

# 돼지에서 plasma protein 에 의한 세포성면역 증진효과에 관한 연구

## 1. 혈액내 백혈구 아군 및 세포별 분포율

양창근\* · 김순재\*\* · 문진산\*\*\* · 정석찬\*\*\* · 박용호\*\*\*

대한제당중양연구소\*, 건국대학교 수의학과\*\*

가축위생연구소\*\*\*

(1994년 3월 4일 접수)

## Enhancement of cell-mediated immunity by administration of plasma protein in pigs

### 1. Proportion of leukocyte subpopulations and cells expressing adhesion molecules in peripheral blood

Chang-kun Yang\*, Soon-jae Kim\*\*, Jin-san Moon\*\*\*

Suk-chan Jung\*\*\*, Yong-ho Park\*\*\*

*Veterinary Diagnostic Laboratory of Thaihan Ind Co\**  
*Department of Veterinary Medicine, Kon-kuk University\*\**  
*Veterinary Research Institute, RDA\*\*\**

(Received March 4, 1994)

**Abstract** : Plasma protein which has been known as one of nonspecific immunostimulators was added to feedstuff to examine its effect on the enhancement of cellular immune response in porcine immune system. A total of 40 piglets, 20 male and 20 female each, were fed for 30 days with or without plasma protein. The peripheral blood were collected and analyzed for the investigation of leukocyte subpopulations and their activities by using a panel of monoclonal antibodies specific to porcine leukocyte differentiation antigens and flow cytometry.

The results obtained as follows.

1. Total weight gain, daily feed intake and feed conversion rate for 10 days were significantly improved to 56%, 20% and 22% in the piglets fed plasma protein, respectively.

2. A significant increase in N (null or non T/non B) cells was also noticed. Leukocyte proportion from piglets fed plasma protein was 20.2-24.7%, otherwise that from piglets fed without plasma protein was 12.3-13.4%, respectively.

3. A significant increase in the proportion of B cells and cells expressing poCD1 was not found in piglets fed plasma protein.

4. Reaction with monoclonal antibodies specific to adhesion molecules, poCD11a, poCD11b, poCD44 and poCD45A and poCD45B, has shown that leukocyte subpopulation from piglets fed plasma protein did not significantly higher than that from piglets fed without plasma protein.

5. Total proportion of granulocytes and monocytes was about 50% in both group and the proportion after

treated with Hypaque/Ficoll was 2.7% and 5.8% in each group, respectively.

**Key words:** leukocyte subpopulations, plasma protein, pig, monoclonal antibody, flow cytometry

## 서 론

오래전부터 동물의 면역계는 체내에서 자기(self)와 비자기(non-self)를 구별하는 능력을 갖고 있었는데 시간이 지남에 따라 이 간단한 분별 활동은 현재의 포유 동물에서 매우 복잡하게 전개되어 왔다. 그것은 침입체를 위시한 이물질들을 인식하는 외에 기억능력 및 필요한 특이성과 반응하는 능력에 따라 이를 제거하는 작용을 수행하기 때문에 동물이 생존을 계속 영위해 가는데 있어 필수적인 방어역할을 수행하게 되는 것이다.<sup>20,49,50</sup> 이와 같은 숙주의 면역체계 형성과정을 살펴보면, 개체 발생동안 다능성 간세포(pluripotential stem cell)가 출현하며 면역학적으로 중요한 3개의 관련있는 세포가 분화 발생된다. 즉 흉선에서 T 세포가 분화되고, B 세포는 태아간(fetal liver), 골수(adult bone marrow) 그리고 복강에 나타난다. 동시에 단핵세포-대식세포계(monocyte-macrophage system)가 발생된다.<sup>47</sup>

최근에 그 기능 및 역할에 있어서 광활한 만한 연구가 집중되고 있는 N 림프구는 처음에 양에서 non T / non B (N-세포) 세포로 구별되어 표현되기 시작한 후 쥘소 및 양에서 CD4/CD8 복합 음성세포 또는 '공(null) 세포로 명명되었다.<sup>32</sup> Koren et al<sup>28</sup>은 양 적혈구(sheep red blood cell; SRBC)와 rosette를 형성하지 못하므로 부착성과 비부착성 양쪽에 다 활성이 있다고 했으며 더구나 percoll 분류에 의해 세포 크기와 NK 활성과는 관계가 없다는 것이 알려졌다. 그러므로 돼지 NK 세포는 전형적인 cytolytic T 림프구와 많은 특징을 공유한다고 하였다.

NK 세포들은 주로 흉선에 존재하며 흉선 제거시 소멸된다.<sup>8</sup> 또한 흉선에서 나가는 세포들의 대부분이 이에 속한다.<sup>7</sup> 그들은 mitogen에 쉽게 반응하지 않으며<sup>37</sup> 다시 순환하지 않는다.<sup>6</sup> 그러나 이들은 nylon wool에 높은 비부착성을 갖고 있다.<sup>2,5,9</sup> 최근의 연구 결과는 N 림프구의 작은 집단 또는 세포들의 모임이 존재한다는 것이 밝혀졌으며, 이들은 CD2, CD6 외에  $\gamma\delta$  T세포 수용체를 소유하고 있으며, CD2 또는 CD8을 표면 항원으로 나타내고 있음이 알려지게 되었다.<sup>6,23</sup>

B세포는 T세포와 다르게 아군별로 나누어지지 않고 단지 항원의 자극을 받아 B세포의 선택적 활성화로 plasma세포가 되어 특정항원에 대한 특이항체를 생산하여 일부는 memory B 세포로 된다.<sup>26,39,53</sup>

면역반응에 관여하는 림프구는 형태적으로 서로 구별하기 어려우므로 세포면역 수용체(surface receptor)의 종류와 nylon wool과의 부착여부를 이용하여 구별하려는 연구가 오래전부터 이루어져 왔다. SIg과 Fc 수용체(receptor)를 갖고 있으면서 nylon wool에 부착하는 것은 B세포이나, 면양적혈구와 결합하여 rosette를 형성하는 표면수용체를 가진 것은 T세포이다. SIg도 없으면서 SRBC와 rosette를 형성하지 않는 세포를 null 세포로 분류하였다.<sup>3,8,10,11,17,18,37</sup>

