

생체분리 면역세포를 이용한 면역기전 연구

Study on the Immune Mechanism using Primary-cultured Immune Cells

김창환* 박상진*
Changhwan Kim Sangjin Park

ABSTRACT

Primary-cultured immune cells are widely used in research to elucidate the mechanism of inflammation including chemotaxis, production of reactive oxygen species, cytokine release and antigen presenting. Mice are one of the species of experimental animals commonly used for such studies. Immune cells can be isolated and cultured from various organs such as bone marrow, peritoneal cavity, lung, spleen. For elaborated experimental studies, immune cells should be elicited with inflammatory substances or proliferated *in vitro* with special media. This paper details methods of obtaining immune cells from various organs of mice and investigating immune mechanism using isolated immune cells. It contains standard protocols of isolating and culturing immune cells from bone marrow, peritoneal cavity and lymphoid organs. It also covers the methods of investigating immune mechanism such as ELISA, western blotting, confocal microscopy and ELISPOT assay. With the works in this study, we established the standardized isolation and analysis methods of primary-cultured immune cells.

Keywords : Immune Cell(면역세포), Primary Culture(초대배양), Bone Marrow Derived Macrophage(골수유래 대식세포), ELISA(효소면역측정법), Lymphoid Organ(림프기관)

1. 서론

척추동물은 선천면역계와 적응면역계의 두가지 면역체계를 보유한다. 선천면역계(innate immunity)는 병원체 감염 후, 신속하게 활성화되어 작용할 수 있는 방어체계로서 주로 분엽구(호중구, 호산구, 호염기구), 대식세포 및 수지상세포에 의하여 매개된다. 선천면역에 관여하는 세포들은 패턴인식 수용체(PRR : Pattern

Recognition Receptor)을 통하여 외부물질을 인지한 후, 직접적으로 공격을 하거나 면역활성물질 등을 분비하여 면역반응을 매개하게 된다^[1]. 또한, 항원제시(antigen presenting) 과정을 통하여 적응면역체계를 활성화하기도 한다^[2]. 미생물 병원체 감염에 대한 선천면역반응은 대개 침입 후, 수분 내에 시작된다.

다양한 선천면역체계에도 불구하고 몇몇 병원체들은 선천면역계를 회피하여 체내로 침입할 수 있다. 이런 경우, 적응면역계(adaptive immunity)가 유도되는데, 이는 침입한 병원체를 특이적으로 인지하여 공격할 있는 B림파구와 T림파구로 구성되어 있다. 적응면역계는 선천면역계와는 달리 충분히 활성화되는 데 1

† 2013년 2월 18일 접수~2013년 5월 17일 게재승인

* 국방과학연구소(ADD)

책임저자 : 김창환(vetkim@add.re.kr)

주 이상의 시간이 소요된다. 또한 적응면역계는 면역 기억현상을 보이는데 이는 특정 병원체가 침입하였을 때에 보다 신속하고 강하게 반응하는 것을 말한다^[3]. Fig. 1은 선천면역과 적응면역을 구성하는 성분 및 세포를 나타낸다^[4].

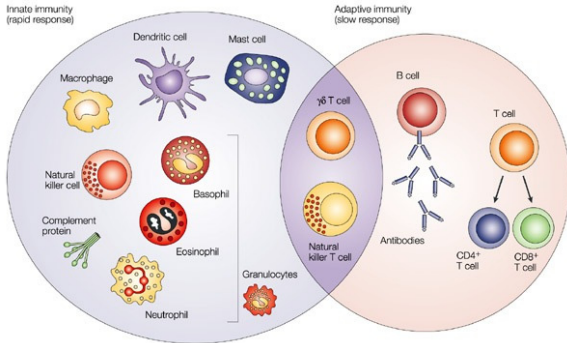


Fig. 1. Components of innate and adaptive immune systems(Figure from reference 4)

면역세포를 이용하여 다양한 면역기전을 연구하기 위해서는 면역세포의 확보가 필수적으로 요구된다. 이를 위하여 주로 면역계 종양세포의 세포주(cell line)를 이용하게 된다. 그러나, 다양한 염증세포에 대한 세포주의 확보가 어렵고 세포주의 생리학적 성질도 일반적인 생체세포와 다를 수 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 초대배양(primary culture)을 통하여 면역세포를 분리하여 시험에 이용하기도 한다. 초대배양이란 생체조직에서 직접적으로 목적하는 세포를 분리 및 배양하는 방법을 말하며 장기 및 목적하는 세포에 따라 고유한 분리 및 배양기술이 필요하다^[5].

