

## 韓牛末梢血液內 rosette 形成細胞의 酵素化學的 染色性 比較

金年守 · 宋喜鐘\* · 金順在\*\* · 徐禮原

江原道 家畜衛生試驗所 中部支所  
全北大學校 獸醫科大學\* · 建國大學校 獸醫學科\*\*  
(1996년 4월 12일 접수)

### Comparison of enzyme cytochemical activities between rosetted cells in peripheral blood of Korean native cattle

Nyeun-su Kim, Hee-jong Song\*, Sun-jae Kim\*\*, Ye-won Seo

*Chung Bu Branch of the Kang Won-Do Veterinary Service Laboratory  
College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University\**  
*Department of Veterinary Medicine, Kon-Kuk University\*\**

(Received Apr 12, 1996)

**Abstract** : Peripheral blood mononuclear cells(PBMNC) of Korean native cattle rosetted with Korean goat erythrocytes(KGRBC) and blood monocytes were evaluated for four cytochemical reactions such as acid phosphatase(ACP), alkaline phosphatase-anti-boby(ALP-Ab),  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase( $\alpha$ -NBE) and peroxidase.

The results obtained were as follows;

In rosetted cells, the positivities of ACP in E AET-DeX, EA and EAC were 70.3%, 22.4% and 25.2%, those of  $\alpha$ -NB were 27.4%, 44.2% and 79.8%, and those of ALP-Ab were 9.5%, 88.3% and 91.5%, respectively. Whereas, the positivity for Peroxidase in monocytes was 100%.

In non-rosetted (remained) cells, the positivities of ACP in E AET+DeX, EA and EAC were 41.4%, 57.2% and 61.9%, those of  $\alpha$ -NB were 38.6%, 16.5% and 18.9% and those of ALP-Ab were 98.2%, 5.3% and 6.3%, in order

**Key words** : cytochemical reaction, acid phosphatase,  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase alkaline phosphatase, peroxidase.

### 緒 論

感染性 疾患에 있어서 宿主의 細胞性 및 體液性 免疫

能은 T, B 淋巴球 및 大食細胞의 相互作用에 따라 發現  
되어진다. 따라서 宿主의 疾病에 대한 防禦機能의 機轉  
을 규명하기 爲해서는 이들 細胞의 分離同定이 必須的  
이며, 이들의 相互作用 關係를 理解하여야 한다<sup>1-17,41</sup>.

Address reprint requests to Dr. Nyeun-su Kim, Chung Bu Branch of the Kang Won Do Veterinary Service Laboratory.

