

## 돼지에서 plasma protein 에 의한 세포성면역 증진효과에 관한 연구 2. 혈액내 T 림프구 아군 및 MHC class 세포의 분포율

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

대한제당중앙연구소\* · 건국대학교 수의학과\*\*

가축위생연구소\*\*\*

(1994년 3월 4일 접수)

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

#### 2. Proportion of T lymphocyte subpopulations and cells expressing MHC class I, II 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. Subpopulations expressing major histocompatibility complex(MHC) class I antigen were  $96.2 \pm 3.1\%$  and  $86.6 \pm 3.8\%$  in piglets fed with plasma protein and in piglets fed without plasma protein, respectively.

2. Proportion of leukocyte subpopulation expressing MHC class II antigens were significantly higher in the piglets fed with plasma protein than ones without plasma protein. The proportion was  $27.6 \pm 3.6\%$  and  $16.6 \pm 2.2\%$  in MHC class II DQ antigen, and  $28.1 \pm 2.0\%$  and  $20.0 \pm 0.3\%$  in MHC class II DR antigen, respectively.

3. A significant increase in the proportion of cells expressing poCD2 was not found in piglets fed plasma protein.

4. Proportion of subpopulation expressed porcine(Po) CD4 antigens which specific to helper T lymphocytes were not increased ( $18.3-19.1\%$  vs.  $25.6-28.8\%$ ), rather slightly decreased, in plasma protein-treated group.

5. The most important increase of proportion in plasma protein-treated group was the leukocyte subpopulation specific to poCD8<sup>+</sup> T cytotoxic/suppressor lymphocytes. The expression level was significantly higher up to  $45.9-47.1\%$  in plasma protein-treated group in comparing with  $29.7-33.0\%$  in non-plasma protein-treated group.

6. Lymphoblastogenetic responses using different concentrations of Con A mitogen and plasma protein has found that the responses of lymphocyte from piglets fed plasma protein was significantly activated ( $p < 0.01$ ). The activities measured by  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation showed 3-6 times stronger in plasma protein-treated group than those in non-plasma protein-treated group.

The study has concluded that plasma protein, which has known as a nonspecific immunostimulator, may have an immunoenhancing activities in porcine lymphoid system by increase the activated cell proportions and their blastogenetic properties which is critical to host immune responses.

**Key words:** plasma protein, pig leukocyte subpopulation, MHC class

## 서 론

전염병을 예방하기 위하여 각종 병원체에 대해서 숙주 동물을 면역시키는 것이 동물을 질병에서 보호함은 물론, 경제적 손실을 줄이는 가장 좋은 방법이라고 알려져 왔다. T 세포는 그 기능에 따라 다양한 생물학적 전달물질을 생산하는 helper T(Th) 세포, 표적세포의 생화학적 기능에 영향을 미치는 suppressor T(Ts)세포 및 표적세포를 직접 접촉하여 용해시키는 cytotoxic T(Tc) 세포의 3 가지로 분류된다.<sup>15,17,46,57</sup>

단백질항원과 대식세포(macrophage) 표면의 major histocompatibility complex(MHC) 와의 복합체는 helper T(Th) 세포의 T 림프구 수용체에 의해 감지되며 세포분비 물질인 Interleukin-1(IL-1) 등이 항원 전달세포(antigen presenting cell:APC) 로 부터 생산되어 T 세포와 B 세포의 분화와 성숙을 촉진시킨다.<sup>12,30,47</sup> Th 세포는 다시 Th 1과 Th 2의 두종류로 구분되며 Th 1은 주로 IL-2,  $\gamma$ -interferon을 생성하여 cytotoxic T 세포, NK 세포 및 대식세포의 발생 및 자극에 관여한다. 그리고 Th 2 세포는 주로 IL-4, IL-5, 및 IL-10 등을 분비함으로써 B 림프구의 분화와 증식을 돕는다. 그리고  $\gamma$ -interferon은 항 바이러스성 효과(antiviral effect)외에 단핵식세포(mononuclear phagocytes)를 활성화하며 아울러 다양한 숙주세포에서 MHC class II 유전자 발현을 유도한다.<sup>7,9,37,40,41</sup> Cytotoxic T 세포는 helper T 세포에서 분비되는 IL-2 와 구조적합항원(MHC class I) 복합체에 의해 활성화된다. Cytotoxic T 세포가 활성화되면 바이러스 항원과 밀착된 MHC-class I 항원을 감지함으로써 표적세포들에 직접 또는 간접적으로 작용하여 그것을 용해시켜 제거하는 기능을 가지고 있다.<sup>23,27</sup>

전통적으로 이식과 관련있는 MHC class I 항원은 사람의 명명법에 따라 돼지에서는 SLA-A, B, C 항원으로 불려지고 있다. 또한 면역반응과 관련있는 것으로 알려진 MHC class II 항원도 사람과 일치하여 SLA-D

영역에 위치하며 유전자 산물은 SLA-DQ로 작성되었다.<sup>34</sup> 구조적합항원을 수의 분야에 적용하여 Sachs et al<sup>51</sup>이 처음으로 SLA항원을 보고하였다. Mouse I-E MoAb와 Human Leukocyte Antigen(HLA)-DR MoAb와 교차반응하기 때문에 높은 분자량 항원은 SLA-DRw 항원으로 명명했으며, bovine class II 항원과 반응하는 낮은 분자량은 SLA-DQw 항원으로 명명하였다.<sup>32</sup>

CD2 항원은 말초혈액에서 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>와 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> T 세포에서 독립적으로 발견되며 모든 성장한 돼지의 T세포에서 표현되는 SRBC 수용체이다.<sup>16</sup> 이 단백질의 단클론항체는 rosette를 형성하는 T 세포의 능력을 차단한다. 그리고 CD2항원은 흉선 T 세포에서 기원되며, 돼지 CD2특이 단클론항체인 MSA4는 Hammerberg와 Schurig<sup>18</sup>가 첫번째로 작성 보고하였다.

CD4 항원은 class II 특이 T 세포에서 발견된다. Pescovitz et al<sup>44</sup> 이 돼지에서는 처음으로 이것의 단클론항체를 작성했으며, 말초혈액단핵구(PBMC)와 약 20-40%, 또한 nylon wool 비 부착 세포의 30-70%는 이 단클론항체와 반응한다고 보고하였다. 아울러 cytotoxic/suppressor T (T c/s) 세포를 표현하는 CD8항원에 특이적인 76-2-11(a CD8) 및 단구와 과립구에 특이적인 74-22-15(a Gr+M) 단클론항체를 작성하였다. Jonjic과 Koszinowski<sup>26</sup> 는 Tc 세포에 특이적인 295/33 과 122/28 을 작성하였다.