본 논문은 다양한 장기에서 초대배양을 통하여 면역세포들을 분리 및 배양하고 이를 이용하여 면역기전을 연구하기 위한 방법들을 제시하고 있다.

2. 골수유래 면역세포의 분리 및 배양

가. 골수유래 면역세포의 분리 방법

BSC 바닥에 호일을 깬 후, 페트리디쉬 2개에 PBS를 따라 놓는다. BMDM(Bone Marrow Derived Macrophage)을 추출할 동물을 경추탈골한 후, 알코올 스프레이로 체표면을 소독한다. 동물을 양위위로 눕힌 후, 복부의 피부를 가위로 살짝 자르고 위아래로 당겨

서 근육을 노출시킨다. 가위로 둔부쪽을 잘라서 대퇴골두를 노출시킨 후, 대퇴골과 골반골을 분리하고 발목을 잘라 페트리디쉬에 넣는다. 이후, 대퇴골과 경골을 오금쪽에서 꺾고 Kim wipes를 이용하여 근육을 제거한다. 50mL Falcon tube에 BMDM media 50ml을 따라놓는다. 10mL 주사기에 BMDM media 10mL을 빨아들인 후, 26 gauge 주사바늘을 장착한다. 대퇴골 및 경골의 골두와 골단부분을 자르고 포셉으로 골간을 잡은 후, 골수강으로 BMDM media를 흘려 골수세포를 모은다. 150π 페트리디쉬에 배지 40mL을 넣은 후, 분리된 골수세포를 mesh로 걸러준다. 피펫팅을 여러번 실시하여 단일세포로 만든 후, 25mL의 배지를 다른 페트리디쉬에 옮겨 두 개의 배양시료를 만든다. 배양용기에 라벨링을 한 후, 37°C CO₂ incubator에 넣어 배양한다. 3일째 되는 날에 페트리디쉬에 배지 10mL을 추가한다. 배양용기에 세포가 가득 차는 걸 확인한 후, 시험에 이용하는데 보통 5~7일 정도가 소요된다(Fig. 2).

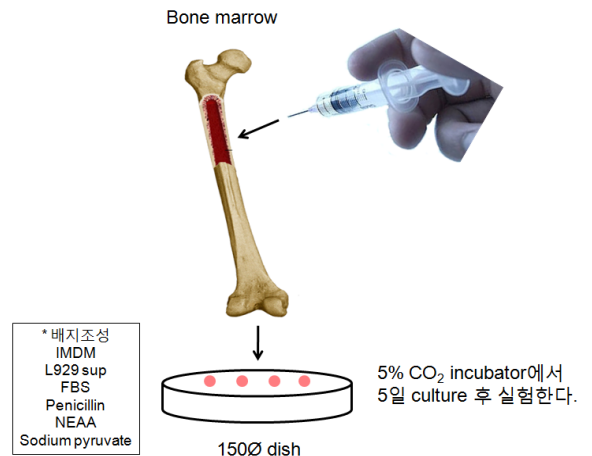


Fig. 2. Isolation of bone marrow derived cells

나. 골수유래 면역세포의 배양

골수유래 세포를 특정 면역세포로 분화시키기 위해서는 별도로 제작된 배양액을 이용하여야 한다. 예를 들어 골수에 존재하는 조혈모세포를 대식세포로 분화시키기 위해서는 M-CSF(Monocyte Colony Stimulating Factor)가 배지 내에 필수적으로 포함되어야 한다. 이를 위하여 상업적으로 구입 가능한 시약을 이용하기도 하지만 L929 세포를 약 일주일간 배양한 상층액을 배지에 일정부분 포함시키기도 한다. L929 세포는 마우스 유래 섬유아세포로 증식 및 분화시 배양액에

M-CSF를 유리하게 된다. Table 1은 이렇게 제작된 대식세포 배지의 예이다.