酵素組織化學的方法 및 단클론 항체를 이용하여 正常 T 細胞의 成熟過程을 段階別로 나누어 詳細히 調查하여 보면 惡性 T 細胞 腫瘍은 同一 個體發生의 多樣性이 反影되고 있다는 事實을 알 수 있다. 大部分의 境遇에 있어서 이와같은 報告들은 T 細胞 腫瘍群은 正常的인 發達 段階中 成熟過程이 妨害를 받았다는 結論이 支持를 받고 있다. T 細胞 表面抗原을 認識할 수 있는 단클론 항體인 OKT series를 利用하면 promocyte 및 thymocyte과 成熟 T 細胞를 區別할 수 있다. 이와 類似하게 循環血液 및 淋巴組織內의 大部分의 T 細胞는 acid phosphatase(ACP),  $\beta$ -glucuronidase(BG) 및  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase( $\alpha$ -NB)와 같은 酵素를 利用하여 染色을 하여 보면 細胞의 年齡에 따라 特徵的인 細胞 組織化學的인 特性을 觀察할 수 있다. 例를 들면 ACP는 胎兒 初期에 胸腺細胞로부터 T 細胞의 分化過程 全般에 걸쳐 繼續的으로 維持되나<sup>4,31</sup>, BG는 發達後期에 出現하며 妊娠後期の 胸腺細胞 및 成熟한 循環 T 細胞에서 發見된다<sup>20</sup>. 따라서 BG는 pan T-enzyme이라고 볼 수 있다<sup>18,19,27</sup>. 그리고  $\alpha$ -NB의 抗原決定期는 좁은 範圍의 pH(5.7-6.0)에서 活性을 보이며, 成熟 T 細胞와 胸腺 水質部의 細胞에서 發見된다<sup>18,19,27</sup>. Basso *et al*<sup>4</sup>은 이와같은 根據를 바탕으로 T 細胞의 成熟過程을 먼저 ACP 陽性, BG陰性으로부터 ACP陽性, BG陽性,  $\alpha$ -NB陽性過程을 거쳐 分化한다고 主張하였다. SRBC를 利用한 rosetting方法으로 얻어진 大部分의 成熟 T 細胞는 ACP, BG 및  $\alpha$ -NB와 같은 酵素를 利用한 染色<sup>28</sup>을 하여보면 뚜렷한 focal(dot) pattern을 볼 수 있는데 이는 IgM(Tm, T $\mu$ ,  $\mu$ Fc)에 對한 細胞 表面受溶體를 나타내고 있다<sup>21</sup>. 한편 Ig G (Tr, rFc)의 Fc receptors에 對해서는 diffuse/granular pattern으로 染色된다. Tm 및 TG 細胞 아군들 OKT-4(helper) 및 OKT-8(suppressor) 세포군과 共通<sup>18-20,27</sup> 點을 가지고 있다는 몇가지 證據가 있으나<sup>18-20,27</sup> 反對되는 意見도 提示되고 있다<sup>21,28</sup>. 現在 이와같은 酵素活性에 對한 表現형은 惡性 T 細胞腫瘍시 妨害를 받는 成熟段階를 糾明하는데 主로 利用되고 있으며, 한편으로는 T, B 細胞 및 non-T, non-B 細胞疾患을 鑑別하는데 利用되고 있다<sup>16,17,22-26,29-43</sup>.

한편 B 細胞의 分離 및 鑑別은 細胞表面 抗原, antigen receptor, 補體 또는 免疫 글로부린의 Fc와의 結合能, lipopolysaccharide와 같은 細胞分化因子에 對한 反應性, 免疫螢光抗體法, 免疫酵素抗體 등을 利用하여 鑑別이 可能하다<sup>15,16,27,36</sup>.

本 研究에서는 이미 發表되어진 여러 方法으로 韓牛 循環血液內의 T,B 淋巴球 및 大食細胞를 分離하여 이들 細胞에 對하여 몇가지 酵素 즉, acid phosphatase(ACP), alkaline phosphatase-antibody(ALP-Ab),  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase( $\alpha$ -NB) 및 peroxidase 染色을 實施하였고 이들 細胞들의 活性度를 酵素細胞化學的 染色所見으로 判讀한 바 그 結果를 報告하고자 한다.

## 材料 및 方法

淋巴球分離 및 Rosette 形成實驗 : 韓牛의 淋巴球는 全羅北道 種畜場 및 韓牛 示範農家에서 採血한 후 전보의 方法에 따라 實驗하여 分離하였고, E Rosette 形成 實驗은 在來山羊 赤血球를 aminoethylisothiouonium bromide(AET) 또는 dextran(Dex)을 各各 또는 조합처리한 것을, EA와 EAC Rosette 形成實驗은 在來山羊赤血球를 赤血球에 對한 抗體를 處理하거나 또는 抗體處理赤血球를 補體로 處理하여, 이들의 前處理된 赤血球와 分離한 韓牛 末梢血液 淋巴球와 Rosette을 形成시킨 후 슬라이드에 塗抹, 乾燥 後 必要에 따라 固定液에 固定하여 酵素化學的 染色材料로 使用하였다.

