

Toxic Shock Syndrome Toxin-1 및 Mite 항원이 사람섬유아세포의 생물활성에 미치는 효과

김광혁[†] · 옥미선* · 유태현**

고신대학교 의과대학 미생물학교실
기생충학교실*
이비인후과학교실**

Effects of Mite Antigen and Toxic Shock Syndrome Toxin-1 on the Biological Activity of Human Fibroblast

Kwang-Hyuk Kim[†], Mee-Sun Ock* and Tai-Hyun Yu**

Department of Microbiology, Parasitology and Otolaryngology**,
College of Medicine, Kosin University, Pusan, Korea*

Abstract

The production of interleukin-1(IL-1) and nitric oxide(NO) by cultured fibroblast cells of human nasal turbinate was revealed by biological and chemical assay respectively. The cells were incubated for various periods of time in the presence of staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1(TSST-1) and house dust mite(*Dermatophagoides farinae*, HDM), and the culture supernatants were harvested. There was a little difference in the activities of IL-1beta and the amount of NO produced by the cells when stimulated with 0.002-0.1 µg/ml of TSSTO-1 and 0.02-1 µg/ml of HDM. The shapes of the time course curves for the production of IL-1beta and NO by the cells were different. Groups stimulated with TSST-1 or HDM produced more IL-1beta in 2 h than no exposure group(Control). A certain mixed group(TSST-1, 10 ng+mite, 100 ng) continued to produce IL-1beta highly throughout the entire incubation period. The cells stimulated with TSST-1 or HDM produced more NO in 2 h and 6 h than that produced in the end of incubation(48 h). Also, the mixed groups were generally similar. These results suggest that induction of IL-1beta by a certain mixed condition(TSST-1+mite) in fibroblast cell *in vivo* may play a role in inflammation.

Key words : fibroblast, TSST-1, mite antigen, IL-1beta, NO

[†] Corresponding author

서 론

가옥내의 먼지속에 서식하는 진드기류(*Dermatophagoides* sp)가 알려지원이 된다는 사실은 1964년 Voorhorst 등¹⁾이 진드기발생의 계절적 소장과 소아천식의 빈도가 일치하며 미량의 진드기항원으로 피내반응을 일으킬 수 있다는 보고로부터 시작된다. 일본과 같은 독특한 방구조(Tatami 사용)에서는 소아 천식환자의 60-80%가 집먼지 진드기항원(*D. farinae*)을 사용한 피내반응에서 양성을 보였다는 보고가 있었다.²⁾ 한국에서는 주 등³⁾의 역학적 조사를 시작으로 5종의 진드기가 밝혀져 있으며, 알려지성 질환에서 집먼지 진드기항원을 사용한 백 등*의 피내반응 성적을 보면 환자군에서 양성율이 34.2-73.1%, 대조군에서 21.4-29.6%를 나타내어 옥내 알러젠 중에서 진드기항원이 가장 빈도가 높은 것으로 밝혀졌다.

포도상구균의 초항원(superantigen)인 toxic shock syndrome toxin-1(TSST-1)이 T 세포의 과잉활성화와 cytokine의 과잉생성에 관여한다는 가설이 제기된 후 초항원의 항원성이 더욱 확실히 밝혀지게 되었으며 cytokine의 생성과 같은 생물활성이 외독소성 질환의 발증기전에 일차적으로 관여한다는 근거가 마련되었다. 즉 이러한 초항원은 T 세포를 강력하게 활성화시켜 interleukin-2, interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, beta의 생성을 유도하고 있다. 이때의 T 세포는 APC상의 MHC class II와 독소가 결합하여 만들어 낸 복합체를 인식함으로써 활성화된 것이다. T 세포상의 독소인식구조는 항원인식수용체(T cell receptor, TCR)이며 독소인식에는 TCR의 가변부 V beta가 관여하여 특정독소의 자극에 대하여 특정의 V beta를 표현하는 막대한 수의 T 세포 clone들이 일괄적으로 활성화된다.⁴⁻⁷⁾

이상의 집먼지 진드기 항원과 TSST-1 초항원에 의한 세포활성물질 분비양상에 관한 연구는 대부분 면역담당세포에 국한되어 있으나 알려지 반응의 일차적인 증상이 나타나는 비 섬유아세포(nasal fibroblast)에서의 생물활성물질의 분비양상을 추적해 보는 것은 의미있는 일로 생각된다. 섬유아세포의 주기능은 조직특이적인 세포기질과 기관의 생성이며 collagen, elastic fiber, glycoprotein, glycosaminoglycan, proteoglycan과 같은 기질의 거대분자를 합성하여 분비한다. 또한 이들 세포는 collagen fiber를 조합하

