

# Formalin 處理 免疫原에 대한 家兔의 血液細胞像에 관한 연구

全 允 成 崔 熙 仁

서울대학교 獸醫科大學

## 精 論

Formalin 은 일반적으로 免疫原으로 하여금 높은 免疫原性을 부여하기 때문에 vaccine 의 不活化劑로 널리 이용되고 있다. 특히 최근에는 抗炭疽家兔血清과 抗緬羊赤血球家兔血清을 만드는데 성공적으로 이용된 바 있다.<sup>10,12)</sup>

Formalin 의 不活化劑로서의 우수성이 인정되고 있는 반면에 이의 免疫原性增進機轉에 관하여는 아직 분명히 밝혀진 바 없다. 단지 formalin 으로 처리된 免疫原은 沈降恒數가 2倍加하였다는 보고와 旋光性의 변화가 없었다는 보고가 있으나 이것이 免疫原性增進反應의 機轉을 밝혀주지는 못하고 있다.<sup>4,8)</sup> 더구나 이 문제가 抗體形成血液細胞와 연관된 차원에서 연구 보고된 일은 없어서 formalin 처리와 처리된 免疫原과 이를 接種받은 生體의 免疫反應의 세가지 관계를 연관짓는 연구 보고는 아직 없다.

Formalin 處理 免疫原이 生體에 接種되면 여러 곳에서 抗體形成細胞가 증명될 수 있다. 왜냐하면 淋巴節에서는 胚芽中心部와<sup>2,5)</sup> 수질삭<sup>7)</sup>과 심층피질부<sup>6)</sup>에서, 그리고 脾臟에서는 赤髓<sup>7)</sup>와 白髓<sup>6)</sup>에서 免疫反應에 의한 抗體形成細胞가 여러 조건하에서 증명되었기 때문이다. 한 걸음 나아가서 免疫反應에 참여하는 그와 같은 細胞는 血中에 유출될 수 있거나 또는 血中細胞의 경우 核酸代謝를 抑制 또는 增進되도록 영향 받아서 正常生體의 血液像과 다를 가능성도 있을 수 있음이 암시된 바 있다.<sup>8)</sup>

免疫反應에 참여하는 血液細胞와 그렇지 않은 正常血液細胞와의 일차적인 차이는 前者의 경우 抗體蛋白質을 합성하기 위해서 細胞質內에 보다 많은 量의 RNA 가 증가될 것이다. 그리고 細胞質內 RNA 는 pyronin Y 色素에 선택적으로 染色된다.<sup>8)</sup>

이 연구에서는 formalin 의 不活化操作이 抗體形成에 어떻게 영향을 미치는가를 血液學的 見地에서 규명

하였다. 그러기 위해서 formalin saline 과 formalin 不活化 vaccine 을 家兔에 각각 接種하고 徑時的으로 末梢血液를 채취하였다. 이것을 methyl green pyronin 으로 染色하여 pyronin 親和性 淋巴球의 기추를 조사하였다.

## 材料 및 方法

**供試家兔:** 成兔를 암수 구별없이 供試하였으되 好中球/淋巴球의 比率이 1:1 이상이고 임신하지 않은 것을 사용하였다.

**供試細菌:** 炭疽菌인 咸安菌株, 日本陸軍菌株, 安養菌株, 北研菌株등을 安養家畜衛生研究所로부터 분양받아 供試하였다.

**供試 Vaccine:** 炭疽菌은 Burdon<sup>1)</sup>의 重曹培地에서 培養하였다. 즉 dehydrated nutrient broth 8g, yeast extract 3g, 포도당 5g, agar 25g 을 증류수 1,000ml 에 섞고 녹인 다음 121°C 에서 20分間 滅菌하였다. 이 기본배지에 무균 7.0% NaHCO<sub>3</sub> 水溶液을 균기 전에 넣어서 NaHCO<sub>3</sub>의 최종 농도가 0.7%가 되도록 하였다 밀폐된 배양병에 담겨진 채 배지가 굳으면 세균을 심고 다시 밀폐한 다음 37°C 에서 48시간 배양하고 나서 採菌하였다. 芽胞 vaccine 은 nutrient agar 에 細菌을 심고 大氣酸素張力下에서 培養한 것을 사용하였다. 採菌은 0.5% formalin saline 으로 하였고 菌液의 濃度는 Klette-summerson spectrophotometer 의 Filter #64 (Transmission 620~680)를 사용하여 klette reading 300의 약 10배 농도가 되도록 만들었다. Formalin 에 의한 不活化는 37°C 에서 96시간 수행하였고 그후 무균시험을 거쳐 供試하였다.

