

## 생쥐의 대식세포 종양치사활성과 항암효과에 미치는 인삼 Saponin 분획물과 Cyclophosphamide의 영향

전혜경 · 김세창\* · 정노팔\*\*

연세대학교 이과대학 생물학과

\*배재대학교 생물학과

\*\*연세대학교 이과대학 생물학과

(1991년 7월 20일 접수)

## Effects of Ginseng Saponin Fraction and Cyclophosphamide on the Tumoricidal Activity of Mouse Macrophage and the Antitumor Effect

Hye-Kyung Jeon, Se-Chang Kim\* and Noh-Pal Jung\*\*

*Department of Biology, College of Science, Yonsei University, Seoul 120-749*

*\*Department of Biology, Paichai University, Daejeon 302-735 Korea*

*\*\*Department of Biology, College of Science, Yonsei University, Seoul 120-749*

(Received July 20, 1991)

**Abstract** □ This experiment was performed to investigate the effects of ginseng saponin fraction and cyclophosphamide (CY) on the tumor development, the antitumor effect and the tumoricidal activity of mouse macrophage. When mice were treated with saponin or CY following inoculation with Sarcoma 180, tumor development was inhibited and survival ratio increased, and a combination of both treatments further inhibited the tumor development. Tumoricidal activity of macrophage was effectively increased at  $10^{-7}\%$  concentration of CY and it was further increased when macrophage was cotreated with saponin and CY. Tumoricidal activity of macrophage was greatest at the third day after inoculating tumor cell. Both saponin and CY increased the chemiluminescence of macrophage, but CY had no effect on releasing TNF, unlike saponin.

**Keywords** □ Total saponin, diol saponin, triol saponin, cyclophosphamide, macrophage, antitumor effect, tumoricidal activity.

### 서 론

정상세포는 화학적 발암물질이나 종양원성 바이러스(oncogenic virus) 등에 의하여 악성형질전환(malignant transformation)되어 전이세포(transformed cell)가 되며 증식을 거쳐 종양으로 발달하게 된다.<sup>1)</sup> 종양이 발생함에 따라 나타나는 면역작용에는 종양 발생 초기과정에 비특이적으로 종양세포를 파괴하는 자연면역(natural immunity)과 세포독성 T림파구가

MHC class I과 함께 종양항원을 인지해 종양세포를 파괴하는 적응면역(adaptive immunity)이 있다.<sup>2)</sup> 자연면역을 나타내는 면역세포중 대식세포(macrophage)의 종양세포에 대한 직접적인 치사활성을 대식세포 매개 종양치사(macrophage mediated tumor cytotoxicity)라고 한다. 대식세포가 종양치사활성을 나타내기 위해서는  $\gamma$ -인터페론같은 lymphokine 또는 지방다당류(lipopolysaccharide)같은 내독소(endotoxin)에 의하여 활성화되어야 한다.<sup>3,4)</sup> 활성화된 대식

세포의 주요 종양세포 치사기작 중에는 세포파괴인자인 종양괴사인자(Tumor necrosis factor : TNF)를 분비하며,<sup>5)</sup> 이는 직접 종양세포의 TNF 수용체에 부착되어 세포를 파괴시키거나 간접적으로 개체의 면역작용을 변형시켜서 종양치사를 나타내게 된다.<sup>6)</sup>

한편, 인삼은 개체의 비특이적 저항성을 증대시키는 효과가 있으며<sup>7)</sup> 세포의 항체 생성능력을 증가시키고, 양의 적혈구에 대한 혈중 항체의 양을 증가시켜,<sup>8)</sup> 인삼추출물이 혈장단백질의 생합성을 증가시킨다고 보고되었다.<sup>9,10)</sup> 또한 최근에는 인삼의 항암효과에 대한 연구들이 많이 수행되고 있는데 *in vitro*에서 인삼 성분중 panaxytriol이 몇 종의 인체 암세포와 악성 백혈병 세포의 성장을 억제시킨다는 것과,<sup>11)</sup> 인삼이 생쥐에서 화학적 발암물질에 의한 암발생을 억제하며 사람에서는 인삼의 복용량에 따라 비례적으로 암을 예방할 수 있으며,<sup>12)</sup> 또 인삼추출물인 saponin이 자극하는 것이 보고되었다.<sup>13)</sup> 또한 cyclophosphamide (CY)는 일반적으로 암치료에 널리 쓰이는 항암제이지만 그 독성이 종양세포 뿐만 아니라 면역세포에도 독성을 나타내고<sup>14)</sup> 면역 억제작용을 하므로<sup>15)</sup> 그 부작용이 문제되고 있다. 그러나 적은 양의 CY 처리 시에는 개체의 항종양 면역작용을 증가시킨다는 보고와<sup>16)</sup> 함께 CY가 항체 생산을 증가시키며 억제 T 임파구(suppressor T lymphocyte)에 선택적인 독성이 있어 이면 면역치료(adoptive immunotherapy)를 증가시킨다는 결과도 보고되었다.<sup>17,18)</sup> 최근 연구에서는 *in vivo*에서 CY 처리시 자연살해세포의 세포독성이 증가된다는 것도 보고되었으나,<sup>19,20)</sup> 대식세포의 종양치사활성에 대한 CY의 영향에 대해서는 연구가 미흡한 실정이다.

