

항체 생성세포의 발생기원에 관한 연구

I. 항원의 조직화학적 위치증명

Studies on antibody forming cells: I. Histochemical localization of injected horseradish peroxidase in rat spleen

서울대학교 의과대학 해부학교실

백상호·심재도·장가용·이광호

서론

임파기관의 조직절편상에서 주사한 항원의 소재 위치를 증명하는 일은 면역반응의 기전을 규명하려는 데 있어 가장 기본적인 흥미의 대상이 되는 과제중의 하나이다.

식작용에 의하여 어떤 세포의 세포질안으로 들어간 항원이 일련의 면역반응 과정중에서 가장 첫 단계의 어떤 부분적인 역할을 하고 있다는 사실은 거의 모든 연구자들에 의해 인정되고 있다. 그러나 최초로 항원을 포식하는 세포들과 실제로 항체를 생성해내는 세포들과는 그 종류가 다른 것으로 알려져있고 따라서 이 두 종류의 세포들 사이에 이루어 질 것으로 믿어지는 어떤 일련의 반응이 과연 어떠한 경로를 거쳐 어떠한 기전으로 이어져 가는지 가장 관심의 핵심이 되고 있다.

따라서 생체내에 주입된 항원과 또 어느 시간의 경과 후 생성되는 항체의 소재 위치를 증명하려는 시도가 오래전부터 계속되어 오고 있으나 연구자들마다 각각 다른 결과를 보고하고있어 현재로서는 일치된 결론을 얻지 못하고 있다 (Mellors 등 1962, Wellensiek 등 1964, Mitchell 등 1965, Kerr 등 1968, Nossal 등 1968, Leduc 등 1969, Straus 1970).

항원의 위치증명은 사용한 항원종류, 증명방법에 따라 동일한 동물의 장기에서도 다른 소견을 보일수가 있다. 이것은 항원의 분자량에 따른 침투력의 차이, 증명방법에 따른 특이성의 정도에 관계된다. 식물성 효소인 horseradish peroxidase(이하 H. R. P로 약칭)는 분자량이 약 40,000가량이며 일반적으로 과거에 사용되었던 다른 항원들에 비해 훨씬 작은 분자 크기를 가지고 있어 생체내로 주사하였을때 세포내로 침투하는 힘은 매우 강하며 특이적 반응을 일으킬 수 있는 조직화학적

증명방법이 확립되어 있다 (Graham 등 1965, 1966).

본 논문은 이러한 HRP를 항원으로 사용하여 흰쥐 비장 조직절편상에서 주사한 항원의 소재 위치를 조직화학적으로 증명함으로써 1) 항원을 포식하는 세포가 배수 및 적수에 걸쳐 분포되어 있는 모든 거식세포인가 2) 시간의 경과에 따라 어떠한 분포의 변화를 일으키는가를 규명하기 위한데 그 목적을 두고있다.

재료 및 방법

동물 : 체중 200gm에서 230gm 사이의 Sprague-Dawley 계의 숫 흰쥐를 사용하였으며 식이는 자유로이 투여하였다.

항원 : Horseradish peroxidase type II (Sigma Chem. Co.) 20mg을 생리식염수 0.5ml에 용해하여 고리정맥을 통하여 1회 주사하였다.

조직 : 주사한지 1분, 10분, 30분, 60분, 120분 및 24시간 경과후 각각 ether 마취하에 비장을 적출하여 두께 3mm 정도로 조직을 잘라 Straus(1970)의 방법에 따라 고정액(4% formaldehyde in 0.05M phosphate buffered saline, pH 7.4 with 30% sucrose)에 넣어 4°C에서 16내지 20시간 고정하였고 그후 30% sucrose로 세척을 하였으며 이 액은 여러번에 걸쳐 교환하여 주었다. 고정액이 충분히 씻겨져 나간 뒤 조직편을 즉시 -40°C로 동결시켜 보관하였다가 세절할때에는 -20°C로 온도를 올린뒤 cryostat로 두께 6μ의 절편을 만들어 slide에 밀착 건조시킨후 염색할때까지 4°C에 보관하였다.