**Vaccine 의 接種:** 炭疽 vaccine 을 家兔의 耳靜脈에 1회에 최하 0.5ml 그리고 최고 3.0ml 까지 接種하였고 formalin 對照群에 대하여는 0.5% formalin saline 을 같은 조건하에서 接種하였다.

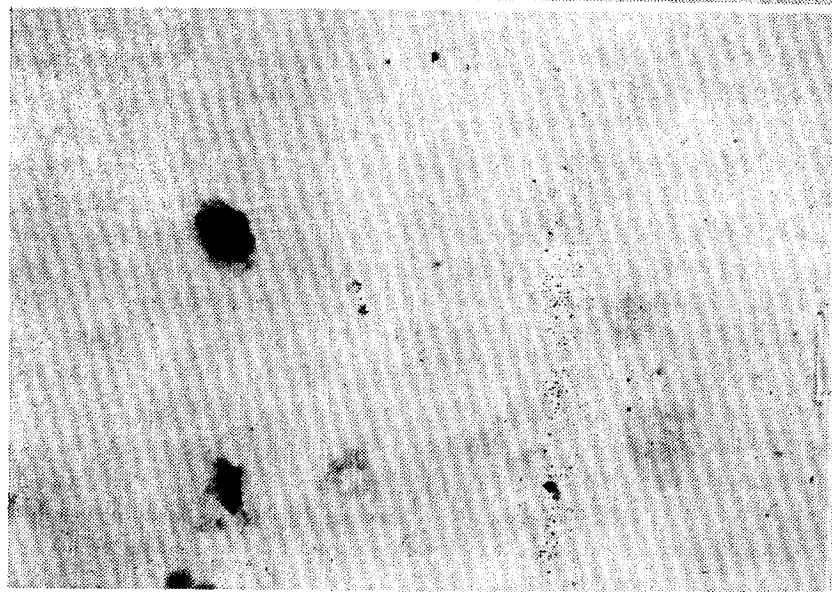
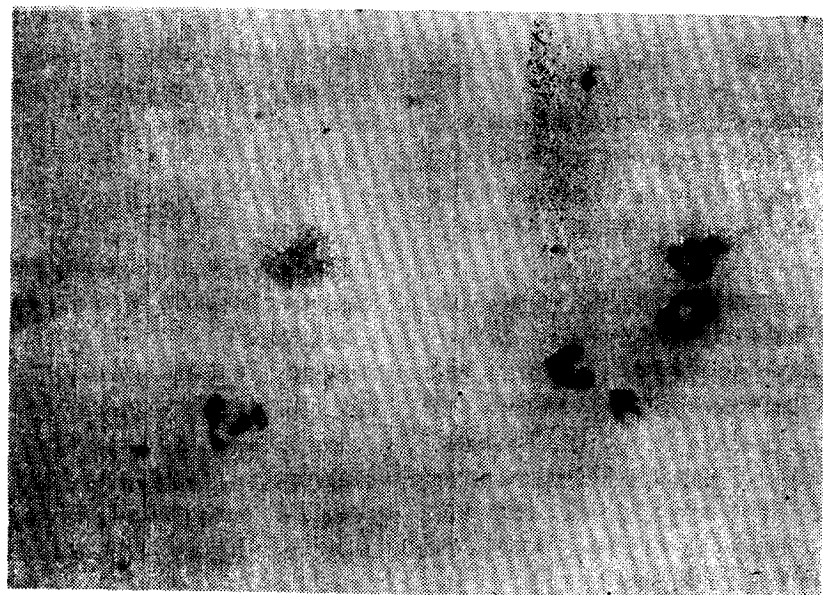
**血液의 採取 및 處理:** 供試物이 接種된 家兔의 血液採取는 目的에 따라 횟수나 시간 간격이 각각 다르나

모두 공통적인 조건으로는 耳靜脈에서 採血을 하고 나서 다음 회의 接種物을 接種하였다. 採血된 耳靜脈血液은 slide glass에 도말하고 건조한 다음 無水 methanol에 固定하였다. 이것을 giemsa 染色과 methyl green-pyronin 染色에 사용하였다. 그리고 採血할 때 總白血球數와 總赤血球數도 계산하였다.

