

Levamisole, selenium 및 tocopherol이 한국 재래산양의 혈중 림프구기능 및 항체생성에 미치는 영향

김 중 만 · 마 접 술* · 전 윤 성*
가축위생연구소 · 서울대학교 수의과대학*
(1991. 4. 24 접수)

Effect of levamisole, selenium and tocopherol on the lymphocyte blastogenesis and production of antibody in Korean native goat

Jong-man Kim, Jum-sool Mah*, Yun-seong Jeon*

Veterinary Research Institute; College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

(Received Apr 24, 1991)

Abstract: In this study, effect of levamisole, selenium and tocopherol on the lymphocyte blastogenesis and antibody production in Korean native goat were evaluated *in vitro* and *in vivo*.

Lymphocyte blastogenesis of goat blood increased significantly ($p < 0.01$ and $p < 0.05$) when the cells were treated *in vitro* with levamisole at the concentration of $50 \sim 500 \mu\text{g/ml}$, with selenium at the concentration of $0.062 \sim 1.0 \mu\text{g}$ and with tocopherol at the concentration on $12.5 \mu\text{g}$. Increased lymphocyte blastogenesis was detected from 2 to 24 hours after oral administration of levamisole (2.5mg/kg of body weight). After 7 days, increased mitogenic response of lymphocytes was not detected.

Meanwhile increased blastogenesis of lymphocyte from goats given the selenium-tocopherol mixture (selenium $100 \mu\text{g}$ -tocopherol 200IU/head/day) was detected from 10 days after feeding, and the tendency continued throughout the entire experimental period.

When immune responses of goats against PPD were subjected to test by ELISA, the mean IgG titers of levamisole group ($1 : 1,800$) and selenium-tocopherol group ($1 : 960$) were higher than that of control group ($1 : 600$) at 2 weeks after 1st inoculation.

At 3 weeks after 1st inoculation and 1 week after 2nd inoculation, the significant ($p < 0.05$) differences in IgG titers were detected among the three groups. The mean IgG titers of levamisole group, selenium-tocopherol group and control at that time were $1 : 20,480$, $1 : 5,120$ and $1 : 2,640$, respectively.

The IgG production of levamisole group was significantly ($p < 0.01$) higher than that of control group.

Key word: Korean native goat, lymphocyte blastogenesis, antibody production.

서 론

병원체가 동물체내로 침입하면 순환계의 항체, 보체,

탐식세포 및 림프구 등이 이들에 대한 면역을 형성하는데 중요한 역할을 한다. 이중 림프구는 항체합성 및 증양세포나 이종세포의 파괴 등 체액 및 세포면역 건

반에 걸쳐 중요한 역할을 한다.¹⁻³

Levamisole은 B세포에는 직접 영향을 주지 않으나 Th 세포의 분화를 촉진시키고 T세포와 대식구의 반응을 증강시켜 세포면역 반응을 자극함으로써 B세포의 기능에 간접적인 영향을 주어 항체생성능을 높힌다고 하였다.^{4,5}

Selenium과 tocopherol은 유사하게 항산화제로 작용하여 각종 세포에서 생성하는 유해한 산소대사산물을 분해하여 면역세포를 보호함으로써 항체생성능을 증강시키는 등 전반적으로 체액 및 세포면역능을 높혀준다.^{6,7}

본 연구에서는 levamisole, selenium 및 tocopherol이 림프구의 기능과 항체생성에 미치는 영향을 시험하기 위하여 한국제대산양의 혈중 림프구기능을 시험관내에서와 생체내에서 조사하였고 이들 제제가 항체생성에 미치는 효과를 아울러 시험하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 체중 15~20kg의 한국제대 암산양 14두를 사용하여 5두는 정상 혈중 림프구를 분리하여 시험관내에서 유약화반응에 미치는 영향을 검사할 목적으로 사용하였으며, 9두는 3두씩 3군으로 나누어 levamisole 급여군, selenium-tocopherol 급여군 및 급여하지 않은 대조군으로 하여 동일한 사양조건에서 사육하면서 생체에서 림프구기능과 항체생성에 미치는 영향을 시험하였다.