Tobias et al<sup>56</sup>은 LPS와 결합하는 미량의 혈장단백질(trace plasma protein)을 규명하였으며(LPS binding protein; LBP), Mathison et al<sup>36</sup>은 LPS와 결합하는 LBP가 있으며, 이것은 tumor necrosis factor(TNF)의 생산을 증가시키며, LPS에 대한 높은 특이성을 보이면서 체계적으로 control하는 macrophage 반응성에 일부 역할을 하는 것이 입증되었다고 보고했다.

돼지에서는 혈액과 림프계 장기에 분포하는 림프구의 아군별 조사는 다른동물에 비해 그리 많지 않은데 Escajadillo와 Binns<sup>14</sup>, Binns<sup>1</sup>, Binns et al<sup>34</sup>, Johnson et

al<sup>24</sup>, Outteridge et al<sup>39</sup> 이 조사 보고한 바 있다. Pescovits et al<sup>43</sup>, Jonjic과 Koszinowski<sup>26</sup>, Hammerberg와 Schurig,<sup>18</sup> Jonjicern et al<sup>25</sup>, Saalmüller et al<sup>49,50</sup>, Kelly et al<sup>28</sup> 그리고 Rothkotter와 Pabst<sup>48</sup>는 혈액을 비롯한 각종 림프계 장기에서 림프구의 아군별 분포율을 조사 보고했으며 국내에서는 Hwang et al<sup>22</sup> 이 돼지의 혈액 및 림프계 장기내 림프구의 아군별 분포율을 보고하였다.

본 연구는 최근 비특이 면역증강제로 사료등에 많이 첨가 사용되는 제재중의 하나인 혈장단백질 (plasma protein; pp)의 효과를 어린 돼지를 대상 숙주로 하여 림프구의 표면 항원에 특이적인 각종 단클론항체를 이용하여 돼지혈액에서 분리한 림프구와 돼지백혈구 특이 단클론항체를 결합시킨 후 flow cytometry를 이용하여 구체적인 면역증강기전을 밝히고자 하는데 목적이 있다.

## 재료 및 방법

공시동물 및 실험설계 : 본 실험의 균일성을 유지하

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	5.0
		(Dom; CP 58%)	
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

기 위하여 대한제당중앙연구소 시험농장에서 건강하고 이상이 없는 정상의 포유자돈을 4복에서 선발하여, 대조구, 시험구 각각 20두씩(암수 반반) 총 40두를 실험에 적용했다(Table 1). 시험 사료는 대한제당(주)에서 생산되는 포유자돈 입분임사료(piglet prestarter feed)를 사용했으며 시험군은 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 시험개시전 및 시험개시 30일후 말초혈액을 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).

25kg으로 포장 시판되는 American Protein

Corporation社 제품을 돼지 prestarter feed 에 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>10</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 등을 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 buffer 로 3회 이상 원심세척하였다. 최종 원심후 3ml의 PBS-ACD buffer로 pellet을 부유시켜 trypan blue exclusion

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

technique 에 의해 생존세포수를 측정하였다. 최종 농도가  $5 \times 10^5 / 50\mu l$  되도록 조절하여 이용하였다.

돼지 백혈구 특이 단클론항체 : 본 실험에 공시된 단클론항체들은 Table 5에서 보는 바와 같다. anti-MHC class I 1종, anti MHC class II 2종, anti-CD2 2종, anti-CD4 2종 및 anti-CD8 3종에 대한 단클론항체를 이용하였다.

형광 세포유출 장치 (flow cytometry) : Laser이용 형광세포유출 측정장치를 이용한 검사를 하기 위하여 세포는 1개 또는 2개의 형광색소(FITC 및 phycoerythrin)을 이용하여 간접적으로 표식되어 있어야 한다.

본 실험은 conical bottom microplate의 한 well당 단클론항체  $50\mu l$  ( $15\mu g/ml$ )를 96well 에 각각 넣고 혈액으로부터 분리한 림프구( $5 \times 10^5 / 50\mu l$ )를 첨가한 후 4℃에서 30분간 잠작시켰다. 그리고 4℃에서 2000rpm, 3분 동안 원심분리하여 상층액은 버리고 pellets를 분주시키기 위하여 vortex로 shaking 했다. 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) 200 $\mu l$ 를 넣고 각 well에 3회 원심 (2000rpm, 3qns, 4℃) 세척한 후 상층액을 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 $\mu l$ 씩 첨가하였다. 이를 다시 4℃에서 30분간 잠작 시킨 다음 4℃의 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 검사시

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%

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

Specificity of monoclonal antibodies	Monoclonal antibodies	Cell types	References
MHC class I	PT 85A	All nucleated cells	Davis et al <sup>10</sup>
MHC class II	H 42A	Antigen Presenting Cell (macrophages, dendritic cells)	Davis et al <sup>10</sup>
MHC class II	TH 81A5	T.B cells	Davis et al <sup>10</sup>
CD2	MSA4	T cells	Hammerberg and Schurig <sup>18</sup>
CD2	PG168A	T cells	Davis et al
CD4	PT168A	T h/i cells	Davis et al
CD4	74-12-4	T h/i cells	Pescovitz et al <sup>43</sup>
CD8	PT 36B	T c/s cells	Davis et al <sup>10</sup>
CD8	PT81B	T c/s cells	Davis et al <sup>10</sup>
CD8	76-2-11	T c/s cells	Pescovitz et al <sup>10</sup>

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

Examination	Control(n=10)	Plasma protein(n=10)	Remark
	Mean ± SE	Mean ± SE	
Initial body wt	7.34kg±0.098	7.10kg±0.141	
Final body wt	9.31kg±0.124	10.05kg±0.155	
Gain per period	1.97kg	2.95kg	+0.98kg
Daily gain	197g/d	295g/d	rate of increase; 49%
Daily feed intake	276g/d	332g/d	rate of increase; 20%
Feed/gain	1.40	1.13	rate of improvement; 19%

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

까지 냉암소(4℃)에 보관하였다. 염색이 완료된 시료의 검사는 flow cytometry를 이용하여 각 시료당 총 2,000개 이상의 세포를 검사하여 양성반응 세포수를 측정하였다. 측정과 자료분석은 Becton Dickinson사의 Consort 32 컴퓨터 및 Lysis program을 이용하여 실시하였다.