는데 중심적인 역할을 하며, 정상조직 형성과 병리적 섬유화과정에도 관여하고 세포분화와 발달을 포함하는 다양한 생리현상중에 요구되는 세포간질의 생성과 분해사이의 균형을 긴밀하게 유지시키는 역할도 맡고 있다. 섬유화세포는 세포의 기질단백의 생성으로 특성화되지만 이 세포들이 염증 혹은 면역반응과정중에 다양한 기능을 수행할 수 있는 것으로 여겨지고 있다.^{8,9)}

본 실험에서는 정상인의 하비갑개(inferior turbinate of nose)로부터 분리한 섬유아세포를 초대배양(primary culture)하고 여기에 집먼지 진드기 항원(*Dermatophagoides farinae*)이나 포도상구균의 TSST-1을 노출시키거나, 이 두가지 항원을 동시에 혼합노출시켰을 때 나타나는 interleukin-1 beta 및 nitric oxide의 생성능을 보고자 한다.

재료 및 방법

1. 섬유아세포의 배양(Fig. 1)

정상여인(67세)의 하비갑개(inferior turbinate of nose)로부터 조직절편 2-5mm³를 무균적으로 생검하여 1mm³ 크기로 절편한 후 조직을 수태아혈청(fetal calf serum, FCS, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)을 10% 추가하여 만든 Eagle's minimum essential medium (EMEM, Gibco, Grand Island, NY, USA) 2ml을 적하한 60nm 조직배양용 접시(Costar, Cambridge, MA, USA)에 정착하고 멸균된 cover slip으로 고정된 뒤 37°C, 5% CO₂ 배양기에 넣어 3-4일 간격으로 배지를 교환하면서 배양하였다. 약 3주 후에 배양용 접시 전체에 monolayer로



Fig. 1. Fibroblast growth in primary explant culture from inferior turbinate of human nose(400X)

형성된 섬유아세포로부터 배지를 흡입하여 버리고 PBS로 1회 세척한 후 0.25% trypsin 0.3ml을 첨가한 후 배양기에서 5분 동안 방치하였다. 박리된 세포들은 10% FCS EMEM으로 재부유시켜 IL-1 및 NO 생성 세포로 사용하였다.

2. 섬유아세포 배양상층액의 준비

1) TSST-1의 노출

부유시킨 섬유아세포(2.5×10^5 /ml) 2ml씩을 24 wells 배양용 plate에 분주한 후 TSST-1(Sigma, USA)을 ml당 100ng, 10ng, 2ng 작용시켰으며 각 dose 당 2, 6, 18, 24, 48시간까지 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 각각 배양하여 배양액을 수거하였다. dose 및 시간에 따른 실험 well은 triplicate로 시행하였다. 수거된 배양액은 300g에서 30분간 원침시킨 후 그 상층액을 수거하여 -70°C에 보관하면서 TSST-1 노출후의 IL-1 및 NO 생성효과 측정에 사용하였다.

2) Mite항원의 노출

1)에서와 같은 조건의 세포에 mite항원(*D. farinae* 항원, Bencard, England)을 ml당 1,000, 200, 100, 20ng 작용시켰으며 각 dose당 2, 6, 18, 24, 48시간까지 배양하여 수거된 상층액의 보관 및 실험 well수는 1)과 같이 시행하였다.

3) Mite항원 및 TSST-1의 중복노출

1)에서와 같은 조건의 세포에 ml당 mite항원 1,000ng과 TSST-1 100ng을 작용시킨 군, mite항원 200ng과 TSST-1 10ng을 작용시킨 군, mite항원 100ng과 TSST-1 10ng을 작용시킨 군, mite항원 20ng과 TSST-1 2ng을 작용시킨 군으로 나누고 각 dose당 2, 6, 18, 24, 48시간까지 배양하여 수거된 상층액의 보관 및 실험 well수는 1)과 같이 시행하였다.

3. IL-1의 정량

IL-1의 정량은 Gillis 등¹⁰⁾의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 즉 1×10^7 세포/ml의 Balb/C 마우스 흉선세포 부유액 0.1ml 씩을 96 well microplate에 분주하였다. 여기에 4 μ g/ml의 concanavalin A(Sigma, USA)용액 및 시료를 각각 50 μ l씩을 적하하였다. 사용 well은 시료 별로 duplicate로 시행하였다. 적하가 완료된 plate는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된

후 PBS로 5mg/ml이 되게 용해시킨 tetrazolium salt MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide](Sigma, USA) 액 10 μ l씩을 각 well에 작용시킨 후 4.5시간 다시 추가 배양하였다. 배양 후 0.02 M HCl 액에 녹여 만든 10% SDS(sodium dodecyl sulfate, Sigma, USA) 액을 25 μ l씩 각 well에 적하하여 실온에 1시간 동안 방치하였다. Optical density는 multiscanner(Titertek Multiscan MCC/340, Flow Laboratories, USA)를 이용하여 620nm에서 측정하였다. 표준곡선은 IL-1beta(Boehringer Mannheim, Germany)로 작성하였다.

