

재래산양 적혈구를 이용한 한우 순환 혈액내 rosette 형성 세포 정량

정기수 · 김년수 · 김동훈 · 강명대* · 송희종*
가축위생시험소 영동지소, 전북대학교 수의과대학*
(1989. 7. 26 접수)

Enumeration of Korean native goat erythrocytes (KGRBC)-rosette forming cells in peripheral blood of Korean cattle

Ki-soo Cheong, Neun-su Kim, Dong-hoon Kim, Myoung-dai Kang,* Hee-jong Song*
*Yeong Dong-Branch of Kangwon-Do Animal Health Laboratory,
College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University**
(Received July 26, 1989)

Abstract: In order to enumerate the T-lymphocytes in bovine peripheral blood lymphocytes (PBL) by E rosette assay, KGRBC were treated with various concentrations of 2-aminoethylisothiouonium bromide(AET) and dextran(Dex), singly or in combination. To further standardize the assay, optimum concentration of AET- and/or Dex-treatment and incubation time for rosette forming cell(RFC) counts were determined. The levels of B-lymphocytes in the PBL were evaluated by erythrocyte-antibody(EA_{Fc})- and erythrocyte-antibody-complement (EAC)-rosetting techniques.

The results obtained were as follows;

The PBL from 20 clinically normal Korean cattle were formed as low percentage of spontaneous E-rosette ($6.7 \pm 2.4\%$) in control group, whereas in KGRBC treated with 0.1M AET for 20 minutes and 8% Dex were formed as $37.3 \pm 2.7\%$ and $45.1 \pm 2.1\%$, respectively. And the synergistic effects were noted no less than $66.5 \pm 5.6\%$ when the KGRBC treated with 0.1M AET and 8% Dex subsequently and rate of RFR did not change significantly between 3~24 hours incubation time at 4°C, EA-and EAC-RFR were $23.3 \pm 9.1\%$ and $23.1 \pm 7.9\%$, respectively.

These results suggest that the KGRBC would be a useful agent for the enumeration of T-lymphocytes by E rosette assay and B-lymphocytes by EA- or EAC-rosette assay in cattle-PBL.

Key words: E, EA, EAC rosette; AET; dextran; cattle-PBL.

서 론

사람을 포함한 대다수의 척추동물(숙주)의 림프계에는 각기 기능이 다른 2계열의 림프구 즉, thymus-derived cells(T 림프구)과 bursa 또는 bursa equi-

valent derived cells(B 림프구)가 있으며, 이들이 수행하는 면역 조절에 의해 세포성 및 체액성 면역이 이루어지고 있음은 주지의 사실이다.^{1,2} 또한, 면역반응 조절에는 T-형조 세포(helper T cell, Th)와 T-억제세포(suppressor T cell, Ts inducer, Ts transducer,

Ts effector, Ts efferent 및 Ts afferent)가 관여하여 T-세포의 복잡한 협조 및 억제회로(T-helper/suppressor cell circuit)가 있음이 밝혀지고 있다.^{1,3} 따라서 lymphocyte subpopulations의 동정 및 이들 세포의 활성도를 측정하는 것은 숙주의 건강 및 질병상태에 있어서 이들 세포의 기능을 이해하는데 매우 중요하다.⁴⁻⁶

Rosette형성기법은 숙주의 면역기능을 세포수준에서 평가하는 방법의 하나이며, rosette은 림프구에 동종 또는 이종적혈구나 항원이 결합되어 이루어진다. 즉, B림프구는 적혈구에 특이 항체를 처리(erythrocytes-antibody, EA) 또는 EA에 보체를 처리(erythrocytes-antibody-complement, EAC)하여 주변 rosette을 형성하게 되고, T림프구는 자연(비면역)적으로 또는 항원의 감각에 의해 생성된 specific membrane receptor에 적혈구 또는 항원이 결합되어 rosette을 형성한다.⁷⁻⁹ 그러나 림프구의 rosette 형성능은 실험기법, 온도, 배양시간, 적혈구원, 단백질농도 등 제반 요인에 의해 영향을 받고,^{5,10,11} 특히E rosette 형성실험에서는 적혈구를 neuraminidase, papain, helix pomatia(HP), peanut agglutinin(PNA), bromelin, 2-aminoethylisothiouonium bromide(AET) 등으로 처리하거나¹²⁻¹⁷ rosette medium에 혈청 또는 dextran을 첨가하면^{11,18,19} 세포의 친화성이 증가되어 rosette 형성율이 현저히 증가하게 된다.