Levamisole 및 selenium-tocopherol의 산양급여 : levamisole을 산양 체중 kg당 2.5mg을 PPD를 점종한 1주 후부터 1주 간격으로, 1차점종 3주 후의 2차항원점종 1주 후까지 4회 급여하였다. 매급여 2시간, 24시간 및 7일 후에 림프구를 분리하여 기능을 실험하였다.

Selenium-tocopherol 급여군은 selenium 100 μ g과 tocopherol 200IU를 1두분으로 하여 1차 PPD 항원점종 3주 전부터 1일 1회씩 경구로 급여하기 시작하여 2차 항원점종 2주 후까지 8주간 급여하면서 10일, 30일, 45일 및 56일에 림프구를 분리하여 기능검사를 하였다.

시험관내 림프구의 levamisole, selenium 및 tocopherol 처리 : levamisole hydrochloride (Sigma), sodium selenite (Sigma) 및 dl- α tocopherol (Sigma)를 각각 세포배양용 배지 [RPMI 1640배지 (Sigma) 88%, fetal bovine serum 10%, L-glutamine (200 mM) 1%, 항생제액 (penicillin 200IU/ml, streptomycin 200 μ g/ml) 1%]로 농도를 달리하여 희석하고 림프구와 혼합하여 CO₂ 항온기에서 37°C, 30분간 작용시킨 후 각종 기능검사를 실시하였다.

산양 림프구의 분리 : 림프구는 Kehrlí 등의⁸ percoll

gradient centrifugation 방법에 따라 순수분리하였다. 즉 항응고제인 2 \times ACD액 (sodium citrate 22.52g, citric acid 8.0g, dextrose 22.0g, D.W 500ml) 5ml와 산양 경정맥에서 채취한 혈액 45ml를 혼합하고 2,500 rpm, 20분간 원심분리하여 적혈구층 표면의 buffy coat를 capillary pipette로 채취하고 PBS (0.01M, pH7.2) 5ml로 부유시킨 것을 percoll액 [비중 1,084, stock percoll액 (percoll, 비중 1.130 90%, 10 \times saline 10%) 70%, saline 30%] 4ml가 들어 있는 플라스틱 원심관에 중층한 다음 1,500rpm, 40분간 원심분리하였다. Percoll에 형성된 단핵세포층을 취하여 PBS 5ml로 부유시키고 lysing액과 restoring액으로 처리하여 혼합되어 있는 적혈구를 용혈시킨 후 PBS로 2회 원심세척하였다.

이와같이 처리한 것을 림프구만을 분리하기 위하여 세포배양용 RPMI 1640 배지에 세포수가 2 \times 10⁶/ml되게 세포부유액을 만들어 조직배양용 플라스틱 사래에 5ml씩 분주한 다음 CO₂ 항온기에서 37°C, 2시간 배양하였다. 이와같이 배양한 결과로 사래 표면에 부착한 단핵구를 제외하고 배지에 부유되어 있는 림프구만을 수집하여 PBS로 세척한 다음 세포수를 일정한 수로 조절하여 유약화반응 (blastogenesis)을 검사하였다.

림프구의 유약화반응 (Blastogenesis) 조사 : 림프구의 blastogenesis는 Denizot와 Lang의⁹ 방법에 따라 생체포에 있는 mitochondrial enzyme인 succinate dehydrogenase가 tetrazolium 색소, MTT [3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide, sigma]와 반응하여 생성되는 formazan양을 비색법으로 측정하였다. 즉, 림프구를 RPMI 1640배지로 세포수가 1 \times 10⁶/ml 되도록 조절하여 100 μ l씩 microplate well에 분주하고, mitogen으로 Con A (Sigma)는 10mg/ml, PHA (Sigma)는 1mg/ml, 그리고 PWM (Sigma)은 40 μ g/ml로 RPMI1640 배지에 녹여, 여과 (pore size 0.2 μ m) 소독 후 소량씩 분주하여 -20°C에 보존한 것을 ConA는 640배, PHA는 400배, PWM은 10배 (4 μ g)로 희석하여 mitogen별로 100 μ l씩 가하였다. 대조로는 mitogen 대신 RPMI1640 배지 100 μ l를 가하였다. 이와같이 처리한 microplate는 5% CO₂ 기상의 항온기에서 37°C, 48시간 배양하였다. 배양이 끝난 microplate를 400rpm 15분간 원심하여 (IEC, DPR-6000, Rotor No. 227) 상층액을 제거하고 MTT액 (2mg/ml) 50 μ l씩을 각 well에 가한 다음 5% CO₂ 기상의 항온기에서 37°C, 3시간 반응시켰다. 반응이 끝난 microplate를 다시 400rpm, 10분 원심하여 상층액을 제거하고 생성된 formazan을 isopropanol 100 μ l를 가하여 용해시켜

