大韓獸醫學會誌(1987) 第27卷 第2號
Korean J. Vet. Res. (1987) Vol. 27, No. 2, pp. 253~258

韓牛에서 免疫調節細胞의 活性에 관한 硏究 : Ⅰ. 末梢血液 淋巴球의 E Rosette形成能

劉男善 · 金鍾晃 · 宋熹鍾 · 蔡孝錫 · 姜明大 · 李周默
全北大學校 農科大學 獸醫學科

(1987. 7. 30 接受)

Studies on the Activity of Immune Regulatory Cells in the Korean Native Cattle: I. E Rosette Formation Rate of Peripheral Blood Lymphocytes

Nam-sun You, Jong-myeon Kim, Hee-jong Song, Hyo-seok Chai, Myeong-dai Kang and Ju-mook Lee
Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Chonbuk National University

(Received July 30th, 1987)

Abstract: The erythrocytes(E) rosette forming capacity of peripheral blood lymphocytes(PBL) in Korean native cattle was determined with 2-aminoethylisothiouronium bromide hydrobromide (AET) and dextran(Dex)-treated sheep erythrocytes(SRBC). To further standardize the assay, optimum concentration of AET and/or Dex-treatment and incubation time for rosette forming cell (RFC) counts were determined.

In untreated SRBC resuspended in the rosetting medium(RPMI 1640 containing 10% FCS), PBL from 7 animals formed low percentage of rosettes(7.8±6.0%). Both AET and Dex treatment not only enhanced the rosette formation but also made it easy to enumerate rosettes by increasing numbers of SRBC attached on them. SRBC treated with 0.1M AET for 20 min or 8% Dex formed the highest percentages of rosettes, (35.7±6.0% and 48.3±4.7%, respectively) and were used in subsequent studies.

With SRBC treated with 0.1M AET for 20 min and suspended in 8% Dex, the maximum RFC observed were 56.6±6.8% in female and 65.8±6.3% in male and the rates of RFC did not change significantly between 3 and 20 hr incubation time at 4°C.

緖 論

免疫反應에 關與하는 細胞集團은 多樣하며 여기에는 大食細胞, 顆粒細胞, T 및 B淋巴球 등이 包含된다. 最近에는 淋巴球가 體液性 및 細胞性免疫反應의 根幹을 이루며 相互間의 補完作用 및 情報傳達에 의해 數없이 많은 抗原을 認識(特異性, 記憶 등)하여 反應할 수 있는 細胞系임이 證明되었다(Bjotvedt와 Lee, 1982; Tizard, 1982; Higgins, 1981). 따라서 淋巴球 亞集團의 同定은 宿主의 健康 및 疾病狀態에 있어서 이들 細胞의 機能을 理解하는데 매우 重要하다(Yang, 1981; Wybran과 Fundenberg, 1973). 이에 따라 淋巴球 亞集團의 同定을 위한 努力이 계속되어 宿主-寄生體의 相互關係에 있어서 免疫能을 評價하는 方法이 多數 開發되었고, 實際로 患者·患畜의 免疫機能 狀態를 確認하는데 利用되어 왔고 또한 實驗的 感染 또는 백신投與 후 宿主의 防禦力 程度를 評價하는데 應用되고 있다(Higgins, 1981).

Rosette形成技法은 免疫反應을 細胞水準에서 評價하는 方法의 하나이며, rosette는 淋巴球에 異種 또는 同種의 赤血球나 抗原(感染因子)이 結合되어 나타난다. 즉, T淋巴球에서는 自然的으로 또는 抗原의 感作에 의해 生成된 特異細胞膜受容體(specific membrane receptors)에 抗原이 結合되고, 淋巴球에서는 特異抗體를 處理하거나 또는 여기에 補體를 處理하여 줌으로써 그 結果 rosette를 形成한다(Mishell과 Henry, 1980; Wilson, 1973). 그러나 rosette形成能은 溫度, 培養時間, 赤血球源, 蛋白質濃度, 實驗技法 등 여러 要因에 의해 影響을 받게 되고(Nagahata 등, 1984; Paul 등, 1979; Wardly, 1977) 特히 E rosette形成實驗에서는 赤血球를 neuraminidase, papain, bromelin, 2-aminoethylisothiouronium bromide hydrobromide(AET) 등으로 處理하거나(Lee Belden 등, 1981; Paul 등, 1979; Kaplan과 Clark, 1974; Weiner 등, 1973), rosette培地에 血淸 또는 dextran을 添加하여 주면(Binns, 1978; Wardley, 1977; Brown 등, 1975) 細胞의 親和性이 增加되어 rosette形成率이 顯著히 增加하게 된다.

