

## 건유기 유방염 감염우의 유방내 면역저하요인 규명에 관한 연구

### I. 유방염 감염우와 정상우의 말초혈액 및 유즙내 림프구 아집단 분포율 비교

신동백 · 박용호\* · 남향미\*\* · 문진산\*\* · 주이석\*\* · 신종욱

경상대학교 수의과대학 · 서울대학교 수의과대학\*

수의과학연구소\*\*

(1996년 2월 6일 접수)

## Characterization of immunosuppressive factors in the mastitis-infected mammary gland of non-lactating cows

### I. Comparison of proportion of lymphocyte subpopulations from peripheral blood and mammary gland secretions of normal healthy cows and mastitic cows

Dong-baek Shin, Yong-ho Park\*, Hyang-mi Nam\*\*, Jin-san Moon\*\*

Yi-seok Joo\*\*, Jong-uk Shin

*College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University*

*College of Veterinary Medicine, Seoul National University\* · National Veterinary Research Institute\*\**

(Received Feb 6, 1996)

**Abstract** : To establish the effective ways to prevent bovine mastitis, the study has been performed to investigate the attributable factors causing down-regulation of immune responses in mammary gland of non-lactating cows. Lymphocytes from peripheral blood and mammary gland secretions(MGS) were obtained from normal healthy cows and mastitic cows, respectively. Cellular immune responses were examined by comparison of proportion of lymphocyte subpopulations using a set of monoclonal antibodies and flow cytometry.

The results obtained are as follows.

1. Proportions of peripheral blood lymphocyte subpopulations expressing BoCD2 and BoCD4 molecules were 32.9%, 15.4% in mastitic cows and 43.3%, 28.3% in normal healthy cows, respectively. The ratios of BoCD4 to BoCD8 were 0.76 and 1.47, respectively.

2. Proportions of mammary gland lymphocyte subpopulations expressing BoCD2 and BoCD4 molecules were 18.5%, 8.3% in mastitic cows and 38.2%, 14.2% in normal healthy cows, respectively. The ratios of BoCD4 to BoCD8 were 0.6 and 2.0, respectively.

3. Proportions of T lymphocyte subpopulations from MGS were significantly lower than those from peripheral blood both in mastitic cows and normal healthy cows. However,

lymphocyte subpopulations expressing ACT2 and ACT3, which represent activated T suppressor cells, were significantly higher in MGS than those in peripheral blood.

**Key words :** non-lactating cow, mastitis, lymphocyte subpopulations.

## 서 론

젖소의 유방염은 낙농산업에 있어서 유량 감소와 유질의 저하를 나타내는 가장 복잡하고 비용이 많이 드는 질병으로서<sup>1</sup>, 원유 품질 관리는 명백히 유방염과 체세포수의 관리에 달려 있다.

통상 60일 정도의 건유기간 중 처음 2주 동안과 마지막 2주 동안 즉, 소의 유선이 비유기에서 퇴축기로 그리고 퇴축기에서 초유생성기로 생리적 이행을 하는 시기 중에 병원체 감염에 대한 감수성이 가장 높아서<sup>2-6</sup> 이 시기에 새롭게 발생하는 유방내 감염율(new infection rate)은 다른 시기보다도 7배 이상 높은 것으로 나타났다<sup>7</sup>. 건유기 젖소 유방의 병원체에 대한 높은 감수성은 이 기간 중에 관찰되는 여러가지 요인들에 의한 면역저하 상태와 매우 상관성이 높다<sup>7-10</sup>.

면역시스템은 질병 저항성에 영향을 주는 가장 중요한 체계로서 최근의 유방염 연구는 말초혈액 및 유선내에 국소적으로 작용하는 비특이적 또는 특이적인 숙주 방어기전 양자에 대한 깊이 있는 연구들이 이루어지고 있다<sup>11-14</sup>. 유선의 특이적 면역기전인 림프구는 림포카인과 항체를 분비하는 등 체액 및 세포성 면역 전반에 걸쳐 유선방어에 중대한 역할을 담당한다. 형태적으로는 구별이 어렵지만 기능적으로는 현저한 차이를 나타내는 일련의 세포아집단으로 구성되는 림프구의 수나 기능은 유선과 생체 전신 양측의 생리적 및 병리적 상태에 의해 영향을 받는데<sup>15</sup>, 많은 연구자들이 생리적 이행기 중의 림프구 기능 감소 즉, mitogen<sup>16</sup>이나 병원체<sup>17</sup>에 대한 림프구의 증식반응<sup>18,19</sup> 및 림프계 세포수의 감소<sup>20</sup> 등을 보고한 바 있다. 또한 비유단계별 혈액 및 유즙내 림프구 아집단 구성을 조사했던 보고에 의하면 유선 분비물내 림프구 아집단 구성도 비유단계에 따라 변화할 수 있으며 이러한 변화가 감염에 대한 유선 감수성의 변화와 상관이 있을 수 있다<sup>21</sup>.

한편 유선의 국소성 세포면역 기능은 말초혈액에서 보다 저하된다. 그 이유로는 유선분비물은 많은 수의 림프계

세포들을 보유하는데 여러가지 항원에 대한 림프구의 증식반응이 동일개체의 말초혈액 림프구에 비해 저조하다<sup>22</sup>. 뿐만 아니라 건강한 젖소에서 유선분비물내에는 독특한 면역억제 T림프구인 활성화된 CD8\*가 존재하며, 이렇게 활성화된 CD8\*세포 집단이 유선내의 면역증가 T림프구인 CD4\*의 mitogen이나 특이항원의 자극에 대한 증식반응을 억제시킨다는 림프구 아집단 구성에 따른 유선의 면역저하 기전도 보고된 바 있다<sup>23</sup>.

림프구는 혈액을 이동경로로 하여 끊임없이 림프기관과 림프조직을 출입하기 때문에 혈액내 림프구 아집단의 조사는 전체적으로 그 개체 림프계에 관한 정보를 얻어낼 수 있다. 실질적으로 최근 수년간 여러가지 질병을 앓고 있는 사람의 혈액에서 림프구 아집단의 변화 정도가 조사되어 왔으며, 많은 질병상태에서 변화조건들이 보고된 바 있다<sup>24</sup>. 최근에는 소의 백혈구 세포 표면 분자에 특이적인 단클론항체가 개발되어 소의 단핵백혈구 집단을 표현형적으로 그리고 보다 광범위하게 특징을 규명하는데 있어 flow cytometry를 이용할 수 있게 되었다<sup>25,26</sup>.

건유기 치료와 유두침지소독에도 불구하고 유방염은 여전히 세계적으로 문제가 되고 있다. 유방염 방제를 위해서는 유방감염에 감수성이 가장 높은 시기 중에 유선의 자연적 방어인자들을 조절하여 안전하게 면역기능을 증강 시킴으로써 자발적 치유율을 높이고 유선의 병원체 방어능을 강화시키는 것이 이상적이며<sup>27</sup>, 이를 위해서는 건유기 유방 면역기전 저하요인을 규명하려는 다각적인 연구가 필수적으로 선행되어야 할 것이다.

