

T 세포 하이브리도마에 의한 α_2 -Macroglobulin의 생산

이종길* · 한성순
충북대학교 약학대학

(Received September 8, 1994)

Production of α_2 -Macroglobulin by a T Cell Hybridoma

Chong Kil Lee* and Seong Sun Han

College of Pharmacy, Chungbuk National University, Cheonju 360-763, Korea

Abstract— α_2 -macroglobulin (α_2 -M) has been shown to have a variety of activities. One of those activities is the suppression of immune response. Characterization of the immunosuppressive factor secreted by a T cell hybridoma showed that α_2 -M was produced and secreted from the T cell hybridoma. α_2 -M was produced abundantly from the T cell hybridoma when cultured as ascites. The isolation and identification of the α_2 -M were studied using affinity chromatography and N-terminal amino acid sequencing. The extended observations were that the α_2 -M produced by the T cell hybridoma suppresses mixed lymphocyte reaction.

Keywords □ T cell hybridoma, α_2 -macroglobulin, immune suppression

면역반응의 억제에 T 세포가 관여한다는 사실은 극과량의 항원을 주사한 실험동물 모델에서 처음으로 확인되었으며¹⁾ 임신한 경우,²⁾ 조직을 이식한 경우,³⁾ 암이 발병한 경우⁴⁾ 등에서도 면역반응의 억제에 관여하는 T 세포의 존재가 확인되었다. 이들 T 세포가 면역반응을 억제 시키는 기전으로서의 면역억제인자(억제 인자)를 분비하여 면역반응을 억제시키는 것으로 보고되어 왔다.⁵⁾ T 세포가 생성하는 면역억제인자에는 항원 특이성 면역억제인자(antigen-specific suppressor factor)와 항원 비특이성 면역억제인자(antigen-nonspecific suppressor factor)로 나눌 수 있는데, 항원 특이성 면역억제인자는 두 종류의 펩타이드 즉, 항원과 특이적으로 결합할 수 있는 펩타이드와 주요조직적합항원의 I-J subregion에서 발현되는 I-J 펩타이드로 구성되어 있는 것으로 보고되어 왔다.^{6,7)} 그러나, 현재까지 항원과 특이적으로 결합할 수 있는 펩타이드의 정체가 밝혀지지 않고 있으며, I-J 유전자에 대한 molecular mapping 및 유전자 클로닝을 시도한

여러 연구자들이 I-J 유전자를 확인하지 못함으로써 T 세포에 의한 항원 특이성 면역억제인자의 생성에 대한 의문이 강하게 제기되고 있다.⁸⁻¹¹⁾

반면, T 세포는 여러 종류의 항원 비특이성 면역억제인자를 생성하여 면역반응을 억제할 수 있는 것으로 밝혀지고 있다. T 세포 또는 T 세포주에 의하여 생성되는 항원 비특이성 면역억제인자로 알려진 것들 중에서 유전자 클로닝 등의 방법에 의하여 그 정체가 밝혀진 것으로는 인터루킨-10¹²⁾ 및 transforming growth factor- β 가 있으며,¹³⁾ 이들 이외에도 soluble immune response suppressor(SIRS),¹⁴⁾ natural suppressor factor(NSF),¹⁵⁾ suppressor activating factor(SAF),¹⁶⁾ suppressor lymphokine(SL)¹⁷⁾... 등으로 불려지는 수 많은 면역억제인들이 T 세포에 의하여 생성된다고 보고되고 있다. T 세포가 과연 몇 종류나 되는 면역억제인자를 생성하며, 어떠한 조건에서 어떠한 면역억제인자가 생성되는지 등을 알아내기 위해서는 T 세포에 의해서 생성되는 면역억제인자의 정체를 밝힘으로써 가능할 것이다.

저자 등은 면역억제인자를 생성하는 것으로 이미

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

보고된 T 세포 하이브리도마로부터 면역억제인자를 분리하여 그 정체를 규명하고자 하였다. 본 연구에서는 T 세포 하이브리도마에 의하여 생성되며 림파구 혼합배양 시험을 억제 시키는 물질을 분리 정제하여 N-말단의 아미노산 서열을 밝힌 결과 α_2 -macroglobulin임을 확인할 수 있었기에 그 결과를 보고한다.

