

原 著

Secretory leukocyte protease inhibitor による
マクロファージ機能の修飾: LPS 刺激および *Mycobacterium*
avium complex 刺激マクロファージのサイトカインおよび
nitric oxide 産生能に及ぼす作用について

佐野 千晶 清水 利朗 佐藤 勝昌 小笠原圭子
富岡 治明

島根医科大学微生物・免疫学

EFFECTS OF SECRETORY LEUKOCYTE PROTEASE INHIBITOR ON THE
PRODUCTION OF SOME CYTOKINES AND NITRIC OXIDE BY MURINE
PERITONEAL MACROPHAGES IN RESPONSE TO LIPOPOLYSACCHARIDE
STIMULATION AND *M. AVIUM* COMPLEX INFECTION

Chiaki SANO, Toshiaki SHIMIZU, Katsumasa SATO,
Keiko OGASAWARA, and *Haruaki TOMIOKA

*Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University

Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), a serine protease inhibitor abundantly found in mucous secretions of lung, is thought to serve as an important protective component in the secretory fluids at sites of degenerative and inflammatory diseases. In this study, we examined the effects of SLPI on the production of a proinflammatory cytokine, TNF- α , and immunosuppressive cytokines, IL-10 and transforming growth factor- β (TGF- β) by macrophages (M ϕ s), in response to lipopolysaccharide (LPS)-mediated stimulation and *M. avium* complex (MAC) infection, using recombinant half-sized SLPI (1/2 SLPI) consisting of C-terminal domain (Arg⁵⁵-Ala¹⁰⁷) of intact SLPI. In addition, effects of SLPI on the production of nitric oxide radicals (NO), important antimicrobial effectors of M ϕ s against micro-organisms, by these M ϕ s were studied. First, when the number of TNF- α producing cells in the LPS-stimulated M ϕ population was counted by the ELISPOT assay, more than half of the M ϕ s acquired TNF- α secreting ability at 24 hr after LPS stimulation. On the other hand, MAC-infected M ϕ s produced detectable amounts of TNF- α into culture fluid during the first 24 hr. In both cases, 1/2 SLPI did not affect the LPS- or MAC-induced TNF- α production by M ϕ s. Second, when the production of IL-10 and TGF- β by M ϕ s was determined by measuring the amounts of

*〒693-8501 島根県出雲市塩冶町 89-1

* 89-1 Enya-cho, Izumo-shi, Shimane 693-8501 Japan.
(Received 17 Feb. 1999/Accepted 23 Mar. 1999)

these cytokines accumulated in M ϕ culture fluids by ELISA, the following was observed. M ϕ IL-10 production was rapidly increased in the early phase of cultivation after LPS stimulation or MAC infection, peaking on day 1 and thereafter declining to normal level by day 14. Half-sized SLPI did not affect IL-10 production of LPS-stimulated M ϕ s, while it caused slight enhancement of IL-10 production by MAC-infected M ϕ s. M ϕ TGF- β production was initiated in the middle phase (day 7) of M ϕ cultivation and continued until day 14. Notably, 1/2 SLPI markedly potentiated the TGF- β producing ability of the LPS-stimulated M ϕ s. Moreover, 1/2 SLPI caused moderate increase in the TGF- β production by MAC-infected M ϕ s. Third, significantly potentiated NO production was observed in M ϕ s during the first 2 days after LPS stimulation and MAC infection. Half-sized SLPI did not affect the NO production by LPS-stimulated or MAC-infected M ϕ s. These findings indicate that SLPI up-regulates the production of some immunoregulatory cytokines including IL-10 and TGF- β , particularly the latter, by M ϕ s in response to LPS stimulation or MAC infection, thereby suggesting the possibility that SLPI may exhibit antiinflammatory effects *in vivo*, especially patients with bacterial infections including MAC diseases, through the modulation of M ϕ expression of some immunosuppressive cytokines.