본 실험은 건유기 유방면역 저하요인을 규명하기 위한 일련의 연구로서 먼저 정상우와 유방염 감염우의 말초혈액과 유즙내 백혈구 아집단의 분포율을 조사 비교하였다.

## 재료 및 방법

대상동물 및 시료채취 : 95년 1월에서 8월 사이에 경기도내 대단위 목장의 젖소 40여두를 무작위적으로 선발하여 비유단계 및 산차 등을 파악하고 착유전 혼합유를 무

균적으로 채취하여 체세포수 및 세균학적 검사를 실시하였다. 동시에 미정맥에서 채취한 말초혈액을 heparin이 함유된 시험관에 주입하여 총백혈구수와 백혈구 감별계수를 측정하였다. 이러한 우유중의 체세포수와 세균검사 및 혈액검사소견을 근거로 유방염 감염우와 비감염우를 구분하였고, 개체별 우유와 혈액을 이용하여 림프구를 분리하였다.

**우유검사 ;**

가. 체세포수 검사 : 멸균된 시험관에 무균적으로 우유시료를 채취하여 냉장온반한 다음, Somacount 300(Bentley Co. Minnesota, USA)기기를 이용하여 체세포수를 측정하였다.

나. 세균학적 검사 : 우유시료를 5% 면양혈액 한천배지 및 MacConkey agar에 심고 37℃에서 24~48시간 배양후 균 집락의 성장과 용혈성 및 그람염색소견 등에 의해 1차적으로 균을 선별한 다음, 분리된 균의 동정은 Cowan<sup>28</sup>의 방법에 준하였다.

혈액검사 : 미정맥에서 무균적으로 채취한 혈액의 총백혈구수를 blood cell counter(system-9018 ; Serono)를 사용하여 조사하였다. 백혈구 감별계수는 혈액을 slide glass에 도말하여 methanol로 5분간 고정한 뒤 30분간 Giemsa 염색하여 현미경하에서 조사하였다.

**혈액 및 유즙에서의 림프구 아집단 분포율 조사 ;**

가. 혈액중의 림프구 분리 : 말초혈액 백혈구의 분리는 Davis 등<sup>29</sup>의 방법으로 실시하였다. 즉, 미정맥으로부터 채취한 혈액과 항응고제인 acid citrate dextrose(ACD ; sodium citrate 22.0gm, citric acid 7.3gm, dextrose 24.5gm, D.W 1,000ml)용액을 3:1의 비율로 혼합하여 잘 섞은 다음, 1,500rpm에서 30분간 원심분리하였다. Buffy coat층을 채취한 후 37℃로 가온한 0.87% tris-buffered ammonium chloride(tris-NH<sub>4</sub>Cl ; 0.01M tris, pH 7.2)용액과 혼합하여 37℃ 항온수조에 넣어 약 5분간 적혈구를 용혈시켰다. 다시 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 버린후 pellet을 phosphate buffered saline(PBS ; sodium chloride 7.6gm, disodium phosphate 1.2688g, monosodium phosphate 0.1g, monopotassium phosphate 0.2113g, pH 7.2)과 ACD용액을 9:1로 혼합한 PBS-ACD buffer로 2회 정도 원심 세척하였다. 마지막 원심후 pellet은 RPMI 1640(Sigma) 배지에 부유시킨 뒤 Histopaque(비중 1.083, Sigma)에 중층시킨 후 1,500rpm으로 20분간 원심 분리한 다음, Histopaque과 혈장과의 경계면에서 림프구를 채취하였다. 분리

된 림프구는 PBS로 3회 세척하여 PBS에 부유시킨 다음, tryphan blue 염색하여 생존 세포수를 측정후 후 최종농도를 1×10<sup>7</sup>/ml 정도로 조절하여 실험에 이용하였다.

나. 유즙중의 림프구 분리 : Park 등<sup>21</sup>의 방법에 따라 우유시료 약 200ml(건유기간에는 25-40ml)의 분비율을 20%의 ACD 및 20mM의 EDTA를 함유하고 있는 PBS(PAE, pH 7.2)와 동량으로 혼합하여 15℃, 400×g에 30분간 원심시켰다. Cell pellet은 50ml의 원심튜브에 PAE로 원심 세척한 다음, 혈액에서의 마찬가지로 Histopaque(비중 1.083, Sigma)을 이용해 림프구를 분리한 다음, PAE로 여러차례 세척한 후 RPMI 1640 배지에 부유시켰다.

다. 림프구 아집단 검사용 단클론항체 : 미국 워싱턴 주 림대학교 수의과대학 단클론항체 센터로부터 분양받은 anti-T cell, anti-B cell, anti-N cell 단클론항체와, 식물성 유래의 Concanavalin A(Con A) mitogen의 자극에 의해서 활성화된 세포(activated cell; ACT)에 특이적으로 반응하는 단클론항체인 anti-ACT2 등 총 7종을 실험에 사용하였다(Table 1).

**Table 1. Monoclonal antibodies specific to bovine leukocyte differentiation molecules used to define the composition of leukocyte subpopulations from peripheral blood and mammary gland secretions**

Molecules <sup>1</sup>	MAB <sup>2</sup>	Isotype of MAB	Cell type <sup>3</sup>
BoCD2	BAQ95A	IgG <sub>1</sub>	T
BoCD4	CACT138A	IgG <sub>1</sub>	T helper, inducer
BoCD8	CACT80C	IgG <sub>1</sub>	T cytotoxic, suppressor
surface IgM	PIG45A	IgG <sub>1</sub>	B
N12	CACT61A	IgG <sub>2b</sub>	nonT/nonB
ACT2	CACT26A	IgG <sub>1</sub>	N and activated BoCD8
ACT3	CACT114A	IgG <sub>2b</sub>	N and activated BoCD4

1 Molecules = Bovine leukocyte differentiation molecules.  
 2 MAB = Monoclonal antibodies which specifically react with leukocyte differentiation antigen.  
 3 Cell type = Cells expressing molecules.

라. 형광세포 유출장치 분석(flow cytometry analysis) : 림프구 아집단별 분포율 분석은 Davis 등<sup>30</sup>의 방법에 준해서 flow cytometry를 이용하여 실시하였다. 즉, conical bottom microplate의 한 well당 각 단클론항체 50μl (15μg/ml)를 단일염색을 위해서는 1종만 넣고 이중염색을

위해서는 2종을 함께 미리 넣은 다음, 혈액 또는 유즙에서 분리한  $1 \times 10^7$ /ml의 림프구 100 $\mu$ 씩을 첨가한 후 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 잠작시켰다. 이어서 4 $^{\circ}$ C의 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)로 3회 원심(2,000 rpm, 3분, 4 $^{\circ}$ C) 세척한 후, 상청액을 버리고 침전된 림프구 세포덩어리를 plate shaker 또는 vortex mixer로 흔들어 와해시켰다.