Table 1. BMDM media

BMDM	Volume (mL)
IMDM media	150
L 929 배양 상층액	75
Fetal bovine serum	25
Nonessential amino acid	2.5
Sodium pyruvate	2.5
Penicillin / streptomycin	2.5

골수유래 대식세포는 37℃ 배양기에서 5~7일간 분화 및 증식을 유도한다. 골수세포에는 줄기세포, 다양한 계열 세포들의 전구세포, 적혈구, 백혈구, 기질세포 등의 여러가지 세포들이 혼재하여 존재한다. 최초로 분리된 골수세포를 BMDM media에 배양할 경우, L929 세포에서 유래한 M-CSF에 의하여 대식세포의 분화 및 증식이 유도되게 된다. 한편, 골수세포를 수지상세포로 분화시키기 위해서는 배지에 GM-CSF(Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor)를 일정량 포함하게 된다.

다. 골수유래 대식세포의 분화

시간에 따른 대식세포의 분화 및 증식 결과는 Fig. 3과 같이 관찰된다.

골수세포 분리 1일차에는 다양한 골수유래 세포들이 혼재하여 존재하며 특정한 세포로의 분화는 아직 나타나지 않는다. 바닥에 붙어 자라는 대식세포의 특성상 다른 골수유래 세포들과 구분할 수 있는데 바닥에 약하게 붙은 세포들이 고배율에서 일부 관찰이 되며 세포의 형태는 원형 혹은 타원형을 유지하고 있다(Fig. 3A). 3일차에는 분화된 대식세포들이 배양용기 바닥에 붙어 집락 형태로 관찰된다. 세포는 타원형, 다각형 혹은 방추형으로 다양하게 관찰된다. 분화된 세포는 일반 세포들보다 좀 더 크고 현미경상에서 약간 진하게 관찰된다(Fig. 3B). 5일차에는 배양용기 바닥에 붙어있는 분화된 대식세포들이 현저하게 많이 증가된다. 세포의 모양은 다각형 혹은 방추형으로 보이며 대식세포의 위쪽으로 보이는 길게 뻗어있는 구조가 나타난

다(Fig. 3C). 7일차에는 완전히 분화된 대식세포들이 배양 용기의 대부분을 차지하게 된다. 현미경상에서 분화된 대식세포들은 대부분 방추형으로 보이며 핵과 세포질이 명확하게 구분되어 관찰된다(Fig. 3D).

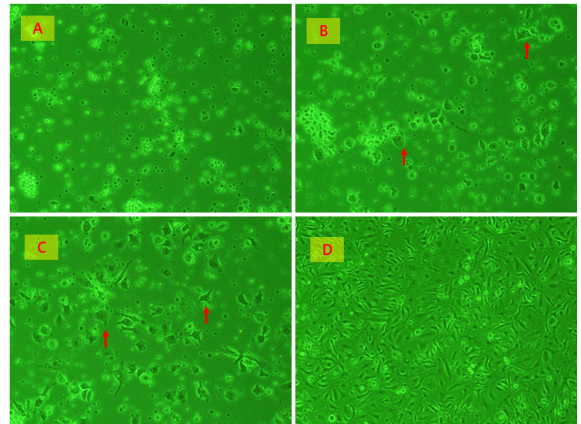


Fig. 3. Isolation and culture of bone marrow derived macrophages

A. day 1, B. day 3, C. day 5, D. day 7
Arrow : differentiated macrophage

3. 복강유래 면역세포의 분리 및 배양

가. 복강유래 호중구의 유도 및 분리

호중구는 세포유착, 화학주성 및 활성산소의 분비 등을 포함하는 염증의 작용기전 연구에 광범위하게 이용이 되고 있다. 성숙한 호중구는 혈액 혹은 복강액에서 수거할 수 있는데 유도하지 않고 수거할 수 있는 양은 10⁶개/마우스 이하로 이는 다양한 실험적 연구를 수행하기에는 부족한 양이다. 따라서, 염증유도 물질을 투여하여 인위적으로 염증반응을 유도하면 좀 더 많은 양(~5×10⁶PMN/mouse)의 호중구를 획득할 수 있다. 염증유도물질인 casein으로 염증반응을 유도하여 호중구를 획득하는 시험과정은 다음과 같다.