4. NO 정량분석

NO는 공기중에서 수 초내에 nitrite ion으로 산화되기 때문에 실제로는 nitrite ion의 농도를 측정하였다. nitrite ion의 측정은 Ding 등¹¹⁾의 microplate검사법에 준하여 시행하였다. 즉 방법 2에서 수거한 배양상층액 및 혈청을 각각 0.1ml 씩 96 well microplate로 옮겼다. Griess시약(1% sulfanilamide, Sigma/0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride, Sigma/2.5% phosphoric acid, Junsei)을 0.1ml 씩 증첩하여 작용시킨 후 실온에서 10분 동안 방치하였다. Optical density는 방법 3의 기종을 이용하여 540 nm에서 측정하였다. 표준곡선은 sodium nitrite(Hayashi, Japan)로 작성하였다.

결과 및 고찰

IL-1은 염증관련 cytokine으로서 IL-2 등의 다른 cytokine 들이 주로 림프구에 대한 성장인자들로 작용하는 것과는 성질을 달리하고 있다. IL-1은 단구, 대식세포 등이 세균내독소(lipopolysaccharide, LPS), muramylpeptide, phorbol ester, 보체결합면역복합체, 보체성분(C3a, C5a), 인터페론, 종양괴사인자, 콜로니자극인자, transforming growth factor-beta(TGF-beta), 바이러스 등의 자극을 받아 생성된다. 또한 IL-1 생성세포도 다양하여 keratinocyte, NK세포, T세포, B세포, 혈관내피세포, 호중구, 섬유화세포를 비롯, melanoma나 급성골수성백혈병세포 등의 암세포에서도 IL-1이 생성되고 있다. 병인론 차원에서 IL-1을 포함한 여러 cytokine들이 급성염증반응시 방출되어 전신적인 반응이 일어나지만, 국소적이면서 지속적으로 IL-1이 생성되게 되면 다양한 만성염증성질환이 유도되어 골, 관절,

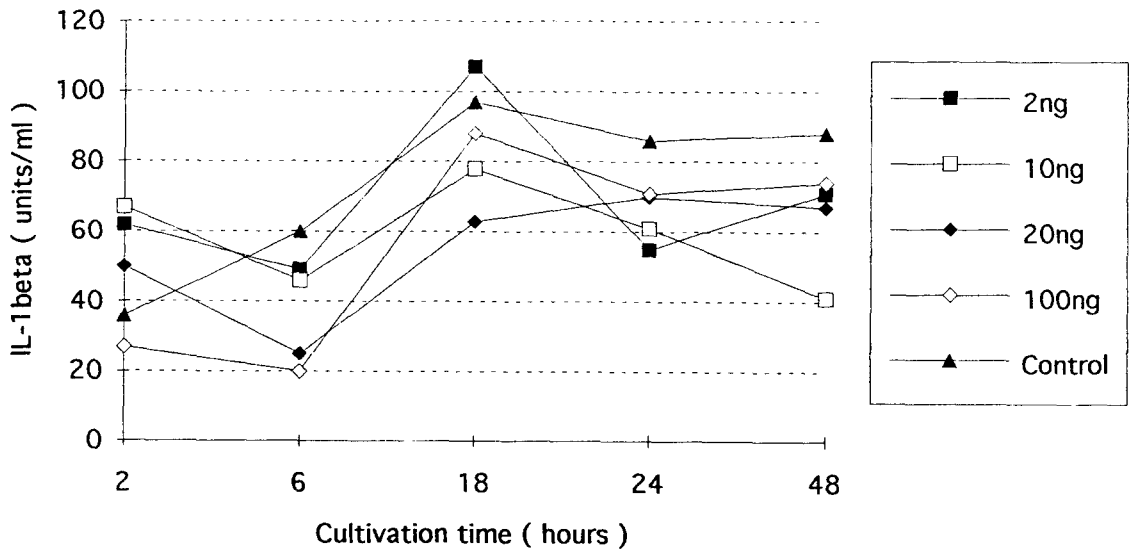


Fig. 2. Effects of TSST-1 on the production of IL-1beta in the human nasal fibroblast. Several doses of TSST-1 were added to fibroblast cells(2.5×10^5 cells/ml). Control cells were exposed to PBS.