와해된 림프구를 secondary antibody를 이용하여 단일 염색을 하였다. Fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG+IgM antibody(Caltag Lab Inc, San Francisco)를 200배 희석한 후 각 well에 100 $\mu$ 씩 첨가하고, 이중염색을 위하여는 각각 사용된 단클론항체의 Ig isotype와 일치하는 FITC 또는 R-phycoerytherin(PE)-conjugated goat anti-mouse isotype-specific antibodies(IgM, IgG1, IgG2a 또는 IgG2b;Caltag Lab., Inc)를 약 150배로 희석한 후 각각 50 $\mu$ /well 되게 가하였다. 이를 다시 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 잠작시킨 다음, 4 $^{\circ}$ C의 secondary washing buffer (first washing buffer 성분중 horse serum만 제거한 것)로 3회 원심세척하였다. 2% PBS-formalin(38% formalin 20ml, PBS 980ml)용액을 200 $\mu$ /well 되게 가하여 고정시킨 후 염색이 끝난 세포들은 검사할 때까지 모두 냉암소(4 $^{\circ}$ C)에 보관하였다.

염색이 완료된 시료는 flow cytometry를 이용하여 총 2,000개 이상의 세포를 검사하여 양성반응 세포수를 측정하였다. 측정과 자료분석은 Becton Dickinson사의 Consort 32 컴퓨터 및 Lysys II program을 이용하여 실시하였다.

통계분석 : 통계분석은 Student's test(unpaired t-statistic)를 이용하였다.

## 결 과

젖소 혼합유의 체세포수에 따른 말초혈액의 백혈구 소견 : 총 41마리에 대한 개체별 우유내 체세포수에 따르는 말초혈액의 백혈구수는 Table 2에 나타낸 바와 같다. 평균 백혈구수는 체세포수 25만 이하인 그룹이 9.0으로 가장 낮았으며 100만 이상인 그룹이 16.1로서 가장 높게 나타났다. 대체적으로 체세포수가 50만 이하인 그룹에서의 백혈구수는 10.4 이하로서 정상 범위내에 들었으나 체세포수가 50만을 넘어서는 경우엔 백혈구수가 정상범위를 훨씬 벗어난 수치로 일관성 있게 증가된 소견을 보였다.

백혈구 감별계수의 검사결과는 체세포수 25만 이하인 그룹에서는 정상적인 젖소의 백혈구상을 나타냈던 반면 25만을 넘어가는 그룹부터는 유약 호중구의 수가 점차 증가되면서 림프구가 주를 이루는 단핵 백혈구의 숫자는 반대로 점차 줄어들어 100만 이상인 그룹에서의 호중구:림프구 비율은 6:3 정도로 정상우의 백혈구상과는 반대소견을 나타냈으며 나머지 두 그룹도 이와 유사한 경향을 보였다.

유방염 감염우와 비감염우의 말초혈액 및 유즙에서의 림프구 아집단 분포율 ;

가. 말초혈액내 림프구 아집단 분포율 : 우유 체세포수와 세균학적 검사 및 혈액학적 소견을 근거로 유방염 감염여부를 판정하여 유방염 감염우와 비감염우로 분류한 젖소 각 6마리에 대한 혈액내 림프구의 아집단 분포율을 flow cytometry를 이용하여 검사한 결과는 Table 3과 같다.

본 실험에서 유방염 감염우와 비감염우의 말초혈액내 림프구 아집단의 분포율은 T 림프구를 나타내는 BoCD2 양성발현 세포의 경우 비감염우가 43.3%, 감염우가 32.9%였으며, T helper cell을 나타내는 BoCD4 molecule의 경우는 비감염우가 28.3%, 감염우는 15.4%로서 두 그룹간에 가장 큰 차이를 보였다. T cytotoxic/suppressor cell을 나타내는 BoCD8 molecule은 비감염우가 19.1%, 감염우가 20.2%로 거의 비슷한 수치를 보였지만 결과적으로 CD4/CD8 ratio는 비감염우가 1.47로 감염우의 0.76에 비해 거의 두배정도 더 높게 나타났다.

성숙 B세포가 발현하는 sIgM에 대해서는 비감염우가 28.1%, 감염우가 32.9%로서 T 세포와는 반대소견을 나타냈으나, N(nonT/nonB)세포의 경우는 비감염우가 7.6%로서 4.1%를 나타낸 감염우에 비해 더 높은 수치를 보였다.

한편 활성화된 BoCD4 아집단만이 표출하는 ACT3 molecule에 대해서는 비감염우와 감염우에서 각각 5.3%, 3.3%로 나타났고, 활성화된 모든 N세포와 BoCD8세포 아집단에 표출되는 ACT2 molecule의 경우 비감염우와 감염우가 각각 4.0%, 5.2%를 나타내므로 양자가 서로 비슷하였다.

나. 유즙내 림프구 아집단 분포율 : 유방염 감염우와 비감염우의 유즙에서 림프구를 분리하여 말초혈액에서와 같은 방법으로 아집단 분포율을 조사한 결과는 Table 4와 같다. 대체적으로 유방염 감염우와 비감염우의 유즙내 림프구 아집단 분포율은 특히 T 림프구의 경우 혈액에서의 소견보다 더 확연한 차이를 나타내었다. BoCD2, BoCD4

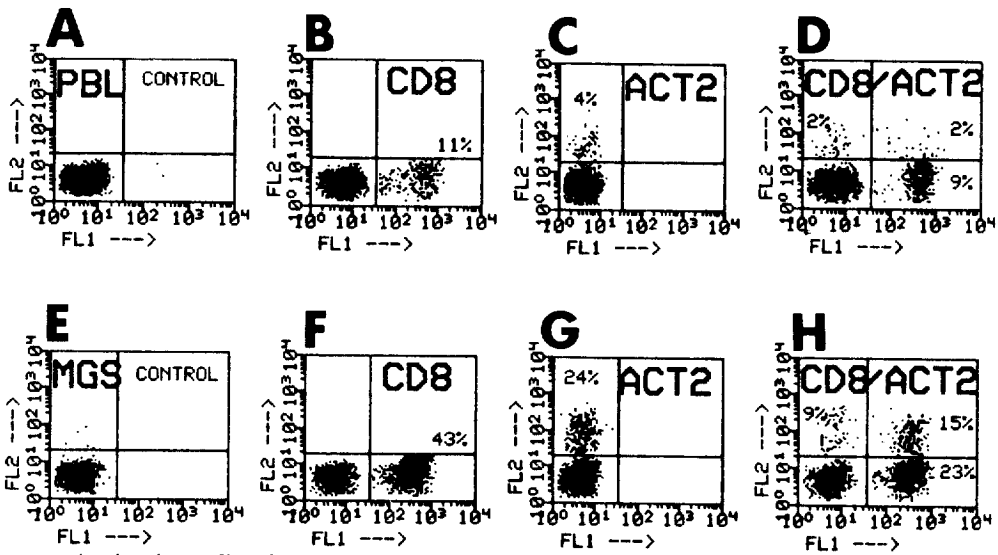


Fig 1. Representative dot plot profiles of lymphocytes from peripheral blood and mammary gland secretions labeled with one or two monoclonal antibodies specific to bovine CD8 or ACT2 molecules. FL1:green fluorescence, specific for fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-mouse Ig isotype, FL2:red fluorescence, specific for phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse Ig isotype. The upper four profiles were obtained with peripheral blood mononuclear cell of healthy cows(PBL). The lower four profiles were obtained from mammary gland mononuclear cell of healthy cows(MGS).

