

개 末梢血液에서 monocytes 分離

金 貞 培 · 李 芳 煥

全南大學校 獸醫科大學

(1989. 1. 30 접수)

Separation of monocytes from canine peripheral blood

Jeoung-bae Kim, Bang-whan Lee

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University

(Received Jan 30, 1989)

Abstract: Pure separation of various leukocytes is required for the assessment of their roles in immunological and physiological function.

In this study, pure separation of monocytes from canine peripheral blood was attempted. At first, mononuclear cells (PBMC) were separated by ficoll-hypaque gradient method and then monocytes were recovered from PBMC suspensions in sucrose gradient Sol. (PBMC-Sucrose), autologous plasma (PBMC-Plasma) and autologous serum (PBMC-Serum) incubated at 37°C for 2 hours.

1. In the separation of PBMC by ficoll-hypaque gradient method in canine blood, higher relative centrifugal force (RCF) was required, as high as more than 1,300xg RCF for 40 minutes, for clear formation of PBMC layer than that in human blood as usually used 400xg RCF for 40 minutes.

2. In monocytes-separation from three PBMC suspensions following PBMC separation, recovery, purity and viability rate of monocytes showed better results in PBMC-Plasma and PBMC-Serum than in PBMC-Sucrose suspension, particularly showing better results from PBMC suspensions performed by centrifugation at 1,500xg RCF for 40 minutes.

Key words: monocytes separation, peripheral blood, canine.

緒 論

백혈구의 순수분리는 면역학적 또는 생리학적인 연구에 있어서 각종 백혈구의 기능을 검사하기 위한 선행 작업으로써 필요하다. 사람혈액을 대상으로 하는 백혈구 분리에 관한 연구는 1938년 Ake와 Lindgren¹에 의한 백혈구 침강을 관찰에서부터 비롯되었으며 그 후 이와 비슷한 sedimentation method^{2,3}, low-speed centrifugation method⁴, albumin, dextran, saline을 이용한 sedimentation method^{5,6}, polyvinyl pyrrolidone method⁷, vinylpyrrolidone method⁸, polyethylene glycolrolidone method⁷, counter flow centrifugal elut-

riation method⁹ 등의 다양한 백혈구 분리방법이 보고되고 있다. 특히 근년에 와서 실용적으로 널리 이용되고 있는 방법으로서는 ficoll-hypaque gradient method^{4,5,9,12}, ficoll-isopaque gradient method¹³⁻¹⁷, percoll gradient method¹⁸ 등을 들 수 있으며 이들 방법에 의해서 사람혈액에서 백혈구를 분리하는데 있어서 좋은 성과를 거두고 있다.

가축혈액을 대상으로 하는 백혈구 분리에 관한 연구는 1970년을 전후하여 시작되었으며 1969년 Joel et al¹⁹이 소와 산양의 혈액에서 liquid silicon method를 이용하여 lymphocytes 분리를 시도한 이래 ficoll-hypaque,²⁰⁻²² low-speed centrifugation²³, sephadex,

gelatin-plasma adhesion method²⁴, percoll gradient method²⁵ 등을 이용한 소의 각종 백혈구의 분리성적이 보고되고 있다. 개의 혈액에 있어서 백혈구의 분리연구는 1979년 Hart와 Filder²⁶의 low-speed centrifugation에 의한 monocytes 분리를 효시로 하여 그 후 Latimer et al²⁷의 sedimentation method에 의한 neutrophils의 분리 및 Stickle et al²⁸의 starch solution 희석혈액 원심분리법에 의한 neutrophils분리가 시도된 바 있다.

전술한 바와 같이 근년에 사람혈액에서의 monocytes 순수분리는 ficoll-hypaque를 이용하여 원심분리(400xg, 30분)하는 방법으로 우수한 회수성적을 보여 현재 이 방법이 많이 쓰여지고 있다. 여기서 사용되고 있는 ficoll-hypaque는 안전한 합성화학 물질로 세포 삼투성이 낮고 포유동물 세포에 독성이 없다는 것이 장점으로 보고되고 있다. 그럼에도 불구하고 ficoll-hypaque를 이용한 개혈액의 백혈구 순수분리에 관한 연구보고는 거의 찾아볼 수 없다.

