

Salmonella typhimurium에 대한 마우스 지연성 과민반응의 입양전달

전북대학교 의과대학 미생물학교실* 및 전북대학교 대학원 의학과

이헌구*, 장현철**, 한장연**, 하대유*

= Abstract =

Adoptive Transfer of Delayed-Type Hypersensitivity to *Salmonella typhimurium* in Mice

Hern-Ku Lee, Hyun-Chul Chang, Jang-Yun Han and Tai-You Ha

Department of Microbiology and Immunology, Chonbuk National University Medical School,
Chonbuk 520, Korea

This study was undertaken to investigate to know whether spleen and lymph node cells from immunized mice can transfer systemically the delayed-type hypersensitivity(DTH) reaction to *Salmonella typhimurium* and to characterize the lymphoid cells using glass, nylon wool and rabbit anti-mouse thymocyte serum. Mice, C57BL/6 or ICR, were immunized subcutaneously at 11, 8 and 2 days before adoptive systemic transfer with 100 μ g of protein antigen from *S. typhimurium* in complete Freund adjuvant. It was found that DTH reaction to *S. typhimurium* could be transferred to normal recipient systemically by both spleen and lymph node cells(10⁸ cells, respectively) from immunized mice. The cells responsible for this transfer of DTH reaction were glass nonadherent T lymphocytes.

Key Words: DTH, *Salmonella typhimurium*, Adoptive transfer

서 론

정상적인 개체가 세균의 침입을 받으면 그 세균에 대한 특이적 면역반응을 작동시켜 세균감염으로부터 개체를 보호하게 되는데 이에 관여하는 보호 면역반응은 세균의 종류에 따라 다르다. 즉 세포내 재성세균(intracellular bacteria)인 항산성 세균, *Listeria monocytogenes*, 장티프스균 및 *Bruella*균 등에 대해서는 주로 세포성 면역반응이 개체보호에 관여하며 세균에 대한 지연성 과민반응(delayed-type hypersensitivity, DTH)이 보호면역반응과 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다^{1-6, 10}. 세포성 면역반응이 체액성 면역반응과의 큰 차이점은 DTH반응이 세균감염을 받지 않은 정상개체에 입양전달(adoptive transfer)된다는 점인데 이러한 전달을 가능케 하는 매체로서는 감염된 개체로부터 얻은 면역세포^{3, 7, 11, 13, 15, 18} 및 이 세포에서 유래한 transfer factor¹²로 대별할 수 있고, 세포에 의한 DTH반응

전달방식에도 전신적 및 국소적 전달방식이 있다.

마우스에서 살모넬라 균에 대한 DTH반응은 균 감염에 의해 쉽게 야기되며^{2, 12}, 이 DTH반응은 국소적 입양전달³ 및 transfer factor¹²에 의해 전달되나 전신적(systemic)입양전달에 관한 보고는 찾아볼 수 없다.

저자는 *Salmonella typhimurium*에서 유래한 단백질항원으로 면역한 마우스에서 이 항원에 대해 매우 강력한 DTH반응을 발현시켰던 하등¹³의 성적을 참작하여 같은 방식으로 면역한 마우스의 임파구를 이용하여 전신적 입양전달을 시도하였던 흥미있는 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

실험동물

생후 8-10주된 C57BL/6 마우스를 암수 구별없이 사용하였으나 실험군과 대조군은 항상 동성(sex-matched)마우스를 사용하였다. 마우스는 polycar-

bonate cage에 8마리씩 넣어 수도수와 실험동물 pellet 사료(제일사료 주식회사, 대전)를 공급하고 가능한한 스트레스를 받지 않도록 사육하였다.

항 원

전북대학교 의과대학 미생물학교실에서 분리하여 한천배지에 제대배양하면서 보관중인 *S. typhimurium* JB38 균주로부터 유래한 단백질을 항원으로 사용하였다. 항원제조는 *S. typhimurium*을 brain-heart infusion broth(Difco Laboratories, Dertoit, Michigan)에 증식시켜 멸균된 생리식염수로 10,000G에서 20분간 3회 원심세척 후 Fisher sonifier(model 300)을 이용하여 얼음위에서 30분간 초음파 처리하였다. 이를 4°C에서 20,000G로 원심하여 상층액을 단백질항원으로 사용하였으며, 여과멸균하여 -20°C에 보관하였다. 상층액의 단백질농도는 Lowry¹⁴⁾ 방법에 의하여 측정하였다.