실험방법

세포 및 세포의 배양—면역억제인자를 생성하는 T 세포 하이브리도마인 A.1.1은 캐나다 University of Alberta의 D. Green 박사로부터 분양 받았고,¹⁸⁾ B 세포 하이브리도마인 PNKI는 미국 University of Health Sciences/The Chicago Medical School의 김윤범 박사로부터 받았으며 10%의 우혈청(Hyclone), 2 mM의 glutamine(Sigma), 100 units/ml의 penicillin 및 100 μ g/ml의 streptomycin(Sigma)을 첨가한 RPMI-1640(Sigma) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하거나 Balb/c 계통의 생쥐 복강에서 배양하였다.

항체의 생산 및 정제—항체는 토끼를 이용하여 생산하였다. 즉, polyacrylamide gel에서 용출시킨 163 Kilodalton(Kd)의 단백질 20 μ g을 Freund's complete adjuvant 및 Freund's incomplete adjuvants와 각각 혼합하여 일주일 간격으로 피하에 주사하고, 항체를 생산한 것으로 확인된 토끼로부터 항혈청을 분리하였다.

항혈청중의 IgG의 분리는 protein A affinity column을 이용하였다. 즉, 항혈청을 0.01 M Tris-Cl buffer (pH 8.0)로 미리 평형 시킨 Protein A-Sepharose 4B column에 부하한 후, 0.01 M Tris-Cl buffer (pH 8.0)로 세척하고, Protein A-Sepharose 4B에 결합된 항체를 0.1 M glycine (pH 3.0)용액으로 용출시켰다.

단백질의 정량—단백질의 정량에는 Bicinchononic acid를 이용한 단백질 정량법을 이용하였다.¹⁹⁾ 즉 시료 20 μ l에 Bicinchononic acid 시약 (Pierce, USA) 1 ml을 가하여 60°C에서 1시간 배양시킨 후 방냉시켜 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로서는 우혈청 albumin을 이용하였다.

전기영동—전기영동은 일정량의 시료 용액에 1%의 Sodium dodecyl sulphate (SDS)와 1%의 2-mercaptoethanol을 함유하는 loading buffer 동량을 가하고

100°C에서 5분간 가열한 후 7%의 polyacrylamide gel 상에서 Laemmli가 기술한 방법에 의하여 실시하였다.²⁰⁾ 단백질 밴드의 검출은 Coomassie blue staining에 의하여 실시하였다. 특정 단백질의 용출은 오래된 gel을 약 50배의 단백질 용출액(0.4 M urea, 0.05% SDS, 3.2 mM dithiothreitol을 함유하는 0.16% sodium citrate/150 mM NaCl/50 mM Tris/HCl buffer, pH 8.0)에 넣고 분쇄한 후 상층액을 농축하고 0.1 M propionic acid 및 증류수를 이용하여 투석시켜 얻었다.

Western blot analysis—Polyacrylamide gel 상의 단백질을 nitrocellulose paper (Schleicher & Schull)에 electroblotting 한 다음 163 Kd에 대한 항체 및 alkaline phosphatase가 부착된 goat anti-rabbit IgG (Pierce)를 이용하여 이 등이 보고한 방법으로 발색시켰다.¹⁸⁾

분리 정제—A.1.1 세포를 생쥐 복강에 주사하여 얻은 복수액에 동량의 phosphate-buffered saline (PBS)을 가하고 ammonium sulphate를 40% 포화하도록 가하여 생성되는 침전물을 분리하였다. 침전물을 소량의 PBS에 용해시킨 후 phosphate buffer로 평형 시킨 Sephacryl S-300 (Pharmacia) column (bed volume 600 ml) 상에서 전개시켰다. 유출액은 2 ml 씩으로 포집하여 각각에 대하여 280 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질의 양을 측정하였으며, Western blot 방법에 의하여 163 Kd 단백질의 존재 여부를 확인하였다. Western blot에서 양성으로 나타나는 시료를 모아서 163 Kd 단백질에 대한 항체를 Affigel 10 (Bio-RAD)에 결합 시킨 affinity column에 가하였다. Affinity column을 PBS로 세척한 후 pH 11의 lysine buffer를 이용하여 항체에 결합된 물질을 용출시켰으며 용출액은 PBS로 바로 중화시켰다.

아미노산 서열의 규명—Polyacrylamide gel로부터 163 Kd 단백질을 용출시켜 Hudson 등이 기술한 방법에 의하여 N-말단 아미노산의 서열을 규명 하였다.²¹⁾ 규명된 아미노산 서열의 분석은 IBI/Pustell Sequence Analysis Programs (IBI, New Haven, CT) 및 NBR Protein Data Base를 이용하여 분석하였다.