**Plasma protein에 의한 lymphocyte blastogenesis :** Plasma protein의 림프구 증식 및 분화에 미치는 영향을 조사하기 위하여, plasma protein 투여군과 plasma protein무투여군으로부터 채혈한 말초혈액으로부터 림프구를 분리한 후, 이를 10<sup>4</sup>/well로 조절하여 96 well-plate에 concanavalin A (Con A)와 plasma protein으로 in vitro stimulation 시켰다. 48시간 후 [<sup>3</sup>H]-thymidine 1μCi 씩 첨가하였고, 다시 18시간 배양 후 cell harvester에 의해 filter paper에 옮겨 scintillation counter (Packard, Model 1600 TR)로 CPM을 측정하였다.<sup>18</sup>

**병리학적 검사 :** Plasma protein의 병리학적 연구를 위해 실험 종료후 투여군 및 무투여군 각 3두씩 부검하

여 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 장간막 림프절 등 주요 소화장기를 10% 포르말린 액으로 고정하여 hematoxyline-eosine 염색을 하여 검경하였다.

**통계분석 :** 이 실험에서 얻은 성적은 personal computer에 내장된 SAS 통계처리 package<sup>32</sup>를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 유의성 검증은 ANCOVA법 (Analysis of Covariance:공분산분석)과 unpaired Student's t-test로 검정하였다.

## 결 과

**Plasma protein급여에 따른 증체 및 사료요구를 개선 효과 :** 순수 혈장단백질 (American Protein Co제품)을 8% 수준으로 사료에 첨가하여 시험군 10두에 10일간 투여한 후 증체 및 사료요구를 개선효과를 대조군 10두와 비교한 결과는 Table 6에서 보는 바와 같다. 즉 plasma protein 투여 10일 후 투여군과 대조군(무투여

군)과의 비교 결과 증체량은 0.98kg으로 나타났으며, 일일 증체효과는 49%, 사료섭취량은 20% 증진되었으며, 사료요구율을 조사 하였던 바, 19% 향상 되었다( $p < 0.01$ ) (Table 6).

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

주조직적합항원(MHC) 발현 증강효과 : Plasma protein 급여군과 무투여군인 대조군 각 20두로부터 혈액을 채취하여 투여전 및 투여 30일 후의 반응을 조사하였다. Table 5에서 보는 바와 같이 MHC class I, II, CD

4, CD8에 특이적으로 반응하는 단클론항체를 이용하여 flow cytometry에 의한 변화를 dot plot assay와 histogram analysis로 확인 하였다. Table 7에서 plasma protein을 투여한 급여군과 무투여군의 차이는 MHC class I 은 96.2/86.6% 였으며, MHC class II-DQ는 27.6/16.6%, MHC class II-DR은 28.1/20.0%로 높은 MHC 발현 현상이 plasma protein 투여군에서 관찰되었다(Fig 1,2).

CD2, CD4(Th/i) 및 CD8(Tc/s) 보유세포의 증강효과 : Plasma protein에 의한 세포집단의 조사에서 거의 모든 성숙 T세포가 보유하고 있는 CD2에 특이적인

Table 7. Proportion of MHC molecule expression on porcine blood leukocyte from piglets administered with or without plasmas protein

MoAbs to porcine MHC antigens	Specificity of MoAbs	Proportion (%±SD)	
		Plasma protein administered (n=20)	Control* (n=20)
PT85A	Anti porcine MHC class I	96.2±3.1	86.6±3.8
H 42A	Anti porcine MHC class II DQ like	27.6±3.6	16.6±2.2
TH 81 A5	Anti porcine MHC class II DR like	28.1±2.0	20.0±2.3

\* Control; no plasma protein administered

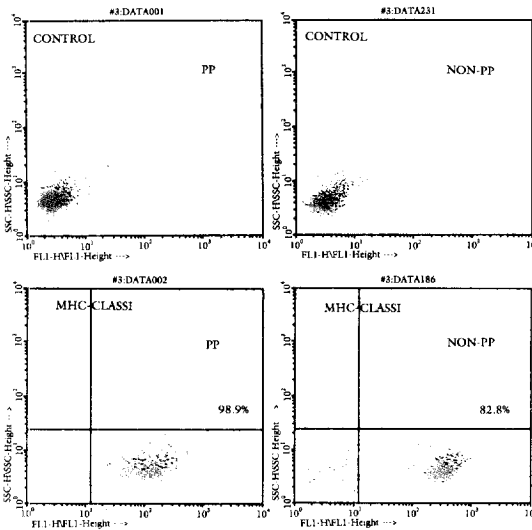


Fig 1. Representative dot plot profiles of porcine peripheral blood lymphocytes (PBL) using monoclonal antibody specifically reactive with porcine MHC-class I antigen. PP indicates PBL obtained from piglets fed plasma protein. Non-PP indicates PBL obtained from piglets fed without plasma protein.

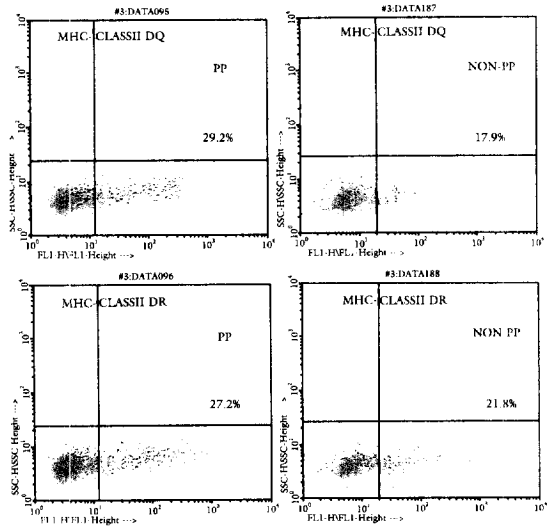
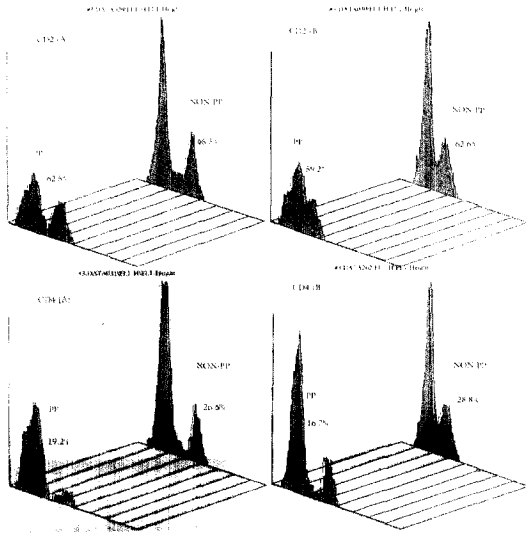


Fig 2. Representative dot plot profiles of porcine peripheral blood lymphocytes(PBL) using monoclonal antibody specifically reactive with porcine MHC-class II DQ and DR antigens, respectively. PP indicates PBL obtained from piglets fed plasma protein. Non-PP indicates PBL obtained from piglets fed without plasma protein.