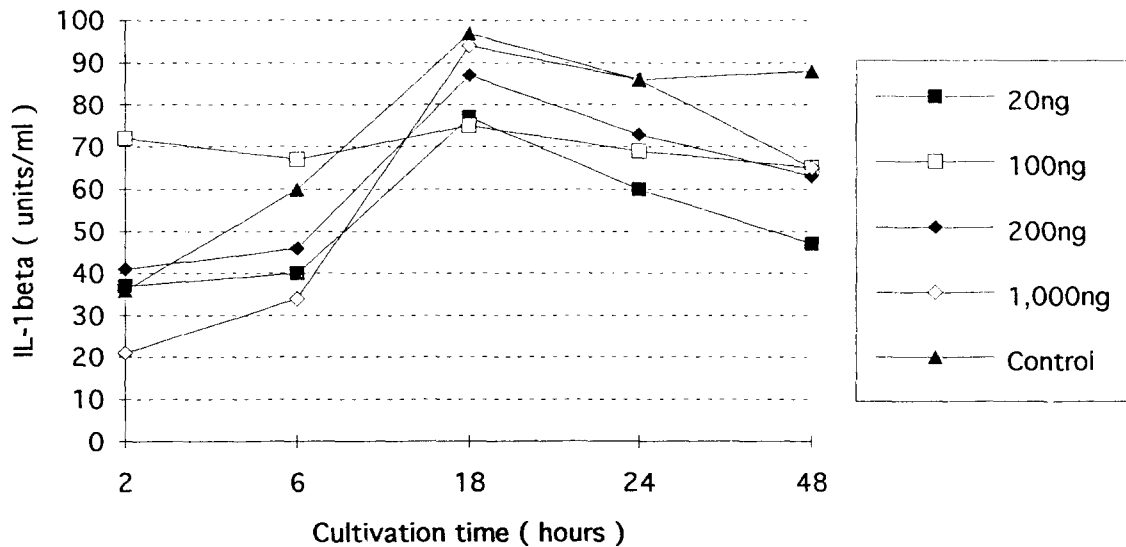


Fig. 3. Effects of mite(*D. farinae*) antigen on the production of IL-1beta in the human nasal fibroblast. Several doses of mite antigen were added to fibroblast cells(2.5×10^5 cells/ml). Control cells were exposed to PBS.

혈관, 근육 등이 장애를 받게 된다.¹²⁻¹⁶⁾

Nitric oxide(NO)는 생체내에서 혈관이완물질, 신경전달 물질, 면역기능조절물질로서 뿐만아니라 항미생물작용 혹은

항암작용을 일으키는 것으로 알려져 있으며 과량의 NO생 성시 정상조직에 손상을 주게된다.¹⁷⁻²⁷⁾ 즉, 혈관내피세포 는 몇가지 혈관작용물질이나 물리적 자극에 반응하여 내피

유래혈관이완인자(endothelium-derived relaxing factor, EDRF)를 생성, 방출하여 혈관상태를 조절하고 있다. EDRF의 본체는 일산화질소(NO) 혹은 NO유사화합물로서,

NO합성효소(NO synthase, NOS)에 의해서 L-arginine으로부터 생성된다. NOS는, 내피세포나 신경세포에 존재하면서 Ca^{2+} 농도에 의해서 그 활성이 조절되는 구성형 NOS