림파구 혼합배양 시험—림파구 혼합배양 시험의 effector cell은 Balb/c 계통 생쥐의 비장세포(1.5×10^6 cell/ml)가 stimulator cell은 CBA 계통 생쥐의 비장세포(1.5×10^6 cell/ml)가 각각 사용되었으며, 이



Fig. 1—Polyacrylamide gel electrophoresis of the ascitic fluid. Ascitic fluids of T cell hybridoma (lane 1) and B cell hybridoma (lane 2) were reduced, and subjected to 8% SDS-PAGE.

등이 전술한 바와 동일한 방법으로 실시 하였다.¹⁸⁾

실험결과 및 고찰

T 세포 하이브리도마에 의한 생성—T 세포 하이브리도마인 A.1.1 및 B 세포 하이브리도마인 PNKI를 생쥐 복강 안에서 각각 배양하여 복수를 얻었으며, 각각에 대하여 환원 조건의 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)을 실시한 후 나타나는 단백질 밴드를 비교해 본 결과 Fig. 1에 보인 바와 같이 A.1.1의 복수액에 분자량이 매우 큰 단백질이 특이하게 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 따라서, T 세포 하이브리도마에 특이한 분자량 약 163 Kd 단백질의 정체를 규명하기 위하여 polyacrylamide gel에서 이 물질을 용출시킨 후 토기에 주사하여 항체를 생성시켰다.

Western blot에 의하여 163 Kd 단백질이 T 세포 하이브리도마에 의하여 특이하게 생성되는지를 조사하였으며, 그 결과를 Fig. 2에 보였다. Fig. 2의 A에 보인 바와 같이 163 Kd 단백질은 T 세포 하이브리도마의 복수액에 다량으로 함유되어 있는 반면, B 세포 하이브리도마의 복수액 또는 정상 혈청에는 상대적으로 매우 적은 양이 함유되어 있는 것으로 나타났다. T 세포 하이브리도마가 163 Kd의 단백질을

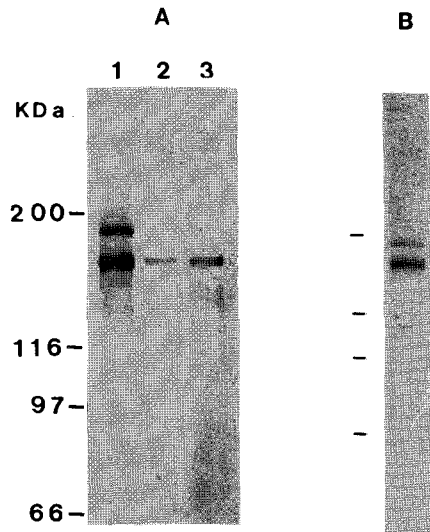


Fig. 2—Western blot analysis of the ascitic fluid and cell culture supernatant of the T cell hybridoma. A: Ascitic fluids (approximately 15 μ g of protein) of T cell hybridoma (lane 1) and B cell hybridoma (lane 2), and normal mouse serum (50 μ g of protein, lane 3) were subjected to immunoblot analysis as described in the text. B: The cell culture supernatant was concentrated with Centricon Microconcentrator (MWCO=100,000) to 1/10 of original volume. For immunoblot analysis, 20 μ l of the concentrated supernatant was used.

생성 분비하는지를 분명히 확인하기 위하여 T 세포 하이브리도마의 배양액을 Centricon Microconcentrator(MWCO100,000, Amicon)으로 약 10배 농축한 후 농축액에 대하여 Western blot을 실시한 결과 T 세포 하이브리도마의 배양액으로부터도 163 Kd 단백질의 존재를 확인할 수 있었다(Fig. 2B).

장기별 함량의 비교—T 세포 하이브리도마에 의하여 생성되는 163 Kd 단백질의 각 장기별 함량을 상대적으로 비교하기 위하여 각 장기를 분쇄하여 얻은 단백질 50 g에 대하여 Western blot을 실시한 결과를 Fig. 3에 보였다. 163 Kd 단백질은 생쥐의 태반에서 검출되었으나 간이나 비장 및 흉선에서는 검출되지 않았다.