한편, 國內에서도 免疫能을 評價하는 方法으로서 人體 및 實驗動物을 對象으로 rosette形成能을 比較한 實驗報告가 많지만(蔡孝錫과 宋熹鍾, 1987; 宋熹鍾 등, 1986; 李正鎬와 河大有, 1981) 家畜에서는 지금까지 報告되지 않았다. 이에 著者 등은 國內에서 飼育하고 있는 動物種에 있어서 免疫調節細胞의 活性度를 比較하고자 하는 硏究의 一環으로 正常 韓牛의 末梢血液 T淋巴球를 erythrocyte(E) rosette法으로 實驗한 바 그 結果를 報告하고자 한다.

材料 및 方法

對象動物 : 全北大學校 農科大學 附屬動物飼育場, 全羅北道 種畜場 및 全州 近郊 韓牛繁殖 示範農家에서 飼育하는 韓牛 중 臨床症狀이 없는 健康한 것을 對象으로 1~3年生을 任意로 選拔하였다.

淋巴球의 分離 : Heparin(20 IU/ml)을 加한 靜脈血을 10분간 遠心(400g), buffy coat層을 取하여(Outteridge와 Dufty, 1981) 同量의 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)과 混合한 후 同量의 Ficoll-Paque液 (Pharmacia, d=1.077)에 重層, 30분간 遠心(400g)하였다. 그 후 淋巴球層을 Pasteur pipette으로 取하여 PBS로 10분씩 3회 洗滌하고 rosette medium(10% FCS 加 RPMI 1640 medium)에 $3\sim4\times10^6$ cells/ml의 濃度가 되도록 再浮遊하여 rosette形成實驗에 사용하였다.

淋巴球의 生存率은 trypan blue dye exclusion法(Garvey 등, 1980)으로 檢査한 바 95%以上이 生存하였다.

緬羊赤血球(SRBC) : 頸靜脈血을 同量의 Alsever's液 (pH 6.1)과 混合 4°C에 保存하면서 採血 후 2週以內의 것을 使用直前에 白血球層을 除去한 후 PBS로 3회 遠心洗滌(400g, 10분)하였다.

緬羊은 全 實驗過程에서 同一個體를 利用하였다.

藥劑 : Rosette形成能을 增加시킬 目的으로 使用한 藥劑는 2-aminoethylisothiouronium bromide hydrobromide(AET, Sigma)와 dextran(Dex, Sigma, Mw. 147,000)이었다.

SRBC의 AET處理(E_{AET}) : AET를 蒸溜水에 濃度別 (0.05, 0.1, 0.15, 0.2M)로 稀釋하여 4N NaOH로 pH를 9.0으로 調定한 후 packed SRBC 1對 AET溶液 4의 比率로 섞어 37°C에 培養(10, 15, 20, 25, 30분)하였다. 그 후 4°C의 生理食鹽水로 4회 洗滌(400g, 10분)하고 rosette medium으로 1% E_{AET}浮遊液을 만들었다.

E_{AET}의 dextran處理($E_{AET+Dex}$) : PBS에 Dex를 稀釋 (w/v, 2, 4, 6, 8, 10%)하고 各 濃度의 Dex液으로 10% E_{AET}浮遊液을 만든 후 E rosette assay를 위하여 사용직전에 同液으로 1% $E_{AET+Dex}$浮遊液을 만들었다(Nagahata 등, 1984).