본 연구에서는 근래 사람에서 통상적으로 사용되고 있는 ficoll-hypaque gradient법을 이용하여 개혈액에서 먼저 peripheral blood mononuclear cell (PBMC)를 분리하고 이것으로부터 다시 monocytes를 순수분리하여 그 실용성을 평가하는 데 목적을 두었다.

材料 및 方法

실험동물 및 혈액: 광주시내의 개 견인사육장 및 훈련장에서 건강하다고 인정되는 1세이상의 성견을 무작위로 선정하여 혈액검사(PCV, Hemoglobin, 적혈구수, 백혈구수 및 백혈구 백분율 측정)를 실시하였으며 그 결과 혈액치가 정상범위내에 있는 10두를 선정하여 공시하였다. 혈액은 요측피경맥에서 20ml씩 각각 무균적으로 채혈하여 heparin으로 항응고처리 하였으며 채혈 후 1시간 이내에 공시하였다.

실험기구 및 시약: 실험에 사용된 모든 초자기구 및 플라스틱기구는 백혈구의 시험관벽 유착을 방지하기 위해서 silicon <Sigma Co.>으로 처리하여 사용하였다. 혈액세척액에는 Ca⁺, Mg⁺ free-Dulbecco's phosphate buffered saline <GIBCO Lab.> (D-PBS) 용액이 사용되었고 PBMC분리용 부유제는 histopaque <Sigma Co.>를 사용하였다. 이 histopaque 100ml중에는 ficoll-400 5.0g과 hypaque 9.0g이 함유되어 있다. 그 후 PBMC로부터 monocyte를 분리할 때는 일정 농도의 ficoll <Sigma Co.>과 sucrose <순정, 일본>의 용액, 자가혈장 및 자가혈청이 사용되었다.

혈액에서의 Monocytes 분리과정: 본 실험에서 말초

혈액으로부터 monocytes를 순수분리하기까지의 과정은 Fig 1에 요약하였다. 제 1 단계의 PBMC 분리과정으로서 원심분리관에 3ml의 histopaque를 넣고 그 위에 0.85% saline solution으로 1:1로 희석한 혈액 4ml를 조심스럽게 중층시켜 histopaque와 혈액과의 한계가 명확하도록 하였다. 이것을 실온(18°C~21°C)에서 400xg, 40분 원심분리한 후 histopaque와 상층액 사이에 형성되어 있는 PBMC층을 pasteur pipette으로 수집하였다. 이 방법은 사람혈액의 PBMC를 분리할 때 통상적으로 이용되는 방법이다. 그런데 이 방법을 개혈액에 적용하였을 때 사람혈액과는 달리 PBMC층 형성이 명확하지 않아 개혈액의 경우에는 1,500xg, 40분으로 원심력을 증가시켜 PBMC층이 명확하게 되도록 하였다.

이렇게 해서 분리된 PBMC층을 D-PBS액에 현탁시켜 10분간 200xg로 2회 세척하였다. 세척 후 사람혈액의 monocytes 분리에 이용되고 있는 sucrose gradient 법^{29,30}으로 monocytes 분리실험을 하였다. 즉 원심분리관에 28% ficoll 4ml을 넣은 다음 그 위에 PBMC 현탁액을 중층시켰다. 이것을 300 xg, 15분간 원심분리하여 ficoll과 현탁액 사이에 형성된 PBMC층을 pasteur pipette으로 수집하여 다시 D-PBS 액으로 세척, 현탁시켰다. 그 후 원심분리관에 16%, 12% 및 6% sucrose gradient solution (PBMC-Sucrose)을 1:5:1의 비율로 순서대로 중층시키고 그 위에 전기한 PBMC 현탁액을 중층시킨 후 200 xg, 15분간 원심분리하여 원심관 하부에 형성되어 있는 PBMC를 pasteur pipette으로 수집하였다. 이것을 조적배양접시(PTC dish)에 넣고, 37°C에서 2시간동안 부화시켰다. 이와 같이 하면 monocytes는 PTC dish의 벽면에 유착되므로, 나머지 비유착세포(lymphocytes, platelets) 부유액을 pipetting으로 제거한 후 벽면에 유착된 monocytes는 cold D-PBS 액을 벽면에 관주함으로써 수집하였다.