따라서 본 실험에서는 saponin과 CY의 처리가 종양발생과 항암에 미치는 영향과 대식세포의 종양치사활성에 미치는 영향에 대하여 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료와 시약

실험동물은 생체내 종양 실험에는 표준사료로 사육한 생후 4~6주된 체중 20±2g의 ICR계 숫생쥐를 사용하였고, 대식세포 종양치사활성 실험에는 생후 8~10주된 체중 25±4g의 ICR계 생쥐를 암·수 구별 없이 사용하였다.

종양세포로는 S180(murine sarcoma cell line) 세포와 L929(murine transformed fibroblast cell line) 세포를 한국화학연구소에서 분양받아 사용하였다.

인삼분획물(total saponin, diol saponin, triol saponin)은 한국인삼연구소에서 제공받아 사용하였다. Thioglycollate는 Difco 제품을, CY, luminol, zymosan은 Sigma 제품을 사용하였으며, RPMI 1640 medium은 Gibco 제품을 사용하였다.

### 2. 실험방법

**세포의 분리 및 배양:** 대식세포는 Smith 등<sup>21)</sup>의 방법을 응용하여 얻었다. 생쥐를 경추 이탈로 희생시킨 후 복강내를 PBS로 세척한 후 원심분리하여 세포를 분리하였다. 종양세포와 대식세포는 10% fetal bovine serum(FBS)을 첨가한 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

**인삼분획물과 CY의 처리:** 생체내 실험에서 인삼분획물은 증류수에 녹여 10 mg/kg씩 경구 투여하였으며, CY는 생리식염수에서 녹여 50 mg/kg을 복강에 주사하였다. 대식세포 종양치사활성 실험에서 인삼분획물은 10<sup>-4</sup>% 농도로, CY는 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-3</sup>% 농도로 대식세포에 처리하여 16시간 동안 배양하였으며, 인삼분획물과 CY의 복합처리시에는 CY의 농도는 10<sup>-7</sup>% 농도를 택하여 16시간 배양하였다.

**종양발생도와 생존율 측정:** 종양발생도 측정은 S180세포를 생쥐에 1마리당 5×10<sup>6</sup>씩 1회 피하 주사한 후 14일째에 생쥐를 경추 이탈로 희생시켜 발생한 종양조직만 절단하여 무게를 측정하였다. 생존율 측정에서는 S180세포를 1마리당 1×10<sup>7</sup>개씩 1회 복강 주사한 후 생쥐의 생존율을 측정하였다.

**대식세포의 종양치사활성 측정:** 대식세포의 종양세포치사활성은 Sidney와 Nathan<sup>22)</sup>의 방법을 응용하여 측정하였다. 대식세포를 96-well culture plate에 첨가하고 2시간 배양 후 RPMI 1640 배양액으로 세척한 후, 약물을 처리하고 배양한 다음 표적세포를 첨가하여 배양하였다. 그 후에 PBS로 세척하고 5% formalin이 함유된 PBS로 고정시킨 뒤, crystal violet으로 염색하고 건조시킨 후 ELISA reader를 사용하여 570 nm의 파장에서 O.D.값을 측정하였다.

**종양괴사인자의 분비 측정:** 대식세포에 의한 TNF 분비측정은 Ruff와 Gifford의<sup>23)</sup> 방법을 응용하여 측정하였다. 대식세포에 약물처리후, PBS로 세척한 다음

FBS가 들어있지 않은 배양액을 사용하여 배양한 뒤 대식세포의 배양액을 회수하여 L929세포를 배양한 96-well culture plate에 첨가하여 배양한 뒤 O.D.값을 측정하였다.