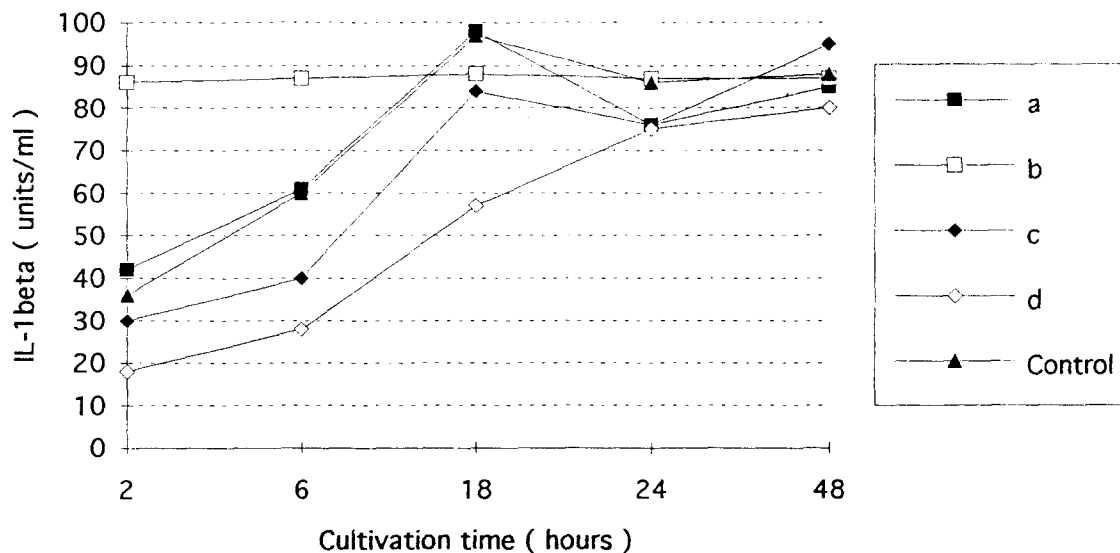


Fig. 4. Effects of TSST-1 combined with mite(*D. farinae*) antigen on the production of IL-1beta in the human nasal fibroblast. Doses of a (TSS-1, 2ng+mite, 20ng), b(TSST-1, 10ng+mite, 100ng), c(TSST-1, 20ng+mite, 200ng), and d(TSST-1, 100ng+mite, 1,000ng) were added to fibroblast cells(2.5×10^5 cells/ml) each. Control cells were exposed to PBS.

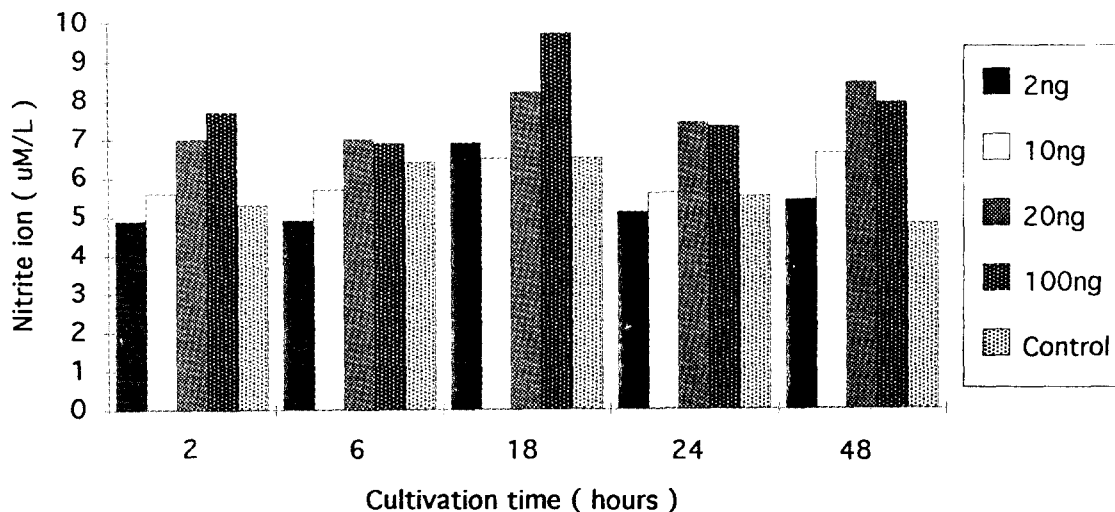


Fig. 5. Effects of TSST-1 on the production of NO in the human nasal fibroblast. Several doses of TSST-1 were added to fibroblast cells(2.5×10^5 cells/ml). Control cells were exposed to PBS.

(constitutive type, cNOS)와 대식세포나 혈관평활근 등에 존재하고 사이토카인 등의 자극에 의해서 유도되는 Ca^{2+} 비의존성의 유도형 NOS(inducible type, iNOS)로 분류되고 있다. 내피세포로부터 생성된 EDRF/NO는 혈관평활근의 이완뿐만 아니라 혈소판의 응집이나 백혈구의 접착을 억제하여 장기혈류를 유지시킴으로서 혈관에서의 염증반응억제라고 하는 IL-1과는 상반된 반응을 나타내게 된다.* 그러나 관절염 경우에는 NO과잉생성이 상당한 의미를 갖게 된다. 관절염에 있어서 NO의 의의를 최초로 검토한 것은 Moncada 등²⁸⁾이었다. 이들은 만성관절류마티스(rheumatoid arthritis, RA)나 변형성관절증(osteoarthritis, OA)환자혈청이나 관절액에서 NO를 측정해 본 결과, RA와 OA환자혈청의 NO농도는 건강인에 비하여 유의하게 높았으며 RA와 OA환자관절액의 NO농도는 동일환자의 혈청 NO농도에 비하여 현저하게 높게 나타남을 관찰하여 관절염국소에서 NO가 과잉으로 생성되고 있음을 밝혔다. 이러한 결과에 근거를 두어 생각한다면 관절염을 통해서 생성된 사이토카인의 영향으로 혈관내피세포, 활막표층세포, 침윤된 대식세포, 활막섬유아세포, 연골세포 등에서 NO가 생성되고 이 NO는 혈관투과성상승, 연골파괴, 동통 등의 병증을 유발시키는 것으로 추측되고 있다.^{29,30)}