**Table 8.** Proportion of CD2, CD4 and CD8 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)
MSA4	Anti porcine CD2	62.5 ± 7.1	61.9 ± 6.6
PG 168A	Anti porcine CD2	64.4 ± 7.7	64.6 ± 4.5
PT 90A	Anti porcine CD4	19.1 ± 3.6	25.6 ± 4.4
74-12-4	Anti porcine CD4	18.3 ± 4.1	28.8 ± 7.2
PT 36B	Anti porcine CD8	46.8 ± 9.0	30.5 ± 7.7
PT 81B	Anti porcine CD8	45.9 ± 10.1	33.0 ± 6.4
76-2-11	Anti porcine CD8	47.1 ± 8.8	29.7 ± 6.1

\*Control; no plasma protein administered



**Fig 3.** Representative histogram of porcine peripheral blood lymphocytes(PBL) using monoclonal antibody specifically reactive with porcine CD2 and CD4 antigen, respectively. PP indicates PBL obtained from piglets fed plasma protein. Non-PP indicates PBL obtained from piglets fed without plasma protein.

MSA4에 대하여는 투여군에서 62.5%, 무투여군에서 61.9%의 양성반응을 보였다. 아울러 단클론항체 PG 168A(CD2)에 대하여는 투여군에서 64.4%, 무투여군에서 64.6%의 양성반응을 나타냈다(Table 8, Fig 3).

또한 plasma protein 투여군은 무투여군에 비해 helper T 세포의 표면 특이항원인 CD4<sup>+</sup> 발현은 증진되지 않았으나(Table 8, Fig 3), 바이러스 숙주 감염시 MHC class I 항원과 함께 자극되는 cytotoxic T세포의

표면 특이항원인 CD8<sup>+</sup> 발현이 유의성 있게 증진되었다. PP 투여군에서의 CD8 T 림프구의 단클론항체 PT 36B, PT 81B, 76-2-11가 각각 투여군에서는 46.8%, 45.9%, 47.1%의 양성율을 보였으며 무투여군에서는 30.5%, 33.0%, 29.7%의 수준으로 PP투여군에서의 CD8 T 림프구 활성효과가 높게 항진되었음을 그림 5에서 알 수 있다(Table 8, Fig 4).

여기에서 주목할 점은 CD8 항원을 보유하는 세포들은 다른 항원을 가진 세포와 다르게 형광색소를 발현하는 intensity의 차이로 인하여 2개의 군으로 구분되는 점이다. 즉 high(bright) intensity를 보이는 주군(major population)에 속한 세포들과 low(dull) intensity를 보이는 소군(minor population)에 속한 세포들로 나눌 수 있었다. 또한 plasma protein 투여가 Th 세포와의 비율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 조사해 본 결과, CD4 양성 세포분포율을 CD8 양성 세포분포율로 나눈 비율(CD4/CD8)은 투여군에서 약 0.4로, 대조군의 0.8-0.9에 비하여 볼 때 높은 CD8<sup>+</sup> T 림프구의 증식 및 활성을 확인할 수 있었다.

Plasma protein 에 의한 세포발육 증강효과 : Plasma protein의 림프구 증식효과를 알아보기 위해 plasma protein 투여군과 무투여군의 말초혈액 림프구에 대한 세포발육 증강효과를 비교한 바, concanavalin (Con A)를 이용하여 50 $\mu$ g, 100 $\mu$ g의 농도로 자극시켰을 때 무투여군은 240,441 및 130,296의 세포수(CPM)를 나타냈으며 그리고 투여군에서는 각각 186,439와 853,330의 세포증식 효과를 보였다. 마찬가지로 plasma protein 50 $\mu$ g, 100 $\mu$ g의 농도로 각각 자극시킨 경우 무투여군에서는 179,023 및 238,017의 세포수를 그리고 투여군은 각각 737,841와 671,103의 세포수를 나타냈다. 이상에서 plasma protein 투여군은 3-6배 이상의 높은 세포 증식효과를 거둘 수 있었으며 특히 50 $\mu$ g 농도에서는 Con A 보다도 훨씬 높은 5배의 세포

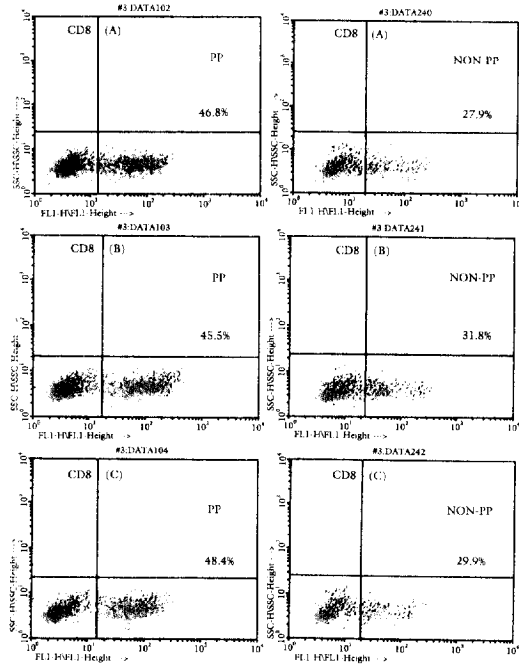


Fig 4. Representative dot plot profiles of porcine peripheral blood lymphocytes(PBL) using monoclonal antibody specifically reactive with CD8 antigens. PP indicates PBL obtained from piglets fed plasma protein. Non-PP indicates PBL obtained from piglets fed without plasma protein.

증식효과를 나타냈다(Table 9).

병리학적 검사 : Plasma protein 투여에 따른 생체조직의 병리학적 변화를 알아보기 위하여 실험 종료후 부검하여 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 장관막 림프절 등 주요 소화장기를 검사한 결과는 plasma protein 투여군의 1두에서 장점막이 약간 얇아졌으며, 무투여군에서

는 1두의 용모가 위축된 이외에는 뚜렷한 변화의 차이를 발견할 수 없었다.