酵素化學 染色 : 實驗材料에 對한 酵素化學 染色은 acid phosphatase(ACP), alkaline phosphataseantibody(ALP-Ab),  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase( $\alpha$ -NB) 및 peroxidase 등을 實施하였으며 各各을 要約하면 다음과 같다.

Acid phosphatase(ACP) 染色 : 材料를 -10℃의 glutaraldehyde fixative 液이 들어 있는 Couplinjara에 넣어 正確히 3分동안 固定한 다음 즉시, 30秒동안 蒸溜水로 洗滌하여 乾燥시켰다. 그 後 5ml의 acetate 溶液을 40ml의 蒸溜水에 섞어 均一液이 되도록 混合하여 37℃로 維持시키고, 여기에 garnet GBC salt 1 capsule(Sigma, 386-15)를 添加하여 잘 섞이도록 磁力攪拌器로 檢査하였다. 이어서 5ml의 naphthol AS-BI phosphoric acid 液(Sigma, 180-2)을 加하여 잘 混合한 다음 染色材料를 넣은 Couplin jar에 부어 1時間 동안 保存하였다. 그 後 染色液을 버리고 30秒동안 蒸溜水로 洗滌하고 15分間 乾燥시키어 methylene blue 液으로 對照染色하였다. ACP 染色紀傳을 要約하면 다음과 같다.

Naphthyl AS-BI	ACP	Insoluble-chromogenic
phosphatase	GBC	naphthol AS-BI-GBC complex
		<Red violet>

$\alpha$ -Naphthyl butyrate esterase( $\alpha$ -NBE) 染色 : 材料는 ACP 染色過程과 同一하게 固定 洗滌 및 乾燥시켰다. 그 後 1.5ml의 pararosaniline 液(Sigma, 180-4)과 同量의 sodium nitrite液을 混合하여 完全하게 섞은 混合液을 37℃로 維持하고 있었던 40ml의 phosphate buffered saline solution(PBS,pH 7.7)에 混合하였으며, 이어서 5ml의  $\alpha$ -naphthyl butyrate液(Sigma 180-1)을 섞어 材料가 들어있는 Copulin jar에 부어 37℃에서 1時間동안 保存하였다. 그 後 染色液을 버리고 蒸溜水로 2-3分동안 洗滌하여 15分間 乾燥시키고 methylene blue液으로 對照染色하였다.  $\alpha$ -NB의 染色 紀傳을 要約하면 다음과 같다.

$\alpha$ -Naphthyl AS-BI	BG	Insoluble-chromogenic
$\beta$ -D-Glucuroride	Hexazoltized pararosaniline	naphthol AS-BI-HPR complex <Redbrown>

**Alkline phosphatase-antibody(ALP-Ab) 및 peroxidase 染色 :** Rosette 形成 細胞內 또는 塗抹標本內에 B 淋巴球 또는 單核食細胞의 分布를 把握하고자 ALP-Ab 및 peroxidase 染色을 同時에 實施하였다. 즉, 各各의 染色材料를 2組의 染色群으로 區分한 다음 한群에는 30 $\mu$ l의 ALP-Ab液을 加하여 4℃에 30分間 反應시킨 後洗滌液(8% fetal bovine s-erum이 添加된 RPMI 1640배지)으로 5分間씩 2회에 걸쳐 洗滌하였고, 그 후 Slg ind-icator (Sigma Diagnostic, No. 95-5)를 500 $\mu$ l를 塗布하여 37℃에 30分間 保存하였다.

한편 同一 染色材料에 單核食細胞의 peroxidase 染色性을 同時에 確認하기 爲하여 上記한 ALP-Ab染色 材料를 5分間 洗滌한 다음 여기에 1ml의 洗滌液, 25 $\mu$ l의 peroxi-dase indicator(Sigma Diagnostic, No. 95-1) 및 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>10 $\mu$ l의 混合液을 加하여 塗布한 다음 1分間 室溫에서 維持시킨 후 5分間 洗滌하였다. 그 후 適量의 洗滌液을 加한 다음 커버그라스로 封入하였다.