최고흡수파장 560nm에서의 발색정도에 따른 흡광도 (OD)를 ELISA reader로 판독하였다.

Levamisole 및 selenium-tocopherol 급여가 항체생성에 미치는 영향조사 : 항원은 *Mycobacterium avium* (D4) 배양여액을 trichloroacetic acid(TCA)로 처리하여 얻은 PPD 분말을 RPMI 1640매지로 60mg/ml이 함유하도록 용해한 다음 여과멸균하여 항원으로 사용하였다.

항원집중은 PPD액 25ml를 동량의 incomplete adjuvant (Difco)와 섞어 glass homogenizer로 균질화한 다음 levamisole, selenium-tocopherol 급여군 및 비급여군에 대하여 각 3두씩의 산양에 항원을 2ml씩 근육내로 1차 접종하고 3주 후에 2차접종 하였다.

산양으로 부터 PPD항원을 접종하기 전과 접종 후 1주일 부터 1주간격으로 8주까지 채혈하여 혈중 IgG의 소장을 검사하였으며, 항체가 측정은 Voller 등의 방법에 따라 간접 ELISA법으로 하였다.

결 과

Levamisole, selenium 및 tocopherol이 시험관내에서 림프구의 **blastogenesis**에 미치는 영향 : levamisole, selenium 및 tocopherol이 림프구의 **blastogenesis**에 미치는 영향을 검사하기 위하여 분리한 림프구를 제제별로 농도를 달리하여 시험관내에서 처리한 다음 Con A, PHA 및 PWM 등의 mitogen으로 활성화하여 일어나는 **blastogenesis** 정도를 MTT method에 의하여 측정하였다.

levamisole로 처리한 림프구의 **blastogenesis**는 levamisole의 농도와 mitogen의 종류에 따라 차이가 있었으며 50 μ g에서 500 μ g까지의 농도에서 현저하게 증가하였다($p < 0.01$, Fig. 1).

Selenium으로 처리한 림프구의 **blastogenesis**도 처리 농도와 mitogen의 종류에 따라 차이가 있었으며 0.062 μ g에서 1.0 μ g까지의 농도에서 현저하게 반응이 증가하였다($p < 0.01$, Fig. 2).

Tocopherol의 경우 처리농도인 3.12에서 100IU까지의 농도에서 무처리 대조세포에 비하여 반응이 증가하였으며 12.5IU에서 가장 현저한 반응증가를 나타내었다($p < 0.01$, Fig. 3). mitogen별로 보던 PHA가 가장 높은 **blastogenesis**를 유발하였으며 다음으로 Con A, PWM 순이었다.

Levamisole 및 selenium-tocopherol을 급여한 산양 혈중림프구의 **blastogenesis** : levamisole을 산양에 급여전과 급여 후 2시간, 24시간 및 7일 후에 혈액으로부터 분리한 림프구를 Con A, PHA 및 PWM으로

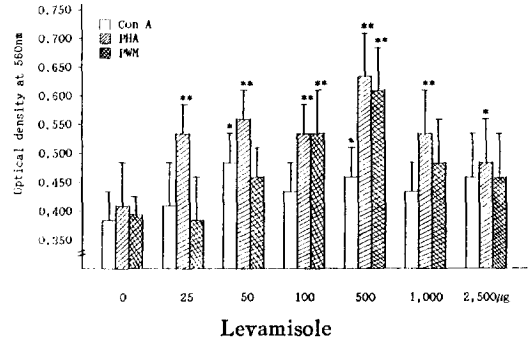


Fig 1. Effect of levamisole on blastogenesis of blood lymphocytes *in vitro*. Lymphocytes were stimulated with Con A (15.6 μ g/ml), PHA (2.5 μ g/ml) and PWM (4 μ g/ml). Reactions were performed in triplicate.

