症例も多いことが明らかとなっており、遺伝子変異の検索による診断は困難とされている³⁾。

遺伝要因を有するヒトが、MHを発症する可能性があるかどうかを、侵襲性の高い筋肉の生検に頼らず

に、簡便で、より精度が高い方法で予測することができれば、この疾患の解明、及び予防に貢献できる。採血による検査法は簡便で、患者への侵襲性が低い診断法といえる。

リンパ球は抗原や種々の液性因子により刺激されることで多様なサイトカイン産生性を示す。MHでみられる臨床症状は筋強直や代謝性アシドーシス、頻脈、体温上昇等多様であり、サイトカインによる作用等、免疫システムを巻き込んだ結果生じる可能性もある。近年、Bリンパ球には Ca^{2+} 放出チャネルとして機能するRyR1とイノシトール三リン酸受容体 (inositol triphosphate receptor; IP_3R) が存在し、これらを介して Ca^{2+} 応答が多様な免疫応答性に関与していることが示唆されている⁴⁾。

最近、 Ca^{2+} チャネルとして機能するRyR1が、マウスの樹状細胞 (dendritic cell; DC) に発現することが明らかにされた⁵⁾。DCは生体内の至る所に存在し、常に外界からの異物の侵入を監視し、生体内に侵入する異物特有の構造パターンを認識することで、未成熟な状態から免疫応答を惹起する成熟DCへと分化する。さらに、認識した異物の構造の違いにより、異なる分化を経ることで免疫応答性 (特にヘルパーT (Th) 応答性) を制御している⁶⁾。細菌由来のLPSを認識したDCは、主に細胞性免疫応答 (Th1) を誘導し、寄生虫などに由来する特殊な糖脂質の糖鎖構造を認識したDCは、主に体液性免疫応答 (Th2) を誘導する⁷⁻¹¹⁾。このように高度に発達分化した免疫担当細胞は、種々の刺激に対し多様な遺伝子を発現し、生体内の免疫恒常性を維持するために重要な役割を演じている。さらに、DCは種々の刺激により特殊な液性因子を産生するだけでなく、細胞遊走、形態学的変化等多様な細胞応答を示すことから、MHSと健常人との相違点を、これらをターゲットとして探索するのに有用である。

本研究では、ヒトDCを用いた悪性高熱症診断法の

1) 埼玉医科大学 麻酔科学、2) 埼玉医科大学 免疫学

開発を目的として, ヒトDCにおけるRyRサブタイプの発現とRyRのCa²⁺チャネルとしての機能をRyRアゴニストを用いて評価し, その有用性を明らかにした¹²⁾.

材料と方法

モノサイト由来DC (monocyte-derived dendritic cells; Mo-DCs) の誘導

インフォームドコンセントの得られた健康人ボランティアの末梢血からFicoll-Paqueを用いた密度勾配遠心法により末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) を分離した. さらにこのPBMCより, CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いてCD14陽性細胞を分離した. 分離したCD14陽性細胞を6穴プレートに 2×10^6 /mlになるように調整し, 50 ng/ml ヒトリコンビナント (rh) IL-4, および50 ng/ml rhGM-CSF (Primmune, Osaka, Japan) を加えた5%ヒト血清入りRPMI1640 (SIGMA, St Louis, MO) で6日間培養したものをモノサイト由来樹状細胞として用いた. DCに成熟刺激を加えないものを未熟DC (immature DC; iDC) とし, iDCに成熟誘導因子であるプロスタグランジンE₂ (PGE₂) (10 μ M) + TNF α (100 ng/ml), あるいはLPS (10 μ g/ml)を加え, 48時間培養して得られたものを成熟DCとして解析に用いた.

RT-PCRによるRyR発現の評価

モノサイト由来DC (iDC, PGE₂-DC, LPS-DC) よりtotal RNAを抽出し (RNeasy Mini Kit, QIAGEN, Maryland, USA), complementary DNA (以下cDNA) を合成した (Omniscript RT kit, QIAGEN, Maryland, USA). 内在性のコントロールとして β -actinを使用し, RyR1-3の陽性コントロールとしてヒト脳cDNA (Origene, Rockville, MD, USA) を使用した. 以下に示すプライマーを用いて各RyRサブタイプの遺伝子発現をReverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法により評価した.

RyR1; 5'-CAGATGAAGCATTTGGTCTCCAT-3',

5'-GACATGGAAGGCTCAGCTGCT-3',

RyR2; 5'-CAGATGAAGCATTTGGTCTCCAT-3',

5'-AAGGAGCTCCCCACGAGAAGT-3',

RyR3; 5'-CAGATGAAGCATTTGGTCTCCAT-3',

5'-AAGAGGAAGAAGCGATGGT-3',

β -actin; 5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC-3',

5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3',

PCR反応は95°C 1分, 62°C 1分, 72°C 2分, 30サイクルで反応させた.

リアルタイムPCR

遺伝子発現量はTaqMan Gene Expression Assays (RyR1; Hs00166991_m1) を用いて定量した (ABI PRISM 7900 Sequence Detector; Applied Biosystems). GAPDHの発現量を一般化し, ddCT法によりRyR1遺

伝子発現量を定量した.