**Methyl Green-Pyronin 染色** : methyl green-pyronin 染色液은 다음과 같이 만들었다. 즉 2.0%의 methyl green과 2.0%의 pyronin Y를 각각 증류수에 용해하고 나서 이것을 同量의 chloroform과 혼합하고 흔들

어서 chloroform에 용해되는 성분을 추출 제거되 용제의 색깔이 거의 무색에 가까워질 때까지 계속하였다. 染色할 때는 위의 原液을 methyl green 7.5ml, pyronin 12.5ml 그리고 증류수 30ml를 혼합하여 사용하였다<sup>3,11)</sup>.

염색은 다음과 같이 하였다. 즉 methanol로 30초 내지 60초간 고정 보관중인 slide를 염색할 때마다 0.25% ethanol collodion을 덮고 건조하였다. 이 collodion液은 ethanol에 21~25%로 용해한 것으로서 다시 0.25%를 희석하여 사용하였다. 이것을 다시 醋



Pyroninophilic lymphocyte of rabbit periperal blood stained with methyl green-pyronin.

酸 alcohol(1:4v/v)로 30秒에서 1分간 처리하고 나서 건조되면 methyl green-pyronin 液으로 10分 내지 30分間 染色하였다. 染色이 끝나면 곧 n-butanol로 세척하고 건조한 다음 검경하였다.

**Pyronin 好染淋巴球의 계산:** 末梢血液의 pyronin 好染淋巴球는 두 가지로 나타나는데 하나는 細胞質의 넓이와 核의 넓이나 細胞 전체의 크기에 변화가 없으면서 細胞質의 染色性도 뚜렷하지 않은 것이 있다. 다른 하나는 細胞質이 차지하는 넓이가 넓고 염색성도 뚜렷한 것이 있다. 이 세포의 細胞質은 赤紅色으로 염색되고 核은 靑綠色 또는 靑紫色으로 염색된다(사진 참조) 계산은 위에 적은 두가지 細胞를 100分率로 나타냈으며 그러기 위해서는 한 slide glass에서 200視野를 무작위로 골라 세포수를 세었다.

**抗體形成證明:** 두 vaccine 接種群과 한 formalin saline 接種群에 대하여는 4일 간격으로 4회에 걸쳐 免疫物을 접종하고 7일 후에 각각 耳靜脈에서 채혈하였다. 그리고 血清을 분리하여 56°C 30分 加溫한 다음 毛細試驗管을 이용한 重層沈降反應으로 抗體를 증명하였다. 그러기 위해서 먼저 血清을 毛細試驗管에 넣고 나서 抗原을 重層한 다음 실온에서 30분만에 반응 결과를 판독하였다.

## 結 果

**Formalin Saline 0이 接種된 家兔의 白血球像:** Formalin 이 接種된 家兔의 白血球像을 관찰함으로써 간접적으로 formalin 이 抗體形成에 어떤 영향을 줄 수 있는가를 밝히려고 이 실험을 하였다. 그러기 위하여 여러가지 다른 양의 formalin 을 家兔의 耳靜脈內에 주사하고 徑時的으로 採血하여 赤血球數, 白血球數 및 白血球의 鑑別計算을 하여 血液細胞의 推移를 관찰하였다.

Formalin 은 生理食鹽水에 0.2M 과 1.5M 농도로 만들었고 이것을 0.2M 0.5ml群, 1.5M 0.2ml群 그리고 1.5M 0.5ml群의 세 實驗群으로 나누어 각 實驗群에 家兔 여섯마리를 두고 실험하였다. 接種은 耳靜脈에 한번 하였고 採血은 역시 耳靜脈에서 24시간 간격으로 120시간까지 0.3 내지 0.5ml씩 採取하였다.

이 실험 결과는 總白血球數의 변동만을 第1圖에 표시하였다. 각 實驗群의 數値는 平均値로 하였고 각 實驗群의 數値를 쉽게 알리기 위하여 對照値에 해당하는 接種前의 血液細胞數値를 100%(0으로 표시)로 한 比較 白血球數値로 표시하였다. 그 결과는 다음과 같다.