면 역

면역은 Collins 등⁵⁾ 및 하등¹⁾의 방법을 다소 수정하여 실시하였다. 간기하면 2mg/ml 농도의 단백질 항원과 동량의 complete Freund adjuvant(CFA, Difco Laboratories, Detroit, Michigan)를 혼합하여 이 유탁액 0.1ml(100 μ g 단백질/마우스)을 마우스의 양쪽 후지족척(後肢足蹠), 서혜부 및 액와부의 피하에 나누어 주사하여 면역하였으며, 면역은 마우스를 희생시키기 11일, 8일 및 2일전에 1일 1회씩 3회에 걸쳐 실시하였다. 대조군은 단백질 항원이 포함되지 않은 CFA만을 동일하게 처리하였다.

DTH 반응 평가

하등¹⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 즉 마지막 면역 2일 후에 200 μ g/ml 농도의 항원 0.05ml(10 μ g/마우스)을 마우스의 좌측 후지족척의 피하에 야기 주사하였다. 족척종창정도는 Mitutoyo engineer's micrometer를 이용하여 야기주사직전(T_0) 및 24시간 후(T_{24})에 측정하여 종창정도의 증가는 다음의 공식에 의하여 %증가로 표시하였다.

$$\% \text{ Increase} = \frac{T_{24} - T_0}{T_0} \times 100$$

마우스 임파구의 아세포변환(lymphocyte transformation) 평가

하등⁶⁾이 기술한 방법에 준하여 실시하였다. 간기하면 마지막 면역 2일 후에 마우스의 슬와(popliteal), 서혜 및 액와 임파절 그리고 비장을 무균적으로 적출하여 penicillin 100u/ml, streptomycin 100

μ g/ml, L-glutamic acid 2mM, sodium pyruvic acid 2.5mM, 2-mercaptoethanol 5×10^{-4} M 그리고 56%에 30분간 비동화시킨 fetal bovine serum (FBS)이 10%되게 첨가한 RPMI 1640배지(Grand Island Biological Company, Grand Island, NY)에 세포부유액을 만들어 세포괴를 제거후 3회 원심세척하였다. 비장 및 임파절세포 부유액 1ml(1×10^6 세포/ml)에 여러 농도의 단백질 항원 50 μ l을 첨가하여 5% CO₂ 존재하에서 37°C에 72시간 배양하였다. 배양세포채취 18시간 전에 0.5 μ Ci의 ³H-thymidine(Specific activity: 20Ci/mM, New England Nuclear, Boston, Mass)을 pulse시켰다. 배양이 끝난 후 세포를 10ml의 생리식염수로 원심세척하고 5ml의 trichloroacetic acid로 1시간 이상 침전시킨 후 10ml의 methanol로 세척하여 건조시켰다. 침전물을 0.5ml의 formic acid와 2ml의 ethanol로 용해시켜 10ml의 scintillation fluid를 가하여 ³H-thymidine 양은 β -liquid scintillation counter(Parkard Tri-Carb 460 C, 111)를 이용하여 측정하였다.

세포전달

이등²⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 즉 마지막 면역 2일 후에 마우스로부터 비장 및 임파절을 무균적으로 절취하여 상기한 방법으로 세포부유액을 만들었으며, 비장세포의 경우는 ammonium chloride-Tris 완충액(pH 7.2)으로 적혈구를 제거시켰다. 각 세포를 5×10^6 /ml의 농도로 부유시켜 0.2ml을 정상마우스의 미정맥을 통하여 전달하고 전달후 1시간 이내에 10 μ g의 단백질 항원을 좌측 후지족척의 피하에 주사하여 24시간 후에 DTH반응의 발현을 측정하였다.

세포분획

세포전달실험 결과 비장 및 임파절세포에 의해 모두 DTH반응이 전달되었으며, 임파절세포에 의한 DTH반응이 더 높았기 때문에 임파절세포를 취하여 어떤 종류의 세포가 DTH전달에 관여하는지를 알아보고자 glass, nylon wool 및 마우스 흉선세포에 대한 가도항혈청을 이용 분획하여 세포전달을 실시하였다.