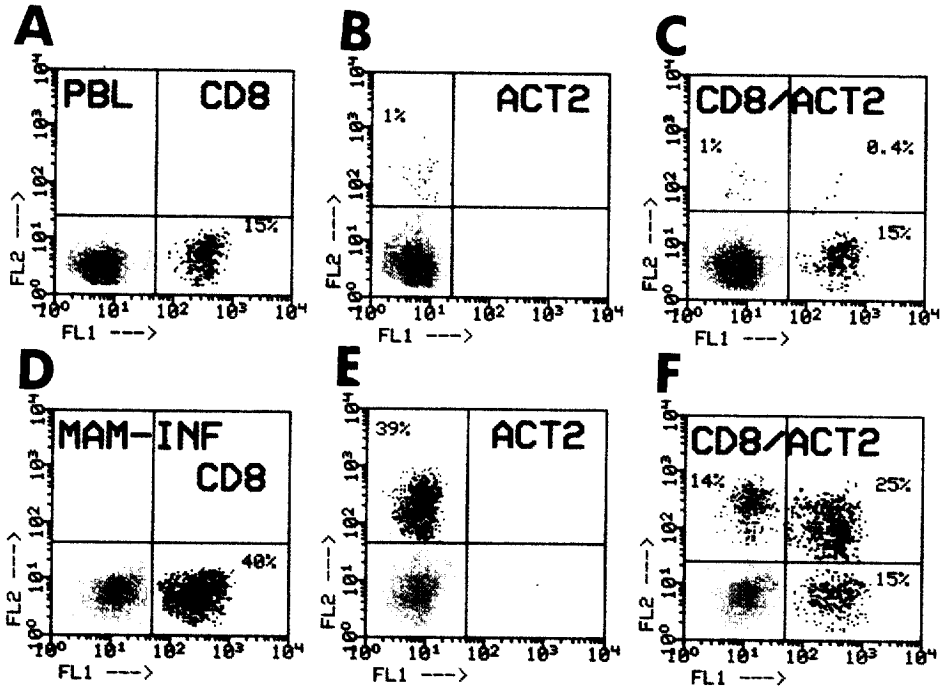


Fig 2. Representative dot plot profiles of lymphocytes from peripheral blood and mammary gland secretions labeled with one or two monoclonal antibodies specific to bovine CD8 or ACT2 molecules. FL1:green fluorescence, specific for fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated goat anti-mouse Ig isotype, FL2:red fluorescence, specific for phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse Ig isotype. The upper three profiles were obtained with peripheral blood mononuclear cell of *S. aureus*-infected cows(PBL). The lower three profiles were obtained from mammary gland mononuclear cell of *S. aureus*-infected cows(MGS-INF).

및 BoCD8 molecule의 발현율은 비감염우의 경우가 각각 38.2%, 14.2% 및 7.1%였으며 감염우의 경우는 각각 18.5%, 8.3% 및 13.4%로서 전체 T 세포와 T helper 세포는 비감염우에서, T cytotoxic/suppressor 세포는 감염우에서 각각 현저히 더 높은 분포율을 보였다. 그 결과 CD4/CD8 ratio도 비감염우 2.0, 감염우가 0.61로서 큰 차이를 나타내고 있다.

유즙에서의 B세포(surface IgM) 분포율은 비감염우가 41.5%, 감염우가 43.7%로서 비슷한 분포율을 보였으나, N세포의 경우는 비감염우가 10.4%로 감염우의 3.4%보다 높은 분포율을 나타내므로서 혈액에서와 비슷한 경향을 보였다.

활성화된 BoCD4 아집단을 나타내는 ACT3는 비감염우가 11.8%, 감염우가 10.8%로서 혈액에서의 소견과 동일한 경향을 보였던 반면, 활성화된 BoCD8 아집단을 나타내는 ACT2의 경우는 비감염우가 5.1%인데 비해 감염우는 18.9%로서 혈액에서와는 다르게 감염우에서 훨씬 더 높게 나타났다.

혈액과 유즙에서의 림프구 아집단 분포율을 비교했을 때는 대체적으로 T 세포의 경우 비감염우나 감염우 모두 혈액보다 유즙에서 더 낮은 분포율을 보였으나, B 세포의 경우는 비감염우나 감염우 모두 혈액보다 유즙에서 더 높게 나타났다. 또한 ACT3와 ACT2의 양성 발현을 역시 비감염우나 감염우를 막론하고 혈액보다는 유즙에서 훨씬 더 높은 분포율을 보였다(Figs 1, 2).

## 고 찰

숙주와 감염 미생물간의 작용기전에 의하면 미생물 감염에 대한 유선의 감수성은 유선의 생리적 이행기인 건유 초기와 말기 그리고 분만 전후기에 특히 증가된다. 그 원인으로서는 착유중지로 인한 유즙축적에 의한 유방내압의 증가<sup>31</sup>와 유선내 병원체의 정기적 배출중지<sup>32</sup> 그리고 유방의 생체해부학적 변화와 유즙의 생화학적 성분변화<sup>33</sup>등 여러가지 물리적 및 화학적 요인들이 밝혀진 바 있다. 또한 최근에는 숙주의 자연적 방어능을 증강시켜 감염의 예방과 자발적 치유력을 높이려는 다양한 시도들이 면역학적 측면에서 이루어지고 있다. 그 결과 유즙내에 존재하는 세포집단 특히 림프구의 구성상태나 기능적 활성변화와 유선 면역기능과의 상관성 그리고 이러한 생체 면역상태를 변화시키는 요인 및 그 기전들이 최근 이용되는 첨단

기술인 단크론항체를 이용한 flow cytometry 등의 기법들을 통하여 밝혀지고 있다.

유선내에서 작용하고 있는 면역학적 특이성분중 면역 반응을 시작하고 유지하는 림프구의 능력은 감염에 대한 저항성에 있어 가장 중요한 근본적인 요소라 할 수 있다. 하지만 유선에서 비특이적 방어작용을 담당하는 대식세포나 호중구의 기능에 대한 연구들이 많이 있었던 것에 비하면, 체액성 면역 뿐 아니라 특이적 흡소년의 생산을 통해 탐식작용 및 사이토카인 생성 및 T, B림프구 기능증가 등 세포성 면역에도 영향을 끼치는 림프구의 본질적인 역할에 대해서는 그 중요성에도 불구하고 많은 연구가 이루어지지 못하였다.