## 고 찰

돼지를 비롯한 여러 종류의 동물들의 림프구를 기능별로 분류하기 위하여 오래 전부터 SRBC와의 rosette 형성능, 세포표면의 Ig 함유 여부 및 nylon wool과의 부착능 검사, 보체 매개성 세포독성 분석법, 효소매개면역흡수 분석법 (ELISA) 등 여러방법이 연구되었으며 이에 따라 단순히 T 세포와 B 세포만을 구별할 수 있었으나 더 이상의 세분화된 분류는 할 수 없었다.<sup>1,5,6,13,14,39</sup> 최근 flow cytometry의 광범위한 적용확대에 따라 사람, 마우스 이외에 인간과의 생리학적 유사관계 및 주요 식량원으로서 닭, 토끼, 개, 양, 소, 염소, 및 돼지는 동물의 생체, 세포면역체계를 모델로 이용한 연구에 매우 널리 사용되고 있다.<sup>8,16,20,21,29,42,44,45,54,58</sup> 본 실험에서는 최근에 포유 자돈의 항병력 증강 목적으로 prestarter feed에 많이 첨가 사용되는 plasma protein을 급여하여 돼지 림프구 표면항원에 대한 단클론항체를 이용하여 돼지의 말초혈액내에 존재하는 림프구의 아구별 분포율로 비교하여 특정 면역관여 세포수의 증강을 조사하였다.

혈장단백질을 prestarter feed에 8% 수준으로 첨가 하여 당 연구소 실험농장에서 plasma protein 투여군과 무투여군을 비교한 결과는, 증체량은 0.98kg으로 나타났으며, 일일 증체량은 49% 증강되는 결과를 보였다. 또한 일일 사료 섭취량도 20% 이상 증진되었으며, 사료 요구율을 조사하였던 바, 19% 향상 되었음을 알 수 있었다.

이러한 결과로 미루어 보아 plasma protein은 기존의

Table 9. Lymphocyte blastogenesis of peripheral blood leukocyte from piglets administered with plasma protein

In vitro stimulation by	CPM (±SD)		
	Concentration	Non-plasma protein (n=20)	Plasma protein (n=20)
Concanavalin A (Con A) (Per 10 <sup>4</sup> cells)	-	202,335 ± 1275	103,772 ± 1001
	50µg	240,441 ± 2217	186,439 ± 2530
	100µg	130,296 ± 997	853,330 ± 4890*
Plasma protein (Per 10 <sup>4</sup> cells)	-	187,754 ± 850	178,334 ± 980
	50µg	179,023 ± 1095	737,841 ± 4110*
	100µg	238,017 ± 2010	671,103 ± 2970*

\*p<0.01



밝혀진 탐식세포에 의한 방어기전증강에 따른 1차 면역증진, 즉 plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) 의 첨가는 LPS에 대한 sensitivity가 현저하게 증가되며 아울러 LBP는 TNF mRNA의 생산을 촉진한다는 사실<sup>36</sup>뿐만 아니라 대사작용에도 관여하여 사망관리 및 수직성을 향상시킬 수 있는 것으로 사료되었다.

Cytotoxic T 림프구 활성능력과 밀접한 관련이 있는 MHC I 양성세포 분포율을 조사하기 위하여 자돈의 혈액에서 분리한 림프구에 대한 검사 결과, plasma protein 급여군에서 MHC class I 의 양성세포 분포율은 96.2%로 무투여군 86.6%와 비교하면 약 10% 정도 높은 MHC 발현 현상이 plasma protein 투여군에서 관찰되었다. 또한 돼지 helper T 림프구활성에 관여하는 것으로 알려진<sup>31</sup> 돼지 MHC class II 항원인 SLA-DQ, DR에 대한 영향을 살펴보기 위하여 분포율을 조사해 본 결과, plasma protein 급여군과 무투여군과의 차이는 MHC class II-DQ 가 27.6/16.6% 이며, MHC class II-DR은 28.1/20.0% 로 약 8-11% 정도 높은 MHC 발현 현상을 plasma protein 급여군에서 관찰할 수 있었다. 이것은 Davis et al<sup>10</sup> 이 정상적인 성돈에서 조사한 MHC class I 70-85% 보다 상당히 높았으며 MHC class II의 28% 의 분포율과 비교시는 거의 비슷한 수준이었다. 그러나 Hwang et al<sup>22</sup> 이 5-6개월된 성돈에서 조사 보고한 MHC class II 양성세포 분포율 22% 보다 높은 수준이었다. 이 두사람의 성적들은 본 실험의 plasma protein 무투여군의 양성 세포분포율과 비슷한 수치를 보이며 본 실험은 25-55일령된 면역학적으로 아직 미성숙된 자돈에서의 성적임을 감안해 볼 때 activation 된 세포집단만이 MHC 항원발현이 증진된다는 사실에 비추어 보아, plasma protein은 어떤 특정 세포를 자극하여 면역활성에 관여할 수 있다는 가능성을 시사해 주고 있다.

이와 같은 MHC 발현 증진이 모든 면역반응의 중추적인 역할을 하고 있는 중요성으로 미루어 볼때 세포활력증진은 세포활성 물질인 cytokine에 의한 것이 아닐까 짐작된다.

모든 말초혈액 및 흉선내 T세포에 존재하는 CD2 항원에 대한 양성세포 분포율은 plasma protein 투여군이 62.5-64.6%로 양자의 유의차는 없는 것으로 나타났다. 이 성적은 Johnson et al<sup>23</sup> 이 조사 보고한 63.8% Hammerberg와 Schurig<sup>18</sup>의 59.5%와 비슷한 수준이지만 Outterage et al<sup>39</sup>의 52.2% Hammerberg et al<sup>19</sup>의 42% 및 Hwang et al<sup>22</sup>의 49.0% 보다 다소 높았다. 이것은 Mackay<sup>35</sup>가 사람은 76% 그리고 소는 62%,

Organ et al<sup>38</sup> 이 랫드는 76% 및 Dean et al<sup>11</sup>의 고양이는 54.8%로 보고한 성적과는 비슷한 수준을 보였다. 이러한 사실에 비추어 볼 때 본 실험에서 투여군과 무투여군의 CD2 양성세포 분포율은 다른 보고자들의 성적보다 비교적 높은 수준을 보였지만 plasma protein에 의한 양성세포에 대한 항진효과는 발견되지 않았다.