일정수의 섬유아세포에 TSST-1을 dose별로 작용시키

어는 배양상층액의 시간별 IL-1beta의 생성은 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 배양 18시간째에서 전반적으로 가장 높게 나타나는 것은 대조군을 포함하여 모든 군에서 같은 경향을 보였다. 배양 2시간째인 초기에는 toxin에 노출된 군들(100ng은 제외)에서 대조군보다 많은 IL-1 생성을 보였으나 그 이후에는 대체적으로 대조군보다 낮았다. Mite항원을 노출(Fig. 3)시켰을 때도 이와 유사한 경향을 보였으며 agent가 고농도일 때 배양초기에 IL-1 생성이 억제되는 것을 볼 수 있었다. TSST-1과 mite를 혼합하여 노출(Fig. 4)시켰을 때에는 agent 들의 혼합된 량에 따라서는 특이한 곡선을 보였다. 즉, b곡선(TSST-1, 10ng+mite, 100ng)에서 처럼 초기에 가장 활발히 IL-1 생성을 보였으며 시간이 경과되는 데도 활성을 그대로 유지하였다. 이는 agent들의 일정농도하에서는 지속적인 생성이 이루어 지고 있음을 의미하게 된다.

TSST-1을 dose별로 작용시킨 섬유아세포를 배양하여 수거한 상층액의 시간별 NO생성은 Fig. 5에 나타난 바와 같다. 배양초기(2시간과 6시간째)보다는 배양말기(48시간째)에서 모든 dose별 시료노출군들에서 대조군보다 뚜렷한 상승을 보였다. 이는 대식세포들에서 나타나는 양상과 비슷한 결과로 해석된다. 즉, 자극물에 영향을 받은 세포는 NO생성에 관련을 갖는 사이토카인을 먼저 분비할 것

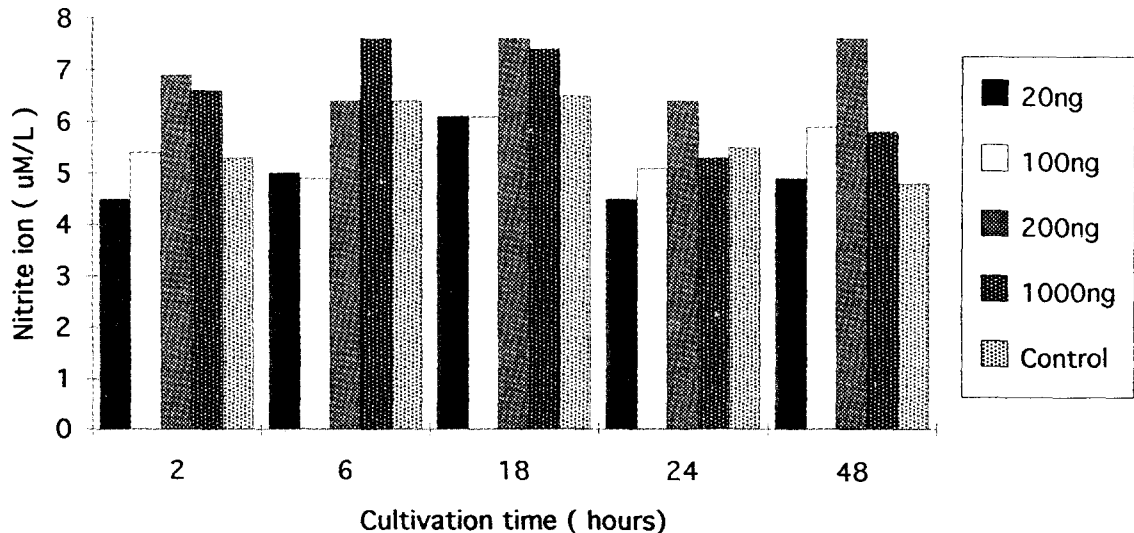


Fig. 6. Effects of mite(*D. farinae*) antigen on the production of NO in the human nasal fibroblast. Several doses of mite antigen were added to fibroblast cells(2.5×10^5 cells/ml). Control cells were exposed to PBS.