염색 : 4°C에 보관되었던 동결절편들은 염색하기 전 약 30분간 실온에 방치해 두었다가 아래의 과정에 따라 HRP를 조직화학적으로 염색하였다.

1. 25% ethanol, room temperature

2. Incubate in 0.2% 3,3'-diaminobenzidine (or 4-CI-1-naphthol) in 0.05M Tris buffer containing 40% ethanol and 0.045% hydrogen peroxide, -10°C , 10~20sec.

3. Wash with three successive 35% ethanol, -10°C

4. Dehydrate with 50%, 70% and absolute ethanol, -10°C

조직절편중의 일부는 위와 같이 HRP를 위한 반응을 거친뒤 이어서 methyl green pyronin (MGP로 약칭) 염색을 시행하였고 나머지 일부는 H-E 염색, Gomori의 acid phosphatase 반응 (Pearse 1968)을 단독으로 또는 HRP 반응후 이중으로 시행하였다.

실 험 성 적

H-E 염색 : 사용동물이 무균사육된것이 아니므로 대부분의 백수(white pulp)는 배아중심(germinal center)이 형성되어 있었으며 거식세포(macrophage), 중등도의 임파구(lymphocyte) 및 분열중에 있는 세포(dividing lymphocyte)들 및 망상세포(reticulum cell)들로 차있어 백수의 나머지 부분에 비해 비교적 밝은 염색성을 띠므로 어렵게 염색되는 주위의 소임파구층과 대조적이었다. 거식세포의 핵은 주위에 있는 다른 세포들에 비해 약한 염기성염색을 보이고 있었으나 망상세포들과는 구별이 어려웠고 다만 큰 세포체와 그 안에 간직한 cell debris 등으로 감별되었다. 그러나 모든 거식세포가 다 cell debris를 가지고 있지는 않았으며 이런 경우에는 더욱 감별이 어려웠다. 배아중심을 제외한 나머지 백수 부분은 대부분이 소임파구로 차 있었으며 cell debris를 간직한 거식세포도 가끔 발견되었다.

적수에서도 각 세포간의 감별은 용이하지 않았고 소임파구, 형질세포등은 비교적 구별이 용이하였다.

MGP 염색 : 형질세포, large pyroninophilic cell, 임파구 및 거식세포의 감별이 비교적 용이하였다. Pyronin 양성으로 반응된 세포들은 백수의 소임파구층에서는 볼 수 없었고 배아중심에서는 형질세포 및 중등도 크기의 임파구 즉 large pyroninophilic cell들이 강한 양성반응을 나타냈으며 거식세포들은 pyronin 음성이었으나 큰 세포체와 세포질내에 간직한 cell debris 등으로 구별되었고 핵은 다른 세포들에 비해 비교적 밝은 하늘색을 띠고 있었다(Fig. 3). 흰쥐의 배아중심에서도 Chang 등 (1971)이 관찰 보고한 명대(light zone)와 암대(dark zone)를 인정 할 수 있었다.

적수에서는 비삭(splenic cord)을 이루고 있는 주축세

포체인 소임파구, 망상세포 또는 거식세포 및 형질세포, 중등도의 임파구등과 각종의 혈액세포들이 관찰되었다.

Acid phosphatase 반응 : 많은 세포들이 양성반응을 보였으며 특히 백수에서 보다는 적수에 많이 밀집되어 있었다. 형태는 난원형도 있었지만 대부분의 세포들은 다각형이었으며 때로는 마치 신경세포체 처럼 긴 돌기를 가진것도 있었다(Fig. 1).

백수내에도 이들 양성반응을 보인 세포들이 출현되었으며 그 모양도 적수의 그것들과 흡사하였으나 숫자는 비교적 적었다. Acid phosphatase와 HRP의 이중염색을 한 표본에서는 전자는 흑갈색, 후자는 갈색으로 염색반응이 나타나므로 동일 절편상에서 양자를 식별하기는 어려웠다.