細胞内カルシウム動態の測定

calcium buffer (calcium buffer; 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 5 mM glucose, 1 mM CaCl₂, and 10 mM HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine -N'-2-ethanesulfonic acid; pH 7.5)) およびCa²⁺指示薬Fura-2-AM (5 mM) (Biotium, Hayward, CA, USA) でDCを4°C, 30分インキュベートした. 1×10^6 /mlに調整したDCを, cell tak (BD Biosciences, CA, USA) を塗布したガラスベースディッシュ (Iwaki, Chiba, Japan) に固定し, 4°Cにて30分間静置した. この際にRyR1阻害薬として20 mM ダントロレン (Calbiochem, Darmstadt, Germany), IP₃R阻害薬として10 mM ゼストスポンギンC (Wako, Osaka, Japan), 細胞外Ca²⁺キレート剤として5 mM EGTA (WAKO, Osaka, Japan), 細胞内Ca²⁺キレート剤としてBAPTA-AM (nacalai tesque, Kyoto, Japan) 存在あるいは非存在下のものを用意した. これを37°Cに保ち, RyRアゴニストである細胞内Ca²⁺誘導性試薬 (4-クロロ-m-クレゾール; 4-chloro-m-cresol; 4CmC, ならびにATP) を直接添加した. 5秒毎の蛍光強度を蛍光顕微鏡を用いて2波長励起1波長蛍光計測 (340 nm, 380 nm) し, ニコンTE2000倒立顕微鏡 (Nikon ECLIPSE TE 2000) と, Aqua Cosmos画像解析装置 (浜松ホトニクス; Hamamatsu Photonics) を用いて測定解析した. 結果は340/380 nm蛍光強度比にて示した.

DCの表現型の解析

DCの表面分子の発現はフローサイトメトリーにより解析した. 解析の際には死細胞 (7-ADD陽性細胞) を除去した. DCのアポトーシスは, 死細胞の除去を行わずにAnnexin V陽性細胞をアポトーシス細胞として検出した.

混合リンパ球反応

PBMCよりCD4⁺CD45RO⁺ (ナイーブ) Th細胞を精製した (CD4⁺Tcell isolation kit II, CD45RO microbeads; Miltenyi Biotec). 放射線照射 (3000cGy) したDCとアロナイーブTh細胞を共培養した. 5日後, [³H]-thymidine (1 μ Ci/well) をパルスし, 16時間後の放射能の取り込みを定量することでT細胞増殖応答を評価した.

サイトカイン測定

DCより産生されるサイトカインはELISA法により定量した (R&D systems; Minneapolis MN).

結 果

1. ヒトDCはRyR1を発現する

主なヒト免疫担当細胞におけるRyRサブタイプの遺伝子発現を評価した. DCにおいてはiDC, PGE₂-DC, LPS-DCの3つのDCサブセットを解析に用いた. ヒト

脳細胞はすべてのRyRサブタイプ (RyR1, 2および3) を発現する為, これを陽性コントロールとした。また, β -actinは内在性コントロールとした。図1Aに示すように, RyR1は未熟および各成熟DCにおいて発現が認められた。特にiDCは, PGE₂-DC, LPS-DCなどの成熟DCに比較してRyR1遺伝子の高発現を認めた。RyR2, 3はDCには発現が認められなかった。

定量的PCR解析においてRyR1遺伝子は未熟DCにおいて最も多く発現していた(図1B)。

2. 4CmCはヒトDCにおける細胞内ストアからの細胞内Ca²⁺上昇を誘導する

次に我々は, RyRアゴニストである4CmCを用いてDCを刺激することによって, 細胞内Ca²⁺が上昇するかを検討した(図2)。

細胞内外のCa²⁺を除去せずに4CmC (500 mM) 刺激することによりヒトDCは, 細胞内Ca²⁺の持続性の上昇が認められた(図2A)。さらに, EGTAを用いて細胞外Ca²⁺を除去して4CmC刺激した場合においては, 細胞内Ca²⁺の一過性の上昇が認められた(図2B)。一方, BAPTA-AMを用いて細胞内Ca²⁺を除去して4CmC刺激した場合では細胞内Ca²⁺上昇は認められなかった(図2C)。以上より, ヒトiDCは4CmC刺激することにより細胞内Ca²⁺上昇を示すが, この細胞内Ca²⁺上昇は細胞内Ca²⁺ストアに由来することが明らかとなった。

細胞外のCa²⁺をキレートし, 各受容体の阻害薬のない状態で, DCを4CmC刺激した場合には細胞内Ca²⁺の上昇が認められた(図2D)。ダントロレン存在下, 4CmC刺激した場合では, DCにおける細胞内Ca²⁺上昇の抑制が認められた(図2E)。一方, ゼストスポンギンC存在下, DCを4CmC刺激した場合では, 細胞内Ca²⁺上昇の抑制は認められなかった(図2F)。以上より, 4CmC刺激により誘導される細胞内Ca²⁺上昇は, RyRを介したものであり, IP₃Rを介さない応答であることが示唆された。

図2G~2Iは未熟, 成熟の各DCを4CmC刺激し, 細胞内カルシウムの上昇を評価したものである。細胞外のCa²⁺をキレートし, 各受容体の阻害薬のない状態で, iDCを4CmC刺激した場合には細胞内Ca²⁺の上昇が認められた(図2G)。また, 細胞外のCa²⁺をキレートし, 各受容体の阻害薬のない状態で, PGE₂-DCを4CmC刺激した場合にも細胞内Ca²⁺の上昇が認められた(図2H)。細胞外のCa²⁺をキレートし, 各受容体の阻害薬のない状態で, LPS-DCを4CmC刺激した場合においても細胞内Ca²⁺の上昇が認められた(図2I)。それぞれのDCにおけるCa²⁺上昇パターンに相異は認められなかった。

3. RyR1刺激がヒトDCの成熟に及ぼす影響

LPS刺激の際に4CmCあるいは4CmCとダントロレンを加え, HLA-DRとCD86分子の発現を評価した。HLA-DRとCD86分子は, DCの成熟が促進した際に

発現が上昇する分子である¹³⁾。Annexin Vはアポトーシスをおこした細胞に陽性となる。LPS刺激の際に4CmCを添加したDCは, HLA-DRおよびCD86分子の上昇が促進された(図3-A)。また, この効果はダントロレンで抑制された。従って, RyR1を介したカルシ