이와같이 T, B 림프구 및 N 림프구들과 그들의 아군의 형태학적, 기능적 차이를 구별하기 위해 여러 방법이 사용되었지만<sup>12</sup>, CD4와 CD8세포들을 분류할 수 없었다. 그러므로 단클론항체(monoclonal antibody; MoAb)가 세포 표면항원과 그들이 표현하는 기능적인 특성 연구를 위한 적당한 도구이다. Köhler와 Milstein에 의해 처음으로 개발된 단클론항체 작성기법은 각종 질병에 대한 정밀진단에 응용 및 치료 뿐만 아니라 살아 있는 림프구의 표면항원 분석 및 유전학적 연구의 기술 혁신에 널리 응용되었다.<sup>13,14,20,29,35</sup>

CD44는 35-40 일령의 양의 흉선세포에 의해 강하게 발현되지만 흉선 80일령 쯤에는 흉선내 반응세포의 수가 점차로 감소하여 성숙한 양의 수준으로 되며, 말초혈액에서 CD44의 발현은 mitogen 또는 phorbol esters 및 ionomycin으로 자극후 증가한다는 것이 밝혀졌다.<sup>33</sup>

혈액에서 세포형태의 존재는 다양하게 조절되는데 즉 B림프구는 혈액을 먼저 떠나서 T 림프구 보다는 나중에(흉관을 경유하여) 돌아온다. 감염이 있을 때 혈액에서 새로 형성된 림프구의 수가 40배 증가 하지만, 성숙한 림프구는 거의 증가하지 않는다. 또한 많은 양의 림프구가 혈액에서 이동됨에도 불구하고 혈액 내 림프구의 수는 놀랍게도 일정한데 이것은 효과적인 조절이 되기 때문이다.<sup>51</sup> Licence와 Binns<sup>31</sup>는 SRBC와 rosette 형성능 및 SIg 검출법으로 건강한 돼지의 혈액에서 T 세포는 42-63.8%였으며, B세포는 7.3-16.3%라고 보고했다. 또한 혈액뿐만 아니라 비장, 흉선, 장간막 림프절, Peyer's patches 등을 비롯한 각종 림프계 장기에 분포하는 T 세포와 B세포 분포율도 조사 보고하였다.<sup>7,10,11,17,45</sup>

무척추와 척추동물은 G(-) 세균 감염에 대응하는 복합기전이 연구되어 왔는데 그 반응은 lipopolys-

accharide(LPS 또는 endotoxin)와 G(-) 세균의 outer membrane에 존재하는 glycolipid의 인지에 의존하는 여러 방어기전의 자극에 의한 것으로 밝혀졌다. 사람을 포함한 많은 종에서 LBP는 정상혈청에서 0.5µg/ml이하로 존재하며, 급성 phase response의 유도후에는 24시간 동안 50µg/ml까지 상승한다. LBP는 rough-(R-) 그리고 smooth-(S-)를 형성하는 세균의 LPS에 대해 높은 친화력으로 결합하는 lipid A에 대한 결합 부위를 갖고 있다.<sup>17</sup>

본 연구는 최근 비특이 면역증강제로 사료등에 많이 첨가 사용되는 제제중의 하나인 혈장단백질 (plasma protein; PP)의 효과를 어린 돼지를 대상 숙주로 하여 림프구의 표면 항원에 특이적인 각종 단클론항체를 이용하여 flow cytometry 분석을 통해 면역 증강기전을 밝히고자 하는데 목적이 있다.

### 재료 및 방법

공시동물 및 실험설계 : 본 실험의 균일성을 유지하

기 위하여 대한제당 중앙연구소 시험농장에서 건강하고 이상이 없는 정상 포유자돈을 4복에서 선발하여, 대조구, 시험구 각각 20두씩(암수 반반) 총 40두를 실험에 공시하였다(Table 1). 실험사료는 대한제당(주)에서 생산되는 포유자돈 입블임사료(piglet prestarter feed)를 사용했으며 실험군은 여기에 8%의 plasma protein을 첨가해서 각 개체가 충분히 섭취할 수 있도록 자유급이를 실시했다(Table 2). Plasma protein에 대한 증체량 및 사료요구율등을 측정하기 위하여 시험 개시 10일 후 측정했으며, 또한 림프구의 아군별 분포율을 조사하기 위해 시험개시 전 및 시험개시 30일후 말 초혈액을 채혈하였다.

#### Plasma protein의 생산

1) Plasma protein 생산 방법 및 특성 : 본 실험에 사용된 plasma protein은 돼지의 신선한 전혈을 수거하여 저온 spray drying 방법으로 만들었다. 이 신선한 혈액은 이물질을 제거하기 위하여 disintegrator로 순환시켜서 무균적으로 생산했다(spray dried porcine plasma protein; SDPP).

Table 1. Application of plasma protein to piglets in the study

Farms	Group	No of pigs	Age
A	Plasma protein	10	4wk old
	Control	10	4wk old
B	Plasma protein	10	4wk old
	Control	10	4wk old

Table 2. Formula of piglet prestarter feed

Nutrition value		Ratio of cereals (grains)	
ME(kcal/kg) <sup>*1</sup>	3,300	Corn	7.5
Crude protein(%)	19.5	Wheat bran	10.18
Crude fat	3.82	Soybean meal(Dom <sup>*2</sup> )	15.0
Crude fiber	2.18	Corn gluten	3.0
Cash	5.95	Fish meal (Dom; CP 58%)	5.0
Calcium	1.0	Limestone	0.32
Phosphorous	0.7	TCP <sup>*3</sup>	1.0
Lysine	2.1	Cake powder	8.0
Methionine	0.36	Wheat flour	25.0
		Glucose	5.0
		Milk replacer	15.0
		Fumaric acid	2.0
		Additive	3.0
		Total	100

\*1 ME ; metabolic energy  
 \*2 Dom ; domestic product  
 \*3 TCP ; tri calcium phosphorous

**Table 3.** Composition of plasma protein used to the study

Composition	%
Total protein	90-92%
Total fat	2.50% max
Total fiber	0.50% max
Total ash	4.00% max
Protein digestibility	98%
Moisture	6.00% max

**Table 4.** Composition of amino acid profile in plasma protein

Composition	%	Composition	%
Tryptophan	1.62%	Methionine	1.00%
Asparatic acid	3.76%	Isoleucine	0.76%
Threonine	4.27%	Leucine	11.24%
Serine	4.76%	Tyrosine	2.60%
Hydroxyproline	1.33%	Phenylalanine	6.97%
Glutamic acid	7.87%	Hydroxylysine	0.01%
Proline	3.32%	Histidine	6.06%
Alanine	8.78%	Lysine, Total	9.37%
Cystine	1.05%	Arginine	4.46%
valine	8.27%	Glycine	4.36%

25kg으로 포장 시판되는 American Protein Corporation社 제품을 돼지 prestarter feed에 8% 수준으로 첨가하여 실험에 이용했다.