한편, 숙주의 T림프구를 정량하는데 있어서 사람, 개, 고양이, 토끼, 소, 기니피크, 마우스, 말, 돼지 등에서 각각 보고된 점을 감안하면 동물종류에 따라 이종 적혈구에 대한 T-cell의 receptors가 다르기 때문에 적혈구의 선택이 매우 중요함이 지적된다.^{1,9,12,13,20,21}

본 실험에서는 재래산양(혹염소) 적혈구를 이용하여 한우 순환 혈액내 T 및 B림프구를 rosette법으로 정량한 바 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

대상동물 : 한우는 전라북도 종축장에서 사육하고 있고, 사육중에 특이한 병력이 없었던 1~2년생의 건강한 중모우 20두를 림프구원으로, 재래산양(혹염소)은 본 대학에서 사육하고 있는 성숙한 암산양을 적혈구원으로 하였다.

한우 순환혈액내 림프구(PBL) 분리 : 경정맥혈(heparin 20IU/ml)을 채취하고, ficoll-hypaque액(Sigma, d=1.077)에 중층 400g로 30분간 원심한 후 PBL을 분리, 원심 세척한 후 rosette medium(10% FCS, RPMI 1640, 25mM HEPES, pH7.4)에 $3 \sim 4 \times 10^6$ cells/ml가

되도록 재부유하여 사용하였다.

재래산양 적혈구(KGRBC) : 경정맥에서 채취한 혈액을 동량의 Alsever색액(pH 6.1)과 혼합, 4°C에 보존하면서 채혈 후 2주 이내의 신선한 것을 사용하였으며, 사용 직전에 백혈구를 제거한 다음 PBS로 3회 원심세척하였다.

약제 : Rosette 형성능의 증감여부를 확인할 목적으로 사용한 약제는 2-aminoethylisothiouonium bromide (AET, Sigma)와 dextran (Dex, Sigma, MW 147,000)이었다.

KGRBC의 AET처리(E_{AET}) 및 Dex처리(E_{Dex}) : AET를 증류수에 각각 0.05, 0.1, 0.15 및 0.2M이 되도록 희석하여 pH를 9.0으로 조정후 25% E_{AET} 용액을 만들어 37°C에 20분간 배양하였다. 그 후 4°C의 생리 식염수로 4회 세척하고 rosette medium으로 1% E_{AET} 용액을 만들었다.¹²

한편, Dex는 PBS에 희석(w/v, 2, 4, 6, 8 및 10%)하여 10% 적혈구 부유액을 만들고 사용직전에 1% E_{Dex} 액을 만들었다.

E_{AET} 의 Dex처리($E_{AET+Dex}$) : 상술한 바의 E_{AET} 를 각 농도의 Dex용액으로 10% $E_{AET+Dex}$ 부유액을 만든 후 E-rosette assay을 위하여 사용직전에 동액으로 1% $E_{AET+Dex}$ 부유액을 만들었다.¹⁰ 한편, 대조 rosette형성 시험에는 무처리 KGRBC를 사용하였다.

Rosette형성능 실험 : 순환 혈액 림프구의 KGRBC-rosette형성 실험은 E-, EA- 및 EAC-rosette법으로 구분하여 실시하였다.

E-rosette형성 : 전술한 바와 같이 제작한 순환혈액 림프구 부유액과 무처리 KGRBC(E), E_{AET} , 및 E_{Dex} $E_{AET+Dex}$ 부유액을 동량(v/v)씩 각각 혼합하여, E_{AET} 와 $E_{AET+Dex}$ 의 경우는 37°C에 30분간 배양한 후 200g로 5분간 원심하여 4°C에 보존하였다.⁵

EA-rosette형성 : Complete Freund's adjuvant에 혼합한 KGRBC 부유액 0.5ml(1×10^8 세포)를 Rat의 피하에 주사하고 14일 후에 채혈하여 분리한 IgG rich anti-KGRBC serum²²을 비동화시킨 후 적정농도로 희석한 혈청과 10% KGRBC 부유액을 동량 혼합, 37°C에서 30분간 작용시킨 후 400g로 10분간 원심하여 상청액을 버리고 이를 PBS로 세척한 다음 1% EA가 되도록 rosette medium으로 재부유하였다. 여기서 전술한 바의 림프구를 동량(v/v) 혼합한 후 밀전하여 37°C수조에서 30rpm으로 15분간 rotation하고 4°C에 보존하였다.