주사기를 멸균된 casein으로 채우고 1mL을 각 마우스의 복강에 주사한다. 염증반응이 유도되도록 하룻밤 기다린 후, 다음날 아침에 1mL의 casein 용액을 다시 주사한다. 두 번째를 주사하고 3시간이 경과한 후, 실험동물을 적절한 방법으로 안락사 한다. 복부를 70% 알코올로 소독한 후, 가위를 이용하여 복강 정중부에 피부절개선을 만든다. 이후, 복부 피부를 포셉으로 잡

아당겨 복근이 노출되도록 한다. 3~5mL의 멸균 수거액(PBS, HBSS 또는 배지)을 주사기에 채운 후, 복강 안으로 주입한다. 복강을 가볍게 마사지하고 복강액을 회수하여 이를 원심용기에 담는다. 다시 3~5mL의 수거액을 주입하고 동일한 과정을 반복하여 남은 세포들을 획득한다. 모아진 복강액은 원심분리 후, 상층액을 제거하고 PBS로 세척한다. Trypan blue를 이용하여 세포수를 측정한 후, 세포를 적절히 희석하여 시험에 이용한다. 밀도차에 의한 원심분리(density gradient centrifugation)을 실시할 경우, 좀더 정제된 호중구를 얻을 수 있다⁶⁾.

나. 복강유래 대식세포의 분리 및 배양

복강은 상주하는 일반적인 대식세포를 비교적 쉽게 채취할 수 있는 장소이다. 마우스 복강에 존재하는 대식세포는 분화가 정지된 성숙한 세포들로 획득할 수 있는 양은 마우스당 0.5~1×10⁶개이다. 따라서, 좀 더 많은 양의 세포를 얻기 위해서는 호중구와 마찬가지로 염증유도물질을 미리 주입하여 인위적으로 염증반응을 유도한다. 이렇게 유도된 대식세포는 상주하는 대식세포와는 생리학적인 성질이 다를 수 있다. 염증유도물질로 빈번하게 이용되는 thioglycollate로 대식세포 획득하는 시험과정은 다음과 같다.

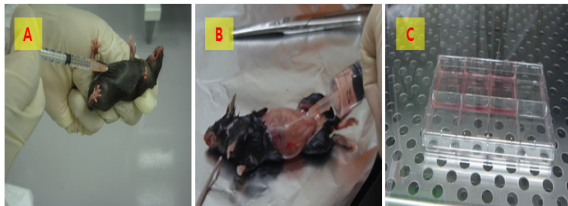


Fig. 4. Isolation of immune cells from peritoneal cavity

- A. Injection of immune stimulatory substance,
- B. Isolation of immune cells,
- C. Culture of immune cells

복강 세포를 유도하기 위하여 주사기에 3% Brewer thioglycollate medium을 채워 복강에 주사한 후, 약 4일을 기다린다(Fig. 4A). 세포의 채취를 위하여 적절한 방법으로 실험동물을 안락사 한다. 복부 피부를 70% 알코올로 소독하고 멸균된 가위로 복강 정중선을 따라 작은 절개선을 만든 후, 피부를 당겨 복벽을 노출한다. 주사기에 멸균 수거액을 채운 후, 마우스의 복강으로 주입한다(Fig. 4B). 주사바늘이 복강 장기를 찌

르지 않도록 주의하면서 동일한 주사기로 복강액을 빨아들인후, 복강액을 얼음위에 놓인 원심용기에 수거한다. 동일한 채취과정을 한번 더 반복하여 모은 후, 복강 추출액을 원심분리한다. 상층액을 제거하고 바닥에 존재하는 펠렛을 배지로 피펫팅하여 재부유한다. Hemocytometer로 세포수를 센 후, 시험에 따라 적절히 농도로 희석한다. 필요시 배양기를 이용하여 추가배양을 실시한다(Fig. 4C). Cytospin 등을 이용하여 수거된 세포에 대한 감별계산을 실시하기도 한다⁷⁾.

4. 림프기관 유래 면역세포의 분리 및 배양

가. 개요

비장, 임파절 및 흉선 등의 림프기관은 임파구, 대식구 등을 포함하는 다양한 염증세포들이 존재하며 이를 분리/배양하여 면역기전의 연구에 이용하게 된다. 비장은 실험동물에서 좌측 하복부에 존재하는 장기로 혈구세포의 보관 및 제거를 담당하며 유사시에 조혈기관으로서 역할을 하기도 한다. 흉선은 흉강 입구에 존재하는 기관으로 주로 T-임파구가 존재하고 있다. 임파절은 체내 여러장기에 광범위하게 분포하며 임파구를 비롯한 염증세포의 보관 및 항원제시(antigen presenting) 장소로서의 역할을 담당한다.