**대식세포의 화학발광 측정 :** 대식세포를 luminescence 측정용 cuvette내에 2시간 동안 배양한 후, 측정하고자 할 때 배양액을 PBS로 세척하고 여기에 40  $\mu$ M luminol과 5.5 mM glucose를 갖는 PBS를 2 ml 넣어준 후 zymosan 1.25 mg를 처리하여 37°C에서 10 분간 배양한 후에 luminometer(Monolight 2001, All Co., U.S.A)로 10초간 적분한 광량을 얻었다.

**결과 및 고찰**

**1. 인삼분획물과 CY가 종양발생과 생존율에 미치는 영향**

인삼분획물을 단독 투여한 경우 total saponin은 대조군에 비하여 종양발생이 27.1% 억제되었으며 diol saponin, triol saponin은 각각 18.8, 25% 종양발생이 억제되었다. CY를 단독 투여한 경우 42.7% 억제되었고, 인삼분획물중 total saponin과 CY를 복합처리하였을 때 종양발생 억제율은 50%까지 증가되었다 (Table 1).

**Table 1.** Effect of saponin and cyclophosphamide on antitumor activity against sarcoma 180 in ICR mice<sup>a</sup>

Group	Tumor weight (g)	Inhibition ratio (%)
Control	0.48 ± 0.06	—
C.S.	0.35 ± 0.10	27.1
D.S.	0.39 ± 0.12	18.8
T.S.	0.36 ± 0.09	25.0
CY	0.28 ± 0.16	42.7
C.S.+CY	0.24 ± 0.08	50.0
D.S.+CY	0.27 ± 0.09	43.8
T.S.+CY	0.26 ± 0.13	45.9

<sup>a</sup> Sarcoma 180 cells ( $1 \times 10^6$ ) were inoculated S.C. on day 0. Ginseng components (10 mg/kg) were given by oral administration from day 1 to 10. Cyclophosphamide (CY: 50 mg/kg) was injected i.p. on day 1 and 8. Tumor tissues were weighted on day 14. There were usually eight to twelve mice in each experimental group. All P values are <0.01.

C.S.: total saponin, D.S.: diol saponin, T.S.: triol saponin

생존율은 대조군의 경우 종양세포 주입시로부터 20 일 후에 모두 사망하였고, 인삼분획물만 처리한 군은 대조군 보다는 생존이 오래 지속되었으나 28일 후에는 모두 사망하였다. CY만 처리한 군은 실험 생쥐수의 18%가, 인삼분획물과 CY를 복합처리한 군은 28%가 40일 이후까지 생존하였다(Fig. 1).

**2. CY가 대식세포의 종양치사활성에 미치는 영향**

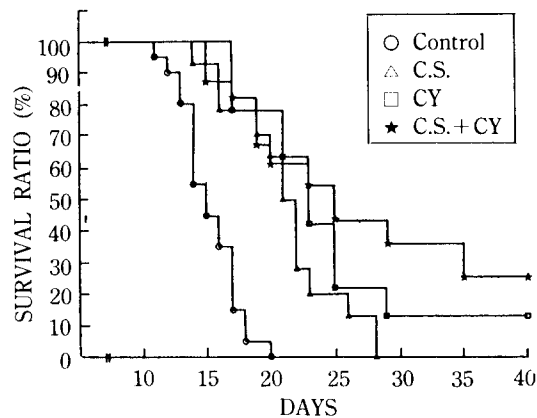
CY를 농도별로 전처리하여 대식세포의 종양치사활성도를 측정한 결과 L929, S180 종양세포 모두에서  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ % 농도에서는 대조군에 비하여 치사활성도가 유의성 있게 증가하였으며, 특히  $10^{-7}$ % 농도에서 가장 크게 증가하였다. 따라서  $10^{-7}$ % 이하의 농도에서는 CY가 대식세포의 활성을 증가시킨다고 생각된다. 그러나  $10^{-5}$ % 농도 이상에서는 CY가 대식세포에 오히려 독성작용을 나타낸다고 할 수 있다 (Fig. 2,3)