2) 구성 성분 : 본 실험에 사용된 plasma protein의 성분과 amino acid의 구성성분은 Table 3, 4와 같다.

돼지 말초혈액 채취 및 백혈구 분리 : 시험군 및 대조군 각 20두의 백혈구는 Davis et al<sup>15</sup>의 방법에 준하였다. 즉 돼지의 경정맥으로부터 50-60ml 혈액과 항응고제인 acid citrate dextrose(ACD; sodium citrate 22.0gm, citric acid 7.3gm, dextrose 24.5gm, DW 1000ml)를 3:1의 비율로 혼합하여 잘 섞었다. 혼합된 혈액은 50ml 원심분리튜브(centrifuge tube, Costar Co)에 45ml씩 분주한 후 1,500rpm에서 30분간 break 없이 원심분리하였다(IEC 3,000). Buffy coat 층을 채취한 후 36℃로 가온한 0.87% Tris-buffered ammonium chloride (Tris-NH<sub>4</sub>Cl ; 0.01M Tris, pH 7.2) 용액과 혼합하여 약 5분간 37℃ 항온수조에 넣음으로써 적혈구를 용혈시켰다. 다시 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 버린 후 pellet를 PBS(sodium chloride 7.6gm + disodium phosphate 1.2688gm + monosodium phosphate 0.1gm + monopotassium phosphate 0.2113gm, pH 7.2) 와 ACD용액을 9:1 로 혼합한 PBS-ACD buffer로 3회 이상 원심세척하였다. 최종 원심후 3ml의 PBS-ACD buffer로 pellet을 부유시

켜 trypan blue exclusion technique에 의해 생존 세포 수를 측정하였다. 최종농도가 5×10<sup>5</sup>/50μl 되도록 조절하여 이용하였다.

돼지 백혈구 특이 단클론항체 : 본 실험에 공시된 단클론항체들은 Table 5에서 보는 바와 같다. anti-CD 1, 2 및 anti-B cell, anti-N cell 그리고 leukocyte common antigen인 CD44와 CD45에 대한 단클론항체를 이용하였다. 또한 granulocyte, monocytes에 특이적으로 작용하는 anti-granulocyte, monocyte 단클론항체도 시험에 적용하였다.

형광 세포유출 장치(flow cytometry) : Laser 이용 형광세포 유출 측정장치를 이용한 검사를 하기 위하여 세포는 1개 또는 2개의 형광색소(FITC 및 phycoerythrin)를 이용하여 간접적으로 표식되어 있어야 한다. 본 시험은 conical bottom microplate의 한 well당 단클론항체 50μl (15μg/ml) 를 96well에 각각 넣고 혈액으로부터 분리한 림프구(5×10<sup>5</sup>/50μl)를 첨가한 후 4℃에서 30분간 잠작시켰다. 그리고 4℃에서 2000rpm, 3분 동안 원심분리하여 상층액은 버리고 pellets를 분주시키기 위하여 vortex로 shaking 하였다. 다음에 4℃의 first washing buffer(PBS 450ml, ACD 50ml, 20% NaN<sub>3</sub> 5ml, gamma globulin free horse serum 10ml, 250mM EDTA 20ml, 0.5% phenol red 1ml) 200μl를 넣어 각 well에 3회 원심 (2000rpm, 3분, 4℃) 세척한 후 상층

**Table 5.** Panel of monoclonal antibodies specifically reactive with swine leukocyte differentiation antigens

Specificity of monoclonal antibodies	Monoclonal antibodies	Cell types	References
CDI	76-7-4	Thymocytes	Pescovitz et al <sup>42</sup>
sIgM	PIg 45A	B cells	Davis et al <sup>15</sup>
sIgM	PIg 47A	B	"
Non T/Non B	PT 79A	N	"
Non T/Non B	PT 14A	N	"
CD11	H 20A	B,T,N	"
CD44	BAT 31A	B,T,N	"
CD44	BAG 40A		"
CD45	74-9-3	T,N,B	Pescovitz et al <sup>42</sup>
CD45	MUC 13A	T,N,B	Davis et al <sup>15</sup>
DH59	DH 59B	Granulocyte	"

**Table 6.** Feed intake, growth and efficiency of piglet as influenced by plasma protein addition to the prestarter feed (A farm)

Examination	Control(n=10) Mean ± SE	Plasma protein(n=10) Mean ± SE	Remark
Initial body wt	6.29kg±0.068	6.29kg±0.034	
Final body wt	8.36kg±0.077	9.51kg±0.080	
Gain per period	2.07kg	3.22kg	+1.15kg
Daily gain, Kg	230g/d	358g/d	rate of increase; 56%
Daily feed intake	341g/d	410g/d	rate of increase; 20%
Feed/gain	1.48	1.15	rate of improvement; 22%

\*p<0.01, SE; standard error (Thaihan experimental farm)

액을 버리고 밑부분에 모인 림프구의 pellets를 plate 또는 vortex mixer를 이용하여 부유시켰다. 여기에 secondary antibody로서 단일 염색을 위하여는 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG+IgM antibody(Caltag Lab Inc, South San Francisco, USA) 를 약 200배로 희석한 후 각 well에 100 $\mu$ l씩 첨가하였다. 이를 다시 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 감작시킨 다음 4 $^{\circ}$ C의 second washing buffer (first washing buffer 성분중 horse serum 만 제거한 것) 로 3회 원심 세척한 후 2% PBS-포르말린(38% formalin 20ml, PBS 980ml) 용액을 200 $\mu$ l/well 되게 가하여 고정시킨 후 염색이 끝난 세포들은 모두 검사시까지 냉암소(4 $^{\circ}$ C)에 보관하였다. 염색이 완료된 시료의 검사는 flow cytometry 를 이용하여 각 시료당 총 2,000개 이상의 세포를 검사하여 양성반응 세포수를 측정하였다. 측정과 자료 분석은 Becton Dickinson사의 Consort 32 컴퓨터 및 Lysis program을 이용하여 실시하였다.

통계 분석 : 이 실험에서 얻은 성적은 personal computer에 내장된 SAS 통계처리 package<sup>46</sup>를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 유의성 검증은 ANCOVA법 (Analysis of Covariance : 공분산분석)과 unpaired Student's t-test로 검정하였다.