Glass 부착유무에 따른 세포분획은 Schon-Hegrad 등¹⁷⁾의 방법을 다소 수정하여 실시하였다. 간기하면 100mm 직경의 glass petri dish에 5ml의 FBS를 가하여 4°C에서 18시간 방치후 사용전에 RPMI 1640배지로 1회 세척하였다. 여기에 임파절세포 부유액 5ml(1×10^7 세포/ml)을 가하여 5% CO₂하에서 37°C에 1시간 방치후 petri dish에 부착하지

얇은 세포를 pasteur pipette을 이용하여 채취하고 부착한 세포는 rubber policeman을 이용하여 petri dish의 표면을 부드럽게 긁어 떼어낸 후 세척하였다. 이때 petri dish에 넣은 세포중 약 30%정도가 표면에 부착하였다. Nylon wool을 이용한 T세포 분리는 Julius 등¹⁰⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 간기하면 세포부유액 4ml (1×10^8 세포/ml)을 2.4g의 nylon wool(Type 200)(Fenwal Laboratories, Division of Travenol Laboratories, Inc, Deerfield L-linois)으로 채운 50ml 용량의 plastic 주사기에 가하여 37°C에 1시간 방치후 20ml의 RPMI 1640 배지로 세척하였다. 이때 nylon wool에 부착되지 않은 세포는 전체세포의 약 20%에 해당하였다. 본 실험에 사용한 nylon wool은 sodium citrate 및 EDTA가 각각 0.2% 포함된 증류수에 24시간 담군후 증류수로 10분간 6번 끓여서 말린 후에 사용하였다. 임파절세포의 마우스 흉선세포에 대한 가토 항혈청 처리는 10^8 세포에 20배 희석한 항혈청 1ml을 가하여 37°C에 45분 작용시킨후 혈청을 세척하였다. 여기에 보체원(源)으로써 4배 희석한 정상가토혈청 1ml을 가하여 다시 37°C에 30분 작용시켜 세포를 원심세척하였다. 본 실험에 사용한 항혈청은 C57 BL/6 마우스의 흉선세포(10^8 세포)를 2주 간격으로 3회에 걸쳐 가토의 정맥내로 면역하여 얻은 혈청으로써 마우스의 골수세포(세포량:혈청량=1:10)로 0°C에서 1시간 흡수시켜 사용하였으며, 정상가토혈청은 agarose(70mg/ml)로 0°C에서 1시간 흡

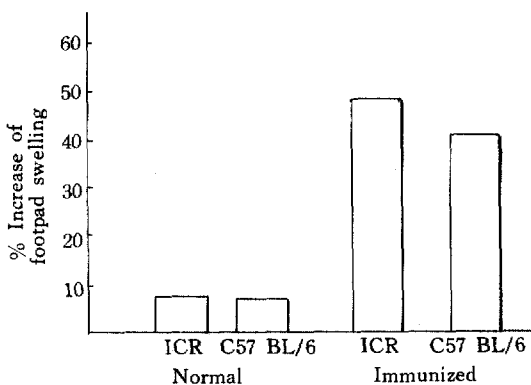


Fig. 1. Induction of DTH reaction to protein antigen of *S. typhimurium* in mice. Mice were immunized subcutaneously with $100\mu\text{g}$ of protein antigen in complete Freund adjuvant at 11, 8 and 2 days before challenge. Immunized or normal mice were challenged with $10\mu\text{g}$ of antigen into left hind footpad 2 days after the last immunization. DTH reaction was determined by footpad swelling reaction at 24h after challenge. Each column indicates mean of 5 mice.

수시켜 세포독성이 없음을 확인한 후 사용하였다. 이상의 여러 방법으로 분획한 세포는 정상마우스의 정맥을 통하여 recipient 마우스에 전달하였으며, 세포를 전달받은 마우스에서 DTH반응의 측정은 상기한 방법과 동일하게 실시하였다.