E rosette形成細胞(RFC)**數 測定** : E rosette形成能은 無處理 SRBC(E), E_{AET}, E_{Dex} 및 $E_{AET+Dex}$에 上記한 淋巴球 浮遊液을 同量(v/v) 混合, 37°C에 30분간 培養한 후 遠心(200g, 5분)하여 4°C에 靜置하였고(Paul 등, 1979), 判讀은 前報(蔡孝錫과 宋熹鍾, 1987)의 方法에 따라 實施하였다.

各 實驗群의 RFC는 判讀者의 判讀錯誤를 避하기 위하여 個體마다 2~3組를 만들고 2人 以上이 判讀한 후 平均値를 求한 다음 그 값의 平均±S.D.를 求하였다.

結 果

藥劑處理濃度에 따른 RFC의 增減率 比較 : 末梢血液 淋巴球의 RFC增減率의 藥劑處理에 따른 變化像을 確認하고자 SRBC에 濃度別의 AET 또는 Dex를 處理하여 RFC를 測定한 바 그 結果는 Table 1과 같다. 즉, 自然 RFC는 7.8±6.0%인데 비하여 AET를 各各 20분간 處理한 群에서는 3.1~4.3倍 그리고 Dex를 添加한 群에서는 3.1~6.2倍의 增加效果를 보여 AET處理보다는 Dex處理群이 더욱 增加됨을 알 수 있었고, 增加幅은 0.1M AET와 8% Dex處理群에서 더욱 顯著하였다.

한편, SRBC에 AET나 Dex를 處理한 結果 대다수의 RFC가 10~20個 以上의 SRBC와 結合되어 있고 3~5個의 SRBC와 結合된 경우는 極小數에 불과하여 RFC의 判讀이 容易하였다. 그러나 0.2M AET處理群에서

Table 1. Effect of Treatment of SRBC with Various Concentrations of Dextran or AET on E Rosette Formation by Normal Bovine Peripheral Blood Lymphocytes

Treatment of SRBC with	RFC(M±S.D)*
None	7.8±6.0%
0.01M AET@	23.9±7.4
0.1 M AET	35.7±6.0
0.15M AET	33.6±8.8
0.2 M AET	ND*
2% Dextran@@	24.1±5.4
4% Dextran	28.0±6.1
6% Dextran	38.3±7.0
8% Dextran	48.3±4.7
10% Dextran	41.7±8.8

AET=2-aminoethylisothiouronium bromide hydrobromide, RFC=rosette-forming cells with three or more adherent SRBC.

* Percentage expressed as the mean values from 14(@) or 7(@@) animals after counting a minium of 200 cells from each samples.

\# ND=not done, uncountable of RFC because of severe aggregation of SRBC.

는 SRBC의 甚한 凝集現象으로 正確한 判讀이 不可能하였다.

따라서 本 實驗에서는 末梢血液 淋巴球의 E rosette 形成細胞의 定量을 위하여 SRBC를 0.1M AET와 8% Dex를 處理하여 사용하였다.

AET處理 時間에 따른 RFC增減率 比較: Rosette形成 實驗에 있어서 最適 AET處理 時間을 決定하기 위하여 SRBC를 0.1M AET로 時間差(10~30분)를 두어 各各 處理하고, 8% Dex를 添加한 후 RFC를 計測하였다. 그 結果 Table 2에서 보는 바와 같이 AET로 10분, 15분 및 20분 處理時에는 RFC의 比率이 漸增되나 25분 및 30분 處理時에는 오히려 減少되었다. 따라서 0.1M AET로 20분 處理한 E_{AET}가 無處理群(암 2.2±1.8%; n=7, 수 10.6±5.4%; n=14, 平均 7.8±6.0%; n=21)에 比하여 最高(암 56.6±6.8%, 수 65.8±6.3%)의 rosette形成率(RFR)을 나타냄을 알 수 있었다.