EAC-rosette형성 : 림프구의 complement receptor rosette형성능은 생리식염수에 희석한 KGRBC 부유

액 0.5ml(1×10^8 세포)를 Rat의 대퇴 정맥내로 주입하고 7일 후에 채혈하여 분리한 IgM rich anti-KGRBC serum²²을 비동화시킨 후 적정농도로 희석한 혈청과 10% KGRBC 부유액을 혼합 EA-rosette형성 실험과 동일하게 처리한 후 세척하여 EA를 얻고, 10% EA 부유액과 기니픽 혈청(complement, 20배 희석)을 동량 혼합, 37°C에 1시간 배양하고 원심, 상층액을 버리고, 이를 PBS로 세척한 후 1% EAC가 되도록 rosette medium으로 재 부유한 다음 EA-rosette형성 실험법과 동일하게 실시하였다.

이상과 같은 과정이 끝난 각 시험관에 0.2% trypan blue액을 1적씩 가하고, 위상차 현미경하에서 검경하였으며, 검경시 림프구에 KGRBC가 5개 이상 부착한 경우 rosette 형성세포로 판정하였다.

Rosette형성율(RFR)은 하기 술식에 의거 계산하였다.

$$\% \text{ of rosette} = \frac{\text{No. of rosette forming cells}}{\text{Total cell counted} \times \text{viability}} \times 100$$

결 과

냉장정지 시간에 따른 rosette 형성율(RFR)의 증감 : Rosette형성 실험 과정을 거친 후 판독할 수 있는 최적 냉장정지 시간을 알아보기 위하여 10두의 정상 한우 PBL을 $E_{AET+Dex}$ 와 혼합, 원심 침전시킨 후 냉장정지하면서 경시적으로 RFC를 계산 비교하였다. 그 결과 Fig 1에서와 같이 RFR은 원심 후 즉시(0hr)에는 $40.1 \pm 3.5\%$ 이었으나 점차 급증하여 5시간에 최고

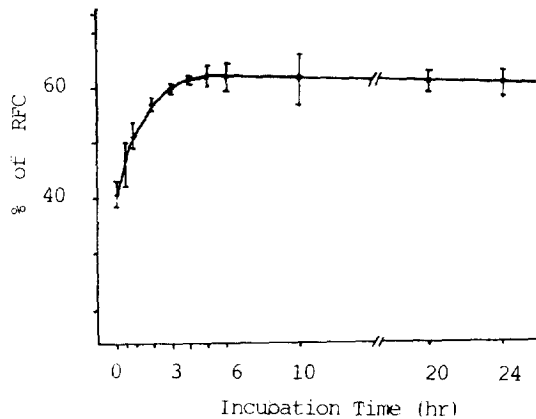


Fig 1. Kinetics of rosette formation by bovine PBL with $E_{AET+Dex}$ PBL were incubated with $E_{AET+Dex}$ at 37°C for 20 min, centrifuged at 200g for 5 min and further incubated at 4°C for varying periods of time. Results are expressed as mean rosette-forming cells from 10 animals \pm S.D.

($62.6 \pm 7.0\%$)에 도달 후 점차 감소되는 경향이나 3~24시간 내에는 냉장정지에 의한 차이가 인정되지 않아 RFC의 판독시간 범위를 알 수 있었다.

RFR에 미치는 AET의 처리효과 : AET가 한우 PBL의 RFR에 미치는 영향을 알아 보고자 KGRBC를 여러 농도의 AET에 20분 각각 처리한 후 PBL과 결합시켜 RFC를 계산하였다. 그 결과 Table 1에서와 같이 무 처리군에서는 $6.7 \pm 2.4\%$ 인데 비하여 AET 처리군에서는 모두 증가($3.88 \sim 5.57$ 배) 되었고, 특히 0.15M 처리군에서 더욱 현저($37.3 \pm 2.7\%$)하였다. 한편, 0.2M AET처리군에서는 0.15M 처리군 보다 오히려 감소되었다.