HRP 반응 : Substrate로서 3,3'-diaminobenzidine을 사용한것과 4-CI-1-naphthol을 사용한것은 그 색조에 차이가 있었으며 (전자는 갈색, 후자는 청회색) MGP와 이중염색을 한 경우 benzidine을 사용한 것에서는 대조가 뚜렷하였으나 naphthol을 사용한것에서는 대조가 좋지 않았다.

HRP를 주사한지 1분후의 비장조직에서 HRP 양성반응을 보인 세포는 이미 관찰되기 시작하였다. 양성 정도는 균등하지 않아 어떤 세포는 매우 진한 갈색을 띠고 반면에 어떤 세포들은 흐린 갈색을 나타내고있었다. HRP는 세포질에 국한되어 있었고 적수의 여러곳에 단독으로 또는 여러 세포들이 집단으로 나타났으며 비장의 중심부보다는 피낭(capsule) 가까운 주변부에 보다 많이 관찰되었다. 백수에서는 HRP 양성세포가 전혀 관찰되지 않았다. 양성반응을 보인 세포들의 모양은 난원형 및 다각형이 대부분이었고 이들의 위치는 정맥동의 내면 및 비삭에서 가장 많이 관찰되었으나 MGP로 이중염색한 절편에서 pyronin 양성세포가 HRP 양성반응을 동시에 보인 경우는 없었으며 정맥동 내면에서 덮고 있는 피복세포(lining)를 제외하고는 비삭내의 HRP 양성세포들은 그것이 망상세포인지 또는 유리된(그 기원이 혈액세포이든 망상세포이든) 거식세포인지 식별은 곤란하였다.

HRP를 주사한지 10분후의 비장에서 양성반응을 보인 세포들은 약간 증가되었다. 백수 및 그 주위에서는 여전히 관찰되지 않았고 적수내의 여러곳에 분포되어 있었으며 HRP의 반응정도에도 차이는 있었다(Fig. 4).

HRP를 주사한지 30분후의 조직에서는 주사후 10분군에 비해 양성반응을 보이는 세포들이 더욱 증가하였으며 양성 정도에도 차이가 여전히 있었으나 반응 정도의 강약이 세포종류에 따른것 같지는 않았고 동일 종

류의 세포에서도 이 차이는 있었다. 숫적으로는 강양성의 세포들이 훨씬 적었다.

HRP를 주사한지 1시간 및 2시간후의 조직소견은 비슷하였으며 이들은 주사한지 30분의 동물들에서보다 더욱 양성반응세포들이 증가하였고 특히 백수와 적수의 경계부위에도 출현되기 시작하여 HRP 반응만을 단독으로 시행한 조직에서는 그 부위가 HRP 음성인 부위와 대조적임을 명백히 관찰할수 있었다(Fig. 2). MGP와의 이중염색표본에서 HRP 양성세포들은 백수주위의 pyronin 양성세포들이 밀집되어있는 환상질속에 출현되었고 적수의 기타부위에 나타나있는 HRP 양성세포들과 형태는 동일하였다(Fig. 5).

HRP를 주사한지 24시간후의 절편에서 HRP 양성세포들은 여전히 나타나 있었으며 형태나 위치 등에 특기할 만한 변화는 없었다. 주사한지 24시간후에도 백수에서는 양성세포는 관찰되지 않았고 강확대하에서 면밀히 관찰한결과 세포간세망에서도 HRP 파립은 관찰되지 않았다.

고 안

임파기관에서 항원을 증명하려는 많은 연구들은 항원의 침투경로를 추적함으로써 항원을 간직하는 세포와 항체를 생성하는 세포와의 연관성을 밝히려는데 궁극적인 목적을 두고 있다. 그러나 많은 보고들은 각기 사용한 동물, 항원 및 증명방법들이 서로 다르고 심지어는 세포들의 분류 및 정의마저도 연구자들에 따라 다르므로 실제로 이들의 업적을 단일화하여 결론 짓기에는 많은 어려움이 따르고 있다.