## 결 과

Plasma protein 급여에 따른 증체 및 사료요구율 개선 효과 : 순수 혈장단백질 (American Protein Co 제품) 을 8% 수준으로 사료에 첨가하여 시험군 10두에 10일간 투여한 후 증체 및 사료요구율 개선 효과를 대조군 10두와 비교한 결과는 Table 6에서 보는 바와 같다. Table 6의 A farm의 대한제당연구소 시험농장에서 10일간 plasma protein 투여 후 투여군과 대조군의 성적을 비교한 결과 증체량은 1.15Kg, 일일 증체효과는

56% 증강되는 결과를 보였다. 또한 사료섭취량은 20% 증진되었으며, 사료요구율은 22% 개선되었다 ( $p < 0.01$ ).

**Plasma protein 급여에 따른 돼지 말초혈액 백혈구 subpopulation 변화**

**N 림프구 (non T/non B cell) 증강 효과 :** 돼지의 면역구조는 T, B 그리고 N cell로 림프구가 구성되어 있으며, 특히 최근에는 N 림프구의 면역기전 증진 관여에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서는 여러 가지 많은 세포들 중에서도 특히 N림프구의 활성이 PP투여군에서는 PT 79A 단클론항체의 경우 20.2%, PT 14A는 24.7%의 높은 양성율을 나타냈으나 무투여

군에서는 N 림프구에 특이적인 PT 14A는 24.7%의 높은 양성율을 나타냈으나 무투여군에서는 N 림프구에 특이적인 PT 79A가 12.3%, PT 14A는 13.4%의 수준으로 낮게 나타났다(Table 7, Fig 1).

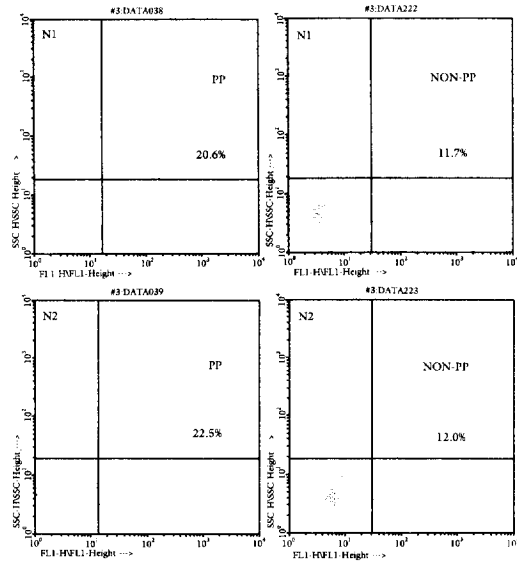
**B 림프구 증강효과 :** 거의 모든 성숙 B세포가 가지고 있는 sIgM에 특이적인 단클론항체 PIg 45A와 PIg 47A에 대하여는 PP 투여군에서는 13.3%, 11.9%의 양성반응을 나타냈으며, 무투여군에서는 각각 14.3% 및 17.2%의 양성반응을 나타냈다(Table 7, Fig 2).

**CD1 및 CD11 증강효과 :** CD1에 특이적인 단클론항체 76-7-4에 대하여는 plasma protein 투여군에서 8.8%의 양성반응을, 무투여군에서는 10.7%의 분포율을

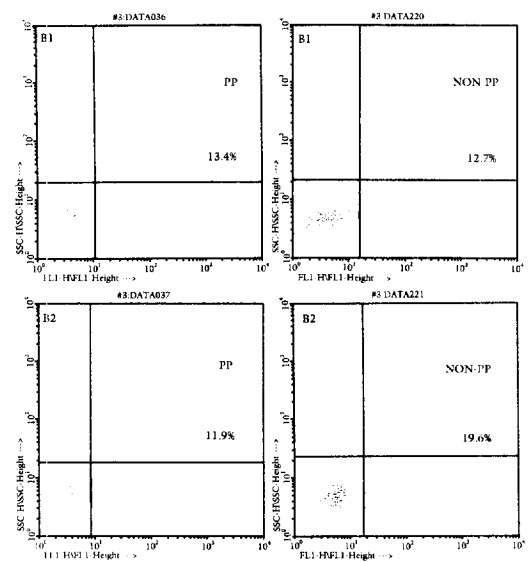
**Table 7.** Proportion of B and N cell-specific molecule expression on porcine blood leukocyte from piglets administered with or without plasma protein

MoAbs to porcine MHC antigens	Specificity of MoAbs	Proportion (%±SD)	
		Plasma protein administered(n=20)	Control* (n=20)
PT 79A	Anti-porcine N cell	20.2±3.3	12.3±6.5
PT 14A	Anti-porcine N cell	24.7±7.1	13.4±3.4
PIg 45A2	Anti-porcine B cell	13.3±4.2	14.3±3.6
PIg 47A	Anti-porcine B cell	11.9±1.6	17.2±2.7

\*Control; no plasma protein administered



**Fig 1.** Representative dot plot profiles of porcine peripheral blood lymphocytes(PBL) using monoclonal antibody specifically reactive with porcine N cell antigens. PP indicates PBL obtained from piglets fed plasma protein. Non-PP indicates PBL obtained from piglets fed without plasma protein.



**Fig 2.** Representative dot plot profiles of porcine peripheral blood lymphocytes(PBL) using monoclonal antibody specifically reactive with porcine B cell antigens. PP indicates PBL obtained from piglets fed plasma protein. Non-PP indicates PBL obtained from piglets fed without plasma protein.

나타냈다(Table 8). 그리고 CD11 항원에 특이적인 H 20A 와 MHC 76A에 대하여는 PP 투여군은 각 87.4/94.9%의 양성을 보였으며, 무투여군에서는 91.6/88.4%의 양성율을 나타냈다(Table 8, Fig 4).

CD44, CD45 및 granulocyte/monocyte 증강효과 : 어린 일령에 모든 흉선세포에서 강하게 표현되는 CD 44에 특이적인 단클론항체 BAT 31A와 BAG 40A에 대하여서는 PP 투여군에서 각각 97.2%/93.7%, 무투여군에서는 95.8/90.0%의 양성반응을 보였다(Table 9, Fig 4). 림프구의 major protein tyrosine phosphatase로 항원 수용체를 통한 T와 B림프구의 activation에 관여하는 것으로 알려진 CD45 항원에 특이적인 74-9-3,

MUC 13A에 대하여는 plasma protein 투여군이 각각 99.6%, 78.4% 이며 무투여군이 97.4%, 72.7%의 양성 반응을 보였다(Table 9, Fig 5).

Granulocyte/monocyte에 특이적인 단클론항체 DH 59B에 대하여는 림프구중 PP투여군이 2.7%, 무투여군이 5.8%의 양성반응을 보였다(Table 9, Fig 6).