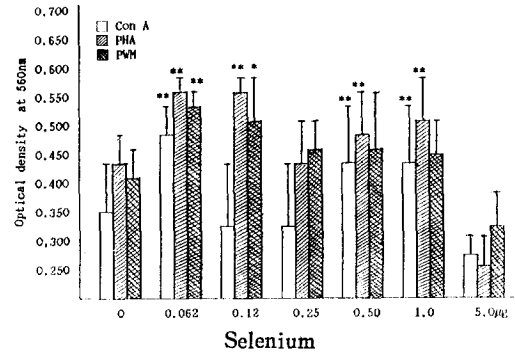


Fig 2. Effect of selenium on blastogenesis of blood lymphocytes *in vitro*. Lymphocytes were stimulated with Con A (15.6 μ g/ml), PHA (2.5 μ g/ml) and PWM (4 μ g/ml). Reactions were performed in triplicate.

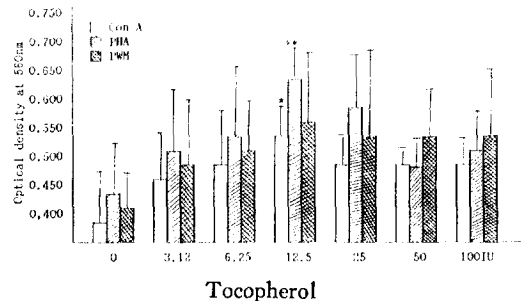


Fig 3. Effect of tocopherol on blastogenesis of blood lymphocytes *in vitro*. Lymphocytes were stimulated with Con A (15.6 μ g/ml), PHA (2.5 μ g/ml) and PWM (4 μ g/ml). Reactions were performed in triplicate.

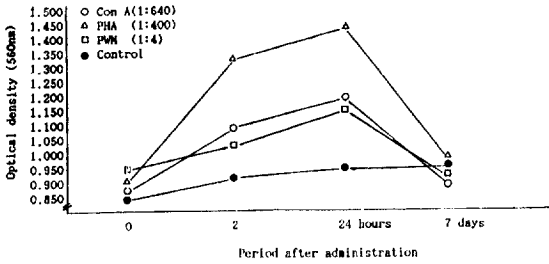


Fig 4. Blastogenesis of lymphocytes stimulated with mitogens after oral administration of levamisole to Korean native goats. The levamisole (2.5mg/kg of body weight) was administrated 4 times at an interval of a week.

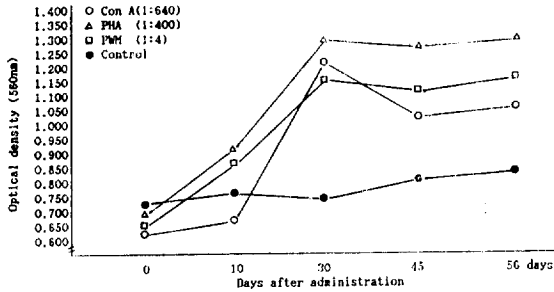


Fig 5. Blastogenesis of lymphocytes stimulated with mitogens after oral administration of selenium-tocopherol mixture to Korean native goats. The selenium (100 μ g)-tocopherol (200IU) mixture was administrated once daily for 56 days to 3 korean native goats.

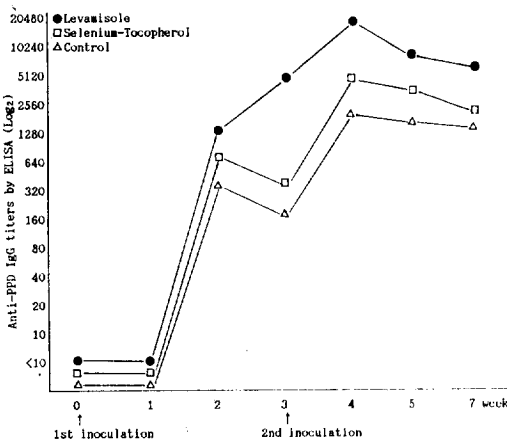


Fig 6. Antibody titres in the sera of goats inoculated with PPD after oral administration of levamisole and selenium-tocopherol mixture to Korean native goats.