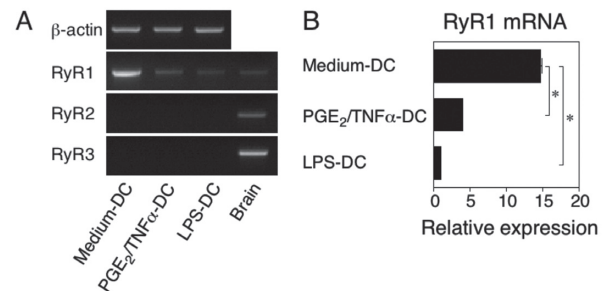


図1. ヒトDCにおけるRyR遺伝子発現。

A. iDC, PGE₂-DC, LPS-DCにおけるRyRサブタイプの発現をRT-PCR法で解析した。脳cDNAは各RyRサブタイプの陽性コントロールとして, β -actinは内在性コントロールとして使用した。

B. iDC, PGE₂-DC, LPS-DCにおけるRyR1の発現量をリアルタイムPCR法で解析した。

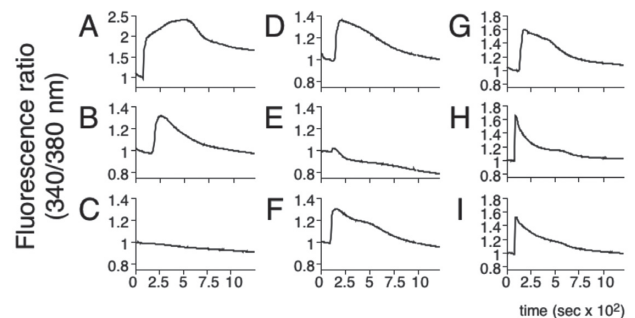


図2. ヒトDCにおけるRyR1はCa²⁺チャネルとして機能する。

A. EGTA (5 mM) 非存在下, BAPTA-AM (50 mM) 非存在下でヒトDCを4CmC (500 mM) 刺激した際のCa²⁺応答を示す。

B. EGTA存在下, 4CmC刺激したヒトDCにおけるCa²⁺応答を示す。

C. BAPTA-AM存在下で4CmC刺激したヒトDCにおけるCa²⁺応答を示す。

D. EGTA存在下, ヒトDCを4CmC刺激した際のCa²⁺応答を示す。

E. EGTA存在下, ダントロレン存在下, ヒトDCを4CmC刺激した際のCa²⁺応答を示す。

F. EGTA存在下ゼストスポンギンC存在下, ヒトDCを4CmC刺激した際のCa²⁺応答を示す。

G. EGTA存在下, ヒトiDCを4CmC刺激した際のCa²⁺応答を示す。

H. EGTA存在下, ヒトPGE₂-DCを4CmC刺激した際のCa²⁺応答を示す。

I. EGTA存在下, ヒトLPS-DCを4CmC刺激した際のCa²⁺応答を示す。

横軸は時間, 縦軸は2波長励起1波長蛍光計測によって得られた蛍光比, fluorescence ratio (340/380 nm) を示す。

ウムシグナルはDCの成熟を促進することが明らかとなった。

次に、これらDCにおけるアロMLR誘導活性を評価した。DCの成熟状態が強ければ、アロ抗原を認識するT細胞の増殖応答が促進されることが知られている。LPS刺激の際に4CmCを添加したDCは、T細胞の増殖応答を著しく促進した(図3B)。

以上より、4CmC刺激により樹状細胞の成熟が促進されることが明らかになった。

4. LPS刺激の際に4CmCを添加した際のサイトカイン産生性

LPS刺激の際に4CmCを添加したDCは、IL-12p40、TNF- α 、IL-6などの炎症性のサイトカインの産生には影響しなかったが、免疫抑制性サイトカインであるIL-10の産生を抑制した(図4A)。また、この効果はダントロレン存在下では減少した(図4B)。

これに対し、LPS刺激の際にATPを添加したDCは、IL-12p40、TNF- α 、IL-6の産生を低下させ、IL-10の産生を促進した(図4A)。

つまり、RyR1刺激によりIL-10産生が抑制され、DCを介して免疫応答を促進する方向に作用することが明らかとなった。

考 察

MHは、全身麻酔時に使用する揮発性の吸入麻酔薬や脱分極性筋弛緩薬の使用により発症するが、1, 臨床

症状が多様であること^{1,2)}、2, EtCO₂の上昇、体温上昇など不適切な麻酔によっても同様の症状が見られること、3, 甲状腺疾患等、合併症依存性を示すこと等の理由により、疾患自体の鑑別が難しいとされている。近年、Bリンパ球およびEBウイルス形質転換B細胞を4CmC刺激することにより、RyR1を介して細胞内Ca²⁺が上昇することが報告された^{4,14)}。すでに4CmC刺激によりEBウイルス形質転換B細胞が産生するIL-1 β 、あるいは筋細胞が産生するIL-6を指標にMHSを同定しようとする試みがある^{15,16)}。前者は、4CmC刺激に対してEBウイルス形質転換B細胞が産生するIL-1 β は微量であるため、その検出が困難であることが問題点である。一方、後者は生検時の生体への侵襲性が高いことが問題点である。従って、これらを応用してMHS判定のために日常検査に用いるのは困難である。また、これらの液性因子を短時間で大量に産生させるのに必要な4CmC濃度は極めて細胞毒性が高く、生理的細胞応答とは大きく異なっている等の点から、診断への有用性および普遍性に乏しい。一方、RyR1の遺伝子変異を解析することによりMHSを診断する方法が報告されているが¹⁷⁾、MHSにおけるRyR1遺伝子の変異が複数箇所にわたって存在すること、さらに、これらの変異部位が人種により異なる等の理由から正確な診断を行うことが困難とされている。