본 실험은 건유기 젖소 유선의 면역저하기전 규명을 위한 일련의 연구중의 하나로서 먼저 유방염의 지표가 될 수 있는 유즙내 체세포수를 개체별로 검사하여 그 말초혈액내 백혈구 소견과 비교하였다(Table 2). 체세포수와 혈액학적 소견 및 세균학적 검사결과를 바탕으로 유방염 감염여부를 판정하여 감염우와 정상우로 분류한 건유기 젖소 각 6마리씩에 대한 혈액 및 유즙내 림프구 아집단 분포율을 조사하였다(Table 3, 4). 유즙내에 배출되는 체세포수는 유질과 유방의 건강상태를 측정하는 가장 일반적인 지표로서<sup>34</sup>, 체세포수에 영향을 미치는 주된 요인은 유선의 감염상태이다<sup>35</sup>. 건강한 유선의 체세포는 대부분 대식세포와 림프구로 이루어지며 호중구나 상피세포는 소수에 불과하지만, 세균에 의해 유선이 감염되면 체세포수의 현저한 증가와 함께 주된 세포유형이 호중구로 이루어지는 등 급격한 변화를 거치게 된다. 본 연구에서 체세포수 25만/ml 이하였던 그룹의 백혈구 소견은 정상적인 소의 혈액상을 보여 주었다. 체세포수가 증가함에 따라 점차 백혈구의 수나 호중구의 비율도 증가되어, 100만/ml 이상의 그룹에서는 호중구와 림프구의 비율이 정상우의 것과 완전히 역전되어 나타났고 백혈구수도 정상 범주를 훨씬 상회하는 수치를 보여주었다. 호중구의 유선내로의 지속적인 유입은 감염에 대한 소의 유선 방어기전으로서<sup>36,37</sup>, Schore 등<sup>37</sup>은 20만/ml를 넘는 우유의 체세포수가 흔히 포도상구균으로 인한 유량감소를 야기하는 유선감염의 지표로 제시되어 왔다고 하였다. Schalm 등<sup>38</sup>은 유방내 세균침입에 방어작용을 할 수 있는 체세포수가 50만/ml이라고 기술한 바 있는데, 본 실험결과에서 말초혈액내 백혈구 소견 등으로 근거했을 때 감염의 여부를 판정할 수 있는 대체적인 기준은 체세포수 50만/ml 정도였다. 그러나

체세포수에 따른 백혈구 소견은 표준편차가 보여주듯이 상당한 개체차이가 인정되었는데 이는 감염균의 유형 이외에도 비유단계나 연령, 영양상태 등 여러가지 요인과 관련이 있을것이다.

한편, Fitzpatrick 등<sup>39</sup>은 최소한 3개월간 연속하여 우유 1ml당 체세포수가 40만 이상인 경우를 고체세포우로,

15만 이하인 경우를 저체세포우로 분류하였고 준임상형 유방염 감염우의 유즙중 주된 세포는 호중구였지만, 고체세포우와 저체세포우간에 인정되는 단핵세포수의 차이가 유방내 국소면역 방어기전에 중요할 것이라 보고하므로서 유선방어에 있어서의 림프구의 중요성을 시사한 바 있다.

Table 2. Differential blood leukocyte counts based on somatic cell counts of cow milk

SCC (×10,000)	No. of test	Total WBC (×10 <sup>3</sup> /ml)	Differential Count(mean±SD)		
			Neutrophil	Lymphocyte*	Eosinophil
< 25	11	9.0±2.6	25.0±8.2	65.7±13.0	8.4±3.5
25~50	11	10.4±6.2	51.1±20.8	43.0±16.7	5.9±3.8
50~100	8	15.1±9.5	59.8±12.2	33.0±13.6	7.7±7.0
> 100	11	16.1±8.0	60.5±15.9	32.4±11.6	7.0±5.6

\* lymphocytes contained monocytes.

Table 3. Proportion of lymphocyte subpopulations in peripheral blood from cows with infected and non-infected mammary gland

Specificity of monoclonal antibodies	Monoclonal antibodies	Positive cells (% mean±SD)	
		Infected*(n=6)	Non-infected(n=6)
BoCD2	BAQ95A	32.9±7.0	43.3±8.8
BoCD4	CACT138A	15.4±6.2	28.3±7.4
BoCD8	CACT80C	20.2±7.2	19.1±7.4
surface IgM	PIG45A	32.9±9.5	28.1±11.6
nonT/nonB	CACT61A	4.1±2.4	7.6±3.3
ACT2	CACT26A	5.2±3.5	4.0±4.1
CAT3	CACT114A	3.3±3.9	5.3±2.7
CD4/CD8		0.76	1.47

\* Mammary glands with somatic cell count > 500,000/ml, and bacterial culture positive

Table 4. Proportion of lymphocyte subpopulations in mammary gland secretions from infected and non-infected cows

Specificity of monoclonal antibodies	Monoclonal antibodies	Positive cells(% mean±SD)	
		Infected(n=5)	Non-infected(n=5)
BoCD2	BAQ95A	18.5±7.0	38.2±6.4
BoCD4	CACT138A	8.3±4.2	14.2±5.3
BoCD8	CACT80C	13.4±3.5	7.1±2.1
surface IgM	PIG45A	43.7±9.0	41.5±7.1
nonT/nonB	CACT61A	3.4±2.1	10.4±3.3
ACT2	CACT26A	18.9±7.4	5.1±6.3
CAT3	CACT114A	10.8±6.0	11.8±3.4
CD4/CD8		0.61	2.0

최근들어 백혈구 표면분자에 특이적인 단클론항체와 flow cytometry 기법을 이용하여 백혈구 아집단 분포율 등을 조사하므로써 질병의 진행 등에 따르는 숙주 면역기전의 변화를 확인하는 연구들이 많이 수행되고 있다<sup>25,26,40-42</sup>. 본 연구에서는 유방암 감염우와 비감염우의 말초혈액 및 유즙에서의 림프구 아집단 분포율을 비교하여 유선감염에 따르는 첫소의 면역기능의 변화상태를 조사한 결과, 림프구 아집단 분포상은 감염우와 비감염우 그룹간에서 상당한 차이가 인정되었으며, 감염여부에 관계없이 혈액과 유즙간에서도 차이가 관찰되었다.