Key words : SLPI, *M. avium* complex, Macrophage, TGF- β

キーワード : SLPI, *M. avium* complex, マクロファージ, TGF- β

はじめに

グラム陰性桿菌の細胞壁成分であるリポポリサッカライド (LPS) は、マクロファージ (M ϕ) の強力な活性化能を有し、食食能、抗原呈示能、サイトカイン (CK) 産生能などの M ϕ の種々の生物活性を増強することが知られている¹⁾²⁾。

最近、諸種のセリンプロテアーゼインヒビターが、LPS刺激マクロファージ (M ϕ) における細胞内シグナル伝達や CK 産生に対して何らかの制御作用を有することが報告されている³⁾⁴⁾。ヒト肺内に最も多く存在するセリンプロテアーゼインヒビターであり、好中球プロテアーゼによる肺マトリックスの障害作用の抑制に重要な役割を演じている secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI)^{5)~7)} も、こうした M ϕ 機能に対して何らかの作用を及ぼす可能性が考えられる。

SLPI にはアンチプロテアーゼ活性のみならず、LPS刺激 M ϕ における NF- κ B 発現あるいは TNF- α や NO 産生に対する抑制作用を有することが報告されており⁸⁾、LPS などによる活性化シグナルを受けた M ϕ における細胞機能の制御系に対して SLPI がどのような作用を及ぼすのかは興味深い問題である。

そこで今回は、特に LPS 刺激 M ϕ から TNF- α 、IL-10 および TGF- β などの炎症性あるいは抗炎症性

CK 産生、さらには M ϕ の殺菌エフェクター分子である nitric oxide (NO) の産生動態に対して SLPI がどのような影響を及ぼすのかについて検討するとともに、*Mycobacterium avium* complex (MAC) 感染 M ϕ の諸種 CK および NO 産生能に対する SLPI の作用についても同様の検討を行った。

材料と方法

1) 供試菌 : MAC 感染患者より分離した N-260 SmT 株 (血清型 16) を用いた。Middlebrook 7H9 培地培養菌を遠心洗浄し、0.1% 牛血清アルブミン (BSA) 加リン酸緩衝食塩水に浮遊させたものを -80°C に保存し、用時融解して実験に供した。

2) SLPI : SLPI は分子量約 12kDa で 107 個のアミノ酸残基よりなる蛋白であり、相互に相同性をもつ 2 つのドメインよりなるが、後半の C 末端ドメインの Leu⁷²-Met⁷³ がキモトリプシンや好中球エラスターゼ、カテプシン G に対する結合サイトとして働いていることが知られている⁶⁾。

そこで本研究では、帝人株式会社により生物工学的な手法により調製された Asn⁵⁵-Ala¹⁰⁷ の C 末端ドメインよりなるヒト half-sized SLPI^{9)~11)} (1/2 SLPI) を供試した。このものはマウス SLPI の後半ドメインとの間に 53% の相同性を有している。

3) Mφのサイトカイン産生能: BALB/c (日本クレア)あるいはCBA/JN (チャールズリバー) 雌マウスに Zymosan A (1mg) を腹腔内投与4日後に, 2%牛胎児血清 (FBS) 加ハンクス氏液 (HBSS) で腹腔内を洗浄して腹腔細胞を採取した。得られた腹腔細胞の 2×10^6 個を浮遊させた10%FBS加 RPMI 1640 培地の 5ml をあらかじめ FBS で coat した 100mm 径の組織培養用デッシュ (Falcon) に撒き, CO₂ インキュベーター (5% CO₂) 内で37°C, 1時間培養後, 次いで2%FBS加 HBSS で洗浄して非附着細胞を除いた後, 附着細胞をゴムベラで掻き取り, これを10%FBS加 RPMI 1640 培地に再浮遊させたものを腹腔 Mφとして供試した。

次いで, 得られた Mφ を 6mm 径の組織培養ウエル (96-Well; Corning) 当たり 5×10^4 個の細胞密度で撒き, LPS (*E. coli* O111:B4; Sigma) (10 μg/ml) さらには 1/2 SLPI (100~1,000ng/ml) の添加あるいは非添加の系で2週間にわたって培養した。また, 実験によっては MAC 菌 (1×10^7 CFU/ml) を2時間感染させた後, 非感染菌を洗浄除去して得られた MAC 感染 Mφ を 1/2 SLPI 添加および非添加の系で培養した。