DCは生体内の至る所に存在し、異なる分化を経ることで免疫応答性(特にヘルパーT(Th) 応答性)を

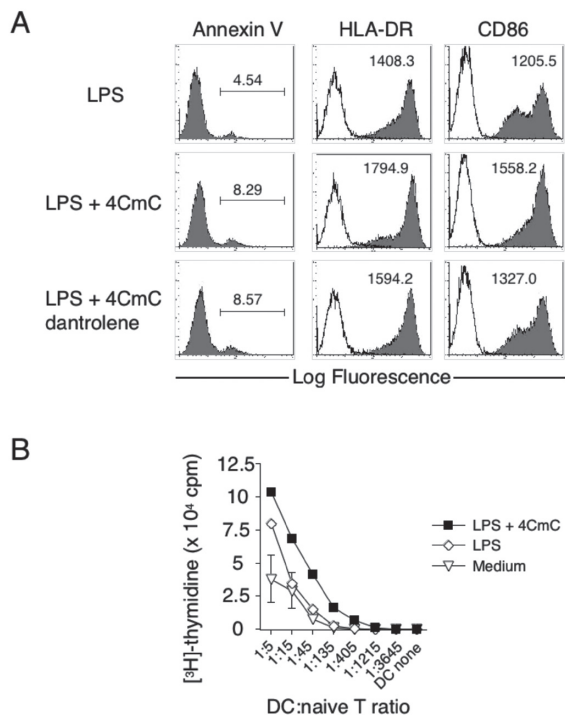


図 3. RyR1刺激によりDCの成熟が促進される。

A. DCの成熟状態

B. アロMLR誘導活性の評価

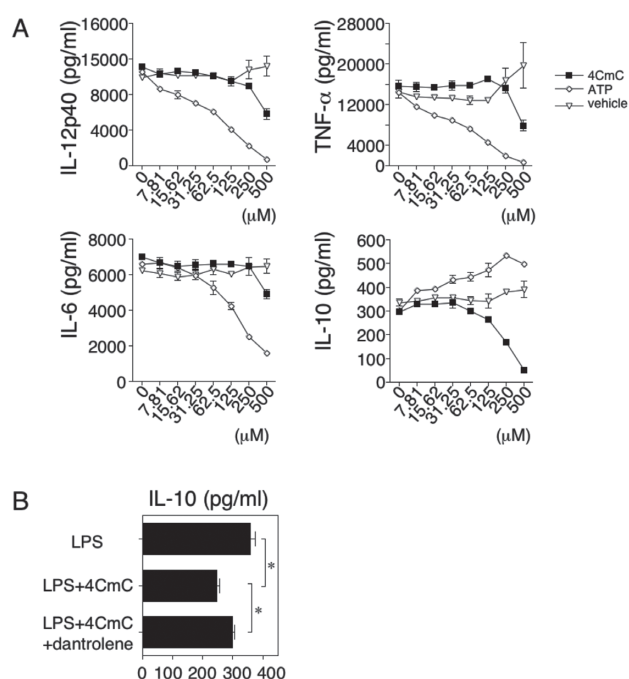


図 4. LPS刺激時にRyR1アゴニスト刺激するとIL-10産生が抑制される。

A. DCのサイトカイン産生

B. DCにおけるIL-10産生

制御する高度に発達分化した免疫担当細胞である。特に、DCから産生される種々の内因性発熱物質は、悪性高熱症で認められる多様な症状を構成する可能性があり、RyR1アゴニストに対するDC応答性を評価することで、MHの病態への関与も明らかとなるかもしれない。

マウスDCのRyR発現を確認した報告はすでに存在する⁵⁾。しかし、ヒトのDCのRyR発現を確認した報告は現在のところない。本研究で我々はヒトのDCにおけるRyRの発現をRT-PCR法を用いて検討した。RyR1は健常人のCD14モノサイト、iDC、PGE₂-DC、LPS-DCに発現していた。また、iDCはPGE₂-DC、LPS-DCなどの成熟DCに比較してRyR1遺伝子を高発現していることが明らかになった。しかし、LPS-DCやPGE₂-DCなどの成熟DCは、4CmC刺激に対してiDCと同様の細胞内Ca²⁺の上昇を示すため、蛋白レベルでは同等に発現しているかもしれない。また、この観察は、成熟DCにおいてRyR1の小胞体におけるターンオーバーが遅い可能性を示唆している。

iDCをRyRアゴニストにより刺激した場合に、Ca²⁺上昇が認められ、さらに細胞外のCa²⁺をキレートした場合でも一過性のCa²⁺上昇が見られた。これに対し、細胞内Ca²⁺をキレートすると、Ca²⁺上昇は認められなかった。従ってRyR刺激によるCa²⁺上昇は細胞内Ca²⁺ストアに由来することが明らかとなった。また、iDCをRyR刺激した際に認められるCa²⁺上昇は、RyR阻害薬であるダントロレンによって抑制されたことから、この反応はRyRを介したものと考えられる。ヒトDCはRyR1遺伝子のみを発現する為、4CmCによって誘導されるCa²⁺上昇はRyR1を介したものと考えられる。さらにIP₃Rの特異的阻害薬であるゼストスポンギンCは、4CmC刺激時のCa²⁺上昇を阻害しないことから4CmCにより誘導されるCa²⁺上昇はIP₃Rを介さない応答と考えられる。