림프기관에 존재하는 면역세포의 분리를 위하여 별도의 배지제작이 필요하며 Table 2는 이러한 배지조성의 한 예이다. 또한, 면역세포의 획득을 위하여 적혈구를 용혈시키는 과정이 필요한데 이를 위하여 ACK solution 혹은 ammonium chloride lysing reagent 등이 이용된다.

Table 2. Media for splenocyte isolation

RPMI 1640 media	1pack(for 1L)
sodium bicarbonate	2g
HEPES	4.8g
Gentamycin	2ml
Penicillin / streptomycin	10ml
100mM sodium pyruvate	100ul
β-mercaptoethanol	Use just before use
Add 10% FBS and filter	

나. 임파기관 면역세포의 분리

임파기관에서의 면역세포 분리과정은 장기에 따라 매우 유사하다. 마우스의 비장에서 면역세포를 분리하기 위한 과정은 Fig. 5와 같다. 비장의 분리를 위하여 실험동물을 안락사한 후, 알코올 스프레이로 체표면을 소독한다. 동물을 좌측 복부가 위로 향하도록 눕힌 후, 복부의 피부를 가위로 살짝 자르고 위아래로 당겨서 복근을 노출시킨다. 가위로 복강을 열어 비장을 추출하고 이를 미리 제작한 RPMI 배지에 옮긴다(Fig. 5A). 채취한 비장은 dish에 담가둔 여과기로 옮기고 주사기 피스톤으로 분쇄한다(Fig. 5B). 이후, RPMI를 넣어 얼음에 유지한 원심용기에 세포현탁액을 옮겨 담는다(Fig. 5C). 세포를 침전시키기 위하여 원심분리를 실시한 후, 상층액을 제거한다. 이후, RPMI 배지로 세포를 재현탁하고 동일한 과정으로 원심분리를 한번 더 수행한다. 상층액을 제거한 후, 적혈구를 용혈시키기 위하여 3ml/spleen의 ACK solutin을 넣고 현탁한다. 상온에서 5분간 반응시키고 27ml의 RPMI를 넣고 현탁한 후, 원심분리한다. 상층액을 버리고 1ml RPMI에 현탁하고 잘 파이펫팅 한 다음 19ml RPMI를 추가로 넣고 세포수를 측정한다. 통상 spleen 1개당 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 정도 얻어진다^[8,9].

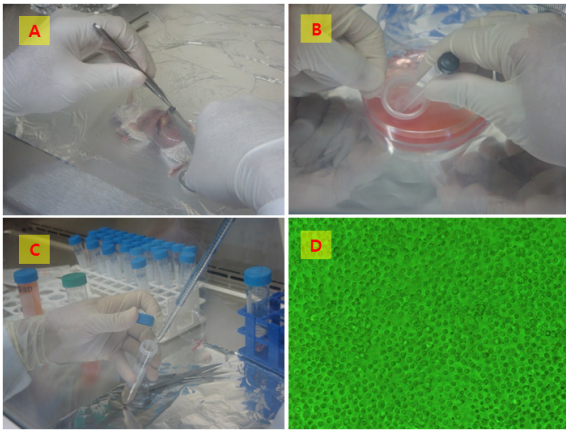


Fig. 5. Isolation and culture of splenocytes

- A. Isolation of spleen,
- B. Mesh the spleen,
- C. Isolation of splenocyte,
- D. Isolated splenocyte

5. 생체유래 면역세포를 이용한 시험

가. 개요

획득된 면역세포를 이용한 면역기전 연구를 위하여 다양한 시험방법들이 활용된다. 본 파트에서는 면역연구를 위하여 이용되는 ELISA, western blotting, 형광염색 및 ELISPOT 시험법에 대해 소개하고자 한다.

나. ELISA 분석을 통한 면역기전 연구

면역세포는 미생물 혹은 면역유도물질과 배양하였을 때, 배지에 cytokine, chemokine 및 antimicrobial molecules를 포함하는 다양한 활성물질들을 분비하게 된다. 따라서, 일정시간 면역세포를 자극하고 배양상층액에서 이러한 물질들의 양을 측정하면 유발된 면역반응을 평가할 수 있게 된다. 이를 위하여 상업적으로 구입이 가능한 키트를 이용하게 된다. Fig. 6은 배양 상층액에 존재하는 사이토카인의 분석을 위한 sandwich ELISA 분석법의 모식도이다.