所定時間後に培養液を採取し, 抗マウス TNF-α モノクローナル抗体 (Pharmlingen), 抗マウス IL-10 モノクローナル抗体 (Genzyme) および抗ヒト TGF-β モノクローナル抗体 (Genzyme) を捕捉抗体に, またビオチン標識抗 TNF-α 抗体 (Pharmlingen), ビオチン標識抗 IL-10抗体 (Pharmlingen) およびトリ抗 TGF-β 抗体 (R&D Systems) を検出抗体に用い, さらにアルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン (GIBCO BRL) またはアルカリフォスファターゼ標識抗トリ Ig 抗体 (Zymed) および発色基質として p-nitro-phenyl phosphate を用いた逆 ELISA 法により, TNF-α, IL-10ならびに TGF-β 濃度を測定した¹²⁾。

4) ELISPOT 法による TNF-α 産生細胞数の計測: 上述の方法で得られた腹腔 Mφ の細胞浮遊液の3倍階段希釈系列を調製し, これをあらかじめ捕捉抗体で coat した ELISA 用ウエル (96-Well; Dynatech) に, 最上段ウエルには 5×10^5 /Well の細胞密度に, また2段目より下の列のウエルには各々3倍階段希釈系列の細胞密度になるように Mφ を撒いた。こうして調製した Mφ 培養を LPS または 1/2 SLPI 添加または非添加あるいは両者添加の系で所定の条件下で, 24時間インキュベートし Mφ よりの TNF-α 産生を行かせた後, 上述と同様の検出用抗 TNF-α 抗体および標識抗体の組合せを用いての逆 ELISA 法により, NBT-BCIP を基質とする呈色反応により認められるスポット数 (TNF-α 産生細胞数) を計測した¹³⁾。

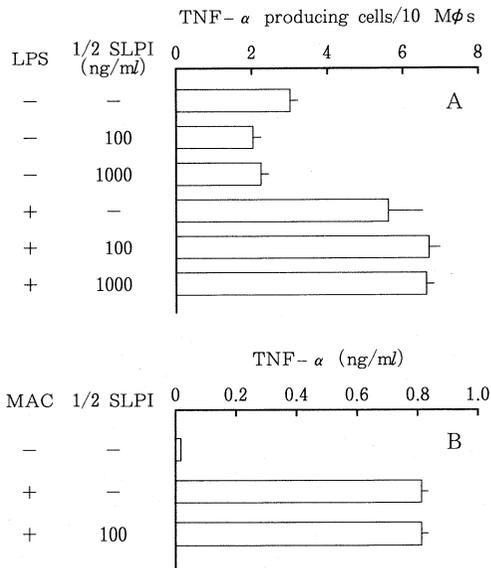


Fig.1 Effects of 1/2 SLPI on the TNF-α production by LPS-stimulated and MAC-infected Mφs. (A) The number of TNF-α producing cells after 24-hr cultivation of LPS-stimulated Mφs was counted by ELISPOT method. (B) The TNF-α production by MAC-infected Mφs into culture fluids during 24-hr cultivation was measured by ELISA method.

5) MφのNO産生能: 上述の腹腔 Mφ の所定の条件下での培養液中に蓄積した NO₂⁻ 量を Griess 法で測定した。

6) Mφ内感染 MAC の増殖動態: 上述の項目3) に記したと同様の方法で 6mm 径の組織培養ウエル中に調製した MAC 感染 Mφ を 1/2 SLPI 添加あるいは非添加の10%FBS加 RPMI 1640 培地中で72時間にわたり培養した。培養ウエルより培地を吸引除去し, 次いで Mφ を SDS 処理により溶解させ, さらに20% BSA を加えて SDS を中和した後, 蒸留水で10倍階段希釈を行い, 得られた希釈液の各10 μl を 7H11 寒天培地に撒き, 5日間培養後に出現したマイクロコロニー数を実体顕微鏡下で計測した。

結 果

1. LPS 刺激および MAC 感染 Mφ の TNF-α 産生に対する SLPI の影響

予備検討では, 非刺激 Mφ や LPS 刺激 Mφ では培養14日目までの全期間を通して培養液中への TNF-α 産生は検出限界以下であった。これは培養液中への TNF-

Table 1 Effects of 1/2 SLPI on the production of IL-10 by Mφs stimulated with LPS or MAC^{a)}