我々は、4CmC存在下LPS刺激したDCは、HLA-DRとCD86分子の発現を上昇させ、アロMLR誘導活性が上昇することを示した。また、RyR1を介したCa²⁺シグナルはLPSによって誘導されるIL-10産生を抑制することを示した。これらの観察は、ヒトDCがRyR1を介したCa²⁺シグナルにより機能的修飾を受けることを示唆している。

従って、ヒトDCは、MHSと健常人との相違点をRyR1を介したCa²⁺応答性をターゲットとして探索するのに有用である。Ca²⁺測定は日常検査に用いるのは困難である。しかし、RyRアゴニスト刺激により特異的に産生されるDCの液性因子等を検出することができれば広く日常検査として応用が可能となる。またMHSと健常人のDC応答性の相違点とCICRの相関、遺伝子変異との関連を明らかにすることにより、より正確な診断法を確立できるものと考えられる。

結 論

我々は、ヒトDCにおいて3つのRyRサブタイプの中でRyR1のみが発現することを初めて明らかにした。さらに、RyR1にアゴニスト活性を示す4CmC刺激に対し細胞内Ca²⁺上昇を示すことを初めて示した。ヒトDCは、MH素因者と健常人との相違点を探索するのに有用な細胞である。

文 献

- 1) 弓削 孟文. 悪性高熱症 最新の知見. 麻酔 1994;43:86-92.
- 2) 向田圭子. 悪性高熱症 最新の知見と診断・治療. LiSA 1995;2:50-8.
- 3) Ibarra MC, Wu S, Murayama K, Minami N, Ichihara Y, Kikuchi H, et al. Malignant hyperthermia in Japan: mutation screening of the entire ryanodine receptor type 1 gene coding region by direct sequencing. *Anesthesiol* 2006;104:1146-54.
- 4) Sei Y, Gallagher KL, Basile AS. Skeletal muscle type ryanodine receptor is involved in calcium signaling in human B lymphocytes. *J Biol Chem* 1999;274:5995-6002.
- 5) O'Connell PJ, Klyachko VA, Ahern GP. Identification of functional type 1 ryanodine receptors in mouse dendritic cells. *FEBS Lett* 2002;512:67-70.
- 6) Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003;3:984-93.
- 7) Whelan M, Harnett MM, Houston KM, Patel V, Harnett W, Rigley KP. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J Immunol* 2000;164:6453-60.
- 8) Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Harn DA, Jr. Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. *J Immunol* 2001;167:442-50.
- 9) van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruize YC, Schmitz M, Kurt-Jones EA, et al. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* 2002;277:48122-9.
- 10) van der Kleij D, Yazdanbakhsh M. Control of inflammatory diseases by pathogens: lipids and the immune system. *Eur J Immunol* 2003;33:2953-63.
- 11) Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T, et al. Cutting edge: different

- Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol* 2003;171:4984-9.
- 12) Uemura Y, Liu TY, Narita Y, Suzuki M, Ohshima S, Mizukami S, et al. Identification of functional type 1 ryanodine receptors in human dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:510-5.
 - 13) Bagley KC, Abdelwahab SF, Tuskan RG, Lewis GK. Calcium signaling through phospholipase C activates dendritic cells to mature and is necessary for the activation and maturation of dendritic cells induced by diverse agonists. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:77-82.
 - 14) Hosoi E, Nishizaki C, Gallagher KL, Wyre HW, Matsuo Y, Sei Y. Expression of the ryanodine receptor isoforms in immune cells. *J Immunol* 2001;167:4887-94.
 - 15) Girard T, Cavagna D, Padovan E, Spagnoli G, Urwyler A, Zorzato F, et al. B-lymphocytes from malignant hyperthermia-susceptible patients have an increased sensitivity to skeletal muscle ryanodine receptor activators. *J Biol Chem* 2001;276:48077-82.
 - 16) Ducreux S, Zorzato F, Muller C, Sewry C, Muntoni F, Quinlivan R, et al. Effect of ryanodine receptor mutations on interleukin-6 release and intracellular calcium homeostasis in human myotubes from malignant hyperthermia-susceptible individuals and patients affected by central core disease. *J Biol Chem* 2004;279:43838-46.
 - 17) Kraev N, Loke JC, Kraev A, MacLennan DH. Protocol for the sequence analysis of ryanodine receptor subtype 1 gene transcripts from human leukocytes. *Anesthesiol* 2003;99:289-96.
- Uemura Y, Liu TY, Narita Y, Suzuki M, and Matsushita S. 17β -Estradiol (E2) plus TNF α induces a distorted maturation of human monocyte-derived DCs and promotes their capacity to initiate Th2 responses. *Hum. Immunol* 2008; in press.
 - 鈴木元晴, 植村靖史, 劉天懿, 成田弥生, 石原理, 松下祥. 妊娠維持における脱落膜 non-invariant NKT 細胞の役割. *臨床免疫・アレルギー科* 2008, 印刷中.
 - 植村靖史, 劉天懿, 鈴木元晴, 成田弥生, 松下祥. NKT 細胞による樹状細胞を介した Th1/2 応答制御臨床免疫・アレルギー科 2008, 印刷中.
 - 菊地博達, 古家仁. 「麻酔満足度を考える」によせて *日本臨床麻酔学会誌* 2008;28:31.