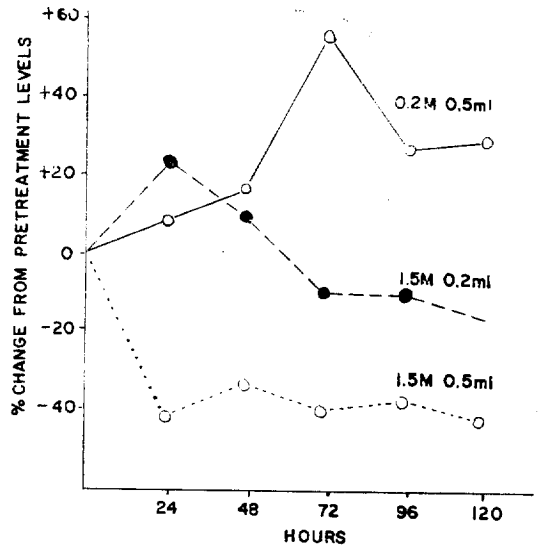


Fig. 1. Effect of a single dose of formalin saline, inoculated via ear vein of rabbits, on the total leukocyte count.

Formalin 0.2M 0.5ml群에 있어서는 白血球가 接種後 120時間限 계속 증가하였다. 1.5M 0.2ml群에서는 接種後 24時間에 가장 많이 白血球가 증가하였으나 그 후 120時間限 계속 감소되었다. 한편 1.5M 0.5ml群에서는 總 白血球數가 처음부터 120時間限 계속 감소되었다.

이 실험에서 formalin 不活化 vaccine 에 첨가하는 formalin 양인 0.2M 0.5ml의 formalin 은 免疫原이 없는 경우에도 家兔로 하여금 白血球數가 增加되게 하였다.

**Formalin 不活化 炭疽 vaccine 에 의한 家兔의 白血球像:** formalin 不活化 炭疽 vaccine 이 家兔에 接種됨으로써 總白血球數와 好中球/淋巴球의 比가 어떻게 달라지는가를 관찰하였다. 그리하여 formalin 不活化가 抗體形成 增進機轉에 어떻게 관련되는가를 짐작하려 하였다.

앞의 실험에서 白血球減少症을 띄우지 않는 formalin 의 격정 농도가 0.2M 임이 밝혀졌다. 따라서 이 실험에서는 모든 接種物의 formalin 의 농도를 0.2M 로 정하고 실험하였다.

이 실험에서는 두 가지의 vaccine 과 한 formalin saline 을 공시하였고 각 실험군마다 여섯마리의 家兔를 사용하였다. 接種은 모두 4회에 걸쳐서 耳靜脈으로 하였다. 즉 처음에 接種前血液 2~3ml 를 채취하고 나서 0.5ml 를 接種하였다. 제 4일째에 2회분의 혈액채로 2 내지 3ml 를 먼저 채취하고 나서 곧 2회 접종을

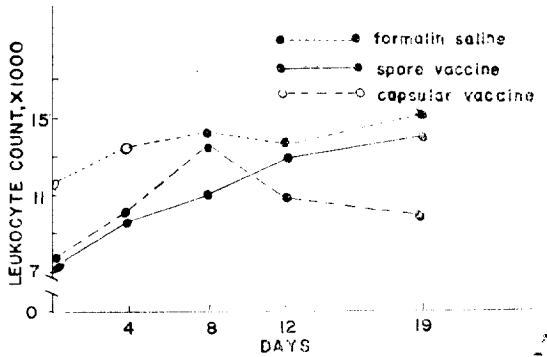


Fig. 2. Leukocyte count following a multiple inoculation of formalin saline, spore and capsular vaccines of *Bacillus anthracis* in rabbits.