첫째로 동물 종류에 따른 임파기관의 정상조직구조에는 많은 차이가 있음을 Chang 등(1971)이 보고한바 있다. 즉 돼지의 임파절은 피질성분과 수질성분의 위치가 다른 동물 종류의 그것과 정반대로 되어 있어 항원의 침투경로도 또한 달라지고 있다. 둘째로 체외에서 들어간 이물질이라도 그 종류에 따라 같은 임파기관에서도 식작용을 한 세포들이 일단 세포질내에 들어온 이물을 다음 단계로 처리하는 과정에는 큰 차이가 있다. 즉 항원성이 없는 단순한 이물질(carbon, dye 등) 및 항원성이 있는 이종단백질(세균체의 일부, 혈청단백의 일부 또는 효소등)은 일차로 식작용이 있는 세포들에 의해 포식되지만 단순이물질들은 그 자체가 분해되어 항체생성 과정으로 들어가지 않으므로 반영구적으로 세포내에 잔류하게 되는 반면 분해효소체(lysosome)에 의해 분해되어 어떠한 경로를 밟든간에 항체생성과정으로 넘어가게 되는 항원성이 있는 이물질들은 시간의 경과에 따라 세포내에서 소실되어감은 많은 보고들은 증명하고 있다

(Schoenberg 등 1964, Straus 1970, Snodgrass 등 1971).

이러한 항원들은 그 분자량의 크기에 따라 많은 차이를 볼수 있다. 즉 비교적 분자량이 큰 ferritin, bovine serum albumin, flagella 등은 분자량이 작은 HRP(약 40,000)에 비해 세포에서의 침투능력에 있어 차이가 있을 것이고 따라서 뒤따르는 일련의 항체생성과정에 어떤 차이가 있을 수 있는 가능성을 전혀 무시할수는 없다. 분자량의 크기도 문제려니와 항원자체의 항원성의 강도에 따라서도 항체생성반응이 조직학적인 차이는 단언하기 어려워도 면역학적으로는 명백한 차이를 보인다. 즉 일반적으로 HRP는 분자량은 다른 것에 비해 작아 침투력이 강하나 항원성이 약한것으로 알려지고 있다.

셋째로 증명방법에 있어서 종래에 많이 적용되어온 형광항체법을 이용한 항원의 증명은 항체자체의 특이성도 문제려니와 자가형광을 포함한 많은 비특이적 형광을 발하고 또 암시야에서의 관찰이므로 항원의 위치 및 주위조직과의 연관성을 단일절편에서 관찰하기에는 많은 결함을 가지고 있다. 그것에 비하면 동위원소를 표시한 항원을 자기방사법으로 증명하는 방법은 비교적 장점이 많으나 이 방법 또한 비특이적 background 및 미세구조상에서의 위치관계를 논하는 문제에서 부적당한 점이 많다. 세포의 경계가 비교적 명백한 경우에는 증명은 비교적 용이하나 백수의 배아중심에서 나타나는 거식세포의 경우처럼 세포막의 관찰이 어렵고 특히 그 돌기부분에서 항원을 관찰한다는 것은 그것이 세포간격에서 발견되는 silver grain 과의 감별이 쉬운일이 아니다(Cheng 등 1961, Mitchell 등 1965).

이들에 비해 항원자체를 특이적으로 염색할 수 있는 것이 HRP를 항원으로 사용하였을 경우이다. HRP는 조직화학적반응으로 염색함으로써 광학 또는 전자현미경하에서 관찰이 가능하며 이중 염색도 할 수 있어 Straus(1967)에 의해 처음 적용되기 시작하였고 그후 Kerr(1968), Graf 등 (1971) 및 Shannon 등 (1971)에 의해 여러면에서 사용되었다.