《平成19年》

論文

《平成20年》

- Liu TY*, Uemura Y*, Suzuki M, Narita Y, Hirata S, Ohyama H, Ishihara O, Matsushita S. *equal contribution. Distinct subsets of human invariant NKT cells differentially regulate T helper responses via dendritic cells. *Eur. J. Immunol* 2008; in press.
- Uemura Y*, Suzuki M*, Liu TY*, Narita Y, Hirata S, Ohyama H, Ishihara O, and Matsushita S. *equal contribution. Role of human non-invariant NKT lymphocytes in the maintenance of type 2 T helper environment during pregnancy. *Int. Immunol* 2008; in press.
- Senju S, Suemori H, Zembutsu H, Uemura Y, Hirata S, Fukuma D, Matsuyoshi H, Shimomura M, Haruta M, Fukushima S, Matsunaga Y, Katagiri T, Nakamura Y, Furuya M, Nakatsuji N, Nishimura Y. Genetically manipulated human embryonic stem cell-derived dendritic cells with immune regulatory function. *Stem Cells* 2007;25:2720-9.
- Hirata S, Matsuyoshi H, Fukuma D, Kurisaki A, Uemura Y, Nishimura Y, Senju S. Involvement of regulatory T cells in the experimental autoimmune encephalomyelitis-preventive effect of dendritic cells expressing myelin oligodendrocyte glycoprotein plus TRAIL. *J. Immunol* 2007;178:918-25.
- Wakui M, Nakano K, Matsushita S. Notch ligand mRNA levels of human APCs predict Th1/Th2-promoting activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2007;358:596-601.
- Nakano K, Saito K, Mine S, Matsushita S, Tanaka Y. Engagement of CD44 up-regulates Fas ligand expression on T cells leading to activation-induced cell death. *Apoptosis* 2007;12:45-54.
- 北村晶, 菊地博達. 診断・治療 頭痛とペインクリニック 総合臨床, 2007;56:713-7.
- 市原靖子, 菊地博達. 副作用各論 重大な副作用 全身性悪性高熱症 *日本臨床*, 2007;65:326-30.
- 大井良之, 小川龍, 加藤正人, 釘宮豊城, 武田純三, 一色淳, 細山田明義, 菊地博達, 巖康秀, 真下節, 高橋成輔, 十時忠秀. 酢酸リソゲル液を対照とした重炭酸リソゲル液の多施設共同無作為二重盲検比較試験 開腹手術予定患者を対象として *新薬と臨床*, 2007;56:2-10.

- ・岩瀬良範. ビデオ喉頭鏡からのメッセージ 電子機器としてのビデオ喉頭鏡 LiSA, 2007;14:810-5.
- ・岩瀬良範. ビデオ喉頭鏡からのメッセージ 臨床機器としてのビデオ喉頭鏡 LiSA, 2007;14:706-11.
- ・中野和久, 松下祥. 樹状細胞によるTh2細胞の誘導とドパミン 臨床免疫・アレルギー科, 2007;48:256-62.
- ・中野和久, 松下祥. ドパミンによる免疫調節作用 アレルギー, 2007;56:679-84.
- ・中野和久, 松下祥. 樹状細胞とT細胞の相互作用におけるドパミンの役割 呼吸, 2007;26:701-6.
- ・中野和久, 松下祥. 樹状細胞とT細胞の相互作用とTh1細胞/Th2細胞の分化 臨床免疫・アレルギー科, 2007;47:458-63.
- ・植村靖史, 鈴木元晴, 劉天懿, 成田弥生, 石原理, 松下祥. 妊娠の維持とNKT細胞 臨床免疫・アレルギー科, 2007;47:367-71.

＜平成18年＞

- ・Takahashi M. Takahashi H. Kikuchi H. Whartonia (Fascutonia) natsume (Acari: Trombiculidae): a new bat chigger collected from Plecotus auritus (Chiroptera: Vespertilionidae) in Japan, with host and distribution records of the genus Whartonia. J. Med. Entomol. 2006;43:128-37.
- ・Wu S. Ibarra MC. Malicdan MC. Murayama K. Ichihara Y. Kikuchi H. Nonaka I. Noguchi S. Hayashi YK. Nishino I. Central core disease is due to RYR1 mutations in more than 90% of patients Brain. 2006;129:1470-80.
- ・Ibarra M CA. Wu S. Murayama K. Minami N. Ichihara Y. Kikuchi H. Noguchi S. Hayashi YK. Ochiai R. Nishino I. Malignant hyperthermia in Japan: mutation screening of the entire ryanodine receptor type 1 gene coding region by direct sequencing. Anesthesiology. 2006;104:1146-54.
- ・Ohnishi Y. Tsutsumi A. Matsumoto I. Goto D. Ito S. Kuwana M. Uemura Y. Nishimura Y. Sumida T. Altered peptide ligands control type II collagen-reactive T cells from rheumatoid arthritis patients. Modern Rheumatology. 2006;16:226-8.
- ・高山尚美, 岩瀬良範, 松島久雄, 崎尾秀彰. ビデオ喉頭鏡とガムエラスティックブジー (gum-elastic bougie)を用いた気管挿管 日本臨床麻酔学会誌, 2006;26:77-81.
- ・植村靖史, 劉天懿, 鈴木元晴, 成田弥生, 高木理恵, 大山秀樹, 涌井昌俊, 菊地博達, 石原理, 松下祥. 樹状細胞を用いたTヘルパー I 型, II 型免疫応答制御療法の為の基礎的研究 埼玉医科大学雑誌, 2006;33:67-72.
- ・新宮興, 増澤宗洋, 表圭一, 並木昭義, 菊地博達,