酵素活性 陽性細胞의 鑑別酵素細胞化學的 染色標本을 檢鏡함에 있어서는 基質을 除外한 反應 混合液에 同一한 條件으로 染色한 것을 陰性 標本으로 삼고 이를 酵素活性 標本과 對照 觀察하였으며, 400倍 視野에서는 單核食細胞에서 brownish black, T 및 B 淋巴球에서 red-violet, redbrown, red-purple 등의 色을 觀察하였고 1,000倍 視野에서 再確認하여 最小한 200-300 細胞를 計算한 結果를 아래의 術式에 따라 各各의 %陽性 細胞率을 求하였다.

$$\% \text{ of positive cells} = \frac{\text{No. of cells with positive activity} \times 100}{\text{Total cell counted}}$$

<Brown black>

## 結 果

**Rosette 形成細胞의 酵素細胞 化學反應 :** E AET+Dex, EA 및 EAC Rosette 形成細胞內의 酵素活性는 Table 1과 같다. 즉, ACP에 對한 反應은 各各 70.3%, 22.4% 및 25.2%,  $\alpha$ -NB에 對한 反應은 各各 27.4%, 44.2% 및 79.8%, ALP-Ab에 對한 反應은 各各 9.5%, 88.3% 및 91.5% 이었으며, peroxidase에 對한 單核食細胞의 反應은 100%로 나타났다.

Table 1. Enzyme cytochemical reaction of rosetted cells and those of monocytes

Enzyme cytochemical staining	% of positive cells			
	Rosetted with			Monocytes
	E AET+Dex	EA	EAC	
ACP	70.3	22.4	25.2	-
$\alpha$ -NB	27.4	44.2	79.8	-
ALP-Ab	9.5	88.3	91.5	-
Peroxidase	0	0	0	100.0

$$\% \text{ of positive cells} = \frac{\text{No of cells with positive activity} \times 100}{\text{Total cell counted}}$$

ACP: acid phosphatase, NBE:  $\alpha$ -naphthyl butyrate esterase, ALP-Ab: alkaline phosphatase-antibody.  
Percentage of 300 cells counted.  
Not determined.

**非Rosette 形成細胞의 酵素細胞 化學反應 :** 上記한 Rosette 形成實驗에서 Rosette을 形成하지 못한 나머지 細胞群에서의 酵素細胞 化學的 反應은 Table 2와 같다. 즉, E AET+Dex, EA 및 EAC와 各各 Rosette을 形成하지 못한 細胞들의 ACP에 對한 反應은 41.4%, 57.2% 및 61.9%이였으며, 이들의  $\alpha$ -NB에 對한 反應은 各各 38.6%, 16.5% 및 18.9%, ALP-Ab에 對한 反應은 各各 98.2%, 5.3% 및 6.3%로 나타났다.