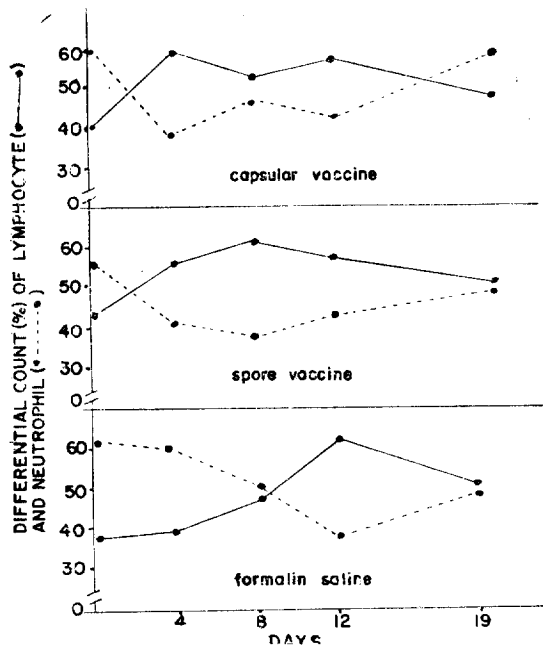


Fig. 3. Lymphocyte and neutrophil counts following a multiple inoculation of formalin saline, spore and capsular vaccines of *Bacillus anthracis* in rabbits.

하였다. 3회 채혈과 3회 접종 역시 2회 때 처럼 하였으며 3회 접종은 제 8일째에 4회 접종은 제 12일째에 그리고 제 19일째는 채혈만을 하였다. 채혈재료로는 赤血球數, 白血球數 그리고 白血球 鑑別計算을 하였다. 이 실험에서 얻은 總白血球數의 增減과 好中球/淋巴球比의 변화는 第2圖와 第3圖에 표시하였다.

이 실험 결과는 다음과 같다. Formalin 群이나 capsular vaccine 群 그리고 spore vaccine 群이 모두 接種 8일 까지 白血球數의 증가를 초래하였다. 그후 spore

vaccine 群의 白血球數만이 감소되었다.

好中球와 淋巴球數의 변화는 接種後 淋巴球數가 모두 증가하였다. Vaccine 群의 경우 接種 4일만에 好中球는 약 60%에서 40%로 감소된 반면에 淋巴球는 40%에서 60%로 증가되었다. 그 후 19일까지 好中球가 다시 증가하는 경향을 보였다. 그러나 formalin saline 群에 있어서는 淋巴球의 증가 추세가 완만하여 接種 12일에 60% 이상에 달한 반면에 好中球는 40% 선으로 떨어졌다. 그러다가 接種 12일 만에는 vaccine 群과 비슷한 회복상을 보여 주었다.

이상의 성적을 간추려 보면 formalin 不活化 免疫原은 家兎로 하여금 formalin saline 보다 淋巴球가 빨리 증가케 하였다. 그리고 formalin saline 역시 淋巴球를 증가케 하는 경향은 비슷하나 약 8일간이나 늦었다. 반면에 vaccine 群이나 formalin saline 群이 모두 같은 시기에 好中球의 正常値를 찾게 하였다.

**Formalin 不活化 Vaccine 에 의한 家兎의 血中 Pyronin 好染性 淋巴球:** Formalin 不活化 炭疽 vaccine 을 接種받은 家兎의 白血球數는 증가한다는 것이 formalin saline 接種群과 더불어 앞의 실험에서 밝혀졌다. 이 실험에서는 증가되는 白血球가 pyronin 好染性 淋巴球와 어떤 관계가 있는가를 알기 위해서 接種後의 血液을 徑時的으로 채혈하여 이의 pyronin 弱陽性 淋巴球와 強陽性 淋巴球의 出現율을 조사하였다.

그러기 위하여 두가지 vaccine 群과 formalin saline 群을 각 群마다 여섯마리의 家兎를 사용하여 실험하였다. 接種은 4회에 걸쳐 第1表에 적은대로 시행하였다. 接種과 채혈은 모두 耳靜脈에서 시행하였는데 채혈은 흐르는 血液을 해파린처리 毛細管에 받은 다음 slide glass 에 옮겨 도말 고정하였다. 그리고 방법에서 기술한 대로 pyronin 染色을 하고 한 slide glass 에서 200 視野를 관찰하여 陽性細胞를 골라 계산하고 이것을 다시 強陽性 淋巴球의 出現率로 第1表에 표시하였다. 이 실험의 결과는 다음과 같다.