Dex添加濃度에 따른 RFR의 增減比較: 最高의 RFR을 이루는 Dex添加濃度를 決定하기 위하여 SRBC를 0.1M AET로 20분간 處理한 후 濃度別 Dex(2~10%)

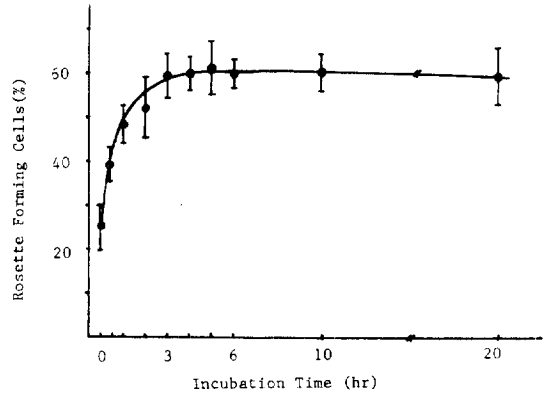

Fig. 1. Kinetics of Rosette Formation by Bovine PBL with $E_{AET+Dex}$. PBL were incubated with $E_{AET+Dex}$ at 37C for 20 min, centrifuged at 200g for 5 min and further incubated at 4C for varying periods of time. Results are expressed as mean rosette-forming cells from 8 animals±s.d.

Table 2. Effect of Incubation Time of SRBC with AET on E Rosette Formation by Normal Bovine Peripheral Blood Lymphocytes

SRBC status	Time of AET Treatment(min)	RFC(M±S.D.)		
		Female(n=7)	Male(n=14)	Female+Male
None	20	2.2±1.8%	10.6±5.4%	7.8±6.0%
0.1M AET+8% Dex	10	42.8±7.3	49.1±9.6	47.6±9.3
0.1M AET+8% Dex	15	43.9±8.4	58.0±9.6	54.7±11.0
0.1M AET+8% Dex	20	56.6±6.8	65.8±6.3	60.4±8.2
0.1M AET+8% Dex	25	53.7±4.4	57.6±5.1	56.1±5.9
0.1M AET+8% Dex	30	37.7±9.8	52.4±7.3	48.9±9.3

Table 3. Effect of Treatment of SRBC with AET and Various Concentrations of Dextran on E Rosette Formation by Normal Bovine Peripheral Blood Lymphocytes

SRBC Status	% of Dex Treatment	RFC(M±S.D.)		
		Female(n=7)	Male(n=17)	Female+Male
0.1M AET+Dex	2	38.6±4.5%	39.2±8.7%	39.0±7.4%
0.1M AET+Dex	4	41.7±7.2	44.5±8.8	43.6±8.2
0.1M AET+Dex	6	49.9±7.7	55.5±7.9	53.6±8.1
0.1M AET+Dex	8	52.8±7.7	63.6±8.0	60.4±6.2
0.1M AET+Dex	10	44.6±6.2	56.1±7.7	52.3±9.0

를 添加하였다. 그 結果 Table 3에서와 같이 Dex를 2, 4, 6, 8% 添加時에는 漸增되나 10% 添加時에는 오히려 減少되었다. 따라서 E_{AET}에 8% Dex를 添加한 경우가 無處理群에 比하여 顯著히 增加(암 ; 52.8±7.7%, 수 ; 63.6±8.0%)됨을 알 수 있었다.

冷藏靜置時間에 따른 RFR의 增減比較 : Rosette形成 手技 過程을 거친 후 判讀할 수 있는 最適冷藏靜置 時間을 알아보기 위하여 8頭의 正常韓牛 PBL을 上記한 $E_{AET+Dex}$와 混合, 遠心沈澱시킨 후 冷藏靜置하면서 經時的으로 RFC를 計算하여 比較하였다. 그 結果 RFR은 遠心 후 즉시(0 hr)에는 25.3±6.0%이었으나 漸次 急上昇하여 5時間에 最高(63.2±4.6%)에 到達한 후 漸次 減少되나 靜置 3~20時間內에는 靜置에 의한 큰 差異가 認定되지 않아 判讀할 수 있는 時間範圍임을 알 수 있었다(Fig. 1).