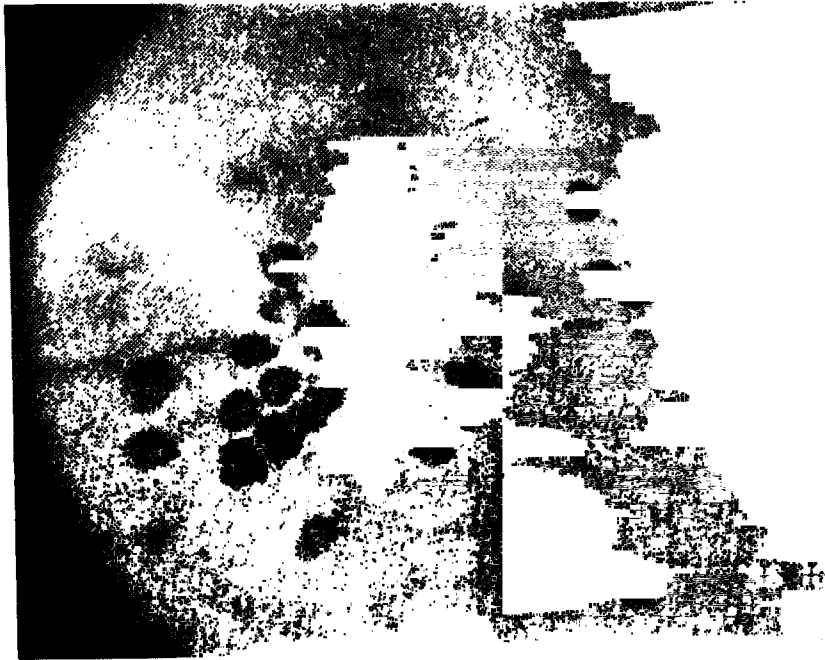


Fig 1. Photomicrograph of a rosette formed by allowing E AET+Dex to lymphocytes of bovine peripheral blood mononuclear cells. Mayer's Hematoxylin stain (x 1,000)

Table 2. Enzyme cytochemical reaction of non-rosetted cells

Enzyme cytochemical staining	% of positive cells in non-rosetted with staining		
	E AET+Dex	EA	EAC
ACP	41.4	57.2	61.9
$\alpha$ -NB	38.6	16.5	18.9
ALP-Ab	98.2	5.3	6.3

## 考 察

韓牛末梢血液內 Rosette 形成細胞의 酵素化學的 染色性 比較實驗에서 Rosette 形成細胞의 酵素細胞 化學反應에서 ACP에 對한 反應은 70.3%,  $\alpha$ -NB에 對한 反應은 79.8%, ALP-Ab에 對한 反應은 91.5%, Peroxidase에 對한 單核食細胞의 反應은 100%로 Rosette을 形成하지 못한 나머지 細胞群에서의 酵素細胞 化學的 反應은 즉, EAET+Dex, EA 및 EAC와 各各 Rosette을 形成하지 못한 細胞들의 ACP에 對한 反應은 61.9%,  $\alpha$ -NB에 對한 反應은 38.

6%, ALP-Ab에 對한 反應은 98.2%로 各各 最高로 나타냈다. ACP에 對한 反應에서 Rosette을 形成細胞 化學反應은 70.3%, Rosette을 形成하지 못한 細胞들은 61.9%인 反面 Miyazaway, Kobayashik, Sugiurak *et al*<sup>22</sup>에서는 75-90%, Poore TE, BarrettG, Kadin ME, Bainton DF *et al*<sup>25</sup>은 T cell 42-83%, B cell 44-56%임을 報告하였다. Peroxidase에 對한 單核食細胞의 反應은 100%이며, Miyazaway, Kobayashik, Sugiurak *et al*<sup>22</sup>에서는 90-100%이다. ALP-Ab에 對한 反應에서 Rosette 形成細胞의 酵素細胞 化學反應에서 91.5%이고, Rosette을 形成하지 못한 細胞 들에서 98.2%이며, Miyazaway, Kobayashik, Sugiurak *et al*에서 ALP (alkaline phosphatase)은 67-72%이었다. 韓牛의 最適狀態의 結果와 類似하여 앞으로 適切한 枝法을 活用하여 多數의 報告가 蓄積되던 相互 比較함으로써 Rosette 形成細胞의 機能을 理解 하는데 큰 도움이 되리라 思料된다.

本 研究은 韓牛血中 單核細胞群中 T와 B 淋巴球 그리고 單核食細胞群에 對한 酵素化學 反應性을 把握코자 試圖한 것이다. 그 結果 淋巴球은 ACP와  $\alpha$ -NB에, 單核細胞群은 Peroxidase에 강한 酵素細胞反應을 나타내었

다. 또한 淋巴球중 T 및 B 淋巴球의 酵素 활성도는 T 淋巴球의 境遇 EST와 ACP에, B 淋巴球의 境遇 ALP-Ab에서 顯著的한 活性을 나타내었다.