이상에서 plasma protein에 의한 B세포, CD1, CD 11, CD44, CD45 세포 집단에 대한 항진효과는 발견 되지 않았으며, plasma protein이 특정한 N세포에 관여 한다는 것을 알 수 있었다.

Table 8. Proportion of CD1 and CD11 molecule expression on porcine blood leukocyte from piglets administered with or without plasma protein

MoAbs to porcine leukocyte antigens	Specificity of MoAbs	Proportion (%±SD)	
		Plasma protein administered (n=20)	Control* (n=20)
76-7-4	Anti-porcine CD1	8.8± 3.6	10.7± 4.5
H 20 A	Anti-porcine CD11a	87.4±11.1	91.6± 7.4
MUC 76A	Anti-porcine CD11b	94.9± 2.3	88.4±10.0

\*Control; No plasma protein administered

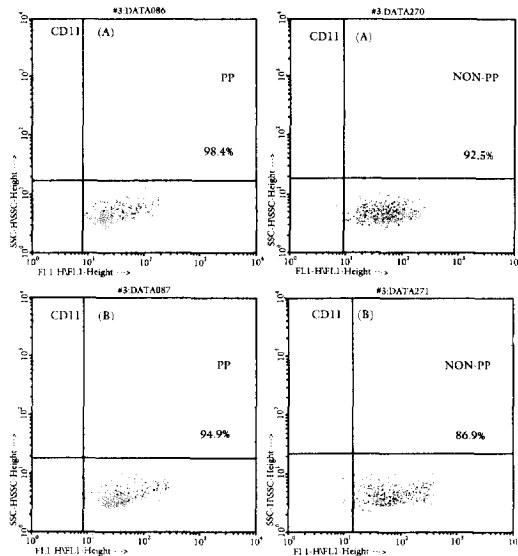


Fig 3. Representative dot plot profiles of porcine peripheral blood lymphocytes(PBL) using monoclonal antibody specifically reactive with porcine CD11 cell antigens. PP indicates PBL obtained from piglets fed plasma protein. Non-PP indicates PBL obtained from piglets fed without plasma protein.

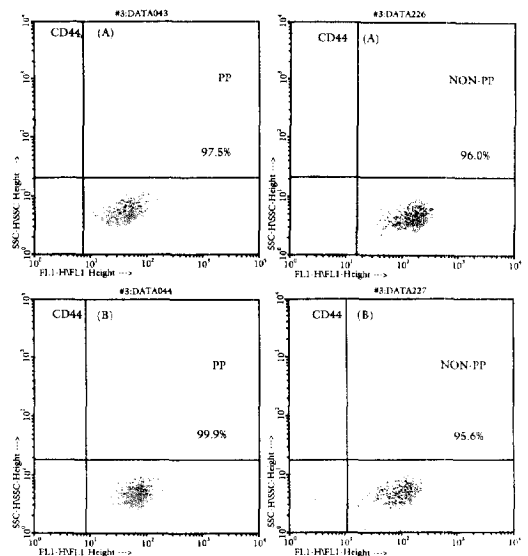
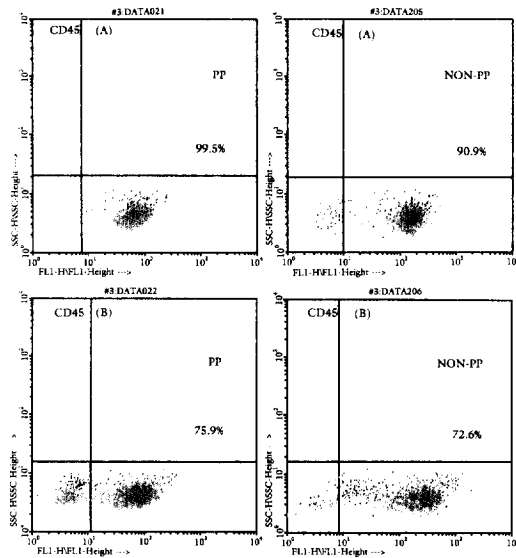


Fig 4. Representative dot plot profiles of porcine peripheral blood lymphocytes(PBL) using monoclonal antibody specifically reactive with porcine CD44 specific antigens. PP indicates PBL obtained from piglets fed plasma protein. Non-PP indicates PBL obtained from piglets fed without plasma protein.

**Table 9.** Proportion of CD44, CD45 granulocyte and monocyte specific molecule expression on porcine blood leukocyte from piglets administered with or without plasma protein

MoAbs to porcine leukocyte antigens	Specificity of MoAbs	Proportion (%±SD)	
		Plasma protein administered (n=20)	Control* (n=20)
BAT 31A	Anti-porcine CD44	97.2±1.0	95.8±1.9
BAG 40A	Anti-porcine CD44	93.7±0.9	90.0±7.7
74-9-3	Anti-porcine CD45A	99.6±0.2	97.4±2.3
MUC 13A	Anti-porcine CD45B	78.4±4.8	72.7±6.6
DH 59B	Anti-porcine granulocyte	2.7±1.0	5.8±2.3
	Anti-porcine monocyte		

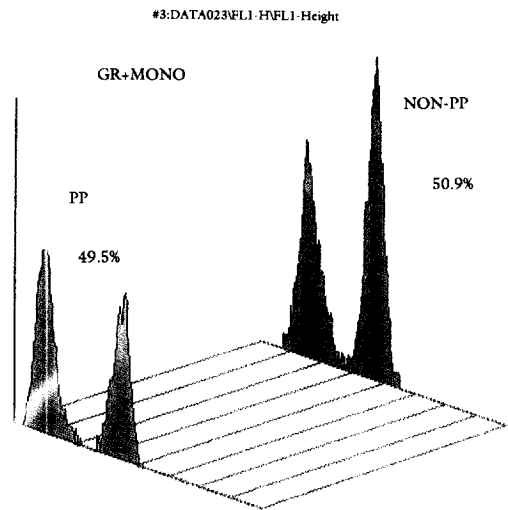
\*Control; no plasma protein administered



**Fig 5.** Representative dot plot profiles of porcine peripheral blood lymphocytes(PBL) using monoclonal antibody specifically reactive with porcine CD45 specific antigens. PP indicates PBL obtained from piglets fed plasma protein. Non-PP indicates PBL obtained from piglets fed without plasma protein.