실험성적

C57BL/6 마우스에서 *S. typhimurium*에 대한 DTH 반응의 발현

하등¹¹⁾은 ICR 마우스를 대상으로 본 실험과 동일한 방법으로 균단백질 항원으로 면역했을 때 DTH 증가율이 약 50%이었음을 보고하였는데, 본 실험에서 C57BL/6 마우스를 대상으로 하였을 때도 Fig. 1에서와 같이 DTH반응 증가율이 42%로 강력한 반응을 보임을 알 수 있었다.

단백질항원에 대한 면역마우스 임파구의 아세포 분획

단백질항원으로 3회 면역한 마우스의 비장 및 임파절세포를 배양하면서 여러 농도의 단백질 항원으로 자극하였다. 그 결과 Fig. 2에서와 같이 면역

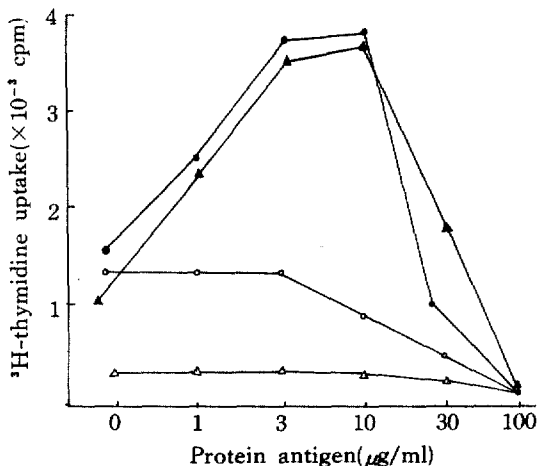


Fig. 2. Dose dependent responses of spleen and lymph node cells from immunized mice to protein antigen of *S. typhimurium*. Spleen cells(SC) or lymph node cells(LNC) (1×10^6 cells, respectively) from mice immunized subcutaneously with $100\mu\text{g}$ of protein antigen in complete Freund adjuvant at 11, 8 and 2 days before sacrifice were cultured at 37°C in absence or presence of varying concentrations of protein antigen for 3 days in 5% CO_2 + 95% air. Each point indicates mean of triplicate cultures. Symbols: ●: LNC cultured in the absence of antigen, ○: LNC cultured in the presence of antigen, Δ : SC cultured in the absence of antigen, \blacktriangle : SC cultured in the presence of antigen.

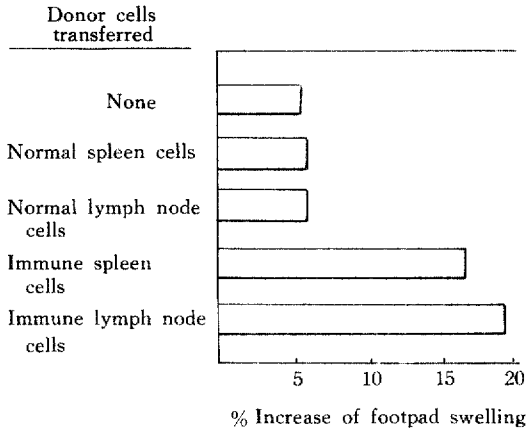


Fig. 3. Adoptive systemic transfer of DTH reaction to *S. typhimurium* by both spleen and lymph node cells. Mice were immunized subcutaneously with 100 μ g of protein antigen in complete Freund adjuvant at 11, 8 and 2 days before cell transfer. Spleen cells (SC) or lymph node cells (LNC) (1×10^8 cells, respectively) from immunized mice were transferred to normal recipient mice. Normal control recipient mice received normal SC or LNC. Recipient mice were challenged with 10 μ g of protein antigen within 1h of cell transfer. Footpad swelling was measured 24h after challenge. Each column represents mean of 4 mice.

마우스의 비장 및 임파절세포는 공히 단백질항원양에 따라 동일한 정도의 아세포변환을 보여 그 정도는 10 μ g의 항원으로 자극하였을 때 가장 높았으며, 항원량이 10 μ g 이상 증가함에 따라 급속히 감소하였다. 단백질항원에 의하여 현저한 아세포변환이 야기된 본 결과를 통하여 *S. typhimurium* 으로부터 유래한 단백질항원으로 3회 면역했을 경우 임파절세포와 비장세포가 공히 항원에 의해 감작 (sensitization) 됨을 알 수 있었다.