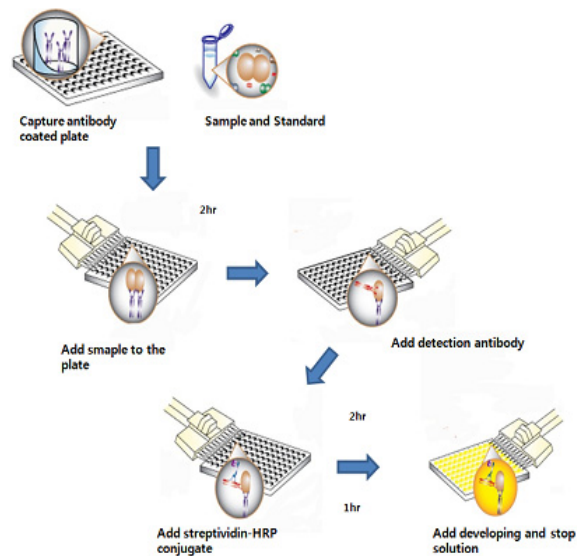


Fig. 6. ELISA assay

다. Western blotting 분석법을 통한 면역기전 연구

Western blotting을 이용하여 세포에서 면역관련 단백질의 발현을 확인할 수 있다. 특히, 면역자극 후 시간에 따른 발현 단백질의 변화량을 관찰함으로써 다양한 면역기전 연구를 수행할 수 있다. 이를 위하

여 면역세포를 미생물 혹은 면역유도 물질과 일정시간 반응시킨 후, lysis 용액을 이용하여 시간별로 세포를 용해시켜 목적하는 단백질의 양을 확인하게 된다. 대표적으로 면역활성물질 생성의 주요 전사인자(transcription factor)인 Nuclear Factor-kappa B(NF-kB), Mitogen Activated Protein Kinase(MAPK)의 활성을 보는 방법을 들 수 있다. Fig. 7은 이러한 시험과정의 모식도이다.

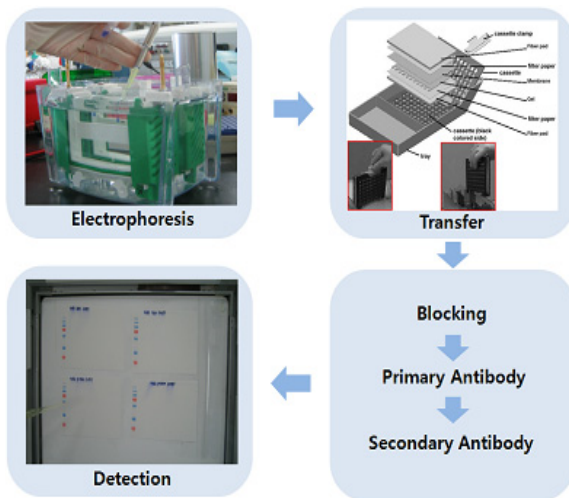


Fig. 7. Western blotting

라. 형광을 이용한 면역기전 연구

미생물 혹은 면역 유도 물질을 형광을 이용하여 염색 혹은 표지한 후, 형광현미경 혹은 confocal 현미경으로 면역기전을 연구할 수 있다. Fig. 8은 confocal 현미경을 이용하여 형광이 표지된 물질이 복강 대식세포에 의하여 탐식되는 과정을 확인한 시험이다. Confocal 현미경의 DIC(Differential interference contrast) 기능을 이용하면 전반적인 세포의 형태를 관찰할 수 있다(Fig. 8B). 또한, 염색 혹은 표지된 형광물질에 적절한 파장의 laser를 조사해줄 경우, 발현되는 형광을 확인할 수 있다(Fig. 8C). 본 그림에서는 FITC로 염색된 시험물질에 488파장의 레이저를 조사하여 발현되는 형광을 관찰한 것이다. 두 개의 사진을 병합할 경우, 면역세포와 시험물질의 위치를 확인할 수 있다(Fig. 8D). 본 사진에서는 형광물질에 염색된 시험물질이 대식세포와 동일한 위치에서 관찰되었으며 이는 대식세포에 의한 탐식과정이 진행되고 있음을 의미한다.