한편 위에서 설명된 sucrose gradient solution 대신 자가혈장 또는 자가혈청으로 대체한 monocytes 분리 실험에 있어서는 저술한 바와 같은 동일한 과정으로 분리된 PBMC층을 Fig 1에서 보는 바와 같이 곧 바로 자가혈장(PBMC-plasma) 및 자가혈청(PBMC-Serum)에 각각 현탁시켜 PTC dish에 옮겼다. 그 후의 monocytes 수집은 PBMC-Sucrose 법과 동일하게 하였다.

Monocytes의 회수율은 원 혈액 2ml에 함유된 monocytes 총 수에 대한 최종분리 monocytes 총 수의 백분율로 표시하였다. 순도는 분리과정이 끝난 후의 monocytes 현탁액으로 Giemsa 염색도말표본을 만들어 경검에 의하여 총 200개의 세포를 검사하여 총 세

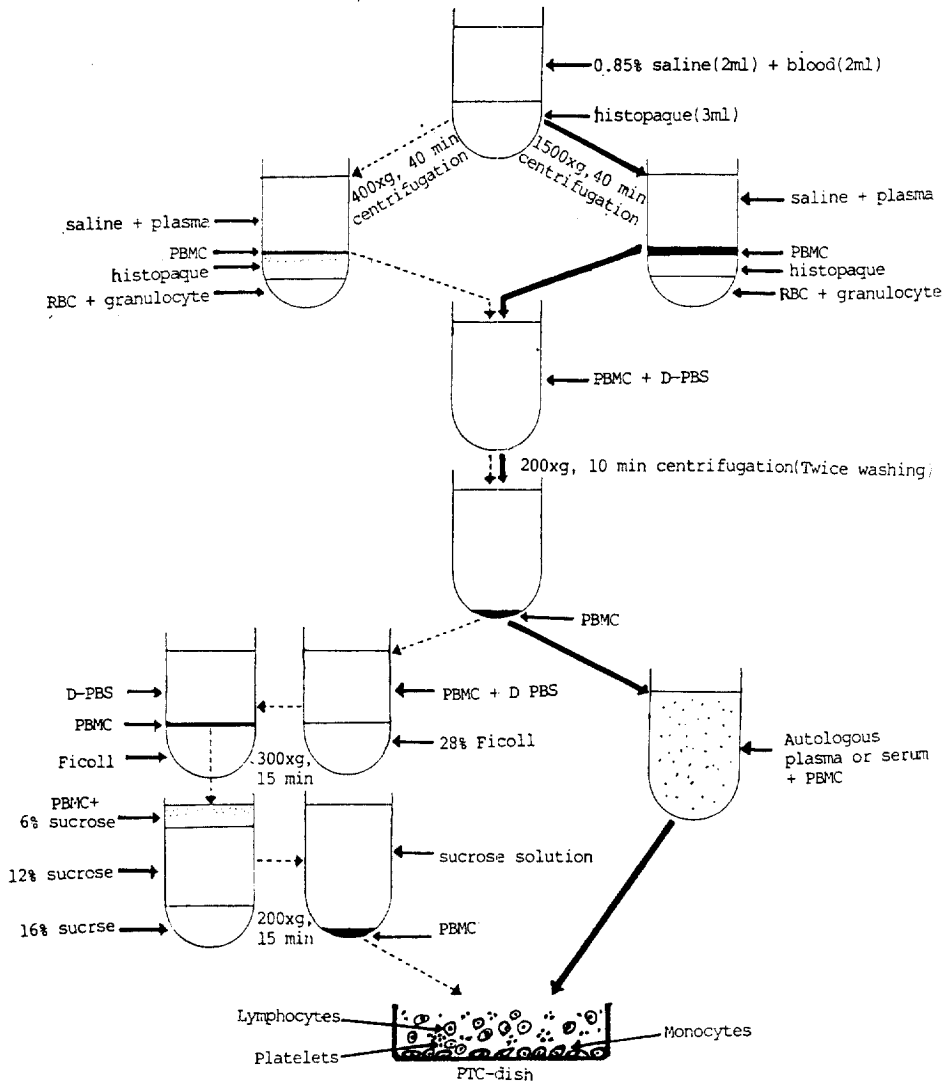


Fig 1. Flow sheet for monocytes separation from canine peripheral blood: Solid lines show modified method by authors.