Stimulation with	Addition of 1/2 SLPI (ng/ml)	IL-10 production (ng/ml)
Expt. 1		
—	—	0.99 ± 0.10 ^{b)}
—	100	1.41 ± 0.55
—	1000	1.66 ± 0.14
LPS (10 μg/ml)	—	2.46 ± 0.29
LPS (10 μg/ml)	100	2.91 ± 0.41
LPS (10 μg/ml)	1000	2.70 ± 0.07
Expt. 2		
—	—	1.25 ± 0.08 ^{c)}
MAC (10 ⁷ CFU/ml)	—	4.72 ± 0.13
MAC (10 ⁷ CFU/ml)	100	5.94 ± 0.12
MAC (10 ⁷ CFU/ml)	1000	6.14 ± 0.05

a) Mφs were cultured in the presence or absence of the indicated agents for 24 hr and concentrations of IL-10 in the culture fluids were measured.

b) The mean ± S.E.M. (n=4).

c) The mean ± S.E.M. (n=5).

αの産生遊離がLPS刺激後数時間でピークとなり以後急速に低下するために、培養1日目ではすでに検出限界以下になってしまっていたことによるものか、あるいは産生されたTNF-αがpost-translational processingを受けることなくN末端側を膜にアンカーした膜結合型として存在していたため培養液中へは遊離、蓄積され得なかったかのいずれかの原因によるものと考えられた。そこでLPS刺激あるいは非刺激Mφ 10⁵個当たりの培養1日目でのTNF-α産生細胞数をELISPOT法によって求めてみたところ、LPS刺激により50%以上のMφポピュレーションがTNF-α産生能を獲得することが分かった。

このようにして測定したLPS刺激MφのTNF-α産生能については、1/2 SLPI添加による有意な影響は認められなかった (Fig. 1A)。他方、MAC感染Mφでは培養24時間目の培養液中に有意なレベルのTNF-α産生が検出できたが、この場合も1/2 SLPIによりMφのTNF-α産生能が特に修飾されるような傾向はみられなかった (Fig. 1B)。

2. LPS刺激およびMAC感染MφのIL-10産生に対するSLPIの影響

LPS刺激およびMAC感染MφからのIL-10産生は、

培養1～3日目をピークに急速に亢進したが、以後時間経過に伴い徐々に低下し14日目には、ほぼ定常レベルに復した (成績省略)。また、非刺激Mφでも同様なIL-10産生パターンがみられたが、そのIL-10産生はLPS刺激Mφの1/2から1/3と軽度であった。

Table 1はLPS刺激およびMAC感染Mφの培養1日目でのIL-10産生能に対する1/2 SLPIの影響をみたものである。LPS刺激あるいはMAC感染Mφの培養系への1/2 SLPI (100～1,000ng/ml)の添加により、濃度依存性は認められなかったが、IL-10産生に若干の増強が認められた。同様に、非刺激MφのIL-10産生能も1/2 SLPIにより若干増強されることが分かった。

このことよりLPS刺激MφやMAC感染Mφを1/2 SLPIで処理した場合にみられるIL-10産生能の増強は、LPSまたはMAC自体の刺激により惹起された反応と、1/2 SLPIによる反応との相加的な効果をみている可能性が考えられる。この場合、それぞれの刺激剤に反応しているMφポピュレーションは異なっているという可能性も否定できない。

3. LPS刺激およびMAC感染MφのTGF-β産生に対するSLPIの影響

Table 2はLPS刺激およびMAC感染MφのTGF-

Table 2 Effects of 1/2 SLPI on the production of TGF- β by M ϕ s stimulated with LPS or MAC^{a)}

Stimulation with	Addition of 1/2 SLPI (ng/ml)	TGF- β production (ng/ml)	
		Day 7	Day 14
Expt. 1			
—	—	< 0.1 ^{b)}	< 0.1
—	100	< 0.1	< 0.1
—	1000	< 0.1	< 0.1
LPS (10 μ g/ml)	—	0.7 \pm 0.2 ^{c)}	0.6 \pm 0.3 ^{c)}
LPS (10 μ g/ml)	100	1.0 \pm 0.3	0.6 \pm 0.3
LPS (10 μ g/ml)	1000	1.5 \pm 0.1	3.2 \pm 1.0
Expt. 2			
—	—	2.9 \pm 0.2 ^{d)}	N.D. ^{e)}
MAC (10 ⁷ CFU/ml)	—	3.4 \pm 0.3	N.D.
MAC (10 ⁷ CFU/ml)	100	4.0 \pm 0.2	N.D.