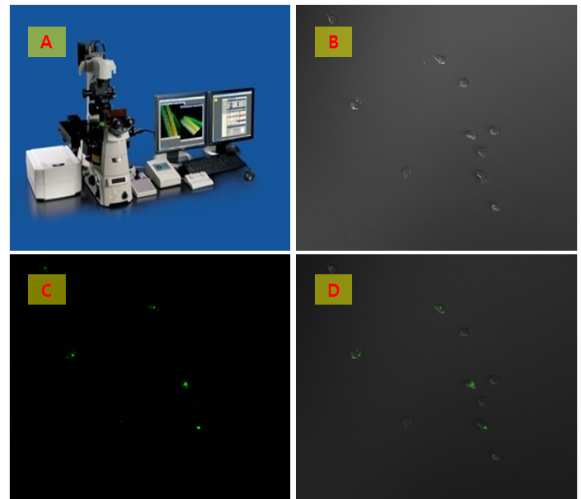


Fig. 8. Examination of immune cells using confocal microscopy
A. Confocal microscopy,
B. Differential Interference Contrast(DIC) image,
C. FITC image, D. Merged image

마. ELISPOT 분석법을 이용한 면역기전 연구

ELISPOT(Enzyme-Linked Immunosorbent Spot) 분석법은 실험실에서 특정 항체 혹은 단백질을 분비하는 세포를 검출하고 정량화하기 위한 방법이다. 샌드위치 ELISA법에 기초한 시험법으로 검출 및 인지항체의 특이성 및 효소증폭으로 높은 민감성과 특이성을 가지는 시험법이다. 최초에는 특정 항체를 분비하는 세포를 검출하기 위한 방법으로 이용되었으나 점차 사이토카인과 같은 특정 물질을 생산하여 분비하는 세포를 측정하기 위한 방법에도 적용되어 왔다. ELISPOT 분석법은 면역자극물질 혹은 미생물에 의한 세포면역의 유도효과를 확인하기 위한 시험법으로 널리 이용되고 있다. 일반적으로 실험동물에 특정 물질로 면역을 유도한 후, 비장 및 림프절과 같은 면역장기에서 면역세포를 분리하고 초대배양하게 된다. 분리된 면역세포는 *in vitro*상에서 검출항체(capture antibody)가 붙은 well에서 동일한 항원으로 재자극하게 된다. 실험동물에서 세포면역이 유도된 경우, 재자극된 면역세포는 세포면역을 나타내는 특정 분자들(r-IFN, IL-4 등)을 분비하게 된다. 분비된 활성물질은 인지항체(detection antibody)에 의하여 확인되고 이후, 효소에 의한 발색과정을 거쳐 spot이 나타나게 된다(Fig. 9A). 세포면역이 유도된 경우, 재자극된 항원에

의하여 spot이 나타나며 이는 ELISPOT reader에 의하여 검출할 수 있다(Fig. 9B, 9C).

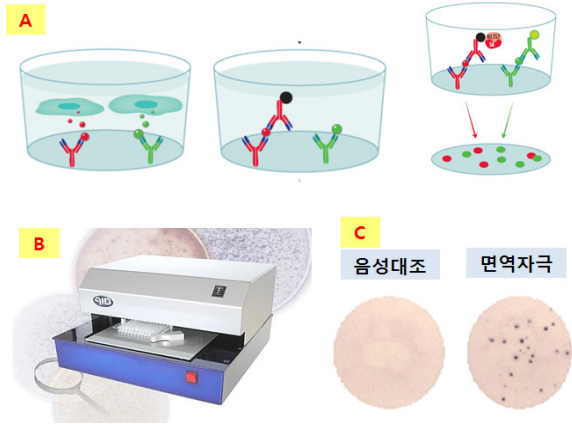


Fig. 9. ELISPOT assay
 A. Principle of ELISPOT assay,
 B. ELISPOT reader,
 C. Result of ELISPOT assay

6. 결론

본 논문에서는 다양한 생체조직에서 면역세포를 분리하고 이를 초대배양하여 면역기전 연구에 이용하기 위한 전반적인 시험 및 분석법을 소개하고 이를 이용한 시험결과들을 기술하였다.