## 고찰

단클론항체를 이용하여 여러 동물 품종간에 공통으로 존재하는 분자들을 확인하고, 잡종 품종에 있어서의 면역반응을 연구하는데 새로운 시도가 가능하게 되었으며, flow cytometry는 면역학 등 세포생물학 전반에서 사용되고 응용되는 연구방법으로, 최근의 분자생물학의 발달과 함께(fluorescence activated cell sorter; FACS) 분자생물학 영역에도 응용되어 많은 연구에 이용되고 있다.<sup>40</sup>



**Fig 6.** Representative histogram of porcine peripheral blood lymphocytes(PBL) using monoclonal antibody specifically reactive with porcine granulocytes and monocyte specific antigens. PP indicates PBL obtained from piglets fed plasma protein. Non-PP indicates PBL obtained from piglets fed without plasma protein.

혈장단백질을 prestarter feed에 8% 수준으로 첨가 하여 당 연구소 실험농장에서 plasma protein 투여군과 무투여군을 비교한 결과는, 증체량은 1.15Kg으로 나타났으며, 일일 증체량은 56% 증강되는 결과를 보였다. 또한 일일 사료섭취량도 20% 이상 증진되었으며, 사료 요구율을 조사하였던 바, 22% 향상 되었음을 알 수 있었다.

이러한 결과를 토대로 plasma protein은 이미 밝혀진 탐식세포에 의한 방어기전증강에 따른 1차 면역증진, 즉 LPS에 대한 sensitivity가 현저하게 증가될 뿐만 아니라 LBP는 TNF mRNA의 생산을 촉진한다는 사실<sup>34</sup>로



서 대사작용에도 관여하여 영양관리 및 수익성을 향상시킬 수 있는 것으로 사료되었다.

T 세포나 B 세포의 marker를 가지고 있지 않은 림프구를 null 세포라고 부르며 이 세포군에 대다수를 점유하는 NK 세포와 항체의존성 세포매개성 세포독성 (antibody dependent cellular mediated cytotoxicity: ADCC) 세포들로 구성 되어 있는데, 일부는 NK세포와 ADCC에서 killer cell과는 구별된다고 했으나 다른 한편에서는 NK와 ADCC의 두 작동 세포 (effector cells)는 같다고 했다. NK세포는 killer(K) 세포와 다르며, K 세포는 표적세포에 대하여 특이항체 없이는 K 세포로서 기능을 발휘할 수 없다. 그러나 NK세포는 항체에 관계없이 자발적인 K세포로서 기능을 한다. 또한 K 세포는 NK 세포보다 먼저 발생한다.<sup>27,28</sup> 또한 지금까지 ADCC는 오로지 시험관내의 현상으로만 연구되어 왔다. 즉 ADCC가 단지 시험관내의 시험관내 현상에 불과한 것인지 생체내에서도 적극적인 역할을 하고 있는지는 아직 확실히 밝혀지지 않았다.<sup>44</sup> Duncan et al<sup>16</sup>은 어린 돼지의 혈액에서 null세포와 NK 세포군은 대부분의 다른 동물과는 다르다고 하였으나, 아직 이 세포의 기능적인 역할과 분화기전에 대해서는 밝혀지지 않았다.

Null 세포의 분포율은 plasma protein 투여군이 20.2-24.7%, 무투여군이 12.3-13.4%로 약 7.9-11.3% 정도로 plasma protein 급여군에서 N 림프구의 활성이 높게 나타났다.

본 성적에서 plasma protein이 면역기전에 크게 관여하는 것으로 알려진 N 림프구 활성에도 매우 크게 작용하고 있다고 사료된다. 이러한 사실은 전반적인 세포성 면역이 plasma protein에 의해 항진될 수 있다는 가능성을 크게 시사해 주고 있으며, 특히 면역 중추 역할을 하는 N림프구를 특이적으로 자극시킴으로써 이루어지는 것으로 생각된다.

SIgM 양성 세포 즉 B 세포의 분포율은 plasma protein 투여군이 11.9/13.3%이며, 무 투여군은 14.3/17.2%로 양자의 유의차는 없는 것으로 나타났다. 이것은 Binns et al<sup>7</sup>의 보고한 28.2% 및 Pescovitz et al<sup>42</sup>의 20-36% 보다는 낮았지만 Paul et al<sup>11</sup>의 9.5%, Licence와 Binns<sup>31</sup>의 8.4%, Outteridge et al<sup>37</sup>의 8.7%, Buschmann과 Pawlas<sup>10,11</sup>의 9.9~11.0%, Binns와 Licence<sup>4</sup>의 9.1%보다는 높았으며 Davis et al<sup>15</sup>의 10-17%, Lewin et al<sup>30</sup>의 15.0%, Binns et al<sup>5</sup>이 16.3% 및 Johnson et al<sup>25</sup>의 15.5%의 보고와는 비슷한 성적을 보였다. 다른 동물에서 MacKay<sup>32</sup>가 소는 35%, 면양은 25%, Lewin et al<sup>50</sup>의 말은 18.8%, Organ et al<sup>36</sup>이 랫드

는 19%의 성적보다는 낮은 수준을 보였으나 Outteridge et al<sup>38</sup>이 면양은 16.6%라고 보고한 성적과는 비슷하였다.

CD1 양성세포 분포율은 plasma protein 투여군과 무 투여군을 비교했을 때 각각 8.8%, 10.7%로 PP 투여군에서의 발현율은 증가되지 않았다. 또한 이 성적은 Pescovitz et al<sup>42</sup>과 Hwang et al<sup>24</sup>의 성적과 유사하였다.

CD11 양성세포 분포율은 plasma protein 투여군과 무투여군 비교시 87.4/91.6%(H2OA)와 94.9/88.4%(MUC 76A)이었다. 또한 CD44 양성세포 분포율은 plasma protein투여군에서는 93.7-97.2%이며 무투여군에서는 90.0-95.8%로 각각 조사되었다.

CD45 양성세포 분포율은 plasma protein 투여군과 무투여군을 비교하면 99.6/97.4% 및 78.4/72.7%이었으며, 마찬가지로 granulocyte/monocyte의 양성세포 분포율은 plasma protein 투여군과 무투여군 비교시 백혈구중 49.5/50.9%로 나타났다. 그러므로 plasma protein 급여에 의한 sIgM CD11, CD44, CD45, granulocyte/monocyte의 양성세포 분포율은 무투여군과 비교하면 이 세포집단에 대한 항진효과는 발견되지 않았다. 이러한 사실로 보아 plasma protein이 세포의 adhesion molecule 항진등에는 크게 작용하지 않으며, 앞서 기술한 바와 같이 plasma protein이 특정한 세포에 관여하여 세포성 면역조절 기능에 참여하고 있다는 사실을 재삼 확인할 수 있었다.