- 川真田美和子, 佐藤重仁, 木村智政, 畑埜義雄, 中塚秀輝, 森田潔, 原哲也, 上村裕一, 武田純三. Org 9426(臭化ロクロニウム)の筋弛緩作用 臭化ベクロニウムとの比較 麻酔 2006;55:1140-8.
- ・市原靖子, 菊地博達. 薬剤による横紋筋融解症の病態, 診断と治療 日本集中治療医学会雑誌 2006;13:206-9.
- ・菊地博達. 麻酔科関連の新しい薬物とその効果 緒言とまとめ. 麻酔 2006;55:814-6.
- ・菊地博達. 術中管理 悪性高熱症はどんな病気ですか? 予測方法と起こったときの治療法について教えてください ナーシングケアQ&A. 2006;(10):142-3.
- ・菊地博達. 術中管理 輸血後の合併症 GVHDとはどんな病気ですか? ナーシングケアQ&A. 2006;(10):128-9.
- ・岩瀬良範, 菊地博達. 手術に必要な処置 気管挿管・全身麻酔 消化器外科. 2006;29:887-92.
- ・市原靖子, Ibarra Moreno Carlos A., 菊地博達. 悪性高熱症とセントラルコア病 日本臨床麻酔学会誌 2006;26:215-24.
- ・菊地博達. 満足感を追求した麻酔 とくに術前のケア マインド手術室・麻酔教室 患者も医療に参加すべき 日本臨床麻酔学会誌 2006;26:35-9.
- ・涌井昌俊, 松下祥. 樹状細胞が発現するNotch リガンドアイソフォームとTh1/Th2分化 臨床免疫・アレルギー科 2006;46:129-35.
- ・松下祥. 生体ホルモン・環境ホルモンとTh2細胞 臨床免疫 2006;45:668-73.
- ・涌井昌俊, 松下祥. Innate immunityの基礎 樹状細胞による自然免疫と獲得免疫のクロストーク. 肝・胆・膵 2006;52:529-36.
- ・松下祥. 疫学・基礎研究 up-to-date アレルギー性鼻炎と遺伝 医学のあゆみ 2006;216:341-5.

著 書

＜平成18年＞

「悪性高熱症」菊地博達編. 克誠堂出版;2006.

学会発表

＜平成19年＞

- ・市原靖子, 菊地博達. 筋生検と遺伝子検索を行い RYR1 変異が認められたにもかかわらずCICR速度が亢進していなかった1症例 第27回悪性高熱研究会, 広島, 平成19年12月15日
- ・菊地博達, 市原靖子, 岩瀬良範, 成田弥生, 水上智, 中川秀之. 新しいCICR測定法 第27回悪性高熱研究会, 広島, 平成19年12月15日
- ・成田弥生, 水上智, 市原靖子, 菊地博達. ヒト樹状細胞を用いた悪性高熱症の新規診断法の開発 第27回悪性高熱研究会, 広島, 平成19年12月15日

- Nakano K, Tanaka Y, Matsushita S. Dopamine synthesized and released by dendritic cells polarizes Th2 differentiation. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 平成19年11月20日～22日
 - Narita Y, Liu T-Y, Uemura Y, Kikuchi H, Matsushita S. Identification of functional type1 ryanodine receptors in human dendritic cells. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 平成19年11月20日～22日
 - Okada Y, Meguro M, Ohyama H, Yoshizawa S, Hatanaka K, Matsushita S, Takashiba S. Effects of HLA-II- induced CXC chemokines from human gingival fibroblasts on the proliferation of HUVEC cells. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 平成19年11月20日～22日
 - Meguro M, Yoshizawa S, Hatanaka K, Okada Y, Ohyama H, Matsushita S, Takashiba S. FAK mediates HLA class II-induced signaling in gingival fibroblasts. 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 平成19年11月20日～22日
 - Matsushita S. T cell-dendritic cell interface and Th1/Th2/Th17 responses 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会, 神奈川, 平成19年11月1日～3日
 - 中野和久, 田中良哉, 松下祥. 樹状細胞はドパミン合成・放出によりTh2分化偏向を誘導する 第57回日本アレルギー学会秋季学術大会, 神奈川, 平成19年11月1日～3日
 - 佐藤栄留, 岩瀬良範, 菊地博達. エアウェイスコープ(AWS)による意識下挿管の経験 第27回日本臨床麻酔学, 東京, 平成19年10月25日～27日
 - 岩瀬良範. Difficult Airway Management 医学生・研修医に対する気管挿管指導 第26回日本蘇生学会, 岡山, 平成19年10月5日～6日
 - 塚本真規, 星島宏, 竹内梨紗, 長坂浩, 佐藤栄留, 中村信一, 菊地博達. プロポフォールの呼吸制御に対する影響 ウサギの舌下神経と横隔神経活動を指標とした実験 第35回日本歯科麻酔学会, 福岡, 平成19年10月3日～5日
 - 竹内梨紗, 星島宏, 塚本真規, 岩瀬良範, 長坂浩, 中村信一, 菊地博達. 2種の喉頭鏡を用いても難渋しファイバースコープで気管内挿管に成功した症例 第35回日本歯科麻酔学会, 福岡, 平成19年10月3日～5日
 - 星島宏, 竹内梨紗, 塚本真規, 長坂浩, 中村信一, 岩瀬良範, 菊地博達. 高度上気道閉塞に対してエアウェイスコープを用いアウェイック挿管し得た一症例. 第35回日本歯科麻酔学会, 福岡, 平成19年10月3日～5日
 - 星島宏, 竹内梨紗, 塚本真規, 長坂浩, 中村信一, 岩瀬良範, 菊地博達. 頭頸部手術の気管挿管時のビデオ喉頭鏡所見について 第35回日本歯科麻酔学会, 福岡, 平成19年10月3日～5日
 - 千住覚, 末盛博文, 植村靖史, 平田真哉, 春田美和, 松吉秀武, 福岡大喜, 福島聡, 松永雄亮, 古谷正敬, 中辻憲夫, 西村泰治. 抗原提示機能を有するヒトES細胞由来の樹状細胞(ヒトES-DC)の樹立 第16回日本組織適合性学会, 京都, 平成19年9月9日～11日
 - 千住覚, 末盛博文, 前佛均, 植村靖史, 平田真哉, 春田美和, 松吉秀武, 下村真菜美, 福岡大喜, 福島聡, 松永雄亮, 片桐豊雅, 中村祐輔, 古谷正敬, 中辻憲夫, 西村泰治. 細胞ワクチンとしての実用化をめざしたヒトES細胞由来の樹状細胞の作成 第11回基盤的癌免疫研究会, 東京, 平成19年7月11日～12日
 - 松下祥. Th1/Th2分化の新知見とその治療応用 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会, 神奈川, 平成19年6月10日～12日
 - 高橋守, Kriangkrai Lerthusnee, 三角仁子, Nittaya Khlaimeanee, Taweesak Monkanna, Chareonsongsermkit Weerayut, Leepitakrat Surachai, 菊地博達. リケッチア陽性および陰性フレッチェリーおよびチャングライツツガムシの生活史の比較 第59回日本衛生動物学会大会, 大阪, 平成19年4月2日～4日
 - 三角仁子, Kriangkrai Lerthusnee, 高橋守, 菊地博達, 松本勲. インハルムツツガムシによる皮膚炎 第59回日本衛生動物学会大会, 大阪, 平成19年4月2日～4日
 - 大山秀樹, 小越菜保子, 西村英紀, 目黒道生, 吉澤さゆり, 中正恵二, 山根木康嗣, 山田直子, 西尾祥史, 植村靖史, 松下祥, 寺田信行. クラスII HLA分子を介した刺激を受けた歯肉線維芽細胞によるTh1/Th2応答性の制御 第96回日本病理学会, 大阪, 平成19年3月13日～15日
- 《平成18年》
- Suzuki M, Uemura Y, Liu T-Y, Narita Y, Ohyama H, Matsushita S. Role of non-invariant NKT cells in the maintenance of uterine Th2 environment during pregnancy. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 平成18年12月11日～13日
 - Liu T-Y, Uemura Y, Suzuki M, Narita Y, Ohyama H, Matsushita S. Dendritic cell-mediated Th deviation controlled by functionally distinct subsets of NKT cells. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 平成18年12月11日～13日
 - Nakano K, Uemura Y, Wakui M, Liu T-Y, Narita Y, Matsushita S. Dopamine as an immunotransmitter released by dendritic cells regulates Th1/Th2 polarization. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 平成18年12月11日～13日
 - Narita Y, Uemura Y, Liu T-Y, Suzuki M, Nakano K, Kikuchi H, Matsushita S. A new diagnostic method