Vaccine 接種群의 pyronin 好染性 淋巴球는 接種後 8일 내지 12일 만에 최고 出現율을 나타낸 반면에 formalin saline 群에 있어서는 19일에 최고치를 나타냈다 따라서 vaccine 이나 formalin saline 이 接種됨으로써 증가되는 白血球는 pyronin 好染性 淋巴球에 가장 크게 의존함이 밝혀졌다. 또한 接種前보다 接種後에 증가하는 pyronin 好染性 淋巴球의 변동은 통계학적으로 유의성이 인정되었다. 한편 強陽性 pyronin 好染 淋巴球의 消長은 第2圖에 표시한 白血球數의 소장과 일치하는 경향을 보여 주었다.

**Table 1. Peripheral Pyroninophilic Lymphocytes in Rabbits Inoculated with Capsulated, Sporulated Anthrax Vaccines and Formalin Saline**

Types of Inoculum	Pyroninophilic Lymphocyte (%)					Analysis of Variance				
	0	4	8	12	19	Factor	d.f.	s.s.	m.s.	F value
Capsular Vaccine	24.07	42.30	53.53	62.57	51.03	Total	14	2,235.29		
Spore Vaccine	31.20	40.60	64.85	47.40	55.60	Vaccine	2	45.20	22.60	0.34
Formalin Saline	24.15	49.20	37.85	51.80	55.96	Time	4	1,655.69	413.42	6.20*
						Intervals				
						Error	8	534.40	66.80	

**考 察**

Pyronin 好染細胞는 免疫細胞라는 것이 오래전부터 알려져 오고 있다. 왜냐하면 pyronin Y는 細胞質內的 RNA를 選擇的으로 염색하는데 이 RNA의 증가는 抗體蛋白質을 合成하는 한 과정이기 때문이다. 이상의 사실은 淋巴節이나 脾臟 또는 胸腺組織中的 淋巴球나 原形細胞에 그 기반을 둔 것이고 이 연구에서 수행한 末梢淋巴球(形質細胞 포함)에 기초한 것은 아니다. 그리고 末梢淋巴球에 위의 사실을 적용하는 것은 여러 면역반응을 연구하는 데 널리 이용될 수 있다.

**末梢淋巴球의 Methyl Green-Pyronin 染色性:** 抗體를 生成하고 있는 細胞나 blastogenesis를 하고 있는 細胞는 細胞質에 많은 RNA를 함유하고 있다. 이 세포를 methyl green-pyronin 染色을 하면 細胞質은 赤色으로 염색되고 核은 靑綠色으로 염색된다. 이와같은 染色性은 淋巴節이나 脾臟에 있는 淋巴球일 때 뚜렷하고 末梢血液의 淋巴球는 그렇지 않다. 따라서 한 個體에서 pyronin 陽性細胞를 經時的으로 관찰하기란 불가능하였다. 本 研究에서처럼 한 個體에서 經時的인 pyronin 陽性細胞를 관찰하기 위해서는 末梢血液의 pyronin 陽性淋巴球를 관찰할 수 있는 적절한 染色法을 확립시킬 필요가 있었다. 따라서 예비적인 染色法의 확립 실험에서 다음과 같은 것을 알아냈다. Alcohol로 고정된 도말 표본은 acetic acid-alcohol (1:4)로 재 고정할 경우 pyronin 強陽性 淋巴球가 검출되었다. 이 경우 細胞가 파괴될 수 있어서 0.25% ethanol collodion으로 덮고 고정하면 세포가 변형됨이 없이 염색되었다. 즉 pH 4.2인 acetate buffer에 회색하는 방법은 chloroform 추출과정에서 색소의 손실은 막아 지나 불순물의 제거 조작이 불량해서 染色性이 좋지 않았다. 한편 染色液을 증류수로 용해하여 만들 경우 chloroform 층에 색소가 섞여나가 손실되는 경향이 있

었으나 이렇게 하여 만든 染色液은 좋은 染色性을 부여하였다.