RFR에 미치는 Dex의 처리효과 : Dex가 PBL의 RFR에 미치는 영향은 Table 2에서와 같이 무 처리군 보다 2~8%의 Dex를 처리함으로써 2.82~6.73배까지 증가됨을 알 수 있었고, 8% Dex를 처리할 때 최고치($45.1 \pm 2.1\%$)에 도달하였다. 그러나 10% Dex를 처리하면 8% Dex 처리군에서 보다 오히려 감소되었다.

AET와 Dex의 복합처리에 의한 RFR의 상승효과 :

Table 1. Effect of various concentrations of AET on E-rosette formation

AET*	% of RFC (M \pm SD)**
Untreated	6.7 \pm 2.4
0.05M	28.9 \pm 4.7
0.1 M	34.9 \pm 5.0
0.15M	37.3 \pm 2.7
0.2 M	26.0 \pm 5.2

* AET: 2-aminoethylisothiuronium bromide.

** RFC: rosette forming cells, percentage expressed as the mean values from 20 animals after counting a minimum of 200 lymphocytes from each samples.

Table 2. Effect of various concentrations of dextran on E-rosette formation

Dex #	% of RFC (M \pm SD)
2%	10.6 \pm 0.1
4%	18.9 \pm 3.2
6%	29.6 \pm 8.5
8%	45.1 \pm 2.1
10%	29.1 \pm 4.3

Dex: dextran.

상술한 바의 결과에서 KGRBC를 0.1M 또는 0.15M AET로, 또는 8% Dex로 처리할 때 RFR이 현저히 증가한 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 이들 약제의 처리 방법을 조합할 경우 RFR의 상승효과가 있는지의 여부를 알아보고자 여러농도의 AET로 처리한 KGRBC (E_{AET})를 각 농도의 Dex용액으로 처리하여 RFR을 구한 결과는 Table 3과 같다. 즉 0.1M AET 처리 E_{AET} 에 각 농도의 Dex를 처리할 경우 Dex 농도가 증가될수록 RFR은 점차 증가되어 8% Dex 처리군에서 최고(66.5±5.6%)에 달하였고, 10% Dex 첨가시에는 오히려 감소되었다. 또한 AET 단독처리시에는 0.15M AET 처리군이 0.1M AET 처리군에서 보다 RFR이 높았으나 Dex의 혼합 처리시에는 오히려 저하된 결과를 초래하여 KGRBC에 의한 한우 PBL의 RFR은 0.1 M AET 처리 E_{AET} 에 8% Dex를 첨가하여 줌으로써 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 한편, KGRBC를 AET로 처리하거나 Dex를 첨가하면 대다수의 RFC가 20개 이상의 KGRBC와 결합되고 있고 5개 이하의 KGRBC와 결합된 경우는 극소수에 불과하여 RFC의 판독이 용이하였다.

EA- 및 EAC-Rosette 형성능 : 순환 혈액내 림프구 anti-KGRBC 항체흡착 KGRBC(E_{Fc})와의 EA 및 EA에 보체를 처리한 EAC rosette 형성율은 Table 4 와 같이 각각 23.3±9.1% 및 23.1±7.9%로 나타났다.

Table 3. Synergistic effect of AET and Dex on E-rosette formation

Erythrocytes treated with		% of RFC(M±SD)
AET	Dex	
0.1M	2%	27.7±7.3
0.1M	4%	40.9±3.8
0.1M	6%	56.7±4.0
0.1M	8%	66.5±5.6
0.1M	10%	36.3±1.8
0.05M	8%	32.4±3.3
0.15M	8%	39.2±1.2
0.2M	8%	30.5±3.0

Table 4. EA- and EAC-rosette formation rates of PBL with KGRBC

Rosette	% of RFC (M±SD)
EA	23.3±9.1
EAC	23.1±7.9

고 찰

숙주의 순환혈액 또는 림프장기내의 T 림프구는 이 종적혈구와 자발적으로 E rosette을 형성한다. 자연 E rosetting 현상은 B 림프구 및 단핵식세포제와 식별을 위한 T 림프구의 편리한 marker로 사용되고 있으며, 이의 활용은 건강과 질병 상태에 있어서 여러가지 cell type의 역할을 이해하고, 면역학적 특성을 결정하는데 널리 이용되고 있다.^{5,11,23} E-rosette 방법으로 T 림프구를 측정할 때 여러가지 이종적혈구가 이용되고 있으며(서론 참조), 특히 소의 T 림프구 정량에는 주로 편양적혈구(SRBC)를 이용한 방법이 보편화 되고 있다.^{11-13,20,24-28)}