위에서 기술한 여러 요인들의 복잡성 가운데서도 항원의 식작용은 면역반응의 제일단계에서 어느 부분적인 중대한 역할을 맡고있을 것이라는 견해는 거의 모든 연구자들에게 인정되어 있는 사실이다.

그러나 흔히 임파절에서 주사한 항원은 급속히 임파소절 또는 배아중심에 나타났고 그 항원의 대부분은 임파소절의 세포밖, 특히 망상세포의 수상돌기 표면 가까이에서 관찰되었다는 보고(Nossal 등 1967)가 있는가 하면 Kerr 등(1968)은 HRP를 guinea pig에 주사하였을 때 임파절이나 비장에서 모두 수질(비장에서는 적수)의 일부 세포에서 항원이 증명되었고 피질(비장에

서의 백수)에서는 거식세포가 항원을 간직하고 있었음을 관찰할 수 없었다고 보고하고 있다.

한편 Straus(1970)는 항원이 임파절의 피질부위와 수질부위의 어느곳에 분포되느냐하는 것은 항원을 주사할 때의 혈액내에 그 항원에 대한 항체가 있느냐 없느냐에 따라 달라져 단일회의 항원 주사시에는 피질에서는 항원의 증거가 안되었으나 혈중에 항체가 출현되기 이전(2~3주 이내)에 제2회의 주사를 하였을 때에는 임파소절의 세포간세망(intercellular web)에서 항원을 관찰할 수 있었다는 결과를 보고하였다.

저자들의 실험결과는 흰쥐를 재료로 HRP를 단일회 정맥내주사로 투여한후 1분에서부터 24시간까지 여러 시간의 간격을 두고 비장조직 절편을 만들어 조직화학적으로 항원의 위치 증명을 시도한 것이다.

항원은 주사후 1분의 조직에서 증명되었다. 이것은 Nossal 등 (1968)이 보고한 3분보다 더 빨리 출현한 것이지만 그들의 실험에서는 가장 빨리 절취한 조직이 3분이었고 더우기 그들은 foot pad에 주사한 것이 본 실험에서 정맥내주사로 투여한것과 다른 점이다.

비장조직절편에서 별도로 염색한 acid phosphatase는 적수 및 백수의 많은 세포에서 증명되었으며 이들은 Straus 및 Kerr 등이 입증한 분해효소체가 많은 거식세포와 동일한 형태를 가진 세포들이었다.

Benzidine 등의 substrate로 처리한 HRP의 반응에서는 적수 또는 적수와 백수의 경계부위에 있는 세포들에서만 양성으로 나타났고 백수의 배아중심에서는 HRP양성을 전혀 볼 수 없었다. 이러한 결과는 24시간까지의 모든 조직에서 동일하였으며 적수와 백수의 경계부위에서의 HRP 양성 세포수가 시간이 감에 따라 약간 증가한 것만이 다를뿐 기타 소견은 동일하였다. HRP의 조직화학적반응은 매우 민감하여 세포질내의 작은 분비과립까지도 증명되는 것으로 미루어 볼때 백수의 세포 또는 세포간세망에서 HRP가 음성이었음은 Kerr 등의 실험결과와는 일치하고 있으나 Nossal 등의 보고와는 전혀 다른 소견이다. 그러나 백수와 적수의 경계부위라고 지적된 곳이 적수의 전형적인 비삭의 구조와는 다른점으로 미루어보아 (Chang 등 미발표 논문)이 부위를 백수로 간주해야 할 것인지는 좀더 명확한 형태학적 연구결과가 나타나야 할 것으로 보인다.

또한 HRP염색후 MGP의 이중염색을 한 절편에서 적수의 세포중 일부는 HRP양성반응을 보이고 있었으나 백수의 거식세포들은 HRP양성반응을 보이지 않고 있는 점으로 미루어 보아 거식세포로 분류되는 모든 세포들이 전부 항원을 포식하는것 같지는 않으며 따라서 백수내에 존재하는 거식세포는 적어도 기능면에서 적수에 나

타나는 거식세포들과는 다른 세포가 아닌가 생각된다 (Fig. 3).