혈액과 유즙에서 공히 감염우군과 비감염우군 간에 가장 현저한 차이를 보였던 세포집단은 T세포 특히 CD4<sup>+</sup>세포군의 비율이었다. 따라서 두 그룹간에 CD8<sup>+</sup>세포군은 별 차이가 없었던 혈액의 경우에도 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>의 비율은 감염, 비감염우군이 각각 0.67과 1.47의 큰 차이를 보였으며, 감염우군과 비감염우군간의 CD8<sup>+</sup>세포비율이 크게 차이를 나타낸 유즙에서의 경우엔 그 비율에 더 큰 격차를 나타냈다. 모든 세포성 면역의 중추적 역할을 맡고 있는 T 림프구는 항원인식에 있어서 MHC class II molecule에 의해 제한을 받으며 T-helper세포의 기능을 나타내는 CD4<sup>+</sup>와 MHC class I molecule에 제한을 받으며 T-suppressor/cytotoxic 기능을 나타내는 CD8<sup>+</sup>세포의 두가지 기능적 아집단으로 분류할 수 있는데 이중 CD4<sup>+</sup> T림프구는 IL-2를 생산하는 등 면역계에서 매우 중요한 역할을 한다. 예컨대, B세포는 독립적으로 항원을 인식할 수는 있지만 그들의 종국적인 증식과 분화는 일반적으로 T-helper 세포를 필요로 한다. 따라서 CD4<sup>+</sup> T세포의 총 수와 상대적 비율의 감소는 면역기능 저하의 지표로 이용되고 있다<sup>43</sup>. 예를 들어 후천성 면역결핍증(AIDS) 환자는 흔히 말초혈액의 T세포수가 감소되며 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>의 비율이 역전되므로써 면역능이 있는 정상인이 2.0인데 비해 흔히 0.5 또는 그 이하를 나타낸다<sup>43</sup>. 본 연구결과 감염된 유선우군의 혈액과 유즙에서의 T-helper세포수나 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>의 비율은 비감염우군에 비해 낮았다. 이는 유방염우의 말초혈액과 유선분비물에서의 T 림프구 기능이 정상우에서 보다 감소되었다는 보고들<sup>44,45</sup>과 일치하는 소견으로서 혈액이나 유즙의 면역저하상태와 유선감염과의 상관성을 보여주는 것으로 사료된다.

Hurley<sup>46</sup>와 Targowski<sup>47</sup>는 유방암 감염우와 비감염우의 유즙내 림프구의 기능이 말초혈액보다 감소되었다고 보고한 바 있다. 또 박 등<sup>21</sup>은 비유단계별로 말초혈액과 유

즙에서의 백혈구 구성성분을 조사한 연구에서 정상우의 말초혈액과 유즙내 평균 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>의 비가 각각 1.53과 0.85였다고 보고하였다. 본 연구에서는 말초혈액과 유즙내 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>의 비가 각각 1.47, 2.0으로서 혈액소견은 비슷했으나 유즙에서의 비율은 반대로 더 높게 나타났다. 이는 유즙내에 CD8<sup>+</sup> T림프구가 CD4<sup>+</sup> T 림프구 보다 더 높은 비율로 존재한다고 했던 박 등<sup>21</sup>의 결과와는 달리 본 연구에서는 정상우군의 유즙내 CD4<sup>+</sup>가 CD8<sup>+</sup>보다 더 높게 나타난 때문이었다. 또 CD8<sup>+</sup> T세포가 말초혈액보다 유즙에서 더 높았다는 보고들과는 달리 본 연구에서는 정상우군과 감염우군 모두 CD8<sup>+</sup>의 말초혈액에서의 비율이 유선에서 보다 더 높아 이같은 상이한 결과를 나타내었는데, Wyatt 등<sup>48</sup>에 의하면 첫소의 말초혈액내 CD8<sup>+</sup>은 14.2%정도이며 Machugh와 Sopp<sup>49</sup>은 17.8% 정도라고 했던 것과 비교했을 때 본 실험에서의 19.1%는 비교적 유사한 수치를 보이고 있다. 그러나 유즙에서의 CD8<sup>+</sup>세포의 평균비율이 정상우에서 13.4%, 감염우에서 7.1%의 낮은 수치로 나타나므로써 결과적으로 유즙에서의 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>의 비가 혈액에서 보다 더 높게 나타났다. 이는 소 유선에서 말초혈액에 비해 CD8<sup>+</sup>, ACT2<sup>+</sup> 및 CD2<sup>+</sup> 림프구의 수가 증가되었고 포도상구균 감염유선의 유즙은 정상유즙에 비해 역시 CD8<sup>+</sup>, ACT2<sup>+</sup> 및 CD2<sup>+</sup> 림프구의 수가 증가되었다는 보고<sup>23</sup>와 상반되는 결과이다. 또한 소의 유선 림프구의 반응이 말초혈액에 비해 감소되는 이유가 유선내 림프구 아집단의 독특한 구성 때문이며, 유즙내에 존재하는 많은 비율의 CD8<sup>+</sup>세포가 활성화된 형태로 존재하고 감염된 유선에서는 이 세포들이 증가한다는 보고<sup>21</sup>와도 상반되는 결과이다. 이같은 차이를 보이는 원인으로서는 여러가지를 생각해 볼 수 있겠지만 혈액내 림프구 아집단 구성비율이 여러가지 생리적 및 병리적 조건들에 의해 크게 영향을 받는다는 점 특히 CD4<sup>+</sup>세포는 연령이 증가하거나 임신시 또는 내독소 등에 노출될 때 감소되는가 하면 급성적인 스트레스를 받거나 지나치게 심한 운동시에는 CD8<sup>+</sup>세포가 증가되기 때문에 개체간의 차이는 물론 동일개체에서도 어느 정도의 차이가 인정된다. 또한 유선감염의 원인체에 따라서도 유방내 면역세포의 변화양상은 차이가 있을 것이다. 따라서 실험 대상우를 선정할 때는 비유단계, 산차, 성별, 감염여부 뿐만아니라 감염원인체를 확인해야 하며 그에 따른 차이를 앞으로 주의깊게 조사해봐야 할 것으로 사료된다.

세포표면에 면역글로부린(sIgM)과 특유의 표면항원



(CD19, CD20, CD21)을 소유하므로서 구별되고 있는 B 림프구의 수는 유방염우의 말초혈액과 유즙에서는 정상우보다 감소한다고 보고된 바 있다<sup>50,51</sup>. 본 연구결과 B 림프구수는 말초혈액 및 유즙에서 모두 정상우보다 감염우군에서 약간 더 높게 나타나 T 세포와는 반대조건을 보이긴 했지만 두 그룹간의 차이는 거의 없었다. 또한 정상우군과 감염우군 모두 유즙에서의 비율이 각각 41.5%, 43.7%로서 혈액에서의 28.1%, 32.9%에 비해 더 높게 나타났다. 혈액 림프구중 일반적으로 B세포가 차지하는 비율이 20% 정도<sup>52</sup>인 점과 말초혈액내 16~26.4%, 유즙내 7~25%였던 박 등<sup>21</sup>의 보고와 비교했을 때, 본 연구결과는 혈액과 유즙 양자에서 모두 비교적 높은 비율을 보이고 있다. 이러한 상이한 결과들 역시 본 실험이 이들 연구자들과는 달리 건유기 젖소만을 대상으로 하였고, 유방감염 원인체도 여러가지가 복합된 경우여서 *Staphylococcus aureus* 감염우만을 대상으로 했던 연구<sup>50</sup>와는 차이가 있었기 때문일 수 있다. 앞으로 비유단계를 각기 다른 병원체의 감염에 따른 유선에서의 B 림프구의 작용기전과 분포율 등에 관한 조사가 보다 상세히 이루어져야 할 것이다.