CD4 양성세포 즉 Th 세포의 분포율은 plasma protein 투여군에서 20% 정도의 낮은 수준을 보였는데, Pescovitz et al<sup>42</sup>의 25-32%, Jonjic 등<sup>25</sup> 이 보고한 40-50%, Saalmuller et al<sup>49</sup>의 34-50%, 보다는 낮은 편이었으나 Hwang et al<sup>22</sup>의 19.4%와는 비슷한 수준으로 나타났다. 그리고 이는 Mackay<sup>35</sup>가 사람은 57%, 소는 32%, 면양은 20%, Organ et al<sup>38</sup> 이 랫드는 56% 및 Dean et al<sup>11</sup> 이 고양이는 33.9%라고 보고한 성적과 비교해 볼 때 본 연구에서 공식한 돼지는 2개월이된 미성숙 자돈 입을 감안할 때 상기의 보고자들의 성적과 상대적으로 비슷한 수준으로 생각된다.

반면에, T c/s 세포의 표면 특이항원인 CD8<sup>+</sup> 발현은 plasma protein 투여군이 45.9-47.1%로, 무투여군 29.7-33.0%와 비교시 각각 16.3%, 12.9%, 17.4% 정도의 높은 발현율을 나타냈다. 이는 Kelly et al<sup>28</sup> 이 조사한 32-35%, Jonjic과 koszinowski<sup>26</sup>의 35-41% 및 Pescovitz et al<sup>43</sup>의 38%, Hwang et al<sup>22</sup>의 37.2% 보다는 훨씬 높은 양성 세포 분포율을 알 수 있다. 또한 Mackay<sup>36</sup>가 사람은 13%, 소는 27%, 그리고 면양은 12%, Organ et al<sup>38</sup> 이 랫드는 23%, Dean et al<sup>11</sup>의 고양이는 19.1%라고 보고한 성적은 plasma protein 무투여군의 양성세포 분포율과 유사한 것을 알 수 있다.

본 실험결과에서 plasma protein 투여군은 무투여군에 비해 helper T 세포의 표면 특이항원인 CD4<sup>+</sup> 발현은 증진되지 않았으나, plasma protein의 역할은 바이러스 숙주 감염시 MHC-class I 항원과 함께 자극되는 cytotoxic T 세포의 표면 특이항원인 CD8<sup>+</sup> 발현증진에 깊은 관련이 있는 것으로 믿어진다. 이러한 결과는 plasma protein이 T 세포중에서도 특정한 일부의 세포, 즉 CD8<sup>+</sup> T 세포를 자극시키는 효과를 가진 것으로 사료되며, 세균성 질병보다는 바이러스성 질병 방어기전 항진에 특이적으로 작용하리라는 가능성을 더욱 높여 주고 있다.

돼지는 말초혈액 T 세포중 약 25%는 CD4와 CD8 양쪽을 다 표현하는 특징 이외에 T 세포군의 CD4/CD8 비율이 다른 동물과는 달리 1 이하는 나타난다.<sup>43,44</sup> CD4/CD8 비율은 본 실험에서는 0.4로 Hammerberg et al<sup>19</sup> 이 보고한 1.3, Jonjic et al<sup>25</sup>의 1.0 및 Saalmuller et al<sup>50</sup>의 0.8 보다는 낮았으나, Lunney와 Pescovitz<sup>33</sup>의 0.6,

Hwang et al<sup>22</sup>의 0.5와 비교하여 볼 때 매우 낮음을 알 수 있으며, 이는 CD8<sup>+</sup> 림프구 또는 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 림프구의 활성화 및 증식에 기인하는 것으로 사료된다. 또한 Jonjic et al<sup>25</sup>은 돼지가 나이가 들에 따라 cytotoxic T세포에 대한 helper T 세포의 비율은 1로 접근하는 경향이 있다고 보고했지만 이는 사람의 1.5-2.0, 소의 1.2, 면양의 1.7, 고양이의 1.9 및 랫드의 2.4에 비해서는 매우 낮다.<sup>11,36,38</sup>

Plasma protein 투여군과 무투여군의 말초혈액으로부터 림프구를 분리한 후 concanavalin A (Con A)와 plasma protein으로 mitogen stimulation시킨 후 CPM를 측정하였더니, Con A 50 $\mu$ g (240,441 $\pm$ 2217) 및 100 $\mu$ g (130,296 $\pm$ 997) 농도에서와 plasma protein 50 $\mu$ g (179,023 $\pm$ 1095) 과 100 $\mu$ g (238,017 $\pm$ 2010) 농도에서는 같은 무투여군에서 보다 3-6배 이상의 높은 세포증식효과를 거둘 수 있었다. 이는 Hammerberg와 Schuric<sup>18</sup>의 대조군에서 123,600 $\pm$ 8000~161,300 $\pm$ 8000 세포수와 비교시 6배 이상의 높은 세포 증식효과를 나타냈음을 알 수 있었다. 또한 같은 농도의 plasma protein과 Con A 를 이용하여 자극시킨 후 증식효과를 비교하면 100 $\mu$ g 농도에서는 Con A가 6배, plasma protein이 3배의 세포증식효과를 보였으나, 50 $\mu$ g에서는 Con A는 반응이 없었지만 plasma protein으로 stimulation시킨 경우는 4배 이상의 높은 증식효과를 보인 결과로 미루어 plasma protein이 저농도에서는 Con A 보다 훨씬 높은 세포 증식효과를 유발한다고 생각할 수 있다. 이처럼 plasma protein 투여군의 림프구에 대한 실험실내 활성을 통한 2차 면역효과는 높은 세포증식효과가 나타난 결과를 보였으므로 이것은 plasma protein이 세포의 표면수용체와 결합하여 세포 증식cycle을 유도함으로써 이루어지는 것으로 짐작된다.