결 론

Horseradish peroxidase를 항원으로 정맥내 주사한 흰쥐 비장의 동결조직 절편상에서 조직화학적으로 HRP를 염색하여 항원의 위치증명을 시도하였으며 methyl green pyronin 염색 및 acid phosphatase 반응을 각각 또는 HRP 반응과 이중으로 시행하여 관찰한 소견을 아래와 같이 요약할 수 있었다.

1. 항원은 적수 및 적수와 백수의 경계부위에 있는 일부 세포에만 그 위치가 국한되었으며 백수의 세포에서는 전혀 증명되지 않았다.
2. 항원은 주사후 1분에 이미 비장조직내에서 관찰되었으며 시간의 경과에 따라 주사후 2시간까지는 항원을 간직한 세포수는 점차 증가하였다.
3. 생체내에 들어간 항원의 일차적인 포식은 거식세포에 의해 이루어지나 비장내의 모든 거식세포가 식작용에 관여하고 있는것 같지는 않다.
4. 따라서 백수의 배아중심에 나타나는 거식세포는 기능면에서 적수의 비삭에 존재하는 거식세포들과는 전혀 다른 세포일 가능성이 많다.

ABSTRACT

Studies on antibody forming cells

I. Histochemical localization of injected horseradish peroxidase in rat spleen.

Sang Ho Baik, Jae Do Shim, Ka Young Chang
Kwang Ho Lee

Dept. of Anatomy, College of Medicine,
Seoul National University

Adult rats were injected intravenously with 20mg of horseradish peroxidase. A series of rats were sacrificed at intervals ranging from 1 minute to 24 hours, and spleens were processed for sensitive histochemical reaction to localize exogenous peroxidase. Methyl green pyronin staining and acid phosphatase reaction were also applied to them singly or combined with HRP staining.

Numerous HRP trapping cells were found throughout the red pulp, junction of red and white pulp of

the spleen, while in the white pulp, no evidence of HRP positive cells were obtained.

Lysosome rich cells in both of white and red pulp appeared positively by the acid phosphatase reaction, but not all of them were positive in HRP staining. In HRP-MGP double stained sections, HRP was localized mainly in the macrophages of the splenic cord and lining cells of the blood sinuses.

Uptake of exogenous antigen by the splenic macrophages was recognized 1 minute after injection and was increased progressively up to 2 hours. No trace of HRP was observed in the cells or in the intercellular spaces of the white pulp.