考 察

韓牛 末梢血液內 T淋巴球를 定量하고자 SRBC를 여러 濃度의 AET로 處理 또는 rosette培地에 Dex를 添加하여 無處理群의 RFR과 比較하였다. 그 結果 無處理群 즉, 自然 RFR은 平均 7.8±6.0%인데 비해 AET 및 Dex處理群에서는 모두 增加되었고 特히 0.1M AET (35.7±6.0%) 및 8% Dex(48.3±4.7%) 處理群에서 最高水準에 達하였다. 따라서 이러한 成績을 基礎로 하여 AET와 Dex를 組合하고 AET處理時間別 및 Dex 處理濃度別을 比較檢討한 바 AET를 20分 處理한 후 8% Dex를 混合하여 줌으로써 最高의 RFR(암, 55.6±6.8%; 수, 65.8±6.3%; 平均, 60.4±8.2%)을 얻을 수 있었고, 形成된 rosette를 冷藏靜置하면서 經時的으로 RFC를 算定한 바 3~20時間內에는 RFR이 큰 變化를 보이지 않음을 알 수 있었다.

이러한 本 實驗의 結果를 韓牛에서 實驗한 報告가 없기 때문에 直接 比較하거나 또한 硏究者마다 條件을 달리하여 實驗한 結果와를 比較하기는 어렵지만 總 T淋巴球의 分布를 把握하였다는 點에서 乳牛나 肉牛의 總 T淋巴球 또는 RFR과 比較하면, Wardly(1977)는 Devon 숫소 4頭에서 SRBC를 neuraminidase로 處理(E_n)하여 52%, 6% Dex를 添加하여 72%가 RFC임을 報告하였고, Lee Beldin 등(1981)은 E_n에서 34±11%, 0.125M AET處理로 50±10%가, Usinger와 Splittler (1981)는 胸腺細胞 및 $F(ab')_2$의 抗血淸을 利用하여 末梢血內 T淋巴球가 約 62%임을, Nagahata 등(1984)은 20~10年生 Holstein-Friesian牛에서 自然 RFR이 3.4±1.8%, 0.143M AET處理群에서 50.0±5.8%, E_{AET}에 8% Dex를 添加하여 61.4±3.9%를 그리고 Paul 등(1979)는 1~2年生의 健康한 Jersey와 Holstein牛 및 白血病을 앓고 있는 牛群과의 比較實驗에서 正常牛群의 自然 RFR은 5.8±3.1%, 0.1M AET로 20分 處理한 群에서 59.3±9.3%임을 報告하여 韓牛의 最適狀態의 結果와 類似하였다. 그러나 白血病 牛群에서는 34.7±12.7%의 RFR을 보여 白血病에서 T淋巴球의 rosette形成能이 低下됨은 물론 B淋巴球의 顯著한 增加를 指適하였다. 따라서 RFC의 增減은 緖論에서 言及한 제반 實驗條件과 疾病狀態(Ishikawa와 Shimizu, 1982), 백신注射(Mandalenaki-Asfi 등, 1976) 등에 의해서도 影響을 받게 됨을 알 수 있어 앞으로 適切한 技法을 活用하여 多數의 報告가 蓄積되면 相互比較함으로써 淋巴球의 機能을 理解하는데 큰 도움이 되리라 思料된다.

한편, neuraminidase, AET, Dex, 血淸 등과 같은 polymer處理의 結果가 自然 RFR보다 顯著히 增加되었는데 이러한 RFC의 增加 機轉으로는 첫째, polymer가 淋巴球와 赤血球間에 cross-links를 이룰 수 있다는 點 둘째, 細胞集團의 surface change 즉, microvillus形成, capping 또는 patching과 같은 結合部位의 再分布나 膜表面에 새로운 結合部位의 合成 및 挿入(insertion) 등과 같은 變化招來 셋째, polymers가 主로 zeta potential에 關係하고 있는 膜表面의 sialic acid를 除去

시켜 줌으로써 細胞의 repulsive change가 還元되기 때문이라고 說明되고 있어(Higgins, 1981; Paul 등, 1979; Brown 등, 1975) 앞으로 細胞膜의 變化에 대한 硏究가 要求된다.