DTH 반응의 전신적 입양전달

면역마우스의 임파구에 의하여 DTH 반응이 전달되는지를 알아보기 위하여 면역마우스의 비장 및 임파절세포 (각각 10^8 세포)를 정상마우스의 미정맥을 통하여 전달하였다. 그 결과 Fig. 3에서와 같이 정상마우스의 비장 또는 임파절세포를 전달했을 경우 DTH 반응의 증가는 6% 정도로 나타나 세포를 전달받지 않은 정상마우스군에 비해 차이가 없었으나, 면역마우스의 세포를 전달했을 경우 세포를 전달받는 수령마우스에서의 DTH 반응은 비장세포를 전달받았을 때 17%, 그리고 임파절세포를 전달받았을 때 19%의 증가를 보였다. 이러한 결과로 *S. typhimurium* 에 대한 DTH 반응이 세포에 의해 정

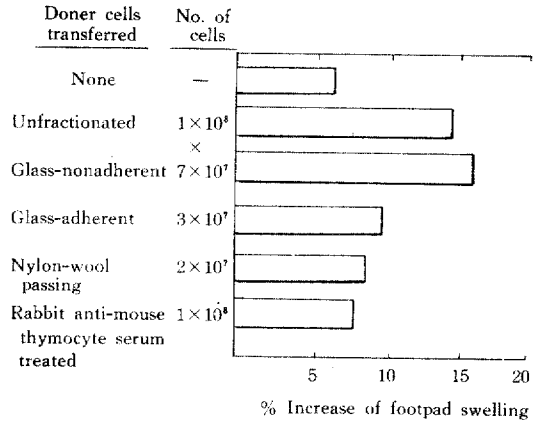


Fig. 4. Comparison of DTH-transferring capacities of different lymph node cell fractions from immunized mice. Various lymph node cells from mice immunized subcutaneously with 100 μ g of protein antigen in complete Freund adjuvant at 11, 8 and 2 days before cell transfer were transferred to normal recipient mice. Recipient mice were challenged with 10 μ g of protein antigen within 1h of cell transfer. Footpad swelling was measured 24h after challenge. Each column indicates mean of 4 mice.

상마우스에 전신적 입양전달이 가능하다는 사실을 알 수 있었다.

Glass 비부착 T 임파구에 의한 DTH 반응의 전달

Fig. 3에서 면역마우스의 비장 및 임파절세포에 의해 DTH 반응이 전달되었기 때문에 이중 임파절세포를 선택하여 어떤 종류의 세포가 이에 관여하는지를 알아보기 위하여 세포를 glass 또는 nylon wool에 부착하는 세포와 부착하지 않는 세포로 나누고 T 임파구를 사멸시키기 위하여 마우스 흉선세포에 대한 가토의 항혈청으로 처리하여 수용마우스에 전달하였다. 그 결과 Fig. 4에서와 같이 glass에 부착하지 않는 세포의 DTH 반응 전달능력은 분획하지 않은 세포의 그것과 비슷하였으며, 세포를 가토 항혈청으로 처리했을 때의 DTH 반응 전달능력은 현저하게 감소하여 DTH 전달은 glass에 부착하지 않는 T 임파구를 알 수 있었다. Nylon wool로 분획한 T 임파구는 전달한 세포의 수가 적었는지 또는 DTH 전달에 관여하는 T 임파구가 nylon wool에 부착되었을 가능성이 있는지는 본 실험만으로 알 수 없지만 nylon wool로 분획한 T 임파구는 DTH 반응을 전달하지 못하였다.