REFERENCES

1. Chang, K. Y., Rha, B. J., Baik, S.H. and Lee, K. H. : *Histological study on the lymph nodes from neonatal and adult pigs. Kor. Cent. J. Med.* 20:337, 1971.
2. Cheng, H. F., Dicks, M., Shellhamer, R. H., Brown, E. S., Roberts, A. N. and Haurowitz, F. : *Localization of antigens by autoradiography. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 106:93, 1961.
3. Graf, J., Kerjaschki, D. and Hörandner, H. : *Simultaneous demonstration of exogenous horseradish peroxidase and acid phosphatase activities in phagolysosome. J. Histochem. Cytochem.* 19:569, 1971.
4. Graham, R. C., Lundholm, U. and Karnovsky, M. J. : *Cytochemical demonstration of peroxidase activity with 3-amino-9-ethyl carbazole. J. Histochem. Cytochem.* 13:150, 1965.
5. Graham, R. C. and Karnovsky, M. J. : *The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: Ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem.* 14:291, 1966.
6. Kerr, J. F. R. and Middleton, G. : *The uptake of injected horseradish peroxidase by lysosome-rich histiocytes, J. Path. Bact.* 95:503, 1968.
7. Leduc, E. H., Scott, G. B. and Avrameas, S. : *Ultrastructural localization on intracellular immune globulins in plasma cells and lymphoblasts by enzyme-labeled antibodies. J. Histochem. Cytochem.* 17:211, 1969.
8. Mellors, R. C. and Brgosko, W. J. : *Studies in molecular pathology. I. Localization and pathogenic role of heterologous immune complexes. J. Exp. Med.* 115:891, 1962.
9. Mitchell, J. and Abbot, A. : *Ultrastructure of the antigen-retaining reticulum of lymph node follicles as shown by high-resolution autoradiography. Nature (London)* 208:500, 1965.
10. Nossal, G. J. V., Abbot, A. and Mitchell, J. : *Antigens in immunity. XIV. Electron microscopic radioautographic studies of antigen capture in the lymph node medulla. J. Exp. Med.* 127:263, 1968.
11. Nossal, G. J. V., Abbot, A., Mitchell, J. and Lummus, Z. : *Antigens in immunity, XV. ultrastructural features of antigen capture in primary and secondary lymphoid follicles. J. Exp. Med.* 127:277, 1968.
12. Pearse, A. G. E. : *Histochemistry, Theoretical and Applied. 3rd ed., Vol. 1., chapter 16, Little, Brown Co., Boston, 1968.*
13. Schoenberg, M. D., Mumaw, V. R., Moore, R. D. and Weisberger, A. S. : *Cytoplasmic interaction between macrophages and lymphocytic cells in antibody synthesis. Science* 143:964, 1964.
14. Shannon, S. L. and Graham, R. C. Jr. : *Protein uptake by synovial cells. I. Ultrastructural study of the fate of intraarticularly injected peroxidases. J. Histochem. Cytochem.* 19:29, 1971.
15. Snodgrass, M. J. and Snook, T. : *A study of some histochemical and phagocytic reactions of the reticuloendothelial system of the rabbit spleen. Anat. Rec.* 170:243, 1971.
16. Straus, W. : *Methods for the study of small phagosomes and the relationship to lysosomes with horseradish peroxidase as a "marker" protein. J. Histochem. Cytochem.* 15:375, 1967.
17. Straus, W. : *Location of antibody to horseradish peroxidase in popliteal lymph nodes of rabbits during the primary and early secondary response. J. Histochem. Cytochem.* 18:120, 1970.
18. Straus, W. : *Localization of the antigen in pop-*

liteal lymph nodes of rabbits during the formation of antibodies to horseradish peroxidase. J. Histochem. Cytochem. 18:131, 1970.

antibody production. X The cellular localization of antigen molecules (ferritin) in the secondary response. J. Exp. Med. 119:685, 1964.

19. Wellensiek, H. J. and Coons, A. H. : *Studies on*

Legends for figures

- Fig 1.** Rat spleen, 2 hours after HRP injection. Numerous cells of red pulp were reacted positively. In white pulp (right lower, W), positive cells were less numerous but showed same intensity of reaction. Acid phosphatase reaction. $\times 430$
- Fig 2.** Rat spleen, another section of same material as shown in Fig. 1. Stained exogenous HRP with 3,3'-diaminobenzidine. Positive cells were localized at the junction of red pulp(left half) and white pulp (right half, W). $\times 430$
- Fig 3.** Germinal center of white pulp, 2 hours after injection of HRP, of same material as shown in Fig. 1. Methyl green pyronin stain. Note the presence of numerous pyronin positive cells and pale macrophages (arrow) containing cell debris in their cytoplasm. $\times 430$
- Fig 4.** Rat spleen, 10 minutes after injection of HRP, stained with 3,3'-diaminobenzidine. A few HRP positive cells were present. Note the negative shadow of nucleus. Background is unstained. $\times 430$
- Fig 5.** Rat spleen, 2 hours after HRP injection, stained with 3,3'-diaminobenzidine. Numerous HRP positive cells appeared mainly in the vicinity of white pulp. $\times 430$