포수에 대한 monocytes 수의 백분율로 표시하였다. 생존율은 trypan blue exclusion test를 실시하여 monocytes 총 수에 대한 생존(비염색) monocytes 수의 백분율로 표시하였다.

結 果

PBMC의 분리: 혈액에서 monocytes를 순수분리하기 위한 선행과정으로서 먼저 whole blood에서 PBMC층을 분리해야 한다. 이 과정에서 사람혈액의 경우에는 histopaque gradient method로 400xg, 30~40분간 원심분리하면 한계가 명확한 PBMC층이 형성된다. 그

런데 사람과 개의 각각 5개의 혈액표본을 이용하여 비교 실험한 결과 한결같이 개혈액에서는 사람혈액의 경우와는 달리 PBMC층의 한계가 불분명하였다. 따라서 개혈액의 경우에 비교원심력 (RCF)을 점진적으로 증가시켜 본 결과 1,300xg, 40분에서부터 한계가 명확한 PBMC층의 형성을 이룩할 수 있었다. 따라서 개혈액에서 monocytes의 순수분리를 위한 선행과정인 PBMC를 분리하는데 있어서 RCF 차이가 최종단계의 monocytes 회수에 어떠한 영향을 미치는가를 확인하기 위하여 histopaque gradient법으로 RCF 400xg, 40분 원심분리군(400 xg군)과 RCF 1,500 xg, 40분의 원심분리

Table 1. Comparison of recovery-, purity- and viability-rate of monocytes recovered from different cell-suspensions in sucrose solution, autologous plasma and autologous serum

	RCF 400xg, 40min in antecedent PBMC separation			RCF 1,500xg, 40min in antecedent PBMC separation		
	Sucrose	Plasma	Serum	Sucrose	Plasma	Serum
Recovery rate						
Range	18.0~39.9	39.7~51.8	32.5~44.1	35.0~42.7	55.0~59.3	52.0~58.9
Mean & SD	33.7± 8.0	42.7± 4.6**	38.0± 4.6*	39.7± 2.6	57.6± 1.6****	55.9± 2.8****
Purity rate						
Range	23.0~32.5	26.0~33.5	29.0~35.0	29.0~31.5	36.0~40.0	36.0~39.5
Mean & SD	27.8± 3.6	31.5± 2.8	32.7± 2.1*	30.6± 1.0	37.6± 1.4***	37.8± 1.2****
Viability rate						
Range	80.0~88.0	91.0~97.5	91.5~97.0	79.0~82.0	94.0~99.0	96.0~98.0
Mean & SD	83.0± 3.9	95.3± 2.3**	94.5± 2.3**	80.7± 1.0	96.2± 1.4**	97.0± 0.6***

: Data from cell-suspensions in plasma and serum were compared to data from cell-suspension in sucrose (: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

#: Data from RCF 1,500xg were compared to data form RCF 400xg (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

군(1,500 xg군)의 2군으로 나누어 비교실험하였다. 그 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 1,500 xg로 분리된 PBMC로부터 monocytes를 회수했을 때 그 회수성적이 우수함을 알 수 있었다. 즉 monocytes 회수율과 순도는 PBMC-Plasma 및 PBMC-Serum 현탁액에서 다같이 400 xg군보다 1,500 xg군에서 고도의 유의성 증가($p < 0.01$)를 보였다. PBMC-Sucrose 현탁액에서의 monocytes의 회수율, 순도 및 생존율은 400 xg군과 1,500 xg군간에 통계학적 유의차는 인정되지 않았을지라도 생존율을 제외한 회수율 및 순도에 있어서는 1,500 xg군에서 증가하는 경향을 보였다.