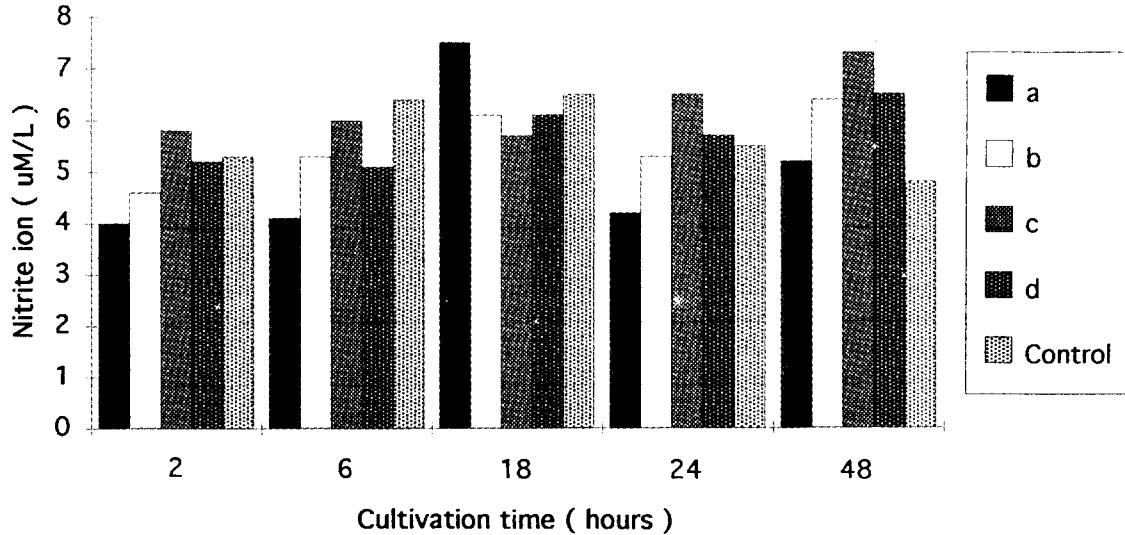


Fig. 7. Effects of TSST-1 combined with mite(*D. farinae*) antigen on the production of NO in the human nasal fibroblast. Doses of a (TSST-1, 2ng+mite, 20ng), b(TSST-1, 10ng+mite, 100ng), c(TSST-1, 20ng+mite, 200ng), and d(TSST-1, 100ng+mite, 1,000ng) were added to fibroblast cells(2.5×10^5 cells/ml) each. Control cells were exposed to PBS.

이다. 이러한 경향은 mite항원노출군(Fig. 6) 및 복합노출군(Fig. 7)에서도 나타났으며 복합노출시 IL-1생성에서 보였던 초기의 상승이 후기에 까지 유지되는 양상과는 다르게 나타남을 알 수 있었다. 즉 NO생성에 있어서는 복합노출의 효과가 미미한 것이다.

요 약

생체내 상당부분을 점유하고 있는 섬유아세포에 외부기생충 중에서 알려지기로 주목받고 있는 집먼지 진드기항원(*Dermatophagoides farinae*)과 원내감염의 대상균이기도 한 포도상구균 superantigen의 일종인 TSST-1으로 시험하여 세포로부터 유리되는 IL-1beta와 NO와 같은 생물활성물질을 관찰하였다.

1. IL-1beta의 생성은 섬유아세포에 TSST-1을 작용시켰을 때 배양 18시간째에서 가장 높게 나타났다. 배양 2시간째인 초기에는 toxin에 노출된 균들에서 대조군보다 높은 생성을 보였으나 그 이후에는 대조군보다 낮았다. Mite항원을 노출시켰을 때는 고농도일 때 배양초기에 IL-1생성이 억제되었다. TSST-1과 mite를 혼합하여 노출시

켰을 때에는 b곡선(TSST-1, 10ng+mite, 100ng)에서처럼 초기에 활발한 IL-1생성을 보였으며 시간이 경과되는데도 활성이 그대로 유지되었다. 이는 agent들이 어떤 일정농도로 작용되었을 때는 IL-1의 계속적인 생성이 이루어지고 있음을 의미하게 된다.

2. TSST-1을 작용시킨 섬유아세포의 NO생성은 배양초기(2시간과 6시간째)보다는 배양말기(48시간째)에서 대조군보다 뚜렷한 상승을 보였다. 이러한 경향은 mite항원노출군 및 복합노출군에서도 나타남으로서 NO생성에 있어서는 복합노출의 효과를 볼 수 없었다.

감사의 글

본 논문은 1994년 고신대학교 의학부 기초임상공동연구비의 지원에 의해 이루어 졌으며 이를 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Voorhorst, R., Spieksma-Boezeman, M. I. A. and Spieksma, F. T. M. : Is a mite(*Dermatophagoides* sp.)