**3. 인삼분획물과 CY의 단독 또는 복합처리가 대식세포의 종양치사활성에 미치는 영향**

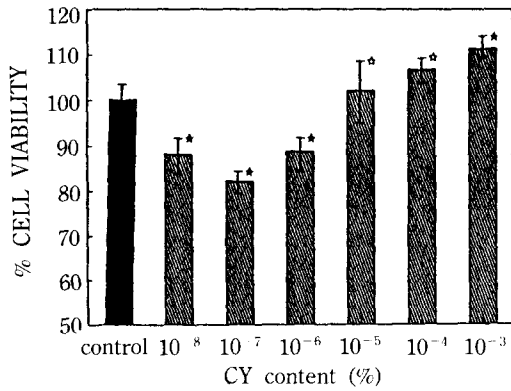
(1) Total saponin의 경우

Total saponin과 CY를 대식세포에 단독처리한 경우 종양세포 생존율이 모두 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었고, 복합처리한 경우는 대조군에 비하여 20%까지 감소되었다(Fig. 4).

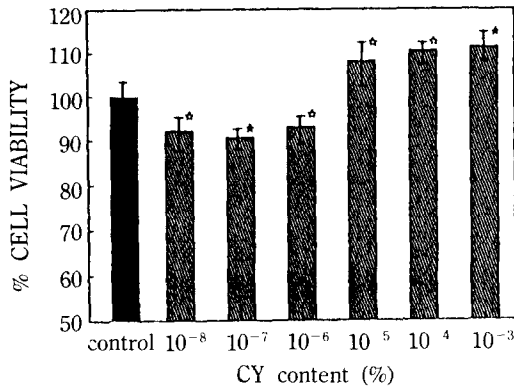
(2) Diol saponin의 경우



**Fig. 1.** Survival of sarcoma 180 tumor-bearing mice treated with total saponin (C.S.) and cyclophosphamide (CY). Sarcoma 180 cells ( $1 \times 10^7$ ) were injected i.p. on day 0. C.S. (10 mg/kg) was given by oral administration from day 1 to 10. CY (50 mg/kg) was injected i.p. on day 1 and day 8.

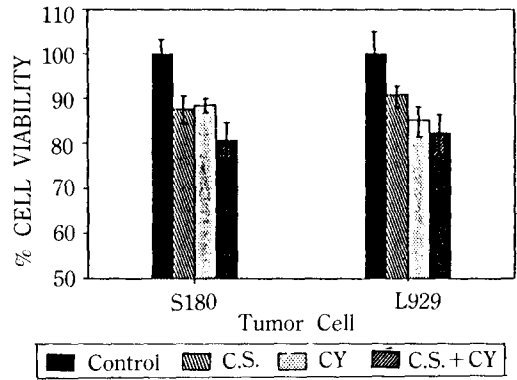


**Fig. 2.** Effect of cyclophosphamide (CY) contents on L929 tumoricidal activity of macrophages from ICR mice. Macrophages were incubated with 10<sup>-8</sup>~10<sup>-3</sup>% CY for 16 hours. Tumoricidal activity was measured by L929 viability using photometric methods. The data are mean ± standard error of four assays.  
 ★; p<0.01  
 ☆; not significant

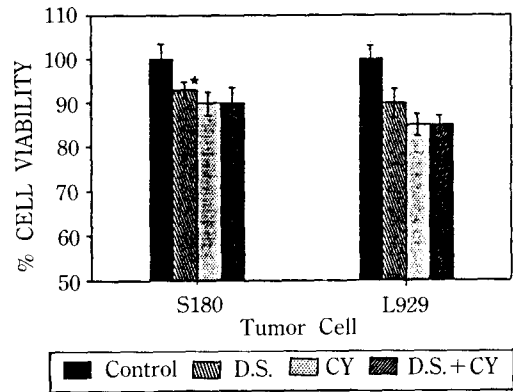


**Fig. 3.** Effect of cyclophosphamide (CY) contents on S180 tumoricidal activity of macrophages from ICR mice. Macrophages were incubated with 10<sup>-8</sup>~10<sup>-3</sup>% CY for 16 hours. Tumoricidal activity was measured by S180 viability using photometric methods. The data are mean ± standard error of four assays.  
 ★; p<0.01  
 ☆; p<0.05

Diol saponin을 대식세포에 단독처리하였을 때 대식세포의 치사활성도는 S180 종양세포의 경우 유의할 만한 영향이 없었고, L929 종양세포에서는 10%정도 생존율이 감소되었다. Diol saponin과 CY를 복합처리시에는 두 종양세포에서 모두 CY를 단독처리하였을



**Fig. 4.** Effects of total saponin (C.S.) and cyclophosphamide (CY) on tumoricidal activity of macrophages from ICR mice. Tumoricidal activity was measured by S180 and L929 viability using photometric methods. The data are mean ± standard error of four assays. All P values are <0.01.