以上의 結果를 綜合하면 自然 RFR보다는 polymer處理結果 RFR이 增加되었고, 韓牛에서도 높은 RFR을 求할 수 있었다. 그러나 上記한 바의 內容에서 個體別, 品種別, 性別 등에 따른 差異 그리고 成牛가 幼若牛에서 보다 RFC가 높고 安定性이 있어 年齡에 의한 差異를 言及한 Outteridge와 Dufty(1981)의 報告, Ficoll-Hypaque法으로 mononuclear cells을 分離한 후 混在하여 있는 單核食細胞系가 Dex에 의해 SRBC와 rosette 形成을 하는지의 與否實驗에서 10%程度가 色素를 貪食하지만 rosette을 이루지 않았고, 더우기 RFC에서는 色素貪食이 없음을 確認한 후 Dex가 單核食細胞의 rosettes에는 關與하지 않는다고 한 Brown 등(1975)의 報告, null cell의 確認實驗(Lee Belden 등, 1981) 등을 勘案할 때 韓牛의 T-cell subsets를 좀더 明確하게 把握하기 위해서는 앞으로 單크론 抗體를 利用한 免疫調節 T淋巴球 亞集團에 대한 細胞化學的 特性把握(De Waele 등, 1983), 酵素化學的 證明(Edwine Poore 등, 1981), anti-thymocyte血淸에 의한 T淋巴球의 確認(Usinger와 Splitter, 1981) 등의 方法을 適用한 再確認實驗이 必要하다고 본다.

結 論

韓牛에서 循環血液內의 T淋巴球를 定量하고자 SRBC를 여러 濃度의 AET 및 Dex로 處現하여 E rosette形成細胞(RFC)를 判讀하였으며 또한 判讀材料의 冷藏靜置 時間에 따른 判讀의 結果를 比較하여 最適의 AET 및 Dex의 濃度와 判讀時間帶를 究明한 바 아래의 結果를 얻었다.

末梢血液 淋巴球의 自然 rosette形成率(RFR)은 7.8±6.0% (n=7)인데 比하여 AET 및 Dex處理群에서는 모두 增加되었으며 特히 0.1M AET(35.7±6.0%) 및 8% Dex(48.3±4.7%) 處理群에서 顯著하였다.

SRBC의 藥劑處現過程에 따른 最適條件을 確認하고자 行한 實驗結果, SRBC를 0.1M AET로 處理한 時間에 따라 8% Dex溶液을 添加한 群에서의 RFR은 20분간 AET를 處理한 群에서 56.6±6.8%(female) 및 65.8±6.3%(male)를 그리고 SRBC를 0.1M AET로 20분간 前處理한 후 여러 濃度의 Dex를 添加한 경우에는 8% Dex處理群에서 52.8±7.7%(female) 및 63.6±8.0%(male)로 最高에 達하였다.

判讀材料의 冷藏靜置 후 判讀時間帶는 3~20時間의 範圍가 적당하였다.

以上의 結果 AET나 Dex로 SRBC를 前處理하면 RFR이 增加되며 特히 0.1M AET處理 SRBC에 8% Dex를 添加할 때 더욱 顯著하며, 冷藏靜置 후의 判讀時間帶는 3~20時間의 範圍임을 알 수 있었다.

參 考 文 獻

Binns, R.M. (1978) Sheep erythrocyte rosette in pig sheep, cattle and goats demonstrated in the presence of dextran. j. Immunol. Methods., 21:197~210.

Bjotvedt, G. and Lee, K.W. (1982) A review of T-lymphocytes and their functions. VM/SAC., 77:1725~1728.

Brown, C.S., Halpern, H. and Wortis, H.H. (1975) Enhanced rosetting of sheep erythrocytes by human peripheral blood T cells in the presence of dextran. Clin. exp. Immunol., 20:505~512.

De Waele, M., De Mey, J., Moeremans, M., Smet, L., Broodtaerts, L. and Van Camp, B. (1983) Cytochemical profile of immunoregulatory T-lymphocytes subsets defined by monoclonal antibodies. J. Histochem. Cytochem., 31:471~478.