a) M ϕ s were cultured in the presence or absence of the indicated agents for 7 or 14 days and concentrations of TGF- β in the culture fluids were measured.

b) Lower than detectable limit.

c) The mean \pm S.E.M. (n=5).

d) The mean \pm S.E.M. (n=4). Culture fluids were subjected to acid-treatment before ELISA.

e) Not determined.

β 産生能に対する1/2 SLPIの影響をみたものである。LPS刺激M ϕ からのTGF- β 産生能は培養3日目までは検出限界以下であったが(成績省略), Table 2に示すように, それ以後の培養7~14日目にかけては軽度の産生が認められた。なお, LPS刺激M ϕ の培養7日目でのTGF- β 産生は1/2 SLPI (100および1,000ng/ml)の添加によって軽度に増強されること, さらに培養14日目でのTGF- β 産生については1/2 SLPI (1,000ng/ml)の添加による有意な増強が認められた($p < 0.05$; t 検定)。この場合, 低濃度の1/2 SLPI (100ng/ml)で処理したM ϕ では, そのような増強はみられなかった。また, 非刺激M ϕ では1/2 SLPIの添加, 非添加の別なく培養7日および14日のいずれでも有意なレベルのTGF- β 産生は認められなかった。

他方, MAC感染M ϕ では, 培養上清をあらかじめ0.1N HClで酸処理してTGF- β を活性型分子に変換させることにより, ELISA法での検出が初めて可能となったが, この場合も1/2 SLPIによるM ϕ TGF- β 産生能の若干の増強が認められた。

4. LPS刺激およびMAC感染M ϕ のNO産生に対するSLPIの影響

Table 3に示すように, 非刺激およびLPS刺激M ϕ からのNO産生には1/2 SLPI (100~1,000 ng/ml)の添加による顕著な影響は認められなかった。他方, MAC感染M ϕ のNO産生能は, 明確な用量依存性は認められないものの1/2 SLPIによってわずかに増強されることが分かった。

5. M ϕ 内感染MAC菌の細胞内増殖に及ぼすSLPIの影響

Table 4は, MAC感染M ϕ を1/2 SLPI添加あるいは非添加の培地中で培養した場合の菌の細胞内増殖の様相をみたものであるが, 1/2 SLPI (100~1,000ng/ml)の添加によってもMAC菌の増殖にこれといった影響は認められなかった。

考 察

LPS刺激マウス腹腔M ϕ のCK産生に対するSLPIの作用についての検討により得られた今回の成績については, 以下の考察が可能である。まず, M ϕ のIL-10やTNF- α あるいはNO産生にはLPS刺激およびMAC感染後のかなり早期に一過性の亢進がみられたのに対して, TGF- β 産生には刺激3日以上を経た中期

Table 3 Effects of 1/2 SLPI on the production of nitric oxide by Mφs stimulated with LPS or MAC^{a)}

Stimulation with	Addition of 1/2 SLPI (ng/ml)	NO ₂ ⁻ production (μM)
Expt. 1		
—	—	13.3 ± 0.25 ^{b)}
—	100	13.1 ± 0.52
—	1000	14.5 ± 0.84
LPS (10 μg/ml)	—	25.0 ± 0.35
LPS (10 μg/ml)	100	24.8 ± 0.14
LPS (10 μg/ml)	1000	24.8 ± 0.32
Expt. 2		
—	—	12.6 ± 0.25 ^{c)}
MAC (10 ⁷ CFU/ml)	—	14.0 ± 0.32
MAC (10 ⁷ CFU/ml)	100	14.6 ± 0.25
MAC (10 ⁷ CFU/ml)	1000	15.2 ± 0.37

a) Mφs were cultured in the presence or absence of the indicated agents for 3 days and concentrations of NO₂⁻ in the culture fluids were measured.

b) The mean ± S.E.M. (n=4).

c) The mean ± S.E.M. (n=5).