처리하여 림프구의 blastogenesis를 MTT method에 의하여 검사한 결과 처리한 mitogen에 따라 차이는 있었으나 급여 후 2시간 부터 상승하기 시작하여 24시간에 가장 현저한 blastogenesis 반응을 나타내었으며 ($p < 0.05$), 7일 후에는 급여전과 비슷한 반응을 나타내었다(Fig. 4).

Selenium-tocopherol을 산양에 급여 전, 급여 후 10일, 30일, 45일 및 56일에 림프구를 분리하여 blastogenesis를 검사한 결과 급여 후 10일 부터 반응이 증가하기 시작하여 30일 부터 급여전에 비하여 현저한 blastogenesis 반응을 나타내었으며 ($p < 0.01$), 검사할 때마다 다소의 차이는 있었으나 56일까지 상승된 blastogenesis 반응이 지속하였다(Fig 5).

Levamisole 및 selenium-tocopherol 급여가 산양의 혈중 PPD 항체 생성에 미치는 영향: levamisole 및 selenium-tocopherol을 산양에 급여함으로써 PPD 항원에 대한 항체생성에 영향이 있는지를 보기 위하여 3두씩의 산양을 levamisole 급여군, selenium-tocopherol 급여군 및 급여하지 않은 대조군으로 하여 각 실험군에 조형 결핵균 PPD 항원 2ml (30 μ g/ml)를 1차 접종한 후 3주에 다시 2차접종을 하였다. 각 실험군에 항원을 접종한 후 1주 간격으로 채혈하여 혈중 IgG가를 ELISA법으로 측정하고 그 소장을 조사하였다.

항원접종 전과 1차접종 후 1주까지 3개 시험군 모두에서 PPD에 대한 IgG를 검출할 수 없었으나 2주 후에는 급격한 항체상승으로 항체가는 levamisole 급여군이 1 : 1,800, selenium-tocopherol 급여군은 1 : 960이었으며, 비급여대조군은 1 : 660이었다. 1차 항원접종 3주 후 2차항원 접종시기에는 비급여군과 selenium-tocopherol 급여군은 약간 항체가가 일시 감소하는 경향을 나타내었으나 levamisole 급여군은 이러한 현상이 없이 항체가가 계속 상승하였다. 2차접종 1주 후에는 모든 실험군에서 가장 높은 항체가를 나타내어 levamisole 급여군은 1 : 20,480, selenium-tocopherol 급여군은 1 : 5,120 그리고 비급여 대조군은 1 : 2,640로서 대조군이 가장 낮은 항체가를 나타내었으며 이와 같은 항체가는 검사한 7주까지 지속하였다.

비급여 대조군과 항체가의 차이가 가장 많았던 시기는 1차접종 3주 후였으며 2차접종 1주 후에도 상당한 차이를 나타내었다. 이상의 결과에서 levamisole 및 selenium-tocopherol은 PPD 항원에 대한 IgG 생성을 증강시킨다는 것을 알 수 있었으며, levamisole이 selenium-tocopherol보다 항체생성 효과가 좋은 것으로 나타났다(Fig 6).

고 활

생체에서 림프구가 항원물질 등과 접촉하게 되면 활성화하여 증생과 분화과정을 거쳐 면역적격 세포가 된다. 시험관내에서 림프구를 mitogen으로 자극시키면 potassium, calcium, sugar, nucleosides 및 amino acids의 섭취가 증가하여 결과적으로 protein, RNA, DNA 합성이 증가한다.^{10,11} levamisole은 흉선호르몬인 thymopietin 작용기전과 매우 유사하여 주요 림프구에 있는 thymopietin 수용체와 작용하여 이들을 활성화한다.¹²