고 안

마우스에서 살모넬라 균에 대한 DTH반응은 균 감염에 의해 쉽게 야기되며¹⁰⁾, 이 DTH반응은 국소적 입양전달¹¹⁾ 및 transfer factor¹²⁾에 의해 전달되거나 전신적 입양전달에 관한 보고는 찾아볼 수 없다. Attridge 등³⁾은 2-10×10⁴세포의 살아있는 *S. enteritidis*을 정맥 또는 복강으로 주사하여 면역한 마우스로부터 면역 7일후에 10⁷의 복강세포를 항원과 함께 정상마우스의 족척에 주사하였을 때 DTH반응이 전달되는데 반하여 10⁷의 복강세포를 정맥주사하여 전신적 입양전달을 시도하였을 때는 DTH반응이 전달되지 않았음을 보고하였다. 그들은 DTH반응이 전신적 입양전달이 안되는 이유로 첫째, 정상수령 마우스에는 정상적으로 suppressor T세포가 존재하고 있기 때문에 이 세포에 의해 DTH반응이 억제될 가능성과 둘째, 정맥으로 주사한 세포가 항원으로 야기주사한 족척부위까지 원활하게 순환(circulation)되지 않을 가능성이 있고 셋째, 야기주사에 사용한 항원의 종류에 따라 DTH반응이 다르게 나올 수 있는 가능성이 있다고 설명하였다. 그러나 DTH반응 전달여부는 면역에 사용한 항원의 종류, 면역경로, 면역횟수, 면역후 세포전달까지의 시간 및 전달세포수 등과 같은 여러 인자에 의해 영향을 받을 것이기 때문에 어느 한 실험조건에 의해 DTH전달의 여부를 결정지을 수 없으리라 생각된다. 본 실험에서는 100 μ g의 *S. typhimurium* 유래 단백질항원으로 세포전달 11일, 8일 및 2일 전에 3회에 걸쳐 피하로 면역한 마우스로부터 얻은 비장 또는 임파절세포(10⁸세포)를 정상마우스의 정맥을 통하여 전달하였을 때 정상수령마우스에서 단백질항원에 대한 DTH반응의 발현을 관찰할 수 있어(Fig. 3) 살모넬라 균에 대한 DTH반응도 전신적 입양전달이 가능함을 확인할 수 있었다. 세균에 대한 DTH반응은 비단 세포내재성 세균에서 뿐만 아니라 세포외재성 세균인 황색포도상구균¹³⁾에 대해서도 발현된다고 알려져 있다. 이등¹⁴⁾은 본 실험과 비슷한 방법 즉, 50 μ g의 단백질항원으로 세포전달, 3주, 2주 및 1주 3회에 걸쳐 피하로 면역한 마우스의 비장 또는 임파절세포(10⁸세포)에 의해 모두 DTH반응이 전신적 입양전달이 되었음을 보고하였다. 본 실험에서 *S. typhimurium*에 대한 DTH반응의 전신적 입양전달에 상기한 여러 요인중 어느 것이 결정적으로 작용했는지에 관해서는 본 실험만으로는 알 수 없지만 본 실험과 이등¹⁴⁾의 실험성적을 찬찬히 비교하여 세균에 대한 DTH반응의 전신적 입양전달에는 본 실험에서 사용했던 방법이 좋은 모델이 될 것으로 생각되었다.

면역마우스의 임파구중 어느 종류의 세포가 DTH

반응의 전달에 관여하는지를 알아보려고 면역마우스의 임파절세포를 분획하여 전달하였던 바 glass에 부착하지 않는 세포는 분획하지 않은 세포의 DTH전달능력과 비슷하였고, 세포를 마우스 흉선세포에 대한 가토의 항혈청으로 처리했을 때 DTH전달능력이 소실된 점으로 미루어(Fig. 4) *S. typhimurium*에 대한 DTH반응 전달은 glass에 부착하지 않는 T임파구에 의해 이루어 짐을 알 수 있었다. Attridge 등³⁾도 마우스에서 살모넬라균에 대한 DTH전달은 glass에 부착하지 않는 Lyt 1+ 2-의 T임파구임을 보고하였다. T임파구만을 선택적으로 분리하는데 사용되는 nylon wool을 통과한 세포 또는 그 DTH반응 전달에 실패하였는데 그 원인에 대해서는 세포수가 적었음인지 또는 DTH반응 전달에 관여하는 세포가 nylon wool에 부착되었는지에 관해서는 본 실험만으로는 알 수 없었다.