to identify malignant hyperthermia susceptible individuals by using human dendritic cells. 第36回日本免疫学会総会・学術集会, 大阪, 平成18年12月11日～13日

- ・松下祥. Th1/Th2パラダイムの再評価 マウスからヒトへ 免疫トランスミッター T細胞-樹状細胞インターフェイスにおけるドパミンの機能 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 平成18年11月2日～4日
- ・中野和久, 植村靖史, 劉天懿, 成田弥生, 涌井昌俊, 松下祥. 樹状細胞はドパミン放出によってTh1/Th2分化を調節する 第56回日本アレルギー学会秋季学術大会, 東京, 平成18年11月2日～4日
- ・岩瀬良範, 上野和徳, 菊地博達. ビデオ喉頭鏡下のガムエラスティックブジー (GEB) 誘導の一工夫 経鼻エアウェイの応用 第26回日本臨床麻酔学会, 北海道, 平成18年10月26日～28日
- ・岩瀬良範. ビデオ喉頭鏡による気管挿管のコツ 第26回日本臨床麻酔学会, 北海道, 平成18年10月26日～28日
- ・松本延幸, 白石正治, 小泉實意子, 村上康郎, 中村信一, 水上智, 相川清, 相田純久, 松本勲, 菊地博達. 突発性難聴の聴力回復を予測する方法 星状神経節ブロックの有無で差が生じるか? 第40回日本ペインクリニック学会, 兵庫, 平成18年7月13日～15日
- ・木下勉, 金古逸美, 上田裕美, 菊地博達. 皮下埋込式硬膜外投与システム 埋込み手技の検討 第40回日本ペインクリニック学会, 兵庫, 平成18年7月13日～15日
- ・大山秀樹, 小越菜保子, 畑中加珠, 山田直子,

中正恵二, 植村靖史, 松下祥, 寺田信行. 早期発症型歯周炎患者におけるP.gingivalis由来53kDa外膜蛋白に対するT細胞応答性 第95回日本病理学会, 東京, 平成18年4月30日～5月2日

国際学会

- ・Ichihara Y, Kikuchi H, Ibarra M CA, Nishino I. CICR Differences in Skinned Fibers from MHS Patients and Normal Controls Depended by Fiber-Type Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists San Francisco, CA(USA), 13-17 October 2007.
- ・Ichihara Y, Kikuchi H, Ibarra M CA, Sasaki J, Ogawa S. The Presence of Mutation in the RYR1 Gene Is Not Associated with the Clinical Severity of MH Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists Chicago, IL(USA) 14-18 October 2006.
- ・Ohyama H, Kogoe N, Takeuchi K, Nishimura F, Uemura Y, Matsushita S, Ohara N, Okano S, Abiko Y, Yamanegi K, Yamada N, Nakasho K, Terada N. The effects of 5' flanking region gene polymorphism of IL12Rb2 on NK cell activity. 41th US-Japan Cooperative Medical Science Program. Tuberculosis and Leprosy Research Conference. Kagoshima(Japan), 19 July 2006.
- ・Sone T, Oshiro S, Matsushita S and Hirayama K. Proteome analysis of Trypanosoma Cruzi CL Brener, a reference strain of genome project. In Proceedings of 11 th International congress of parasitology, Scotland, 6-11 August 2006.