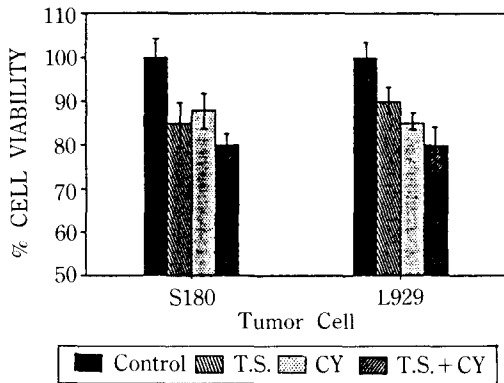


**Fig. 5.** Effects of diol saponin (D.S.) and cyclophosphamide (CY) on tumoricidal activity of macrophages from ICR mice. Tumoricidal activity was measured by S180 and L929 viability using photometric methods. The data are mean ± standard error of four assays. All P values are <0.01.  
 ★; P value is not significant.

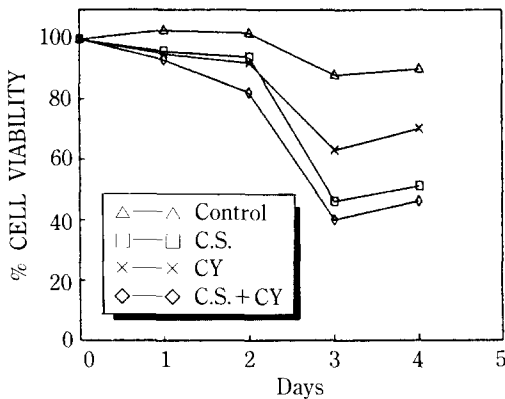
때와 같은 정도로 생존율이 감소되었다(Fig. 5).

(3) Triol saponin의 경우

Triol saponin을 대식세포에 단독처리하였을 때 대식세포에 의한 치사활성도는 종양세포의 생존율이 S180 종양세포의 경우 대조군에 비하여 15%정도 감소되었고, L929 종양세포의 경우는 10%정도 감소되



**Fig. 6.** Effects of triol saponin (T.S.) and cyclophosphamide (CY) on tumoricidal activity of macrophages from ICR mice. Tumoricidal activity was measured by S180 and L929 viability using photometric methods. The data are mean  $\pm$  standard error of four assays. All P values are  $<0.01$ .

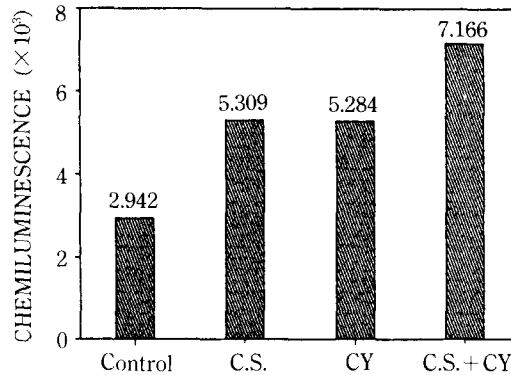


**Fig. 7.** Effects of total saponin (C.S.) and cyclophosphamide (CY) on L929 tumoricidal activity of macrophages from tumor bearing mice. Sarcoma 180 cells ( $1 \times 10^6$ ) were inoculated i.p. on day 0. C.S. (10 mg/kg) and CY (10 mg/kg) were given by oral administration from day 1 to 4. Tumoricidal activity was measured by L929 viability using photometric methods.

었다. Triol saponin과 CY를 대식세포에 복합처리시에는 두 종양세포의 생존율이 모두 20%까지 감소되었다(Fig. 6).

**4. 인삼분획물과 CY가 종양발생과정중 대식세포의 종양치사활성에 미치는 영향**

대조군과 모든 실험군에서 종양세포를 주입한지 3일째에 대식세포의 종양치사활성이 가장 크게 증가



**Fig. 8.** Effect of total saponin (C.S.) and cyclophosphamide (CY) on chemiluminescence of macrophage. Total saponin (10 mg/kg) and CY (10 mg/kg) were given by oral administration from day 1 to day 6.