Table 4 Effects of 1/2 SLPI on Mφ antimicrobial activity against MAC organisms^{a)}

Addition of 1/2 SLPI (ng/ml)	Log CFU/well (mean ± S.E.M.; n=3)	
	Day 0	Day 3
—	3.94 ± 0.04	4.63 ± 0.05
100	N.D. ^{b)}	4.68 ± 0.02
1000	N.D.	4.68 ± 0.11

a) MAC-infected Mφs were cultured for 3 days and the number of CFU of bacteria residing in the Mφs were counted.

b) Not determined.

以後の phase になってからの緩徐な亢進が認められた。このような産生パターンの違いは、LPS 刺激および MAC 感染 Mφ におけるこれら CK あるいは inducible NO synthase の mRNA や蛋白の発現には各々時間的に大きな隔たりがあることを意味しているように思われる。ところで、1/2 SLPI は LPS 刺激 Mφ からの TNF-α、IL-10 および NO 産生には特に有意な影響を及ぼさなかったが、TGF-β 産生に対しては有意な増強作用を示すことが明らかになった ($p < 0.05$; t -test)。同様な傾向は MAC 感染 Mφ でも認められたが、この場

合、特記すべきは 1/2 SLPI による IL-10 産生能の増強が LPS 刺激 Mφ の場合に比べてより明確であることである。また付言するに、実験によっては Mφ の TNF-α 産生能が 1/2 SLPI によって若干低下するような成績も得られており (成績省略)、総じて MAC 感染 Mφ の TNF-α 産生能は、SLPI により著しい影響を受けないものの、わずかながら down-regulate される傾向がうかがわれる。

最近、Jin ら⁸⁾¹⁴⁾により、SLPI 遺伝子の導入により SLPI を過剰発現させた Mφ cell line では、NO 産生

やTNF- α のmRNA発現が抑制されることが報告されているが、このことは、SLPIがprotease活性阻害を介するかあるいはSLPI特異レセプターを介するかして、細胞内でのLPSシグナル伝達系に何らかのクロストークを行う可能性を示唆しており、今回のわれわれのTGF- β についての成績もこうしたメカニズムによるものと考えられる。他方、SLPIはヒト単球のprostaglandin H synthase-2ならびにmatrix metalloproteinase合成に対する抑制作用を有するが、TNF- α やIL-10の産生には特に影響を及ぼさないといったZhangら¹⁵⁾の報告を考慮した場合、供試M ϕ のポピュレーションやM ϕ 刺激法などの実験条件の如何によってはCK産生に及ぼすSLPIの作用発現には何らかの違いがみられる可能性も否定できない。

今回のわれわれの成績では、TNF- α 産生ならびにIL-10産生についてはLPS刺激あるいはMAC感染M ϕ の別なく、1/2 SLPIの影響は特に明確なものとは言えず、これはむしろZhangら¹⁵⁾の報告と軌を一にする成績であると言える。したがって、Jin⁸⁾の報告にあるようにM ϕ へのSLPI遺伝子の導入によりSLPIをendogenousに過剰発現させた場合はともかくとして、Zhangら¹⁵⁾や今回のわれわれの成績からも示唆されるごとく、生理的濃度範囲内のSLPIを外部から作用させた場合ではSLPIのTNF- α 発現抑制作用は余り明確なものにはなり得なかったものと考えられる。なお、今回われわれが供試した1/2 SLPI標品はC末側ドメインよりなるhalf-sized SLPIであるが⁹⁾¹⁰⁾、このものの好中球エラストラーゼ阻害活性はほぼ100%保存されているので¹¹⁾、1/2 SLPIのM ϕ TNF- α 産生に及ぼす作用についてのわれわれの成績とJinら⁸⁾の成績の相違が、供試したSLPI標品のセリンプロテアーゼ阻害活性の差に起因したものである可能性は少ないものと思われる。いずれにしてもSLPIがM ϕ のTGF- β 産生をup-regulateし、またIL-10産生をも若干亢進し得るという今回の成績は、SLPIが炎症部位での好中球プロテアーゼによる組織破壊や好中球浸潤による炎症の激化に対して抑制的に働くといったメカニズム以外にも、M ϕ 機能を介したかたちでその抗炎症作用を発揮するといった可能性があることを示唆するものと思われる。