Monocyte origin(macrophage) 세포는 G(-) bacteria와 bacterial LPS(endotoxin)에 대한 숙주반응을 control하는 이중 역할을 보유하는데, LPS는 cytokine, arachidonic acid 에서 유도되는 lipid산물 또는 mediator를 방출하기 위해 Macrophage를 자극한다. 즉 macrophage에 의해 인식되는 것은 LPS의 lipid A 부분이다. 그러므로 plasma LPS-binding protein(LBP)은 정상 혈장에 있는 구조적인 단백질이며 이것은 LPS에 대한 높은 친화력으로 결합하며, 감염의 초기에 LPS를 탐지하는 숙주의 능력을 끌어 올린다. 이 기전에는 복합 LPS 및 plasma protein, LBP 그리고 macrophage 표면단백질, CD14가 포함된다.<sup>38,53,55,56</sup>

본 연구에서는 이와같은 plasma protein의 숙주내

LBP와 관련된 1차면역반응 증진효과 이외에 어린 동물의 항병력 증진 목적으로 사용되는 plasma protein 투여군에서 숙주 특이면역조절에 선택적으로 작용하는 특정세포집단의 활성이 항진될 수 있다는 가능성을 확인했으며 특히 면역체계의 중심적인 역할을 하는 CD8 T림프구와 Yang et al<sup>59</sup>이 보고한 N림프구를 특이적으로 자극시킴으로써 plasma protein이 특정한 세포에 관여하여 세포성 면역조절기능에 참여하고 있다는 사실을 재삼 확인할 수 있었다.

본 연구는 plasma protein의 돼지백혈구 표면 특이항원의 형질발현에 관하여 조사한 것으로 금후 연구는 특이 반응세포의 표면 특이항원을 분리하여 유전자 탐색 등을 이용한 유전 발현능력등을 Southern blot 또는 Northern blot 기법으로 확인함으로써 면역기능에 대한 작용기전을 밝히기 위한 연구에 중점을 두어야 할 것으로 믿어진다.

## 결 론

어린 돼지의 임플임사료에 항병력 목적으로 최근에 많이 첨가 사용되는 비특이 면역 증강제 중의 하나인 혈장 단백질(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 4종의 돼지림프구 표면항원 특이 단클론항체와 반응시킨 결과를 flow cytometry 로 검사하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 10일간 plasma protein 투여군과 무투여군을 비교 시 일일 증체효과는 49% 개선되었으며 또한 일일 사료 섭취량은 20% 증진 및 사료요구율이 19% 향상되었다.
2. MHC class I 양성세포의 분포율은 plasma protein 투여군이 96.2 $\pm$ 3.1%, 무투여군의 86.6 $\pm$ 3.8% 보다 약 10% 정도 높은 MHC class I 발현현상이 관찰되었다.
3. MHC class II-DQ 양성세포의 분포율은 plasma protein 투여군이 27.6 $\pm$ 3.6%, 무투여군이 16.6 $\pm$ 2.2%였으며, MHC class II-DR세포의 분포율은 투여군이 28.1 $\pm$ 2.0%, 무투여군이 20.0 $\pm$ 2.3%로 plasma protein 투여군이 무투여군에 비해 약 8%이상 높은 MHC class II 발현 증강이 나타났다.
4. CD2 세포의 양성분포율은 투여군이 62.5~64.4%, 무투여군이 61.9~64.6%로 CD2 세포의 증강효과

는 관찰할 수 없었다.

5. CD4 양성세포의 분포율은 plasma protein 투여군이 18.3~19.1%, 무투여군이 25.6~28.8%로, helper T 세포표면 특이항원에 대한 발현은 무투여군이 오히려 약간 증가되었다.

6. CD8 즉 cytotoxic/suppressor T 세포 분포율은 plasma protein 투여군과 무투여군을 비교하면 각각 46.8/30.5%와 45.9/33.0% 및 47.1/29.7%로 약 12.9~17.4%의 높은 CD8<sup>+</sup> 발현증강이 투여군에서 관찰되었다.

7. Plasma protein에 의한 세포발육 증강효과를 보기 위해 실험실내 Con A 와 plasma protein으로 자극했을 때, Con A 50 $\mu$ g 농도에서는 plasma protein 투여군과 무투여군 사이에 세포발육 증강효과는 나타나지 않았지만 100 $\mu$ g 농도로 자극했을 경우에는 6배 이상의 세포 증식효과가 나타났다. 또한 마찬가지로 plasma protein 50 $\mu$ g 농도로 자극했을 때는 plasma protein 투여군은 무투여군에 비해 4배, 100 $\mu$ g 농도에서는 3배의 세포 증식효과를 나타냈다.

본 연구는 비특이 면역증강제의 하나인 plasma protein을 어린 돼지에 급여하여 돼지의 림프계의 세포들을 활성화시킴으로써 특정 림프구아군의 증가 및 숙주 면역반응에 중요한 림프구 증식효과가 관찰되어 plasma protein이 세포성 면역상승효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Binns RM. Organization of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig. *Vet Immunol Immunopathol* 1982; 3:95-146.
2. Binns RM. Sheep erythrocyte rosettes in the pig, cattle and goats demonstrated in the presence of dextran. *J Immunol Methods* 1978; 21:197-210.
3. 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.
4. 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.
5. Buschman H, Pawlas S. A study of porcine lympho-

cyte populations I. Separation of porcine lymphocyte subpopulations. *Vet Immunol Immunopathol* 1980a; 1:215-224.

6. Buschman H, Pawlas S. A study of porcine lymphocyte populations. II Characterization of porcine lymphocyte populations. *Vet Immunol Immunopathol* 1980b; 1:225-241.
7. Cherwinsky HM, Schumacher JH, Brown KD, et al. Two types of mouse helper T cell clone III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays and monoclonal antibodies. *J Exp Med* 1987; 166:1229-1244.
8. 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.
9. Coffman RL, Seymour BW, Lebmman DA, et al. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 1988; 102:5-28.
10. 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 immunesystem in cattle and other species. *Vet Immunol Immunopathol* 1987; 15:337-376.
11. Dean GA, Quackenbush SL, Ackley CD, et al. Flow cytometric analysis of T-lymphocytes subsets in cats. *Vet Immunol Immunopathol* 1991; 28:327-335.
12. DeLuca D. I-A-positive antigen presenting cells, IL-1, IL-2 and gamma-interferon are require for fetal thymocyte development in vitro. *J cell Biochem Suppl* 1987; 11D:203.
13. Escajadillo C, Binns RM. Rosette formation with sheep erythrocyte-A possible T-cell marker in the pig. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1975a; 48:261-275.
14. Escajadillo C, Binns RM. Rosette formation of pig T lymphocytes with sheep erythrocytes. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1975b; 49:325-331.
15. Van Ewijk W. Immunohistology of lymphoid and non lymphoid cells in the thymus in relation to T lymphocyte differentiation. *Am J Ana* 1984; 17:311-330.
16. Giegerich GW, Hein WR, Miyasaka M, et al. Res-