분리 정제—A.1.1을 생쥐의 복강에서 배양하여 얻은 복수에 동량의 PBS를 가한 후 ammonium sulphate를 40% 포화되도록 가하여 침전물을 얻어 Sephacryl S-300 gel filtration chromatography를 실시

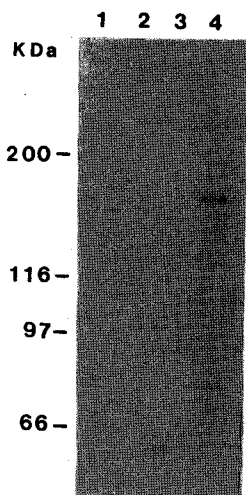


Fig. 3—Western blot analysis of different tissues. Different tissues of BALB/c mouse were homogenized in PBS containing 1 mM of phenylmethylsulphonyl fluoride, centrifuged, and the supernatants (50 μ g of protein) were subjected to immunoblot analysis. Lane 1, liver; lane 2, spleen; lane 3, thymus; lane 4, placenta.

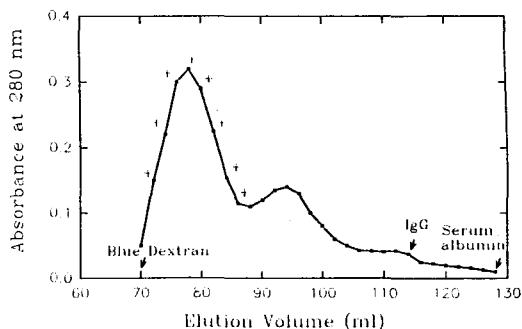


Fig. 4—Purification by Sephacryl S-300 gel-filtration chromatography. To the ascitic fluid of the T cell hybridoma, ammonium sulfate was added to 40% saturation, and the resulting precipitates were separated by Sephacryl S-300 gel-filtration chromatography. + indicates fractions positive in dot-ELISA for 163 Kd protein.

하였으며, 그 chromatogram을 Fig. 4에 보였다. 각 분획에 대하여 Western blot을 실시한 결과 Fig. 4에 보인 바와 같이 void volume을 지나자마자 항체와 반응하는 물질들이 유출되어 나왔다. 항체와 반응하는 물질의 비변성 조건에서의 분자량을 blue dextran, IgG 및 serum albumin을 표준물질로 하여 계산해 본

Table I—Suppression of mixed lymphocyte reaction by the purified protein.

Addition to cultures(mg/ml) ^a	CPM \pm SD ^b	Stimulation Index	% Suppression
None	12,450 \pm 753	1.00	0
10	4,014 \pm 420	0.32	68
2	6,885 \pm 582	0.55	45
0.5	9,186 \pm 645	0.74	26
0.1	11,308 \pm 978	0.91	9
0.05	12,190 \pm 872	0.98	2

^aIndicated amounts of the 750 Kd protein isolated from the ascitic fluid of the T cell hybridoma were added to cultures of mixed lymphocytes. Spleen cells of BALB/c mice (1.5×10^6 /well) were used as effector cells and mitomycin C-treated spleen cells of C57BL/6 mice (2.0×10^6 /well) were used as stimulator cells. Mixed lymphocytes were cultured for 3 days.

^bThe magnitude of lymphoblastogenesis was determined by ³H-thymidine uptake, and expressed as mean \pm SD.

결과 약 750 Kd인 것으로 나타났다. 이 물질의 최종 분리는 항체를 이용한 affinity chromatography를 이용하여 실시하였다. 최종적으로 분리된 물질에 대하여 환원조건에서 SDS-PAGE를 실시한 후 coomassie blue staining을 해 본 결과 Fig. 2의 C와 동일한 양상의 163 Kd 주 밴드와 185 Kd 작은 밴드를 확인할 수 있었다(자료생략).

림파구 혼합배양 시험의 억제—T 세포 하이브리도마의 복수액으로부터 분리 정제된 단백질이 림파구 혼합배양 시험에 미치는 영향을 조사한 결과를 Table I에 보였다. T 세포 하이브리도마의 복수액으로부터 분리 정제된 단백질은 배양액에 가해준 농도에 비례하여 림파구 혼합배양 시험을 억제하는 것으로 나타났다.