Edwin Poore, T., Barrett, S.G., Kadin, M.E. and Bainton, D.F. (1981) Ultrastructural localization of acid-phosphatase in rosetted T and B lymphocytes of normal human blood. Am. J. Pathol., 102:72~83.

Garvey, J.S., Cremer, N.E. and Sussdorf, D.H. (1980) Methods in immunology. A laboratory text for instruction and research. 3ed. W.A. Benjamin Inc. pp.443~450.

Higgins, D.A. (1981) Markers for T and B lymphocytes and their application to animals. Vet. Bull., 51:925~963.

Ishikawa, H. and Shimizu, T. (1983) Depression of B-lymphocytes by mastitis and treatment with levamisole. J. Dairy Sci., 66:556~561.

Kaplan, M.E. and Clark, C. (1974) An improved rosetting assay for detection of human T lymphocytes. J. Immunol. Methods., 5:131~135.

Lee Belden, E., McCroskey-Rothwell, M.K. and Strelkauskas, A.J. (1981) Subpopulations of bovine lymphocytes separeted by rosetting tec-

hniques. Vet. Immunol. Immunopathol., 2: 467～474.

Mandalenaki-Asfi, C., Liakopoulou, P., Apostolou, M., Thomaidis, Th. and Matsaniotis, N. (1976) Rosette-forming lymphocytes and measles vaccination. J. Pediatrics., 88:74～75.

Mishell, R.I. and Henry, C. (1980) Cell surface markers. In Mishell, B.B. and Shigi, S.M. ed. Selective methods in cellular immunology. W.H. Freeman Co. San Francisco. pp.209～234.

Nagahata, H., Funahashi, T. and Noda, H. (1984) Standardization of bovine E-rosette assay and enumeration of lymphocyte subpopulation. Jpn. J. Vet. Sci., 46:415～421.

Outteridge, P.M. and Dufty, J.H. (1981) Surface markers for characterisation of bovine blood lymphocyte populations and changes in these from birth to maturity. Res. Vet. Sci., 31: 315～322.

Paul, P.S., Senogles, D.R., Muscoplat, C.C. and Johnson, D.W. (1979) Enumeration of T cells, B cells and monocytes in the peripheral blood of normal and lymphocytotic cattle. Clin. Exp. Immunol., 35:306～316.

Tizard, I. (1982) An introduction to veterinary immunology. 2ed. pp.74～118.

Usinger, W.R. and Splittler, G.A. (1981) Two molecularly independent surface receptors identify bovine T lymphocytes. J. Immunol. Methods., 45:209～219.

Wardley, R. (1977) An improved E rosetting technique for cattle. Br. Vet. J., 133:432～434.

Weiner, M.S., Bianco, C. and Nussenzweig, V. (1973) Enhanced binding of neuraminidase-treated sheep erythrocytes to human T lymphocytes. Blood., 42:939～946.

Wilson, J.D. (1973) The function of immune T and B rosette-forming cells. Immunol., 25:185～196.

Wybran, J. and Fundenberg, H.H. (1973) Thymus derived rosette forming cells in various human disease state: cancer, lymphoma, bacterial and viral infections and other diseases. J. Clin. Invest., 52:1026～1032.

Yang, T.J. Thomas. (1981) Identification of bovine T and B lymphocytes subpopulations by immunofluorescence surface marker analysis. Am. J. Vet. Res., 42:755～757.

宋熹鍾, 金象皓, 金鍾晃 (1986) 發癌劑 3-Methylcholanthrene投與 마우스에 대한 免疫生物學的 硏究 : Ⅱ. 脾臟細胞의 Rosette形成能 및 NK細胞의 活性. 大韓獸醫學會誌, 26:117～124.

李正鎬, 河大有 (1981) 色素試驗 陽性人의 Toxoplasma-Rosette形成能. 全北醫大論文集, 5:53～58.

蔡孝錫, 宋熹鍾 (1987) Picibanil이 緬羊赤血球 感作 마우스의 免疫反應에 미치는 影響. 大韓獸醫學會誌, 27:53～60.