- the product of the house dust allergen? *Allergy Asthma*, 10, 329(1964).
2. 寺道由晃, 根本俊彦, 松田正己, 堀内洋子: 小兒氣管枝喘息における家塵とだに共通抗原性. *小兒内科外科*, 7, 453(1975).
 3. 주정균, 송수복, 김돈균, 김영균: 진드기(acaroid mite)에 관한 역사적 조사. *대한기생충학잡지*, 5, 71(1967).
 4. Henne, E., Campbell, W. H. and Carlson, E.: Toxic shock syndrome toxin-1 enhances synthesis of endotoxin-induced tumor necrosis factor in mice. *Infect. Immun.*, 59, 2929(1991).
 5. Todd, J. and Fischaut, M.: Toxic-shock syndrome associated with phage-group-1 staphylococci. *Lancet*, 2, 116(1978).
 6. Tyson, W., Wensley, D. F. and Anderson, J. D.: Atypical staphylococcal toxic shock syndrome; two fatal cases. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 8, 642(1989).
 7. Younis, R. T., Gross, C. W. and Lazar, R. H.: Toxic shock syndrome following functional endonasal sinus surgery: A case report. *Head & Neck*, 13, 247(1991).
 8. Freundlich, B., Bomalaski, J. S., Neilson, E. and Jimenez, S. A.: Regulation of fibroblast proliferation and collagen synthesis by cytokines. *Immunol. Today*, 7, 303(1986).
 9. Harris, A. K.: Fibroblasts and myofibroblasts. *Methods Enzymol.*, 163, 623(1988).
 10. Gillis, S. and Mizel, S. B.: T-cell lymphoma model for the analysis of interleukin-1-mediated T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1133(1981).
 11. Ding, A. H., Nathan, C. F. and Stuehr, D. J. Y. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immun.*, 141, 2407(1988).
 12. Muhlradt, P. F. and Schade, U.: MDHM, a macrophage-stimulatory product of *Mycoplasma fermentans*, leads to *in vitro* interleukin-1(IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and prostaglandin production and is pyogenic in rabbits. *Infect. Immun.*, 59, 3969(1991).
 13. Parsonnet, J., Hickman, R. K., Eardley, D. D. and Pier G.B.: Induction of human interleukin-1 by toxic-shock-syndrome toxin-1. *J. Infect. Dis.*, 151, 514(1985).
 14. Hellerstein, M. K., Meydani, S. N., Meydani, M. M., Wu, K. and Dinarello C. A.: Interleukin-1-induced anorexia in the rat. *J. Clin. Invest.*, 84, 228(1989).
 15. Tsukui, T., Kikuchi, K., Mabuchi, A., Sudo, T., Sakamoto, T., Asano, G. and Yokomuro, K.: Production of interleukin-1 by primary cultured parenchymal liver cells(Hepatocytes). *Exp. cell Res.*, 210, 172(1994).
 16. Ogle, C. K., Wu, J., Mao, X., Szczur, K., Alexander, J.W. and Ogle J. D.: Heterogeneity of kupffer cells and splenic, alveolar, and peritoneal macrophages for the production of TNF, IL-1, and IL-6. *Inflammation*, 18, 511(1994).
 17. Adams, L. B., Franzblau, S. G., Vavrin, Z., Hibbs, J. B. and Krahenbuhl, J. L.: L-Arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. *J. Immun.*, 147, 1642(1991).
 18. Adams, L. B., Hibbs, J. B., Tainter, R. R. and Krahenbuhl, J. L.: Microbiostatic effects of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*: Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J. Immun.*, 144, 2725(1990).
 19. Bredt, D. S. and Snyder, S. H.: A novel neuronal messenger. *Neuron*, 8, 3(1992).
 20. Bredt, D. S. and Snyder, S. H.: Isolation of nitric oxide synthetase, calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 682(1990).
 21. Chan, J., Xing, Y., Magliozzo, R. S. and Bloom B. R.: Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.*, 175, 1111(1992).
 22. Curran, R. D., Billiar, T. R., Stuehr, D. J., Hofmann, K. and Simmons, R. L.: Hepatocytes produce nitrogen oxides from L-arginine in response to inflammatory products from Kupffer cells. *J. Exp. Med.*, 170, 1769(1989).
 23. Hibbs, J.B., Vavrin, Z. and Tainter, R. R.: L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immun.*, 138, 550(1987).
 24. Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H. and Osawa, T.: Cytolytic mechanisms of activated macrophages: Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms of activated macrophages. *J. Immun.*, 144, 1425(1990).
 25. Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. and Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological acti-

- vity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524(1987).
26. Stuehr, D. J. and Marletta, M. A. : Mammalian nitrate biosynthesis : Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7738 (1985).
27. Tayeh, M. A. and Marletta, M. A. : Macrophage oxidation of Larginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. *J. Biol. Chem.*, 264, 19654(1989).
28. Moncada, S., Palmer, R. M. J. and Higgs, E. A. : Nitric oxide : Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43, 109(1991).
29. Oyanagui, Y. : Nitric oxide and superoxide radical are involved in both initiation and development of adjuvant arthritis in rats. *Life Sci.*, 54, 285(1974).
30. McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Mizel, D. E., Albina, J. E., Xie, O., Nathan, C. and Wahl, S. M. : Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.*, 178, 749(1993).