결 론

마우스에서 *Salmonella typhimurium*에 대한 DTH반응의 전신적 입양전달을 시도하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. 마우스에서 *S. typhimurium*에서 유래한 단백질항원 100 μ g을 야기주사 11일, 8일 및 2일전 3회에 걸쳐 면역했을 때 동일한 항원에 대한 강력한 DTH반응의 발현(42%의 족척종창증가)을 관찰할 수 있었다.
2. 면역마우스의 비장 및 임파절세포는 시험관내에서 단백질항원에 따른 아세포변환을 보였으며, 이는 10 μ g/ml의 농도에서 가장 현저하였다.
3. 면역마우스의 비장 또는 임파절세포에 의해 비슷한 정도의 DTH반응을 정상마우스에 전신적 입양전달할 수 있었다.
4. DTH반응의 전달에 관여하는 세포는 glass에 부착하지 않는 T임파구이었다.

참 고 문 헌

- 1) 하대유, 이현구, 임선영, 송양근: 지연성과민반응이 *Salmonella typhimurium* 감염에 대한 마우스의 저항에 미치는 영향, 대한미생물학회지, **20**:221, 1985.
- 2) 이현구, 최태훈, 하대유: 황색포도상구균에 대한 마우스의 지연성과민반응 발현. 대한미생물학회지, **21**:145, 1986.
- 3) Attridge SR and Kotlarski I: Local transfer of delayed-type hypersensitivity after salmonel-

- la infection in mice. *Infect. Immun.* **50**:807, 1985.
- 4) Collins FM and Montalvine V: Relative immunogenicity of streptomycin-sensitive and-resistant strains of BCG. *Infect. Immun.* **8**:381, 1973.
 - 5) Collins FM and Mackness GB: Delayed hypersensitivity and Arthus reactivity in relation to host resistance in salmonella-infected mice. *J. Immunol.* **101**:830, 1968.
 - 6) Fauve RM and Dekaris D: Macrophage spreading: inhibition in delayed hypersensitivity. *Science.* **160**:795, 1968.
 - 7) Graham LJR and Navalkar RG: Evaluation of *Mycobacterium leprae* immunogenicity via adoptive transfer studies. *Infect. Immun.* **43**:79, 1984.
 - 8) Ha TY and Waksma BH: Role of the thymus in tolerance. X. "Suppressor" activity of antigen-stimulated rat thymocytes transferred to normal recipients *J. Immunol.* **110**:1290, 1973.
 - 9) Hormaeche CE: Natural resistance to *Salmonella typhimurium* in different inbred mouse strains, *Immunology.* **37**:311, 1978.
 - 10) Julius MH, Simpson E and Herzenberg LA: A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **3**:645, 1973.
 - 11) Killar NM and Eisenstein KT: Differences in delayed-type hypersensitivity responses in various mouse strains in the C3H lineage infected with *Salmonella typhimurium* strain SL 3235. *J. Immunol.* **133**:1190, 1984.
 - 12) Kita E, Matsuda Y, Matsuda K and Kashiba S: Separate transfer of mouse protection and delayed-type hypersensitivity with *Salmonella typhimurium* transfer factor. *Cell. Immunol.* **87**:528, 1984.
 - 13) Lovik M and Closs O: Induction of delayed-type hypersensitivity against ultrasonicated *Mycobacterium lepraemurium* bacilli without simultaneous local reactivity against live bacilli or protective immunity. *Clin. Exp. Immunol.* **53**:319, 1983.
 - 14) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ: Protein measurement with Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265, 1951.
 - 15) Orme IM and Collins FM: Adoptive protection of the *Mycobacterium tuberculosis*-infected lung. Dissociation between cells that passively transfer protective immunity and those that transfer delayed-type hypersensitivity to tuberculin. *Cell. Immunol.* **84**:113, 1984.
 - 16) Sandok PL, Hinsdill RD and Albrecht RM: Migration inhibition of mouse macrophage by brucella antigens. *Infect. Immun.* **4**:517, 1971.
 - 17) Schon-Hegrad MA and Holt PG: Improved method for the isolation of purified mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol. Methods.* **43**:169, 1981.
 - 18) Scovern H and Kantor FS: Local passive transfer of delayed-type hypersensitivity in the mouse. *J. Immunol.* **129**:25, 1982.
 - 19) Taubler JH: Staphylococcal delayed hypersensitivity in mice. I. Induction and *in vivo* demonstration of delayed hypersensitivity. *J. Immunol.* **101**:546, 1968.