본 시험에서 levamisole로 시험관내에서 림프구를 처리한 결과 전반적으로 blastogenesis 반응이 증가하였으며 500 μ g에서 가장 높은 반응을 나타내었다. 경구급여 시험에서도 급여 2시간 부터 림프구의 반응이 증가하여 24시간에 가장 현저하였다. 이러한 levamisole의 림프구 blastogenesis반응 증강결과는 Hennessy et al이¹³ 자돈에 levamisole을 주사한 결과 림프구의 mitogen에 대한 반응과 세포면역활성을 증강시켰다는 보고, Ishikawa와 Shimizu가¹⁴ 젖소에 경구급여로 B세포의 수와 활성이 증가하였다는 등의 보고에 비추어 볼 때 levamisole이 림프구의 blastogenesis반응을 증강시킨다는 점에서 유사한 결과라고 할 수 있다. 그러나 인공적으로 dexamethasone을 급여하여 면역능을 저하시킨 소에서 또는 임신말기의 면역능이 저하된 돼지에서는 levamisole이 림프구 반응에 효과가 없었다는 Purswell et al¹⁵과 Roth와 Kaebaerle¹⁶의 보고와는 차이가 있다.

비특이적으로 mitosis를 유발하는 mitogen 중에 Con A, PHA 및 PPD는 T세포, PWM은 B세포 및 T세포 그리고 LPS는 B세포를 주로 활성화시킨다.^{17,18} 본 시험에서 림프구의 blastogenesis를 유발하는 mitogen으로서 PHA가 가장 높은 반응을 일으켰으며 다음으로 Con A 및 PWM 순으로 반응에 차이를 나타내었다. 이것은 분리한 림프구 중의 T세포와 B세포의 분포비율이 다르고 mitogen별로 자극할 수 있는 세포가 한정되어 있기 때문인 것으로 생각된다.

Selenium과 tocopherol은 lymphokine생산과 mitogen의 작용을 저해하는 prostaglandin 및 면역기능 저해물질인 corticosterone 등의 농도를 감소시킴으로써 면역능을 증가시킨다.^{19,20}

Selenium으로 시험관내에서 처리한 림프구의 활성이 전반적으로 증가하였으며 0.062 μ g~0.25 μ g/ml에서 특히 높은 blastogenesis 반응을 나타내었다. 이는 Swecker et al이²¹ selenium의 면역기능 조절능력은 혈중에서 0.1~0.2 μ g의 농도가 적정하다는 성적과 유사한 농

도로서 시험관내에서나 생체에서 림프구의 활성화에 유효농도임을 알 수 있다.

Selenium과 tocopherol을 혼합급여한 군에서 림프구의 blastogenesis반응이 급여전에 비하여 현저히 증가하였다. 이는 Larsen이²² 양에서 tocopherol 단독 급여 시 blastogenesis에 증강효과가 없다가 selenium과 함께 급여한 결과 상승효과가 있었다는 보고와 Larsen과 Tollersrud²³ 및 Reddy et al이²⁰ selenium 및 tocopherol을 단독 또는 혼합급여로 림프구 반응이 증가하였다는 성적들과 일치하는 결과이다.

항체생성에 있어 levamisole은 mitogen과 항원에 대한 림프구 반응을 증강시키고 항원의 국소화 또는 제거를 신속히 처리하게 하며 T세포 및 주요림프구 활성을 자극함으로써 체액면역 반응을 증강시킨다.^{15,24}

산양에 경구로 levamisole을 급여한 후 PPD 항원을 접종하고 급여하지 않은 대조산양과 IgG가를 비교한 마 전반적으로 급여군의 항체가 높았으며 2차접종 1주 후에는 대조군의 1:2,640에 비하여 1:20,480으로 뚜렷한 항체가의 차이를 나타내었다. 이는 Babiuk과 Misra의²⁵ 소에서 herpes virus-1에 대한 면역반응 증강, Onaga et al의⁵ Eimeria tenella 감염에 대한 면역반응 증강, Hogarth-Scott et al의²⁶ levamisole과 clostridial combined백신 시험에서의 항체가 상승 등의 결과와 유사한 성적이며 levamisole은 T림프구 blastogenesis와 주요림프구 및 대식구 활성자극 그리고 항원에 대한 반응을 증가시킴으로써 항체생성 증강효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 돼지 저리백신 시험에서 levamisole이 항체생성에 증강효과가 없음을 보고한 Jenkins와 Hurdle의²⁷ 결과와는 다르며 이와같은 차이는 항원의 종류, 공시동물의 영양, 생리상태, 투여양과 투여방법에 따라 그 차이가 있음을 고려할 수 있으며, 이들 요인과의 관계를 더욱 추구할 필요가 있다.