Monocytes의 분리: 선행과정에서 얻어진 PBMC층을 다시 PBMC-Sucrose, PBMC-Plasma 및 PBMC-Serum 등의 3종의 현탁액으로 만들어 이들로부터 각각 분리한 monocytes의 회수성적의 비교는 Table 1에서 보는 바와 같이 400 xg군에서나 1,500 xg군에서 다같이 PBMC-Sucrose 현탁액으로부터 회수한 것에 비해서 PBMC-Plasma 및 PBMC-Serum 혈액으로부터 회수한 것에서 monocytes의 회수율, 순도 및 생존율이 다같이 높게 나타났으며 전술한 바 있지만 특히 1,500 xg군에서 더욱 높게 나타났다.

考 察

말초혈액으로부터의 백혈구 순수분리 연구는 1970년을 전후하여 면역학 연구의 급진전에 따른 면역관련세포의 기능구명의 필요성에 따라서 본격적으로 진행되

어 왔다. 그 동안의 연구업적을 개관했을 때 백혈구의 종류별 분리회수에 있어서 Lymphoprep, Percoll 또는 Histopaque등과 같은 용액의 일정량을 혈액에 첨가하여 원심분리에 의해서 백혈구 종류별 계층으로 유도하여 회수하는 방법이 우수한 성과를 거둘 수 있다는 것으로 요약된다.

가축에서의 이와 같은 연구는 사람에서 얻은 업적을 기초로 하여 시작되었으며 현재까지 이에 관한 보문은 그다지 많지 않은 실정이다. 가축혈액을 대상으로 한 연구는 소, 개, 말, 돼지를 대상으로 하는 소수의 보고가 있을 뿐이다.

본 연구에서는 지금까지의 연구실적을 참고로 하여 사람혈액에서 가장 우수한 분리성적을 얻을 수 있는 것으로 생각되는 histopaque를 이용한 분리법을 개 혈액에 적용하여 monocytes의 순수분리를 시도하였으며 그 결과에 따라 사람 혈액과는 달리 개 혈액에서의 monocytes의 순수분리에 있어서 몇가지 특이한 술식을 보완하였다.

monocytes의 순수분리를 위한 선행과정은 histopaque를 이용하여 일정한 RCF로 원심분리한 후 PBMC를 회수해야 한다. 이 과정에서 사람혈액에서는 대부분 30~40분의 400 xg RCF를 이용하였으며, 개의 혈액에서는 Latimer et al²⁷이 30분의 400 xg RCF를 이용하였다. 또한 소의 혈액에서는 30분의 400 xg RCF로,²⁸ 말의 혈액에서는 Tarr et al³¹이 30분의 400 xg RCF로 각각의 혈액에서 PBMC층의 명확한 분리를 할

수 있었으며, 이것으로부터의 후속된 monocytes의 분리과정에 있어서도 소기의 성과를 거둘 수 있었다고 하였다.

본 실험에서 사람혈액과 개혈액에 histopaque를 가하여 RCF 400 xg, 40분의 원심분리를 실시한 바 사람의 그것에서는 PBMC층의 한계가 명확하게 분리되었으나 개의 혈액에서는 PBMC층의 한계가 명확하지 않을 뿐 아니라 그 하층에 혼탁이 잔존하여 RCF를 더욱 증가시킬 필요를 느끼게 되었다.

따라서 개 혈액에서 RCF를 400 xg 이상으로 단계적으로 높여 본 결과 1,300 xg 이상에서부터 한계명확한 PBMC의 분리층이 형성될 수 있었다. 그런데 RCF를 높게 되면 그만큼 분리세포의 손상 또는 활성저해의 우려가 있으므로 이것을 확인하기 위해서 본 실험에서는 RCF 400 xg, 40분군과 RCF 1,500 xg 40분군으로 나누어 PBMC층의 형성 및 후속되는 monocytes 회수성적을 비교하였다. 그 결과 RCF 1,500 xg 40분군에 있어서 전 혈액표본에서 한결같이 PBMC의 한계가 명확한 분리층이 형성될 수 있었을 뿐만 아니라 그 후의 monocytes의 회수율 및 순도에 있어서도 고도의 유의성 증가를 보였으며 monocytes의 생존율에 있어서도 증가된 1,500 xg RCF에 의해서 장애영향이 미치지 않는다는 것이 확인되었다. 따라서 개 혈액에 있어서 monocytes의 순수분리를 위한 PBMC 분리과정에서는 지금까지 사용되어 온 RCF 400 xg, 40분 보다 RCF 1,500 xg, 40분이 우수함을 알 수 있었다.