以上の 結果는 家畜傳染病과 診斷의 基礎資料로 研究하며, 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 依한 差異를 言及한 outteridge와 Dufty(1981)의 報告, Ficoll-Hypaque 法으로 mononuclear cells을 分離한 後 混在하여 있는 單核食細胞系가 Dex에 의해 S-RBC와 Rosette 形成을 하는지의 與否 實驗에서 10% 程度가 色素는 貪食하지만 Rosette를 이루지 않았고, 더우기 RFC에서는 色素 貪食이 없음을 確認한 後 Dex가 單核食細胞의 Rosette에서는 關與하지 않는다고 한 Brown *et al*의 報告, Null cell의 確認實驗(Lee Belden 등, 1981) 등을 勸案할 때 韓牛의 T-cell subsets를 좀더 明確하게 把握하기 爲해서는 앞으로 單클론 抗體를 利用한 免疫調節 T 淋巴球 亞集團에 對한 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 血清에 依한 T 淋巴球의 確認(usinger와 splitter, 1981) 등의 方法을 適用한 再確認 實驗이 地域別, 品種別, 性別, 年齡別, 個體別 그리고 成牛와 幼若牛의 比較實驗이 必要하다고 본다.

## 結 論

韓牛 血中 單核細胞群中 T와 B 淋巴球 그리고 單核食細胞群에 對한 酵素化學的 反應性을 把握하고자 末梢血液을 Ficoll-Hypaque 溶液에 中層, 遠心하여 分離한 細胞로 各各 E AET+Dex, EA 및 EAC Rosette을 形成시키고, 한편으로는 附着細胞를 分離하여 acid phosphatase(ACP),  $\alpha$ -naphthol butyrate esterase( $\alpha$ -NB), alkaline phosphatase-antibody(ALP-Ab) 및 peroxidase 染色을 實施하여 다음과 같은 結果를 얻었다. 淋巴球는 ACP와  $\alpha$ -NB에 單核食細胞群은 peroxidase에서 강한 酵素細胞 化學的 反應을 나타내었다. 한편 淋巴球中 T 및 B 淋巴球의 酵素活性도는 T 淋巴球의 境遇 EST와 ACP에, B 淋巴球의 境遇 ALP-Ab에서 顯著的한 活性을 나타내었다.

## 參 考 文 獻

1. Al-Izzi SA, Maxie MG, Valli VEO. Proliferative, mor-

phologic, and cytochemical characteristics of bone marrow macrophage colonies in liquid culture, *Am J Vet Res*, 43:1868-1872, 1982.

2. Armitage RJ, Linch DC, Worman CP, *et al*. The morphology and cytochemistry of human T-cell subpopulations defined by monoclonal antibodies and Fc receptors. *Brit J Haematol*, 51:605, 1982.
3. Baggiolini M, Horisberger U, Gennaro R, *et al*. Identification of three types of granules in neutrophils of ruminants. Ultrastructure of circulating and maturing cells. *Lab Invest*, 52:151-158, 1985.
4. Basso G, Cocito MG, Semenzato G, *et al*. Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes. *Br J Haematol*, 44:577-582, 1980
5. Bjoetvdt G, Lee KW. A review of T lymphocytes and their function. *VM/SAC*, 77:1725-1728, 1982.
6. Crockard A, Chalmers D, Matutes E, *et al*. Cytochemistry of acid hydrolases in chronic B-and T-cell leukemias. *Am J Clin Pathol*, 78:437-444, 1982.
7. De Waele M, De Mey J, Moermans M, *et al*. Cytochemical profile of immunoregulatory T-lymphocyte subsets defined by mono-clonal antibodies. *J Histochem Cytochem*, 31:471-478, 1983.
8. De Waele M, De Mey J, Moeremans M, *et al*. Colloidal gold as a marker for the light microscope detection of leukocyte cell surface antigens with monoclonal antibodies. *J Clin Immunol*, 2:24S, 1982.
9. De Waele M, Renmans W, Segers E, *et al*. An immunogold-silver staining method for detection of cell surface antigens in cell smears. *J Histochem Cytochem*, 37:1855-1862, 1989.
10. Dulac RW, Yang TJ. Differential NaF-sensitivity of alpha-naphthyl acetate esterase in human, bovine, canine and murine monocytes and lymphocytes. *Exp Hematol*, 1991. in press.
11. Gillitzer R, Berger R, Moll H. A reliable method for simultaneous demonstration of two antigens using a novel combination of immunogold-silver staining and immunoenzymatic labeling. *J Histochem Cytochem*, 38:307-313, 1990.
12. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avi-