Selenium과 tocopherol을 혼합급여한 산양에서 IgG가는 대조군에 비하여 급여군의 항체가가 전반적으로 높았으며 2차접종 1주후에 대조군 1:2,640에 비하여 급여군은 1:5,120으로서 항원가가 다소 높게 나타났다. 이러한 결과는 여러 종류의 동물에서 selenium과 tocopherol이 항원에 대한 항체가를 상승시켰다는 보고와 같은 결과로 평가할 수 있다.^{21,28,29}

levamisole 급여군과 selenium-tocopherol 급여군과의 항체생성능을 비교한 결과 levamisole이 IgG 생성에 더욱 좋은 효과를 나타내었다. 그러나 이들의 효과에 관한 보다 정확한 것을 비교하기 위하여는 실험방법, 사용양, 항원종류, 대상동물 등을 다각적으로 추구하여야 할 것이다.

이상에서 고찰한 바와같이 levamisole, selenium 및 tocopherol이 림프구의 기능과 항체생성에 상승효과가 있음을 증명할 수 있었으며 앞으로 이들의 활용연구와 새로운 면역증강제 개발연구가 좀 더 활발히 이루어져야 할 것이다.

결 론

Levamisole, selenium 및 tocopherol이 림프구의 blastogenesis와 항체생성에 미치는 영향을 한국재산양을 공시하여 생체와 시험관내에서 조사하였다.

림프구의 blastogenesis는 levamisole, selenium, 처리에 따라 그 활성이 증가하였는데 특히 levamisole은 50~500 μ g, selenium은 0.062~1.0 μ g, tocopherol은 12.5IU에서 현저하게 높았다($p < 0.01$).

mitogen별로는 PHA가 가장 높은 blastogenesis 반응을 유발하였으며 다음으로 ConA, PWM 순이었다.

항체급여 시험에서 levamisole은 급여 후 2시간 부터 blastogenesis 반응이 증가하여 24시간에 현저하였으며($p < 0.05$), 7일 후에는 급여 전과 차이가 없었다. selenium-tocopherol 급여에서도 림프구의 blastogenesis 반응은 급여 후 10일 부터 증가하기 시작하여 30일에 현저한 차이를 나타내어($p < 0.01$), 급여 중지일까지 지속하였다.

Levamisole, selenium-tocopherol의 PPD 항체생성능에 미치는 효과에 관한 실험에서 약제급여군이 비급여 대조군에 비하여 항체생성 상승효과가 있었으며, 1차접종 2주 후에 levamisole, selenium-tocopherol 및 대조군의 ELISA에 의하여 조사한 IgG가는 1 : 1,800, 1 : 960 및 1 : 600이었다. 2차항원접종 1주 후에 최고치에 이르러 levamisole 급여군이 1 : 20,480으로 가장 높았고 selenium-tocopherol 급여군은 1 : 5,120, 대조군은 1 : 2,640이었다.

참 고 문 헌

1. Hahn H. and Kaufmann SHE. The role of cell mediated immunity in bacterial infections. *Reviews of Infectious Disease* 1981;3(6):1221~1241.
2. Densen P. and Mandell GL. Phagocyte strategy vs. microbial tactics. *Reviews of Infectious Diseases* 1980;2(5):817~835.
3. Elsbach P. Degradation of microorganisms by phagocytic cells. *Reviews of Infectious Disease* 1980;2(1):106~124.
4. Anderson DC, Hughes BJ, Wible LJ, et al.

Impaired motility of neonatal PMN leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 1984;36:1~15.