**Formalin Saline 接種에 의한 白血球像:** Formalin saline을 家兎에 單一接種할 경우 formalin量은 白血球數에 큰 영향을 끼쳤다. 즉 1.5M 0.5ml 같은 大量을 접종하면 接種 24시간 만에 약 40%의 減少를 보이며 120시간까지 회복되지 못하였다. 1.5M 0.2ml 接種量은 24시간 만에 약 20% 증가하였다가 감소되는 경향을 띄었다. 그러나 0.2M 0.5ml 接種量은 계속 白血球數로 하여금 계속 증가케 하되 120시간에 이르기까지 약 20% 增數된 상태를 유지하였다. 接種量이 1.5 M 0.5ml의 경우 formalin은 白血球나 網狀織內皮細胞系統에 毒性作用을 띠운다고 생각된다. 왜냐하면 接種 24시간만에 약 40%의 白血球數가 감소되고 120시간이 경과되어도 회복 못하는 경향을 보여 주었기 때문이다. 이 실험에서 흥미있는 사실은 formalin 不活化 vaccine에 적용하는 0.2M 0.5ml일 때 白血球數가 增加되는 일이다. 이때 formaline은 網狀織內皮細胞系統을 자극하여 血中에 많은 白血球가 出現케 하는 것으로 믿어진다. 그리고 이것은 抗體形成을 유발케 하는 데 필요한 生體反應의 하나가 아닌가 믿어진다.

**Formaline Saline과 Formalin 不活化 Vaccine에 의한 好中球: 淋巴球比:** 好中球가 淋巴球보다 많은 家兎에 formalin saline이나 炭疽 vaccine을 접종하면 vaccine 接種群에 있어서는 4日 이내에 그리고 formaline-saline 接種群은 그보다 늦은 12日 이내에 淋巴球가 많아졌다. 이 현상은 好中球의 경우 噬菌作用에 기인한 까닭이라고 해석되며 淋巴球는 vaccine인 接種刺戟과 formalin인 hapten 나아가서는 이로 인한 항원 자극에 기인한다고 믿어진다. 그렇다고 하면 vaccine의 경우에는 B 淋巴球일 것이라 믿어진다. formalin의 경우 역시 好中球/淋巴球의 逆轉樣狀이 비슷한 것으로 보아 적어도 抗體形成細胞를 동원하거나 hapten-carrier로써 vaccine의 抗原刺戟처럼 반응하는 것이

아닌가 생각된다.

**Formalin Saline 과 Formalin 不活化 Vaccine 에 의한 Pyronin 好染性 淋巴球像** : Vaccine 接種量이나 formalin saline 群은 모두 統計學的으로 有意差가 없는 pyronin 强陽性淋巴球를 출현케 하였다. Vaccine 接種群의 경우는 당연하나 formalin 接種群은 그렇지 않아야 한다. 왜냐하면 後者は 抗原이 아니기 때문이다. 더구나 접종 시기에 따르는 pyronin 强陽性 淋巴球의 出現은 統計學的으로 有意性이 있었다. 따라서 이 실험 결과는 다음의 두가지 추측을 낳게 한다. 첫째 formalin 은 網狀織內皮細胞系統을 자극하여 血中 淋巴球數를 증가시키고 아울러 細胞의 核酸代謝를 증가시킨다. 따라서 결과적으로 pyronin 强陽性 淋巴球의 수가 증가된다고 믿어진다. 둘째, formalin 은 生體內에서 生體成分과 결합하는 hapten 으로 역할을 하게 되며 따라서 免疫反應에서 볼 수 있는 결과를 초래하였다.

## 結 論

炭疽菌의 formalin 不活化 荚膜免疫原, formalin 非處理 芽胞 vaccine, formalin saline 을 各各 다른 試驗群의 家兔에 接種하였다. 그리고 徑時的으로 末梢血液을 採取하여 pyronin 好染性 淋巴球의 귀추를 관찰하였다. 이 實驗結果의 結論은 다음과 같다.

1. 세 接種物이 모두 차이없이 pyronin 好染性 淋巴球를 動員하였으나(F value: 0.34), 세가지 接種物의 pyronin 好染性 淋巴球의 徑時的 出現力에 뚜렷한 差異를 보였다(F value: 6.20).

2. 接種前 好中球/淋巴球比가 1.0 이상인 家兔의 경우 接種으로 인하여 接種後 4 내지 12시간만에 1.0 이하로 됨으로써 淋巴球는 好中球보다 그 수가 증가하였다가 19시간 후에 원상태로 되돌아 가는 경향을 보였다.

3. 總白血球數는 vaccine 群內에 있어서는 接種前이나 接種後에 별다른 差異를 보여주지 않았으나, formalin saline 은 量에 따라 많은 差異를 보였다. 즉 formalin saline 0.5% formalin 0.5ml 接種群에 있어서는 최단 120시간에 까지도 總白血球數가 증가하였다. 5.0% 0.2ml 接種群에서는 24시간 까지는 증가되었다가 그 후 점차 감소되어 120시간만에 원상회복되었다. 한편 0.5% formalin saline 5.0ml 以上の 接種群에서는 처음부터 심한 白血球減少症이 초래되었다.