PBMC층으로부터 monocytes를 분리회수 하기 위해서는 monocytes의 activity를 유지하기 위해서 보존액에 상당시간 부화(37°C)하는 과정이 필요하다. 사람혈액의 경우 보존액으로써 sucrose gradient solution이 이용된다. 가축의 경우는 채혈량이 많아진다는 결합이 있을지라도 자가혈장이나 자가혈청이 오히려 sucrose gradient solution보다 우수하지 않을까 하는 추리에서 sucrose gradient solution, 자가혈장 및 자가혈청을 이용하여 PBMC의 현탁액을 만들어 2시간 부화한 후 각각의 monocytes의 회수성적을 비교하였다. 그 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 자가혈장 또는 자가혈청을 이용하는 것이 sucrose gradient solution을 이용한 것보다 회수율, 순도 및 생존율에 있어서 다같이 우수함이 인정되었다.

본 연구를 통해서 얻은 결과를 요약하면 개 혈액에서의 monocytes의 분리에 있어서는 PBMC의 분리단계에서 RCF 400 xg, 40분보다 1,500 xg, 40분으로 RCF를 높여야 한다는 점과 그 후의 monocytes 순수 분리 과정에서 sucrose gradient solution보다 자가혈

장 또는 자가혈청을 사용하는 것이 monocytes 회수성적을 크게 향상시킬 수 있을 뿐 아니라 그 분리작업이 간편하다는 점이 확인되었다.

結 論

개의 말초혈액에서 histopaque gradient 법을 이용하여 PBMC를 분리하고 이것을 다시 sucrose액, 자가혈장 및 자가혈청에 각각 현탁 부화하여 monocytes의 순수분리를 비교하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Monocytes의 순수분리를 위한 선행작업으로써 histopaque gradient법에 의한 PBMC 분리과정에 있어서 지금까지 사람의 혈액에서 적용되어 온 RCF 400 xg, 40분의 원심분리에 의해서는 PBMC층의 형성이 불완전하였고 1,300 xg, 40분 이상으로 RCF를 높여야 하였으며 RCF 400 xg, 40분군과 RCF 1,500 xg, 40분의 원심분리 결과를 비교한 바 후자의 경우에 monocytes 회수율 및 순도의 현저한 증가를 볼 수 있었다.

2. PBMC층을 분리한 후 PBMC-Sucrose, PBMC-Plasma 및 PBMC-Serum 현탁액을 만들어 monocytes 회수성적을 비교한 바 PBMC-Sucrose보다 PBMC-Plasma 및 PBMC-Serum에서 monocytes의 회수율, 순도 및 생존율이 향상되었으며 특히 PBMC 분리과정에서 RCF 1,500 xg, 40분의 원심분리를 적용했을 때 그 효과는 더욱 현저하였다.

參 考 文 獻

1. Ake GH, Lindgren K. The relative sedimentation rate of white blood corpuscles. *Folia Hematology* 1938; 57:33~49.
2. Nakao M, Nakayama T, Kankura T. Separation of human blood components. *Nature (London) New Biol* 1973; 246(151):94.
3. Medzihrasky F, Marks MJ, Metcalfe JI. Simple procedure for the separation of viable cells, suitable for long term in vitro experiments. *Biochem Med* 1974;10(2):153~166.
4. Tse HY. Velocity sedimentation at low-speed centrifugation. In: Mishell BB, Shiigi SM, ed. *Selected Method in Cellular Immunology* 1980: 201~205.
5. 서울대학교 의과대학. Laboratory method detecting cell mediated immunity. *면역학* 1983: 102~105.
6. Gold P, Cole M. Simple method for leukocytes separation. *J. Lab Clin Med* 1960;56(2):310~313.