5. Onaga H, Tajima M, Ishii T. Effect of levamisole on the immune response of chickens to infection with *Eimeria tenella*. *Zbl Bakt Hyg.* 1984;A256:323~327.
6. Arvilommi H, Poikonen K, Jokinen I, et al. Selenium and immune functions in humans. *Infection and Immunity* 1983;41(4):185~189.
7. Zanders ED, Smith CM, Callard RE. A micro-method for the induction and assay of specific in vitro antibody responses by human lymphocytes. *Journal of Immunological Methods* 1981; 47:333~338.
8. Kehrli ME, Nonnecke BJ, Roth JA. Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. *Am J Vet Res* 1989;50(2): 215~220.
9. Denizot F, Lmag R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *Journal of Immunological Methods* 1986;89:271~277.
10. Iribe H, Koga T. Biological activities of guinea pig mitogenic factor from immune lymphocytes stimulated with antigen. *Microbiol Immunol* 1983;27(1):65~74.
11. Goodman GW, Sultzler BM. Endotoxin protein is a mitogen and polyclonal activator of human B lymphocytes. *J Exp Med* 1979;149:713~723.
12. Guerrero J. Parasite host interactions relative to levamisole. *JAVMA* 1980;176:1163~1165.
13. Hennessy KJ, Blecha F, Pollmann DS, et al. Isoprinosine and levamisole immunomodulation in artificially reared neonatal pigs. *Am J Vet Res* 1987;48(3):477~480.
14. Ishikawa H, Shimizu T. Depression of B-lymphocytes by mastitis and treatment with levamisole. *J Dairy Sci* 1983;66:556~561.
15. Purswell BJ, Dawe DL, Brown J, et al. Effect of levamisole on immune function and reproductive performance in first-litter gilts. *Am J Vet Res* 1988;49(6):856~859.
16. Roth JA, Kaeberle ML. Effect of levamisole on lymphocyte blastogenesis and neutrophil function in dexamethasone-treated cattle. *Am J Vet Res* 1984;45(9):1781~1784.

17. Kristensen F, Kristensen B, Lazary S. The lymphocyte stimulation test in veterinary immunology. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1982;3:203~277.
18. Schultz RD. Assays of cellular immunity. *JAVMA* 1982;181(10):1169~1176.
19. Ishikawa H. Observation of lymphocyte function in perinatal cows and neonatal calves. *Jpn J Vet Sci* 1987;49(3):469~475.
20. Reddy PG, Morrill JL, Minocha HC, et al. Vitamin E is immunostimulatory in calves. *J Dairy Sci* 1987;20:993~999.
21. Swecker WS, Eversole DE, Thatcher CD, et al. Influence of supplemental selenium on humoral immune responses in weaned beef calves. *Am J Vet Res* 1989;50(10):1760~1763.
22. Larsen HJ, Moksnes K., Øvernes G. Influence of selenium on antibody production in sheep. *Research in Veterinary Science* 1988;45:4~10.
23. Larsen HJ, Tollersrud S. Effect of dietary vitamin E and selenium on the phytohaemagglutinin response of pig lymphocytes. *Research in Veterinary Science* 1981;31:301~305.
24. Brunner CJ, Muscoplat CC. Immunomodulatory effects of levamisole. *JMVMA* 1980;176(10):1159~1162.
25. Babiuk LA, Misra V. Effect of levamisole in immune responses to bovine herpes virus-1. *Am J Vet Res* 1982;43(8):1349~1354.
26. Hogarth-Scott RS, Liardet DM, Morris PJ. Levamisole vaccine combinations. *Australian Veterinary Journal* 1980;56:285~291.
27. Jenkins EM, Hurdle C. Effect of levamisole on parenteral vaccines for swine dysentery. *British Veterinary Journal* 1988;145(6):565~572.
28. Blodgett DJ, Schurig GG, Kornegay ET. Immunomodulation in weaning swine with dietary selenium. *Am J Vet Res* 1986;47(7):1517~1519.
29. Barger H, Garces TR, Fisher RK, et al. Efficacy, safety and residue evaluation of levamisole gel formulation in sows. *Am J Vet Res* 1987;48(5):852~854.