N세포는 T세포나 B세포에 대한 특이적인 marker를 표출하지 않는 림프구 집단으로서 최근 그 기능 및 역할에 대해 많은 연구들이 집중되고 있다. 소 면역계에서 그들의 기능은 잘 알려져 있지 않지만<sup>53</sup> 젖소 말초혈액의 상당부분(15~30%)을 구성하며<sup>49</sup> 소장의 상피에 국소화되는데 이는 이 세포들이 점막면역에 관여할 수 있음을 시사한다. 박 등<sup>21</sup>에 의하면 말초혈액에서의 N세포 비율(7~13%)은 유즙에서의 비율(8~12%)과 별 차이를 보이지 않았는데, 본 연구에서도 이와 유사한 수준으로서 큰 차이는 없었으며 정상우군에서 감염우군보다 약간 더 높게 나타났다.

활성화된 모든 N세포와 CD8\* 세포 아집단에 존재하는 표면항원 ACT2 발현율은 감염우에서, 그리고 감염우부에 관계없이 말초혈액보다 유즙에서 더 높게 나타났다. 이 같은 결과는 박 등<sup>21</sup>이 Isotype이 서로 다른 2가지 단클론 항체를 이용한 dual fluorescence 분석에서 활성화된 CD8\* T 림프구의 비율이 말초혈액에서 보다 유즙에서 더 높다고 한 것과 일치한다. 이들의 보고에 의하면 젖소에서 순환혈류중 ACT2와 ACT3 항원을 표현하는 림프구는 드문 반면, 유즙에서는 대조적으로 ACT2가 CD8\* 림프구에 고도로 표출되고 있다. 또한 ACT2를 공통표현하는 CD8\* T 림프구의 비율은 전체 비유기에 걸쳐서 유즙에서 높았고 동일기간의 말초혈액에서는 그 비율이 매우 낮거나 없

었다. Park 등<sup>23</sup>도 소의 유즙이 혈액에 비해 높은 비율의 ACT2-CD8\* 림프구를 보유하고 있으며, 이 활성화된 CD8\* 세포가 CD4\* T 세포의 증식반응을 억제하므로서 면역반응에 있어서의 조절역할을 하는 것임을 시사했다.

한편, 본 연구결과 활성화된 CD4\* 아집단만이 발현하는 ACT3 항원은 감염우보다 정상우의 유즙에서 더 높게 나타났다. 따라서 소 유선의 세균감염에 대한 면역반응에 있어 유선 T 세포를 조사한 보고<sup>54</sup>에서 CD4\*와 CD8\* T 세포의 실제적 수가 모두 정상우에 비해 유방염우에서 증가되었다는 결과와는 차이가 있었다. 그러나 정상우군과 감염우군간의 활성화된 CD4\* 세포의 비율에 큰 차이는 없었다.

## 결론

유방염 발생율이 특히 높은 건유기 젖소의 면역저하요인을 규명하기 위한 일련의 연구로서 먼저 감염유무에 따른 젖소의 말초혈액 및 유즙내 림프구 아집단 분포율을 조사한 결과, 특히 면역능의 지표가 되는 CD4\* T 세포의 총수와 상대적 비율에 있어서 유방염우와 정상우간에 그리고 정상우에서도 말초혈액과 유즙간에 상당한 차이가 인정되었다. 즉, 유방염에 걸린 젖소의 혈액이나 유선내 림프구 아집단 분포상태는 각각 유선감염이 없는 건강한 젖소에 비해 면역기능이 훨씬 더 저조한 상태에 있음이 확인되었다. 또한 건강한 젖소의 혈액과 유선에서의 림프구 아집단 분포조건을 비교해 보았던 바, 일반적으로 유선의 면역기능은 혈액에서 보다 불리한 상태에 있음이 나타났다.

## 참고문헌

1. Bramley AJ, Dodd FH. Reviews of the progress of dairy science : mastitis control progress and prospects. *J Dairy Sci*, 51 : 481-512, 1984.
2. Hurley DJ, Kensinger MH, Mastro AM, et al. An evaluation of the mononuclear cells derived from bovine mammary gland dry secretions using leukocyte antigen specific monoclonal antibodies, light scattering properties and nonspecific esterase staining. *Vet Immunol Immunopathol*, 25 : 177-193, 1990.

3. Oliver SP, Sordillo LM. Udder health in the periparturient period. *J Dairy Sci*, 71 : 2584-2606, 1988.
4. Smith KL. Mastitis control : A discussion. *J Dairy Sci*, 66 : 1790-1798, 1983.
5. Eberhart RJ. Management of dry cows to reduce mastitis. *J Dairy Sci*, 69 : 1721-1732, 1986.
6. Oliver SP, Mitchell A. Susceptibility of bovine mammary gland to infections during the dry period. *J Dairy Sci*, 66 : 1162-1166, 1983.
7. Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Environment pathogens and intramammary infection during the dry period. *J Dairy Sci*, 68 : 402-417, 1985.
8. Hogan KS, Smith KL, Hoblet KH, et al. Field survey of clinical mastitis in low somatic cell count herds. *J Dairy Sci*, 72 : 1547-1556, 1989.
9. Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Environmental mastitis : cause, prevalence. prevention. *J Dairy Sci*, 68 : 1531-1553, 1985.
10. Smith KL, Todhunter DA. The physiology of mammary glands during the dry period and the relationship to infection. *Proc. 21st Annu Mtg Natl asstitis Counc*, 87, 1982.
11. Targowski SP, Berman DT. Leukocyte response of bovine mammary gland to injection of killed cells and cell walls of *Staphylococcus aureus*. *Am J Vet Res*, 36 : 1561-1565, 1975.
12. Russell MW, Brooker BE, Reiter B. Electron microscopic observations of the interaction of casein micelles and milk fat globules with bovine polymorphonuclear leukocytes during the phagocytosis of staphylococci in milk. *J Comp Pathol*, 87 : 43-52, 1977.
13. Paape MJ, Guidry AJ, Kirk ST, et al. Measurement of phagocytosis of <sup>32</sup>P-labeled *S. aureus* of bovine leukocytes : Lysostaphin digestion and inhibitory effect of cream. *Am J Vet Res*, 36 : 1737-1743, 1975.
14. Pickering LK, Cleary TG, Kohl S, et al. PMN of human colostrum. I. Oxidative metabolism and kinetics of killing of radiolabelled *S. aureus* *J Infect Dis*, 142 : 685-692, 1980.
15. Nonnecke BJ, Harp JA. Symposium : Genetics of disease resistance. *J Dairy Sci*, 72 : 1313-1327, 1989.
16. Craven N, Williams MR. Defences of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. *Vet Immunol Immunopathol*, 10 : 71-127, 1985.
17. Targowski SP. Role of immune factors in the protection of the mammary gland. *J Dairy Sci*, 66 : 1781-1789, 1983.
18. Harmon RJ, Newbould FHS. Neutrophil leukocytes as a source of lactoferrin in bovine milk *Am J Vet Res*, 41 : 1603-1610, 1980.
19. Richie ER, Steinmetz KD, Meistrich ML, et al. T lymphocytes in colostrum and peripheral blood differ in their capacity to form thermostable E-rosettes. *J Immunol*, 125 : 2344-2346, 1980.
20. Barta O, Barta VD, Crisman MV, et al. Lymphocyte blastogenesis inhibition by milk whey as an indicator of mastitis. *J Dairy Sci*, 73 : 2112-2120, 1990.
21. Park YH, Fox LK, Hamilton MJ, et al. Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *J Dairy Sci*, 75 : 998-916, 1991.
22. Smith JW, Schultz RD. Mitogen and antigen-responsive milk lymphocyte. *Cell Immunol*, 29 : 165-173, 1977.
23. Park YH, Jung SC, Moon JS, et al. A subset of mammary gland  $\gamma\delta$  T lymphocytes downregulates BoCD4 T lymphocyte response to *Staphylococcus aureus* in cattle with intramammary infection. *Korea J Immunol*, 16 : 19-27, 1994.
24. J Westermann, R Pabst. Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system? *Immunology Today*, 11 : 406-410, 1990.
25. Bolin SR, McClurkin AW, Coria NF. Effects of bovine viral diarrhea virus on the percentages and absolute numbers of circulating B and T lymphocytes in cattle. *Am J Vet Res*, 46 : 884-886, 1985.
26. Woldehiwet Z. Lymphocyte subpopulation in peri-