만약 LPS가 입자 (particle)로 존재한다면 세균 또는 LPS로 피복된 RBC는 macrophage 표면에 부착되어 있는 opsonin 축진 입자의 역할을 하는 LPS-binding protein(LBP)과 결합하게 된다. 즉 LBP가 있으면 macrophage에 대한 강력한 자극을 유도하는 LPS의 기능을 좀더 강화시키므로써 cytokine생산을 초래하게 되는 것이다. 아울러 LBP의 존재하에서 LPS에 대한 macrophage의 stimulation의 증가력은 LPS-LBP에 대한 receptor인 cluster determinants인 CD14에 달려 있다고 밝혀졌다.<sup>22,52</sup> 이런 까닭에 Mathison et al<sup>11</sup>은 LPS의 lipid A 부분은 macrophage stimulation을 위해 LBP 의존 경로를 요구한다. 그래서 혈장단백질 즉 LBP의 첨가는 LPS에 대한 sensitivity가 현저하게 증가하며 아울러 LBP는 TNF(tumor necrosis factor) mRNA의 출현율과 안정성 두가지 모두 증가된다고 보고하였다.

본 연구에서는 특히 면역체계의 중심적인 역할을 하는 N림프구를 특이적으로 자극시킴으로써 plasma protein이 특정한 세포에 관여하여 세포성 면역조절 기능에 참여하고 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

## 결 론

어린 돼지의 입불임사료에 항병력 목적으로 많이 사용되는 비특이 면역증강제 중의 하나인 혈장단백질(plasma protein; pp)의 효과를 림프구 표면항원에 특이적으로 반응하는 단클론항체(monoclonal antibody; MoAb)를 이용하여 조사하였다. 돼지 40두(암수 각각 20두)를 30일간 공시한 후 혈액에서 분리한 림프구와 7종의 돼지 림프구 표면항원 특이 단클론항체와 반응시킨 결과를 flow cytometry로 검사하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 10일간 plasma protein 투여군과 무투여군을 비교 시 일일 증체효과는 56% 개선되었으며 또한 일일 사료 섭취량은 20% 증진 및 사료요구율이 22% 향상 되었다.

2. N(non T/non B) 세포의 분포율은 plasma protein 투여군이 20.2~24.7% 인 반면에 무투여군에서는 12.3~13.4%의 수준으로 투여군에서 7.9~10.3% 이상 N 세포에 대한 높은 발현현상이 관찰되었다.

3. B 세포의 양성 분포율은 plasma protein 투여군이 11.9~13.3%, 무투여군이 14.3~17.2% 였으며 CD1 세포의 분포율은 투여군이 8.8%, 무 투여군이 10.7%로 B 세포와 CD1 세포의 증강효과는 관찰할 수 없었다.

4. CD11 양성 분포율은 plasma protein 투여군이 87.4~94.9%, 무투여군이 88.4~91.6% 였으며 CD44 세포의 분포율은 투여군에서 93.7~97.2% 무투여군이 90.0~95.8%의 양성반응을 보여 양자의 유의성 차이는 없는 것으로 나타났다.

5. CD45 A, B 양성세포 분포율은 plasma protein 투여군과 무투여군을 비교하면 각각 99.6/97.4% 및 78.4/72.7% 였으며, 마찬가지로 granulocyte/monocyte 세포 분포율은 백혈구 중 각각 49.5/50.9%를 림프구중 2.7/5.8% 분포율을 나타내어 양자의 발현을 차이는 관찰할 수 없었다.

## 참 고 문 헌

1. Baldwin CL, Morrison WI, Nessens J. Differentiation antigens and functional characteristics of bovine leukocyte. In *Differentiation antigens in lymphopoietic tissue* (eds M Miyasaka and E Trnka), New York: Marcel Dekker Inc. 1988; 455-469.
2. Binns RM. Organization of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. *Vet Immunol Immunopathol* 1982; 3:95-146.

3. Binns RM. Sheep erythrocyte rosettes in the pig, cattle and goats demonstrated in the presence of dextran. *J Immunol Methods* 1978; 21:197-210.
4. Binns RM, Licence ST. A major subpopulation of Fc receptor-bearing lymphocytes revealed by rosette formation in dextran media : Studies of pig, sheep and rat lymphocytes. *J Immunol Methods* 1981; 43: 153-162.
5. Binns RM, Licence ST, Symons DBA, et al. Comparison of direct antiglobulin rosetting reaction (DARR) and direct immunofluorescence(DIF) for demonstration of sIg-bearing lymphocytes in pigs, sheep and cattle. *Immunology* 1979a;36:549-555.
6. Binns RM, Pabst R. Lymphoid cell migration and homing in the young pig: Alternative immune mechanisms in action. In *Migration and homing of lymphoid cells* (ed. A. J. husband). Boca Raton, FL: CRC Press Inc. 1988; 2:137.
7. Binns RM, Pabst R, Licence ST. Subpopulations of T lymphocytes emigrating in venous blood draining pig thymus labelled in vivo with fluorochrome. *Immunology* 1988; 68:261-267.
8. Binns RM, Pallares V, Symons DBA, et al. Effect of thymectomy on lymphocyte subpopulation in the pig. Demonstration of a thymus-dependent 'null' cell. *Int Archs Allergy Appl Immunology* 1977; 55: 96-101.
9. Binns RM, Vaiman M, Davies HS, et al. Characterization of pig lymphocyte subpopulations by adherence to nylon wool. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1979b; 58:128-134.
10. Buschman H, Pawlas S. A study of porcine lymphocyte populations I. Separation of porcine lymphocyte subpopulations. *Vet Immunol Immunopathol* 1980a; 1:215-224.
11. Buschman H, Pawlas S. A study of porcine lymphocyte populations. II Characterization of porcine lymphocyte populations. *Vet Immunol Immunopathol* 1980b; 1:225-241.
12. Cantor H, Boyse EA. Functional subclass of T lymphocytes bearing different Ly antigens. *J Exp Med* 1975; 141:1376-1389.
13. Chung KS, Lillehoj HS. Development and functional characterization of monoclonal antibodies recognizing chicken lymphocytes with natural killer