아미노산 서열의 규명—T 세포 하이브리도마의 복수액으로부터 분리 정제된 단백질에 대하여 환원 조건의 SDS-PAGE를 실시한 후 gel로부터 163 Kd 단백질을 용출시켜 N-말단의 아미노산 서열을 규명한 결과를 Fig. 5에 보였다. N-말단으로부터 10개의 아미노산 서열을 규명한 후 컴퓨터를 이용하여 이미 보고된 단백질의 아미노산 서열과의 연관성을 조사한 결과 163 Kd 단백질은 생쥐의 α_2 -macroglobulin(α_2 -M)을 구성하는 한 펩타이드와 아미노산 서열이 100% 동일한 것으로 나타났다.

Residue number 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
 163 Kd protein Ala-Thr-Ala-Lys-Pro-Gln-Tyr-Val-Val-Leu-
 M-AMG Ala-Thr-Ala-Lys-Pro-Gln-Tyr-Val-Val-Leu-

Fig. 5—Amino acid sequences of the 163 Kd peptide. From the SDS-PAGE, 163 Kd peptide was eluted, and the N-terminal amino acid sequences were determined. Amino acid sequences of mouse α -macroglobulin(M-AMG) was cited from Hudson *et al* ²¹⁾.

N-말단 아미노산 서열의 규명에 의하여 163 Kd 단백질이 생쥐의 α_2 -M인 것으로 확인됨에 따라서 문헌 조사를 실시한 결과 생쥐의 α_2 -M은 비변성 조건에서 분자량이 750Kd이며 환원 시킬 경우 185Kd의 중간체를 거쳐 163Kd 및 35Kd로 분리된다는 것을 알수 있었다.²¹⁾ 이러한 사실은 T 세포 하이브리도마의 복수액 및 배양액에 대한 Western blot에서 163Kd 단백질 뿐만이 아니라 185 Kd 단백질도 검출된 결과 (Fig. 2) 및 정제 과정에서 Sephacryl S-300 gel filtration chromatography를 실시했을 때 분자량이 약 750Kd로 계산되었던 결과(Fig. 4)와 일치하는 것이다.

α_2 -M의 혈중 농도는 2 내지 4mg/ml로 다량으로 존재하는 단백질의 하나이고 그 대표적인 기능중의 하나는 proteinase의 inhibitor로서 작용하는 것으로 알려져 있으며,²²⁾ 면역계에 대해서는 항원이나 mitogen에 의해 유도된 림파구의 증식을 억제하며, 염증 반응과 같이 serine esterase를 필요로 하는 각종 반응을 억제하는 것으로 알려져 있다.^{23,24)} 면역반응의 억제와 관련하여 α_2 -M이 마크로파지에 의하여 생성된다는 것은 잘 알려져 있으나,^{23,25)} T 세포에 의한 생성에 관해서는 연구되어 있지 않음으로 앞으로 하이브리도마가 아닌 정상 T 세포에 의해서도 생성되는지 및 생성이 유도되는 조건을 면역반응의 억제와 관련하여 밝히는 것은 T 세포에 의한 면역반응의 조절을 이해하는데 있어서 중요할 것으로 사료된다.

결 론

면역억제인자를 생성하는 것으로 보고된 T 세포 하이브리도마에 의하여 생성 분비되며, 림파구 혼합 배양액에 첨가할 경우 이를 억제 시키는 물질을 분리하였다. 이 물질은 비변성 조건에서 분자량이 약 750 Kd이고, 환원에 의하여 163 Kd 및 더 작은 펩타이드로 분리되었다. 이 물질의 정체를 알아보기 위

하여 환원에 의하여 생성된 163 Kd 단백질의 N-말단 아미노산 서열을 규명한 결과 이 물질은 α_2 -macroglobulin임을 확인할 수 있었다.

감사의 글

저자 등은 아미노산 서열의 규명 및 NBR protein data base를 이용한 분석을 도와 주신 미국 University of Health Sciences/The Chicago Medical School의 Kenneth D. Beaman 박사와 Kalpana Ghoshal 박사에게 심심한 감사를 드립니다.