- din-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem*, 27:1131-1139, 1979.
13. Hancock WW, Atkins RC. Immunohistological studies with monoclonal antibodies. *Method Enzymol*, 121: 828-848, 1986.
  14. Heinen E, Cormann N, Kinet-Denoel C. The lymph follicle: A hard nut to crack. *Immunol Today*, 9:240-243, 1988.
  15. Higgins DA. Markers for T and B lymphocytes and their application to animals. *Vet Bull*, 51:925-963, 1981.
  16. Higgy KE, Burns GF, Hayhoe FGJ. Distribution of B, T and null lymphocytes by esterase cytochemistry. *Scan J Haematol*, 18:437-448, 1977.
  17. Kajikawa O, Koyama H, Yoshikawa T, *et al.* Use of alpha-naph-thyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle. *Am J Vet Res*, 44:1549-1552, 1983.
  18. Knowles DM, Hoffman NT, Ferrarini M, *et al.* The demonstration of acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: Usefulness as a T-cell marker, *Cell Immunol*, 35:112-123, 1978.
  19. Knowles DM, Halper JP. Human medullary and cortical thymocytes are distinguishable according to the acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase(ANAE) activity. *J Immunol*, 125:2823, 1980.
  20. Machin GA, Halper JP, Knowles DM. II. Cytochemically demonstrate  $\beta$ -glucuronidase activity in normal and neoplastic human lymphoid cells. *Blood*, 56: 1111, 1980.
  21. Manconi PE, Marrosu MG, Paghi L, *et al.* Alpha-naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes: Distribution in lymphocyte sub-populations and in mitogen-activated cells. *Scand J Immunol*, 9:99, 1979.
  22. Miyazawa Y, Kobayashi K, Sugiura K. Cytochemical studies of leukocytes of some animal species. I. Peroxidase, alkaline phosphatase and acid phosphatase. *Bull Azabu Univ Vet Med*, 2:197-205, 1981.
  23. Miyazawa Y, Kobayashi K, Sugiura K. Cytochemical studies of leukocytes of some animal species. II. P.A.S., sudan black B, urceolic acid and lymphocytic nuclear stains. *Bull Azabu Univ Vet Med*, 3:21-28, 1982.
  24. Mueller J, Brun Del Re G, Buerki M, *et al.* Non-specific acid esterase activity: a criterion of T and B lymphocytes in mouse lymphnodes. *Eur J Immunol*, 5: 270-274, 1975.
  25. Poore TE, Barrett G, Kadin ME, *et al.* Ultrastructural localization of acid phosphatase in rosetted T and B lymphocytes of normal human blood. *Am J Pathol*, 102:72-83, 1981.
  26. Popema S, Bhan AK, Reinherz EL, *et al.* Distribution of T cell subsets in human lymph nodes. *J Exp Med*, 153:30-41, 1981.
  27. Ranki A, Totterman TH, Havry P. Identification of resting human T and B lymphocytes by acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase staining combined with rosette formation with Staphylococcus aureus strain Cowan 1. *Scand J Immunol*, 5: 1129-1138, 1976.
  28. Reinherz EL, Moretta L, Roper M, *et al.* Human T lymphocyte subpopulations defined by Fc receptors and monoclonal antibodies: A comparison. *J Exp Med*, 151:969, 1980.
  29. Salmon H, Licence ST, Binns RM. Staining of pig lymphocyte subpopulations with acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase. *Vet Immunol Innunopathol*, 14:173-179, 1987.
  30. Stadnyk AW, Befus AD, Gaudie J. Characterization of nonspecific esterase activity in macrophage and intestinal epithelium of the rat. *J Histochem Cytochem*, 38:1-6, 1990.
  31. Stein H, Petersen N, Gaedicke G, *et al.* Lymphoblastic lymphoma of convoluted or acid phosphatase type - A tumor of T precursor cells. *Int J Cancer*, 17:292, 1976.
  32. Stirling JW. Immuno- and affinity probes for electron microscopy: A review of labelling and preparation techniques. *J Histochem Cytochem*, 38:145-157, 1990.
  33. Tamaoki N, Essner E. Distribution of acid phosphatase, beta-gluconidase and N-acetyl beta-gluconamidase activities in lymphocytes of lymphatic tissue of man and rodent. *J Histochem Cytochem*, 17:238-243, 1969.
  34. Wehinger H, Mobius W. Cytochemical studies on T and B lymphocytes and lymphoblast with special reference to acid phosphatase. *Acta Haematol*, 56:129-