- cell activity. *Vet Immunol Immunopathol* 1991; 28: 351-363.
14. Davis WC, Hamilton MJ, Park YH, et al. Ruminant leukocyte differentiation molecules. *Monographs in animal Immunol*. 1990; 1:47-70.
  15. Davis WC, Marusic S, Lewin HA, et al. The development and analysis of species specific and cross reactive monoclonal antibodies to leukocyte differentiation antigens and antigens of the major histocompatibility complex for use in the study of the immune system in cattle and other species. *Vet Immunol Immunopathol* 1991; 28:327-335.
  16. Duncan IA, Binns RM, Duffus WPH. The null T cell in pig blood is not a NK cell. *Immunology* 1989; 68:392-395.
  17. Escajadillo C, Binns RM. Rosette formation with sheep erythrocytes. -A possible T-cell marker in the pig. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1975a; 48: 261-275.
  18. Escajadillo C, Binns RM. Rosette formation of pig T lymphocytes with sheep erythrocytes. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1975b; 49:325-331.
  19. Giegerich GW, Hein WR, Miyasaka M, et al. Restricted expression of CD2 among subsets of sheep thymocytes and T lymphocytes. *Immunology* 1989; 66:354-361.
  20. Gorman J, Hunkapiller T, Hood L. A speculative view of the multicomponent nature of T cell antigen recognition. *Cell* 1986; 45:475-484.
  21. Hammerberg C, Schurig GG. Characterization of monoclonal antibodies directed against swine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 1986; 11:107-121.
  22. Haziot A, Chen S, Ferrero E, et al. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol* 1988; 141:547-552.
  23. Hirt H, Saalmüller A, Reddchase MJ. Distinct  $\gamma\delta$  T cell receptors define two subsets of circulating porcine CD2 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1990; 20:265-269.
  24. Hwang EK, Lim CH, Davis WC. Subpopulation of lymphocytes in blood and lymphoid organs of pigs 1. Proportion of lymphocyte subpopulations in blood, spleen, mesenteric and mandibular lymphnodes, and tonsils. *RDA J Agri Sci* 1993a; 35(1): 691-701.
  25. Johnson HJr, Lunney JK, Sachs DH, et al. Preparation and characterization of an antiserum specific for T cells of pigs. *Transplantation* 1980; 29:477-483.
  26. Joho R, Notfenburg C, Coffman RL, et al. Immunoglobulin gene rearrangement and expression during lymphocyte development. In *Current Topics in Developmental Biology Vol. 18*. A. A. Moscona and A. Monroy, eds, New York: Academic press, 1986; 1811-1815pp.
  27. Kim YB, Ichimura O. Porcine natural Killer (NK)/killer (K) cells system. In M. E. Tumbleson ed. *The swine in Biomedical Research* New York: Plenum press 1986; 1811-1815pp.
  28. Koren HS, Amos DB, Kim YB. Natural Killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity are independent immune functions in the Minnesota miniature swine. *Porc Natl Acad Sci USA* 1978; 75:5127-5131.
  29. Koyama H, Tsunemi E, Hohdatsu T. Preparation and characterization of a monoclonal antibody against bovine T cell surface antigen associated with the bovine homologue of CD2. *J Vet Med Sci* 1991; 53:153-157.
  30. Lewin HA, Calvert CC, Bernoco D. Cross-reactivity of a monoclonal antibody with bovine, equine, ovine and porcine peripheral blood B lymphocytes. *Am J Vet Res* 1985; 46:785-788.
  31. Licence ST, Binns RM. Analysis of a sheep anti-pig T lymphoblast serum with specificity for E rosette-forming lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 1984; 7:255-273.
  32. Mackay C. Sheep leukocyte molecules : A review of their distribution, structure and possible function. *Vet Immunol Immunopathol* 1988; 19:1-20.
  33. Mackay CR, Maddox JF, Wijffels GL, et al. Characterization of a 95,000 molecule on sheep leukocytes homologous to murine Pgp-1 and human CD44. *Immunology* 1988b; 65:93-99.
  34. Mathison JC, Tobias PS, Wolfson E, et al. Plasma lipopolysaccharide(LPS)-binding protein. A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. *J Immunol* 1992; 149:208-206.

35. Nickerson SC, Shapiro RP, Guidry AJ, et al. Production of monoclonal antibodies to bovine leukocyte cell surface components. *J Dairy Sci* 1983; 66:1547-1558.
36. Organ BC, Antonacci AC, Chiao J, et al. Changes in lymphocyte number and phenotype in seven lymphoid compartments after thermal injury. *Ann Surg* 1989; 210:78-89.
37. Outteridge PM, Binns RM, Licence ST. Subpopulations of pig blood E-rosette-forming lymphocytes and thymus-dependent null cells : Separation by nylon wool columns, rosette formation and macrophage-dependent mitogen and antigen responsiveness. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1982; 67:18-24.
38. Outteridge PM, Licence ST, Binns RM. Characterization of lymphocyte subpopulations in sheep by rosette formation, adherence to nylon wool and mitogen responsiveness. *Vet Immunol Immunopathol* 1981; 2:3-18.
39. Parker DC. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:331-360.
40. Park DR, Herzenberg LA. *Flow cytometry and fluorescence-activated cell sorting. Fundamental Immunol*. 2nd eds. New York:Raven Press Ltd. 1989; 29: 781.
41. Paul PS, van Deusen RA, Mengeling WL. Monoclonal precipitating antibodies to porcine immunoglobulin M. *Vet Immunol Immunopathol* 1985; 8: 311-328.
42. Pescovitz MD, Lunney JK, Sachs DH. Preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J Immunol* 1984; 133:368-375.
43. Raybould TJG, Willson PJ, McDougall LJ, et al. A porcine-murine hybridoma that secretes porcine monoclonal antibody of defined specificity. *Am J Vet Res* 1985; 46:1768-1769.
44. Roitt IM. *Essential Immunology* (6th ed.) In *Hypersensitivity*. Osney Mead, Oxford London England. Blackwell Scientific Publications. 1988; 200-203pp.
45. Salmon H. Surface markers of porcine lymphocytes and distribution in various lymphoid organs, *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1979; 60:262-274.
46. SAS: *SAS User's Guide; Statistics*, Cary, Nc: SAS Inst. Inc, 1985.
47. Sharp JG, Course DA, Purtilo DT. Ontogeny and regulation of the immune system. *Arch Pathol Lab Med* 1987; 111:1106-1113.
48. Tobias RS, Soldau K, Ulevitch RJ. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J Biol Chem* 1989; 264:10807.
49. Tonegawa S. The molecules of the immune system. *Sci Am* 1985; 253:122-131.
50. Van der Valk P, Herman CJ. Biology of disease. Leukocyte functions. *Lab Invest*. 1987; 57:127-137.
51. Westermann J, Pabst R. Lymphocyte subsets in the blood : A diagnostic window on the lymphoid system? *Immunol Today* 1990; 11:406-410.
52. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide(LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249:1431-1433.
53. Zola, H. The surface antigens of human B lymphocytes. *Immunol Today* 1987; 8:308-315.