본 실험에서는 한우 PBL내 T 림프구를 정량하고자 KGRBC를 여러 농도의 AET, rosette 배지에 Dex첨가, 또는 AET와 Dex를 조합하여 PBL의 RFR을 KGRBC를 이용한 자연 rosette 형성율과 각각 비교하였다.

그 결과 자연 RFR(6.7±2.4%)에 비하여 AET 및 Dex 단독 처리군에서 모두 증가되었고, 특히 0.15M AET 처리군(37.3±2.7%)과 8% Dex 처리군(45.1±2.1%)에서 증가폭이 현저하였다. 한편, 이러한 결과를 기초로 하여 여러 농도의 AET 전처리 KGRBC (E_{AET})를 각 농도의 Dex 용액으로 처리하여 RFR을 비교한 바 0.1M AET를 20분간 전처리한 E_{AET} 에 8% Dex를 첨가하여 줌으로써 최고의 RFR(66.5±5.6%)을 얻을 수 있었다. 이와 같은 결과는 RBC를 AET, neuraminidase(En),^{4,12,27} helix pomatia (HP),^{13,16} peanut agglutinin(PNA)²⁸ 등과 같은 polymer로 처리하거나, rosette 배지에 Dex 또는 혈청을 첨가¹¹하여 줌으로써 자연 RFR에서 보다 RFR이 증가되고 있어 이들 polymer가 림프구와 RBC간에 cross-links를 이루며, 세포 집단의 막구조 변화 즉, microvillus 형성, capping 또는 patching과 같은 결합 부위의 재분포나 막표면에 새로운 결합 부위의 합성 및 insertion 등과 같은 변화를 초래하였거나 polymer가 주로 zeta potential에 관여하고 있는 막표면의 sialic acid를 제거시켜 줌으로써 세포간의 repulsive charge가 변화되었기 때문이라고 사료되었다.^{1,5,19}

이러한 본 실험의 결과는 유 등¹⁷이 SRBC를 이용하여 한우 PBL내 RFC를 측정할 때 자연 RFR은 7.8±6.0%, 0.1M AET 처리 SRBC에서 35.7±6.0%, 8% Dex 처리로 48.3±4.7% 그리고 0.1M AET 처리 E_{AET} 에 8% Dex를 첨가하여 얻은 종모우의 63.6±8.0%의 결과와 대동소이하었다. 한편, SRBC를 이용한

육우 및 젖소에서의 T 림프구의 RFR 즉, Devon 숫소에서 SRBC를 6.0% Dex 처리 후 온도를 달리하면서 RFR를 측정할 때 37°C 10분에 72%, 22°C 30분에 70%¹¹ 그리고 En으로 52%,¹¹ 34±11%,¹² 48.6%²⁶ AET 처리 방법으로 1~2년생의 건강한 Jersey, Holstein 그리고 백혈병 소와의 비교 실험에서 정상 소의 자연 RFR은 5.8±3.1%, 0.1M AET 처리로써 59.3±9.3%, 백혈병 소에서 34.7±12.7%,⁵ 50±10%,¹² 자연 RFR가 3.4±1.8%, 0.143M AET로 50.0±5.8%, E_{AET}에 8% Dex를 첨가할 때 61.4±3.9%¹⁰ 등과 같은 보고들을 비교하면 RBC를 polymer로 처리하거나 실험 조건을 달리하여 증으로써 다양한 결과를 얻을 수 있음을 확인할 수 있고, 또한 이들이 특종의 T cell subsets일 가능성을 배제할 수 없음을 알 수 있다.^{1,12,20,23}