하였다. 이 때에 total saponin과 CY를 단독 투여한 실험군은 대조군에 비하여 종양세포의 생존율이 각각 48, 30% 정도 감소되었고, 복합처리한 실험군에서는 종양세포 생존율이 약 55%까지 감소되어 대식세포의 종양치사활성이 가장 크게 증가하였다(Fig. 7).

따라서 인삼분획물은 비특이적으로 개체의 저항성을 증가시켰을 뿐만 아니라 대식세포의 활성을 증가시키며, CY의 면역증가 효과로는 대식세포나 세포독성 T 세포보다는 억제 T세포를 효과적으로 제거함으로써 나타나는 것<sup>24)</sup>과 생쥐에 CY를 전처리한 후 SV-40으로 유도된 종양을 주입시 세포독성 T세포의 생산이 증가된다는 것<sup>25)</sup> 또는 자연살해세포 활성을 증가시키는 것 뿐만 아니라, 본 실험에 의해서 대식세포의 활성화도 CY에 의해 증가됨을 알 수 있었고, 이는 항암 효과를 더욱 증대시킬 것이다.

**5. 인삼분획물과 CY투여가 대식세포의 화학발광에 미치는 영향**

Total saponin이나 CY를 단독 투여한 경우 정상적인 대식세포에 비하여 화학발광 정도가 1.8배 더 높은 값을 나타냈고, total saponin과 CY를 복합 투여한 경우는 2.46배의 값을 나타내었다(Fig. 8).

**6. 인삼분획물과 CY가 대식세포의 TNF 분비에 미치는 영향**

Total saponin을 대식세포에 전처리한 후 그 배양액을 L929 종양세포에 처리한 결과, 생존율이 대조군에 비하여 17% 감소하였으나, CY를 전처리한 대식세포 배양액의 경우는 유의할 만한 영향이 없었다

**Table 2.** Effect of saponin and cyclophosphamide on macrophage TNF production<sup>a</sup>

Group	L929 viability after exposure to culture supernatants		P value
	OD	% viability	
Control	0.068± 0.005	100	
C.S.	0.057± 0.005	83	P<0.01
CY	0.066± 0.006	97	NS <sup>b</sup>
C.S.+CY	0.065± 0.001	95.6	P<0.01

<sup>a</sup> Macrophages were cultivated with total saponin (C.S.: 10<sup>-4</sup>%) and cyclophosphamide (CY: 10<sup>-7</sup>%). After these cultivations, the supernatants of media cultivated macrophages were treated to L929 tumor cells. The control was treated with medium only. The activity of TNF was monitored by L929 viability using photometric methods.

<sup>b</sup> NS, not significant.

(Table 2).

따라서 인삼분획물은 대식세포의 TNF 분비를 자극하여 종양세포치사활성도를 증가시키는데 반해, CY는 대식세포를 활성화시키지만 인삼분획물과는 다른 기작으로 대식세포에 작용한다고 추측할 수 있다. 한편, 대식세포의 화학발광은 대식세포가 활성화됨에 따라 생성되는 O<sub>2</sub><sup>-</sup>에서 비롯된 것이다.<sup>26,27)</sup> O<sub>2</sub><sup>-</sup>의 실제적 기능은 그 강력한 산화력이 독성으로 작용해서 포식된 감염균을 치사시키고 종양세포에도 증식을 억제하거나 상해를 입히는 것으로 알려져 있다.<sup>28)</sup> 따라서 대식세포의 화학발광을 측정할 결과 CY의 처리가 대식세포를 활성화시킨 것으로 보아, CY는 대식세포의 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성과 관련하여 종양치사활성을 증가시킨 것으로 생각된다. 그러나 이러한 약물이 대식세포를 활성화시키는 구체적인 기작에 대하여는 아직까지 정확히 규명되지 않았으므로 이에 대하여는 더 많은 연구가 수행되어야 할 것이다.

## 요 약

인삼사포닌분획물과 CY의 단독 또는 복합처리가 항암작용과 생쥐의 대식세포 종양치사활동에 미치는 영향과 기작에 대하여 실험한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

첫째로, 항암작용에 미치는 영향은 인삼사포닌분획물만 처리한 것보다 CY가 처리한 것이 더 큰 항암작용을 나타냈으며, 복합처리시에는 단독처리시 보다

종양발생이 더욱 억제되었고 생존율 또한 더욱 증가되었다.