- 136, 1976.
35. Yang K, Bearman RM, Pangalis GA, *et al.* Acid phosphatase and alpha-naphthyl acetate esterase in neoplastic and non-neoplastic lymphocytes. *Am J Clin Pathol*, 78:141-149, 1982.
  36. Yang TJ, Jantzen PA, Williams LF. Acid  $\alpha$ -naphthyl acetate esterase: Presence of activity in bovine and human T and B lymphocytes. *Immunology*, 38:85-93, 1979.
  37. Ziomek CA, Lepire ML, Torres I. A highly fluorescent simultaneous azo dye technique for demonstration of nonspecific alkaline phosphatase activity. *J Histochem Cytochem*, 38:437-442, 1990.
  38. 강명대, 채효석, 김영진, 윤창용, 김종면, 송희종. 재래산양적혈구 rosette법에 의한 정상인 말초혈액내 T-cell정량. *대한면역학회지*, 11:213-219, 1989.
  39. 양홍지, 윤여백, 김용길, 채효석, 윤창용, 허창열, 송희종. 재래산양(흑염소) 적혈구 로젠법에 의한 한우의 림프구 정량에 관한 연구. 1. 재래산양 적혈구 로젠법에 의한 한우 림프구 정량. *시험연구사업보고 (전라북도 가축위생시험소)*, pp.1-20, 1989.
  40. 유남선, 김종면, 송희종, 채효석, 강명대, 이주목. 한우에서 면역조절세포의 활성화에 관한 연구. 1. 말초혈액 림프구의 E-rosette 형성능. *대한수의학회지*, 27:253-258, 1987.
  41. 최철순. T 림프구와 세포성 면역. *한국수의공중보건학회지*, 10:49-62, 1982.
  42. 정기수, 김년수, 김동훈, 강명대, 송희종. 재래산양 적혈구를 이용한 한우 순환 혈액내 rosette 형성세포 정량. *대한수의학회지*, 29 : 525-530, 1989.
  43. 윤창용, 김태중, 채효석, 김종면, 송희종 : 소의 순환 혈액 및 림프조직내 T 및 B 림프구 분포. *대한수의학회지*, 31 : 71-75, 1991.
  44. 강세웅, 윤창용, 송희종. PHA 및 conditioned medium이 소의 순환혈액림프구의 유약화와 rosette 형성에 미치는 영향. *대한수의학회지*, 34 : 301-306, 1994.