소에서 B 림프구는 EAC- 및 EA-rosette법과 surface immunoglobulin(SiG) 면역형광합체 표시법으로 다른 세포와 분리 또는 감별할 수 있고,^{4,26} rosette로 분리된 림프구는 순수 배양이 가능함으로써 다른 면역 조절세포와의 상호 관계를 구명하는데 이용할 수 있는 장점이 있어 B 림프구의 순수 분리에 널리 이용되고 있다.¹⁻³ 본 실험의 결과 EA- 및 EAC-RFC는 각각 23.3±9.1% 및 23.1±7.9%로 유사하였고, 이는 Reeve와 Renshaw²⁶가 항체를 흡착시킨 CRBC(EA)-rosette법으로 분리한 26.5±3.9%와 유사한 결과임을 알 수 있고, 또한 SiG 표지법에 의한 25%,¹² 22.8±4.1%,¹⁰ 27.0±1.9%,⁴ 28.2±3.1%,²⁶ 28.0±1.8%,²⁸ 26.9±4.4%²³ 등의 보고와도 대동소이함을 알 수 있다.

이상 보고와 본 실험의 결과 그리고 동일 조건하에서 KGRBC와 SRBC를 이용한 human-PBL내 T 림프구 정량을 위한 E-rosette assay에서 SRBC-RFR의 결과보다 KGRBC를 이용하였던 경우에서 동등 이상의 RFR을 얻을 수 있었고 또한 RFC가 T 림프구임을 확인하고자 실시한 alkaline phosphatase antibodies conjugate를 이용한 B 림프구 염색과 monocytes의 peroxidase 염색의 결과 RFC가 B 또는 monocytes가 아님을 확인하였던 점(미발표) 등은 한우 PBL내의 KGRBC-RFC가 T 림프구일 가능성을 보여 앞으로 소에서도 사람에서 실시한 방법을 대입 RFC가 T 또는 B 림프구임을 확인하는 실험이 요구된다. 이상이 확인되면 소에서도 T 및 B 림프구를 rosette법으로 정량할 때 KGRBC의 이용성이 기대된다.

결 론

한우 순환 혈액내 림프구(PBL) 중 T 및 B 세포를 정량하고자 KGRBC를 이용한 rosette 형성기법을 이

용하였다. T 림프구는 KGRBC를 여러 농도의 AET나 Dex용액으로 처리 또는 AET와 Dex를 조합 처리하여 각각의 E-rosette형성 세포를 정량하였으며, B 림프구는 erythrocyte-antibody(EA)-및 erythrocyte-antibody-complement(EAC)-rosette법으로 각각 정량하였다.

한편, 판독 재료의 냉장 정처에 따른 판독의 결과를 비교하여 판독의 적정 시간대를 구명하여 아래의 결과를 얻었다.

1) 판독 재료의 냉장정처 후 최적 판독 시간대는 3~24시간의 범위이었다.

2) PBL의 자연 RFR은 6.7±2.4%(n=20)인데 비하여 AET 또는 Dex 처리군에서는 모두 증가되었고, 특히 0.15M AET 및 8% Dex 처리군에서 각각 37.3±2.7% 및 45.1±2.1%로 높게 나타났으며, 0.1M AET 처리 후 8% Dex 첨가군에서 최고치(66.5±5.6%)를 얻을 수 있었다.

3) EA 및 EAC의 RFR은 각각 23.3±9.1% 및 23.1±7.9%로 나타났다.

이러한 결과는 한우 PBL내 T 및 B 림프구 정량을 위한 E-, EA- 및 EAC-rosette assay에서 KGRBC의 이용성이 높음을 제시한다.

참 고 문 헌

- Higgins DA. Markers for T and B lymphocytes and their application to animals. *Vet Bull* 1981; 51:925~963.
- Tizard I. *An introduction to veterinary immunology*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1982; 74~118.
- Bjotvedt G, Lee KW. A review of T-lymphocytes and their functions. *VM/SAC* 1982;77:1725~1728.
- Nakanishi H, Koyama H, Kajikawa O, et al. Identification of bovine T and B lymphocytes in normal peripheral blood, lymph nodes and spleen. *Jpn J Vet Sci* 1983;45:97~102.
- Paul PS, Senogles DR, Muscoplat CC, et al. Enumeration of T cells, B cells and monocytes in the peripheral blood of normal and lymphocytotic cattle. *Clin Exp Immunol* 1979;35:306~316.
- Yang TJ, Jantzen-Abo PA, Williams LF. Depression of B-lymphocytes levels in the peripheral blood of cows with mastitis. *Infect Immun* 1980;