7. Pertoft H, Back O, Kerstion LK. Separation of various blood cells in colloidal silicapoly (vinylpyrrolidion) gradient. *Exp Cell Res* 1968; 50(2): 355~368.
8. Shrago MI, Shinkarenko AA. Extraction and separation of donor blood using nonionic polymer. *Master Resp Sezda Gematol Transfuziologiya* 1973; 2:200~202.
9. Berkow RL, Weisman SJ, Diana J, et al. Comparative response of human polymorphonuclear leukocytes obtained by count flow centrifugal elutriation and ficoll-hypaque density centrifugation. *J Lab Clin Med* 1984; 104:698~710.
10. 金頌福, 朴在甲, 趙漢翔, 金相仁. 各種 惡性腫瘍患者에서 胸腺依存 淋巴球와 緬羊赤血球間的 로제트 (Rosette) 形成度에 關한 研究. 대한 의학 협회지 1976; 19(6):461~472.
11. Sander son RJ, Shepperdson FT, Vetter AE, et al. Isolation and enumeration of peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1977; 118(4):1409~1414.
12. Jan E de V, Alendry PCJR, Willy SB, et al. The role of monocytes in human lymphocytes activation by mitogens. *J Immunol* 1979; 122(3):1099~1107.
13. Böyum A. Isolation of mononuclear cells-granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation, at 1g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21 (Suppl):77~89.
14. Böyum A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood. General sedimentation properties of white blood cells in a 1-g gravity field. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21 (Suppl):51~76.
15. 宋得洙, 文武彦. 惡性腫瘍과 各種疾患에 있어서의 末梢血液中 T-淋巴球의 分布. 대한 내과학 잡지 1978; 22(2):143~153.
16. 河大有, 鄭憲鐸. 여러가지 要因이 淋巴球의 Rosette 形成에 미치는 影響. 전북 의대 잡지 1976; 1(1):1~13.
17. Abram JT, Dovorá Y, Adriana H, et al. The isolation and purification of human peripheral blood monocytes in cell suspension. *J Immunol Method* 1980; 39:71.
18. Rolf H, Anna-Karin J, Per V. A rapid method for purification of human granulocytes using percoll. A comparison with dextran sedimentation. *J Immunol Methods* 1981; 43:95~101.
19. Joel DD, Adamik ER, Chananna EP, et al. Separation of lymphocytes from blood of calves and goats. *Am J Vet Res* 1969; 30(7):1099~1104.
20. Carson CA, Sell DM, Ristic M. A method for separation of bovine blood leukocyte for in vitro studies. *Am J Vet Res* 1975; 36(8):1091~1094.
21. 이기창. 소의 말초혈액에서의 백혈구 분리법. 전남대학교 석사학위논문 1987.
22. Reeves JH, Renshaw HW. Surface membrane markers on bovine peripheral blood lymphocyte. *Am J Vet Res* 1978; 36(9):917~921.
23. Chambers WH, Washburn SM, Compos M. Isolation of bovine eosinophils by density gradient centrifugation. *Am J Vet Res* 1985; 46(1):154~156.
24. Goddeeris BM, Baldwin CL, Ole-Moiyoi O, et al. Improved method for purification and depletion of monocytes from peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods* 1986; 165~173.
25. Chambers WH, Taylor JR, Klesius PH. Isolation of bovine polymorphonuclear leukocytes by density gradient centrifugation. *Vet Immunol Immunopathol* 1983~1984; 5:197~202.
26. Hart IR, Fidler IJ. The collection, purification and characterization of canine peripheral blood monocytes. *J Reticuloendothel Soc* 1979; 26:121~133.
27. Latimer KS, Crane LS, Prasse KS. Quantitative evaluation of neutrophilic chemotaxis in beagles. *Am J Vet Res* 1981; 42(7):1254~1256.
28. Stickle JE, David KHK, Way S. Neutrophil function in the dog: shape change and response to a synthetic tripeptide. *Am J Vet Res* 1985; 46(1):225~228.
29. Böyum A. Isolation of leukocytes from human blood. A two phase system for removal of red cells with methyl cellulose as erythrocytes-aggregant. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21 (Suppl):9~29.

30. Benjamin WA. Sucrose gradient centrifugation (7S, 19S). In: Garvey JS, Cremer NE, Sussdorf DH, ed. *Methods in Immunology* 1980; 231~240.
31. Tarr MJ, Olsen RG, Krakowka S, et al. Erythrocytes rosette formation of equine peripheral blood lymphocytes. *Am J Vet Res* 1977; 38(11):1775~1779.
-