문 헌

- 1) Gershon, R. K. and Kondo, K.: Infectious immunological tolerance. *Immunology* **21**, 903 (1971).
- 2) Ribbing, S. L., Hoversland, R. C. and Beaman, K. D.: T cell suppressor factors play an intergrating role in preventing fetal rejection. *J. Rep. Immun.* **14**, 83 (1988).
- 3) Beckwith, M. and Rich, S.: Suppressive mechanisms in alloantigen-induced T cell response. *J. Exp. Med.* **158**, 1853 (1983).
- 4) North, R. J. and Bursucker, L.: Maturation and decay of the immune response to progressive fibrosarcoma. $Ly1^{+}2^{-}$ suppressor T cells down-regulate the generation of $Ly1^{-}2^{+}$ effector T cells. *J. Exp. Med.* **159**, 1259 (1984).
- 5) Green, D. R., Flood, P. M., and Gershon, R. K.: Immunoregulatory T cell pathways. *A. Rev. Immun.* **1**, 439 (1983).
- 6) Webb, D. R., Kap, J. A. and Pierce, C. W.: The biochemistry of antigen-specific T-cell factors. *Ann. Rev. Immunol.* **1**, 423 (1983).
- 7) Asherson, G. L., Colizzi, V. and Zembala, M.: An overview of T-suppressor cell circuits. *Ann. Rev. Immunol.* **4**, 37 (1986).
- 8) Steinmetz, H., Minard, K., Horvach, S., McNicholas, J., Frelinger, J., Wike, C., Lone, E., Mach, B. and Hood, L.: A molecular map of the immune response region from the histocompatibility complex of the mouse. *Nature* **300**, 35 (1982).
- 9) Kronenberg, M., Steinmertz, M., Kobore, J. A., Kragin, E., Kapp, J. A., Pierce, C. W., Sorensen, C. M.,

- Suzuki, G., Tada, T. and Hood, L.: RNA transcripts for I-J peptides are apparently not encoded between the I-A and I-E subregions of the murine major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5704 (1983).
- 10) Kronenberg, M., Governman, J., Haars, R., Malissen, M., Kraig, E., Phillips, L., Delovitch, T., Suci-Foca, N. and Hood, L.: Rearrangement and transcription of the α -chain genes of the T-cell antigen receptor in different types of murine lymphocytes. *Nature* **313**, 647 (1985).
 - 11) Moller, G.: Do suppressor T cells exist? *Scan. J. Immunol.* **27**, 247 (1988).
 - 12) Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosman, T. R., Howard, M., Moore, K. M. and O'Garra, A.: IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* **146**, 3444 (1991).
 - 13) Kehrl, J. H., Roberts, A. B., Wakefield, L. M., Jakowlew, S., Spon, M. B. and Fauci, A. S.: Transforming growth factor- β is an important immunoregulatory protein for human B lymphocytes. *J. Immunol.* **137**, 3855 (1987).
 - 14) Rich, R. R. and Pierce, C. W.: Biological expression of lymphocyte activation III: Suppression of plaque forming cell response by in vitro by supernatant fluids from concanavalin-A activated spleen cell culture. *J. Immunol.* **112**, 1360 (1974).
 - 15) Hertel-Wulff, B. and Strober, S.: Immunosuppressive lymphokine derived from natural suppressor cells. *J. Immunol.* **140**, 2633 (1988).
 - 16) Lau, C., Stanojev, D., Visconti, V., Pang, H., Krepi-nsky, G., Grey, A., Wang, E. and Ishaque, A.: Purification, characterization, and structural elucidation of the active moiety of the previously called 'suppressor activating factor (SAF)'. *Cellular Immunology* **125**, 92 (1990).
 - 17) Abolhassani, M., Muraki, J. and Chiao, J. W.: Purification of a suppressor lymphokine (SL) from a human T-cell line. *Immunological Investigations* **18**(6), 741 (1989).
 - 18) Lee, C. K., Ghoshal, K. and Beaman, K. D.: Cloning of a cDNA for a T cell produced molecule with a putative immune regulatory role. *Molecular Immunology* **27**(11), 1137 (1990).
 - 19) Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Garter, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C.: Measurement of protein using Bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76 (1985).
 - 20) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 (1970).
 - 21) Hudson, N. W., Kehoe, J. M. and Koo, P. H.: Mouse α -macroglobulin. *Biochem. J.* **248**, 837 (1987).
 - 22) Barrett, A. and Starkey, P.: The interaction of α 2-macroglobulin with proteinases. *Biochem. J.* **133**, 709 (1973).
 - 23) James, K.: Alpha₂ macroglobulin and its possible importance in immune response. *Trends in Biochemical Sciences* **5**, 43 (1980).
 - 24) Borth, W. and Luger, T. A.: Identification of α 2-macroglobulin as a cytokine binding plasma protein. *J. Biol. Chem.* **264**, 5818 (1989).
 - 25) Nathans, C. F.: Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* **79**, 319 (1987).