둘째로, 대식세포의 종양치사활성에 대한 영향은 인삼사포닌분획물 뿐만 아니라 CY도 치사활성도를 증가시키며, 인삼사포닌분획물과 복합처리시 치사활성은 더욱 증가되었고, 인삼사포닌분획물과 CY 모두 대식세포의 화학발광 정도를 증가시켰다. 그리고 인삼사포닌분획물과 CY가 대식세포에 작용하는 기작으로 인삼사포닌분획물은 대식세포로부터 종양괴사인자 분비를 자극하는 반면, CY는 관련이 없음을 알 수 있었다.

## 인용문헌

1. Ruddon, R.W.: *Cancer Biology*, Oxford Univ. Press, New York, p. 297 (1989).
2. Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D.: *Immunology*, Gower Medical Publishing, London, New York, p. 18, 5 (1989).
3. Judith, L.P. and Stephen, W.R., *J. Immunol.*, **126**, 1863 (1981).
4. Weiel, J.E., Hamilton, T.A. and Adams, D.O., *J. Immunol.*, **136**, 3012 (1986).
5. Rubin, B.Y., Anderson, S.L., Lunn, R.M., Richardson, N.K., Hellermann, G.R., Smith, L.J. and Old, L.J., *J. Immunol.*, **141**, 1180 (1988).
6. Kenneth, F.M., Jane, E., Kazuyoshi, H., Darbie, L. M. and Enrico, M., *Cancer Res.*, **48**, 5427 (1988).
7. Brekhman, I.I. and Dardymov, I.V., *The 11th Pacific Science Congress* (Abstract) (1966).
8. Singh, V.K., Agarwal, S.S. and Gupta, B.M., *Pro. 4th Intl. Ginseng Symposium*, p. 225 (1984).
9. Hikokichic, O., Hia, S., Odaka, Y. and Yokozawa, T., *J. Biochem.*, **77**, 1057 (1975).
10. 김미정, 정노팔 : 고려인삼학회지, **11**(2), 119 (1987).
11. Katano, M., Yamamoto, H. and Matsunaga, H., *Pro. & Abs. 5th Intl. Ginseng Symposium* (1988).
12. 윤택구, 최수용 : 국제 한국인삼학회 초록, p. 68 (1990).
13. 최상운, 정노팔, 김세창 : 고려인삼학회지, **14**(3), 364 (1990).
14. Aisenberg, A.C., *J. Exp. Med.*, **125**, 833 (1967).
15. Frei, E., *Cancer Res.*, **32**, 2593 (1972).
16. Mantovani, A., Luini, W., Peri, G., Vecchi, A. and Spreafico, F., *J. Natl. Cancer Inst.*, **61**, 1255 (1978).

17. Mastrangelo, M.J., Berd, D. and Maguire, H., *Seminars in Oncology*, **13**, 186 (1986).
18. Robert, J.N., *Advances in Immunol.*, **35**, 89 (1984).
19. Rong-Nian, S., Hornbarck, N.B., Homayoon, S., Li, L., Hal, E.B. and Zacharie, B., *Cancer Res.*, **48**, 4561 (1988).
20. Stewart, L.S., Sewell, H.F. and Thomson, A.W., *Transplantation Proceeding.*, **21**, 871 (1989).
21. Smith, R.L., Junt, N.H., Merritt, J.E., Evans, T. and Weidemann, M.J., *Biochem. Biophys. Commun.*, **96**, 1097 (1980).
22. Sidney, P.C. and Nathan, O.K., *Methods in Enzymology*, Academy Press, London, **132**, 537 (1986).
23. Ruff, M.R. and Gifford, G.E., *J Immunol.*, **125**, 1671 (1980).
24. Robert, J.N., *J. Exp. Med.*, **155**, 1063 (1982).
25. Glaser, M., *J. Exp. Med.*, **149**, 774 (1979).
26. Cheson, B.D., Christensen, R.L., Sperring, R., Kohler, B.E. and Babior, B.M., *J. Clin. Invest.*, **58**, 789 (1976).
27. Hamilton, T.A. and Adams, D.O., *Immunology Today*, **8**, 151 (1987).
28. Murray, H.W. and Cohn, Z.A., *J. Exp. Med.*, **152**, 1596 (1980).