- pheral blood of sheep experimentally infected with tick-borne fever. *Res Vet Sci*, 51 : 40-43, 1991.
27. Kehrli ME, Nonnecke BJ, Wood RL et al. *In vivo* effects of a thymosin  $\alpha_1$ -containing colostrum whey product on neutrophils and lymphocytes from lactating cows without and with experimentally induced *Staphylococcus aureus* Mastitis. *Vet Immunol Immunopathol*, 20 : 149-163, 1989.
  28. Cowan ST. *Manual for the identifications of medical bacteria*. 2nd ed., Cambridge University Press, London, 45-50, 1974.
  29. 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*, 15 : 337-376, 1987.
  30. Davis WC, Hamilton MJ, Park YH, et al. Ruminant leukocyte differentiation molecules. In: Barta O, ed. *MHC, differentiation antigens, and cytokines in animal and birds*. Monographs in Animal Immunology, Blacksburg, VA:BAR-LAB, INC, 47-70, 1990.
  31. Cousins CL, Higgs ER, Jackson FK, et al. Susceptibility of the bovine udder to bacterial infection in the dry period. *J Dairy Res*, 47: 11-18, 1980.
  32. Thomas CL, Neave FK, Dodd FH, et al. The susceptibility of milked and un milked udder quarters to intramammary infection. *J. Dairy Res*, 39 : 113-120, 1972.
  33. Breau WC, Oliver SP. Growth inhibition of environmental mastitis pathogens during physiologic transitions of the bovine mammary gland. *Am J Vet Res*, 47 : 218-222, 1986.
  34. Kehrli ME, Shuster DE. Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci*, 77 : 619-627, 1994.
  35. Harmon RJ. Symposium : Mastitis and genetic evaluation for somatic cell count *J Dairy Sci*, 77 : 2103-2112, 1994.
  36. Schalm OW, Carroll EJ, Lasmanis J. The leukocyte barrier and serologic investigations of experimental coliform(*Aerobacter aerogenes*) mastitis in cattle. *Am J Vet Res*, 25 : 90-96, 1964.
  37. Schalm OW, Lasmanis J, Carroll EJ. Effects of pre-existing leukocytosis on experimental coliform(*Aerobacter aerogenes*) mastitis in cattle *Am J Vet Res*, 25 : 83-89, 1964.
  38. Paul VDV, Chester JH. Biology of disease-Leukocyte functions. *Lab Investig*, 57 : 127-137, 1987.
  39. Fitzpatrick JL, McLean N, Young F, et al. MHC Class II expression on milk mononuclear cells from low or high somatic cell counts. Proc 40th intern *Vet Immunol Symp*, 258, 1995.
  40. Parks DR, Herzenberg LA. Flow cytometry and fluorescence activated cell sorting. *Fundamental Immunol*, 2nd ed. Raven press Ltd New York. 29 : 781-785, 1989.
  41. Westermann J, Pabst R. Lymphocyte subsets in the blood : a diagnostic window on the lymphoid system. *Immunol Today*, 11 : 406-410, 1990.
  42. Biddison WE, Shaw S. CD4 expression and function in HLA class II-specific T cells. *Immunol Rev*, 109 : 5-16, 1989.
  43. Harp JA, Kehrli ME, Hurley DJ, et al. Numbers and percent of T lymphocytes in bovine peripheral blood during the periparturient period. *Vet Immunol Immunopathol*, 28 : 29-35, 1991.
  44. Nonnecke BJ, Kehrli ME. Isolation of mononuclear cells from bovine milk by continuous-flow and density gradient centrifugation : Response to cells to mitogens. *Am J Vet Res*, 46 : 1259-1262, 1985.
  45. Torre PM, Oliver P. Suppression of mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells by bovine mammary secretions. *J Dairy Sci*, 72 : 219-227, 1989.
  46. Hurley WL. Mammary gland function during evolution. Symposium : mammary gland phase of lactation *J Dairy Sci*, 72 : 1637-1989, 1989.
  47. Targowski SP. Role of immune factors in the protection of the mammary gland. *J Dairy Sci*, 66 :

- 1781-1789, 1983.
48. Wyatt CR, Claudio M, Chris C, et al. Differential distribution of  $\gamma\delta$  T-cell receptor lymphocyte sub-population in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet Immunol Immunopathol*, 40 : 187-199, 1994.
  49. Machugh ND, Sopp P. Bovine CD8 (BoCD8). *Vet Immuno Immunopathol*, 27 : 65-69, 1991.
  50. Doymaz MZ, Sordillo LM, Oliver SP, et al. Effect of *Staphylococcus aureus mastitis* on bovine mammary gland plasma cell populations and immunoglobulin concentrations in milk. *Vet Immunol Immunopathol*, 20 : 87-93, 1988.
  51. Yang TJ, Jantzen-Abo PA, Williams LF. Depression of B-lymphocyte levels in the peripheral blood of cows with mastitis. *Infect Immun*, 27 : 90-93, 1980.
  52. Concha C, Holmberg O, Morein B. Proportion of B-and T-lymphocytes in normal bovine milk. *J Dairy Res*, 45 : 287-293, 1982.
  53. Franklin ST, Young JW. Proliferation and phenotype of bovine Monuclear leukocytes in cultures stimulated by pokeweed mitogen. *J Dairy Sci*, 77 : 3592-3600, 1994.
  54. Taylor BC, Dellinger JD, Cullor JS, et al. Response to bacterial infection of the bovine mammary gland is associated with changes in the T cell profile on milk. *Proc 4th Intern Vet Immunol Symp*, 263, 1995.
-