**謝 辭** : 이 研究를 잘 끝내도록 여러분이 도와 주

셨습니다. 免疫學과 血液學이 서로 연관된 研究였기에 특히 그러했습니다. Pyronin 好染細胞를 精確하게 判讀할 수 있도록 도와주신 서울大 醫大 金相仁教授, 慶尙大學 朴應馥教授, 家畜衛生研究所 鄭雲翼研究官에게 感謝합니다. 同僚教授로 여러번 상담에 응하여 주신 李俊燮教授와 林昌亨教授를 잊을 수 없고, 뒷일을 오랜기간 맡아서 도와준 大學院學生 李昌雨, 朴錫基, 金德煥 諸君에게 감사합니다.

## 參 考 文 獻

1. Burdon, K.L.: Useful criteria for the identification of *Bacillus anthracis* and related species. J. Bact. (1956) 71 : 25.
2. Congdon, C.C.: The early histologic effects of antigenic stimulation. Arch. Path.(1964) 78 : 83.
3. Disbrey, B.D. and Rack, J.H.: Histological laboratory methods. E. & S. Livingstone, Edinburgh and London (1970) p. 187.
4. Eaton, M.D.: Recent chemical investigations of bacterial toxin. Bact. Rev. (1938) 2 : 3.
5. Hanna, M.G.: Autoradiographic study of germinal center in spleen white pulp during early intervals of immune response. Lab. Invest. (1964) 13 : 95.
6. Langevoort, H.L.: The histophysiology of the antibody response. I. Histogenesis of the plasma cell reaction in rabbit spleen. Lab. Invest.(1963) 12 : 106.
7. Leduc, E.H., Coon, A.H. and Connolly, J.M.: Studies on antibody production. II. The primary and secondary responses in the popliteal lymph node of the rabbit. J. Exp. Med. (1955) 102 : 67.
8. Perry, S. and Reynolds, J.: Methyl-green-pyronin as a differential nucleic acid stain for peripheral blood smears. Blood (1956) 11 : 1132.
9. Pillmer, L., Witter, R.G., Burrell, J.I. and Grossberg, D.B.: The immunochemistry of toxins and toxoids. VI. The crystallization and characterization of tetanal toxin. J. Exp. Med. (1948) 88 : 227.
10. Rhee, Y.O. and Jeon, Y.S.: Studies on a simple method for the preparation of anti-sheep ery-

- throcytes rabbit serum. Korean J. Vet. Res. (1967) 7 : 8.
11. Weir, D.M.: Handbook of experimental immunology. Blackwell scientific publications. Oxford and Edinburgh (1967) p. 763.
12. 전윤성 : 소의 탄저기종저 불활화 혼합백신에 관한 연구. I. 백신제조와 기니피에서의 효과시험. 대한수의학회지 (1972) 12 : 71.

## **Hematological Studies in Reference to Immune Enhancement Mechanism of Formalin Applied to Formalin Inactivated Anthrax Vaccines in Rabbits**

Yun Seong Jeon, D.V.M., M.S., Ph.D. and Hi In Choi, D.V.M., M.S., Ph.D.

*College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

### **Abstract**

Hematological studies were conducted in reference to the immune enhancing mechanism of formalin applied to, as an inactivating agent, a formalin inactivated anthrax vaccines in rabbits. Rabbits were inoculated two types of formalinized anthrax immunogens namely capsular and spore vaccines in addition of formalin saline as a control. From immune rabbits, peripheral blood was collected and subjected to count a total erythrocytes, leukocytes, and pyroninophilic lymphocytes. The experimental results were summarized as followings.

At a level of 0.5M 0.5ml formalin with or without the addition to vaccine, a total leukocytes count was increased. Due to the increased lymphocytes, the ratio of neutrophil and lymphocyte was lowered within 4 to 12 hours of the postinoculation. Formalin saline, anthrax spore vaccine and capsular vaccine, without group difference, caused an increased level of pyroninophilic lymphocytes in peripheral blood.

Throughout the studies, a possible role of immune enhancement by formalin was discussed and suggested.