- 27:90~93.
7. Charriere J, Dardenne M, Bach JF. Antigen recognition by T lymphocytes. IV. Differences in antigen-binding characteristics of T- and B-RFC: A cause for variations in the evaluation of T-RFC. *Cell Immunol* 1973;9:32~44.
 8. Robert GD, Larsh HW. Immunocytadherence during experimental histoplasmosis. *Infect Immun* 1974;10:30~33.
 9. Wilson AB, Coombs RRA. Rosette-formation between guinea pig lymphoid cells and rabbit erythrocytes. A possible T-cell marker. *Int Archs Allergy Appl Immunol* 1973;44:544~552.
 10. Nagahata H, Funahashi T, Noda H. Standardization of bovine E-rosette assay and enumeration of lymphocyte subpopulation. *Jpn J Vet Sci* 1984;46:415~421.
 11. Wardley R. An improved E rosetting technique for cattle. *Br Vet J* 1977;133:432~434.
 12. Belden EL, McCroskey-Rothwell MK, Strelkuskas AJ. Subpopulations of bovine lymphocytes separated by rosette techniques. *Vet Immunol Immunopathol* 1981;2:467~474.
 13. Grewal AS, Babiuk LA. Bovine T lymphocytes. An improved technique of E rosette formation. *J Immunol Methods* 1978;24:355~361.
 14. Higgins DA, Stack MJ. Bovine lymphocytes: Enhanced E rosette formation after storage or gradient centrifugation. *Clin Exp Immunol* 1973;29:304~310.
 15. Paul PS, Brown TT, Miller JM, et al. Enhancement of rosette formation between sheep erythrocytes and bovine T lymphocytes by 2-aminoethylisothiuronium bromide and dextran. *Immunol Lett* 1976;1:93~96.
 16. Pinder M, Pearson TW, Roelants GE. The bovine lymphoid system. II. Derivation and partial characterization of monoclonal antibodies against bovine peripheral blood lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 1980;1:303~316.
 17. 유남선, 김종면, 송희종 등. 한우에서 면역조절 세포의 활성화에 관한 연구 1. 말초혈액 림프구의 E rosette형성능, 대한수의학회지 1987;27:253~258.
 18. Binns RM. Sheep erythrocytes rosette in pigs, sheep, cattle, and goat demonstrated in the presence of dextran. *J Immunol Methods* 1978;21:197~210.
 19. Brown CS, Halpern H, Wortis HH. Enhanced rosetting of sheep erythrocytes by human peripheral blood T cells in the presence of dextran. *Clin Exp Immunol* 1975;20:505~512.
 20. Grewal AS, Rouse BT, Babiuk LA. Erythrocytes rosette. A marker for bovine T cells. *Can J Comp Med* 1976;40:298~305.
 21. Johansen C, Morein B. Evaluation of labelling methods for bovine T and B lymphocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 1983;4:345~359.
 22. Yang WC, Osmond DG. Maturation of bone marrow lymphocytes. I. Quantitative rosetting methods of detecting Fc and complement receptors and surface immunoglobulin. *J Immunol Methods* 1979;25:211~225.
 23. Yang TJ. Identification of bovine T and B lymphocytes subpopulations by immunofluorescence surface marker analysis. *Am J Vet Res* 1981;42:755~757.
 24. Higgins DA, Stack MJ. Bovine lymphocytes: Recognition of cells forming spontaneous(E) rosettes. *Clin Exp Immunol* 1977;27:348~356.
 25. Outteridge PM, Dufty JH. Surface markers for characterization of bovine blood lymphocyte populations and changes in these from birth to maturity. *Res Vet Sci* 1981;31:315~322.
 26. Reeves JH, Renshaw HW. Surface membrane markers on bovine peripheral blood lymphocytes. *Am J Vet Res* 1978;39:917~923.
 27. Renshaw HW. Non-immune erythrocytes rosette formation of bovine peripheral blood and thymus lymphocytes. *Comp Immun Microbiol Infect Dis* 1981;4:75~86.
 28. Usinger WR, Splittler GA. Two molecularly independent surface receptors identify bovine T lymphocytes. *J Immunol Methods* 1981;45:209~219.