초대배양을 통하여 획득된 세포들은 세포주와 비교해 좀 더 생체와 유사하여 보다 신뢰성있는 시험결과를 얻을 수 있다. 또한 *in vitro* 시험과 *in vivo* 시험의 중간과정이라고 할 수 있는 *ex vivo* 시험이 가능하게 된다. 실험동물을 이용한 시험의 경우, 좀 더 많은 수의 동물이 요구되므로 동물 윤리적인 측면에서 단점이 있고 생체에서의 복잡한 기전을 정확히 해석하기가 어려운 경우가 많다. 생체세포를 이용한 시험시 분리 및 배양을 위하여 세포 및 조직마다 필요한 재료들이 다르고 각각 별도의 시험법들이 필요하게 된다. 따라서, 초대배양을 위해서는 다양한 시험기술들을 확립하는 과정이 반드시 선행되어야 한다. 또한, 특정한 세포를 순수하게 배양하기가 어렵기 때문에 시험 및 결과해석에 주의를 기울여야 한다.

면역학적 연구는 일반적인 학문적 연구 뿐만 아니라 식품, 제약 등의 다양한 산업분야에서 광범위하게

수행되고 있다. 특히, 화학 및 생물학 작용제에 대한 방어체계를 확보하기 위하여 군사적인 연구에서도 그 중요성이 부각되고 있다. 생물학 작용제의 경우, 면역세포를 자신의 증식 수단으로 이용하거나 생체에 좀 더 쉽게 감염되도록 면역체계를 회피하는 경우가 빈번하게 존재한다. 예를 들어, 탄저균(*Bacillus anthracis*)의 경우, 면역세포를 숙주에서의 감염 및 증식을 위한 매개체로 이용하는 것으로 알려져 있다^[10,11]. 흑사병(*Yersinia pestis*)의 경우, 면역세포의 자연사를 유발하여 숙주에 좀 더 효과적인 감염 및 증식을 유발한다^[12].

본 연구를 통하여 소개 및 확립된 표준화된 시험 및 평가방법은 생화학 작용제의 면역기전 연구 및 효과적인 해독제의 개발과정에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

References

- [1] S. Akira and K. Takeda, "Toll-like Receptor Signaling", *Nature Reviews Immunology*, Vol. 4, pp. 499~511, 2004
- [2] A. Iwasaki and R. Medzhitov, "Toll-like Receptor Control of the Adaptive Immune Response", *Nature Immunology*, Vol. 5, pp. 987~995, 2004.
- [3] 대한미생물학회., *Kuby 면역학 6판*(이퍼블릭, 서울, 2008), pp. 1~24.
- [4] G. Dranoff, "Cytokines in Cancer Pathogenesis and Cancer Therapy", *Nature Reviews Cancer*, Vol. 4, pp. 11~22, 2004.
- [5] R. I. Freshney., *Culture of Animal Cells 4th Edition* (Wiley-Liss, USA, 2000), pp. 149~175.
- [6] Y. Luo, and M. E. Dorf, "Isolation of Mouse Neutrophils", *Current Protocols in Immunology*, Unit 3. 20, 1997.
- [7] X. Zhang, R. Goncalves, and D. M. Mosser, "The Isolation and Characterization of Murine Macrophages", *Current Protocols Immunology*, Unit 14. 1, 2008.
- [8] J. P. Reeves, and P. A. Reeves, "Removal of Lymphoid Organs", *Current Protocols in Immunology*, Unit 1. 9, 1991.
- [9] A. M. Kruisbeek, "Isolation and Fractionation of Mononuclear Cell Populations", *Current Protocols in Immunology* Unit 3. 1, 2000.

- [10] C. Guidi-Rontani, M. Weber-Levy, E. Labruyere, M. Mock, "Germination of *Bacillus Anthracis* Spore Within Alveolar Macrophages", *Mol, Microbiol.*, Vol. 31, pp. 9~17, 1999.
- [11] S. Welkos, A. Friedlander, S. Weeks, S. Little, I. Mendelson, "In Vitro Characterization of Phagocytosis and Fate of Anthrax Spore in Macrophages and the Effect of Anti-PA Antibody", *J. Med. Microbiol.*, Vol. 51, pp. 821~831, 2002.
- [12] D. M. Monack, J. Mecsas, N. Ghori, and S. Falkow, "Yersinia Signals Macrophages to Undergo Apoptosis and YopJ is Necessary for This Cell Death", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 94, pp. 10385~10390, 1997.