ま と め

Half-sized SLPI (1/2 SLPI) のマウス腹腔M ϕ の諸種サイトカインおよびnitric oxide (NO)産生能に及ぼす作用について検討した。その結果、(1) 1/2 SLPIはLPS刺激およびMAC感染M ϕ のTNF- α 産生能に対しては有意な影響を及ぼさないか、あるいは弱い抑制作用を示すこと、(2) IL-10やNO産生能に対しては

有意な影響を及ぼさないが、MAC感染M ϕ のIL-10産生能を若干増強すること、(3) LPS刺激、MAC感染M ϕ のいずれのTGF- β 産生能も1/2 SLPIにより増強される傾向がみられること、(4) M ϕ 感染MAC菌の細胞内増殖には1/2 SLPI処理による影響は認められないこと、などが明らかになった。

謝 辞

Half-sized SLPIを分与頂いた帝人株式会社 に深謝します。

文 献

- 1) 斎藤慎二：マクロファージの活性化のシグナル。『Annual Review 免疫 1994』、菊地浩吉、矢田純一、奥村康編、中外医学社、1994、77-83。
- 2) Gavaille M, Fitting C, Haeffner-Cavaille N, et al.: Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 1990; 58: 2375-2382.
- 3) Jessop JJ, Henry SL, Hoffman T: Effects of serine protease inhibitor, TAME, on IL-1 β in LPS-stimulated human monocytes: relationship between synthesis and release of a 33-kDa precursor and the 17-kDa biologically active species. *Inflammation.* 1993; 17: 613-631.
- 4) Megyeri P, Pabst KM, Pabst MJ: Serine protease inhibitors block priming of monocytes for enhanced release of superoxide. *Immunology.* 1995; 86: 629-635.
- 5) Stolk J, Davies P, Kramps JA, et al.: Potency of antileukoprotease and α_1 -antitrypsin to inhibit degradation of fibrinogen by adherent polymorphonuclear leukocytes from normal subjects and patients with chronic granulomatous disease. *Am Rev Respir Cell Mol Biol.* 1992; 6: 521-526.
- 6) 木田厚瑞：Secretory leukoprotease inhibitor 臨床応用への可能性をめぐって。呼吸。1994; 13: 363-370。
- 7) Asano S, Kida K, Koyama T, et al.: A morphologic study of lung secretory leukoprotease inhibitor in pneumonia. *Am Rev Crit Care Med.* 1995; 151: 1576-1581.
- 8) Jin F, Nathan C, Radzioch D, et al.: Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage

- product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell*. 1997; 88: 417-426.
- 9) 今泉 厚: 呼吸器炎症におけるエラスターゼとその阻害物質の役割. *Prog Med*. 1992; 12: 1208-1219.
- 10) 鈴木洋二, 今泉 厚: 肺気腫におけるプロテアーゼとアンチプロテアーゼ. *The Lung*. 1993; 1: 13-17.
- 11) Masuda K, Kamimura T, Watanabe K, et al.: Pharmacological activity of the C-terminal and N-terminal domains of secretory leuko-protease inhibitor in vitro. *Br J Pharmacol*. 1995; 115: 883-888.
- 12) Shimizu T, Tomioka H, Sato K, et al.: Effects of the Chinese traditional medicine Mao-Bushi-Saishin-To on therapeutic efficacy of a new benzoxazinorifamycin, against *Mycobacterium avium* infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43: 514-519.
- 13) 萩原恵里, 石ヶ坪良明: サイトカイン ELISPOT 法によるサイトカイン産生細胞の定量. *臨床免疫*. 1997; 29 (Suppl. 17): 271-277.
- 14) Jin F, Nathan CF, Radzioch D, et al.: Lipopolysaccharide-related stimuli induce expression of the secretory leukocyte protease inhibitor, a macrophage-derived lipopolysaccharide inhibitor. *Infect Immun*. 1998; 66: 2447-2452.
- 15) Zhang Y, DeWitt DL, McNeely TB, et al.: Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H synthase-2, prostaglandin E₂, and matrix metalloproteinases. *J Clin Invest*. 1997; 99: 894-900.