- stricted expression of CD2 among subsets of sheep thymocytes and T lymphocytes. *Immunology* 1989; 66:354-361.
17. Goverman J, Hunkapiller T, Hood L, A speculative view of the multicomponent nature of T cell antigen recognition. *Cell* 1986; 45: 475-484.
  18. Hammerberg C, Schurig GG. Characterization of monoclonal antibodies directed against swine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 1986; 11:107-121.
  19. Hammerberg C, Schurig GG, Ochs DL, Immunodeficiency in young pigs. *AM J. Vet Res* 1989; 50:868-874.
  20. Hammerling GJ, Lemke H, Hammerling V, et al. Monoclonal antibodies against murine cell surface antigens: Anti-H-2, anti-Ia and anti-T cell antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol* 1978; 81:100-106.
  21. Hildreth JEK, Gotch M, Hildreth PDK, et al. A human lymphocyte-associated antigen involved in cell-mediated lympholysis. *Eur J Immunol* 1983; 13:202-208.
  22. Hwang EK, Lim CH, Davis WC. Subpopulation of lymphocytes in blood organs of pigs 1. Proportion of lymphocyte subpopulations in blood, spleen, mesenteric and mandibular lymph nodes, and tonsils. *RDA J Agri* 1993b; 35(1):702-719.
  23. Janeway CA, Jones B, Hayday A, Specificity and function of T cells bearing  $\gamma/\delta$  receptors. *Immunol Today* 1988; 9:73-76.
  24. Johnson HJr, Lunnety JK, Sachs DH, et al. Preparation and characterization of an antiserum specific for T cells of pigs. *Transplantation* 1980; 29:477-483.
  25. Jonjic N, Jonjic S, Saalmuller A, et al. Distribution of T-lymphocyte subsets in porcine lymphoid tissues. *Immunology* 1987; 60:395-401.
  26. Jonjic S, Koszinowski UH. Monoclonal antibodies reactive with swine lymphocytes I, Antibodies to membrane structures that define the cytolytic T lymphocyte subset in the swine. *J Immunol* 1984; 133:647-652.
  27. Kaufmann SHE. Immunity against intracellular bacteria: Biological effector functions and antigen specificity of T lymphocytes. *Curr Top Microbiol Immunol* 1988; 198:141-176.
  28. Kelley KW, Salmon H, Davis WC, et al. A cytotoxic murine monoclonal antibody that recognizes a porcine T cell subset involved in lectin-induced proliferation. *Ann Rech Vet* 1988; 19:147.
  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. Lo D, Spent J, Exogenous control of I-A expression in fetal thymus explants. *J Immunol* 1986; 137:1772-1775.
  31. Lunney JK, Davis WC, Pescovitz MD. Identification of monoclonal antibodies that recognize the SLA-DQw antigens, a second set of swine Ia antigens. *Fed Proc* 1985; 44:554.
  32. Lunney JK, Osborne BA, Sharrow SO, et al. Sharing of Ia antigens between species TV. Interspecies cross reactivity of monoclonal antibodies directed against polymorphic mouse Ia determinants. *J Immunol* 1983; 130:2786-2793.
  33. Lunney JK, Pescovitz MD. Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations. *Vet Immunol Immunopathol* 1987; 17:135-144.
  34. Lunney JK, Pescovitz MD. Differentiation antigens of swine lymphoid tissue. In: Miyasaka M and Trnka, Z (eds), *Differentiation antigens in lymphohemopoietic tissues*. New York: Marcel Dekker, 1988; 421-454pp.
  35. Mackay C. Sheep leukocyte molecules: A review of their distribution, structure and possible function. *Vet Immunol Immunopathol* 1988; 19:1-20.
  36. Mathison JC, Tobias PS, Wolfson E, et al. Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. *Immunol* 1992; 149:208-2-6.
  37. O'Garra A, Umland S, Defrance T, et al. B cell factors are pleiotropic. *Immunol Today* 1988; 9:45-54.
  38. 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.
  39. 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.

40. Parker DC. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:331-360.
41. Paul WE, Ohara J. B-cell stimulatory factor-1/interleukin 4. *Annu Rev Immunol* 1987; 5:429-459.
42. Pescovitz MD. Differentiation antigens of porcine leukocytes. *Monographs Animal Immunol* 1990; 1:41-45.
43. Pescovitz MD, Lunney JK, Sachs DH. preparation and characterization of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. *J Immunol* 1984; 133:368-375.
44. Pescovitz MD, Lunney JK, Sachs DH. Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies; Distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cells. *J Immunol* 1985; 134:37-44.
45. Ponsard DC, Cinader B, Chou CT, et al. Characterization of rabbit cells by monoclonal and polyclonal antibodies. *Immunology* 1985; 59:115-122.
46. Reinherz EL, Schlossman SF. The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* 1980; 19:821-827.
47. Rothenberg E, Lugo JP. Differentiation and cell division in the Mammalian thymus. *Rev Biol* 1985; 112: 1-17.
48. Rothkotter HJ, Pabst R. Lymphocyte subsets in jejunal ileal Peyer's patches of normal and gnotobiotic minipigs. *Immunology* 1989; 67:103-108.
49. Saalmuller A, Jonjic S, buhring H-J, et al. Monoclonal antibodies reactive with swine lymphocytes. II. Detection of an antigen on resting T cells down-regulated after activation. *J Immunol* 1987a; 138: 1852-1857.
50. Saalmuller A, Reddehase MJ, Buhring H-J, et al. Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1987b; 17:1297-1301.
51. Sachs DH, Leight G, Cone J, et al. Transplantation in miniature swine. I. Fixation of the major histocompatibility complex. *Transplant* 1976; 22:559-567.
52. SAS: *SAS User's Guide; Statistic*, Cary, Nc: SAS Inst Inc 1985.
53. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, et al. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990; 249:1429-1431.
54. Springer T, Galfre G, Secher DS, et al. Monoclonal xenogenic antibodies to murine cell surface antigens; Identification of novel leukocyte differentiation antigens, *Eur J Immunol* 1978; 8:539-55.
55. Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Isolation of a lipopolysacchaide binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* 1986; 164:777-782
56. 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.
57. Van der Valk P, Herman CJ. Biology of disease. Leukocyte functions. *Lab Invest* 1987; 57:127-137.
58. Wulff JC, Deeg HJ, Storb R. A monoclonal antibody(DT-2) recognizing canine T lymphocytes. *Transplantation* 1982; 33:616-620.
59. Yang CK, Kim SJ, Moon JS, et al. Enhancement of cell mediated immunity by administration of plasma protein in pigs I. proportion of leukocyte subpopulations and cells adhesions molecule in peripheral blood. *Korean J Vet Res* 1994a; 34(2)-