

백일해균의 세포벽과 원형질의 항원성에 관한 연구

A Study on the Antigenic Activities of Cell Wall and Protoplasm of Bordetella Pertussis

서울대학교 의과대학 미생물학교실

최 성 배

서 론

실험재료 및 방법

백일해 균의 항원의 복잡성이 많이 보고 되어 왔다. (Flosdorf et al, 1942; Eldering et al, 1962; Evans et al, 1937; Banerjea et al 1962; Keogh et al, 1947; Masry, 1952; Robbin et al, 1950) 그중에서 특히 방어성 항원, 히스타민 감작성인자, 이열성, 내열성독소, 적혈구 응집소, 응집원 및 임파구증가증 인자등을 들수있다.

저자는 전 보고에서 우리나라 예방액 제조 균주들의 상호간의 항원성에 대하여 상술한 여러 성상의 일부를 보고한바 있다. (Choi, 1971) 본보에서는 백일해 균체를 캐프러이 원심침전 방법(Munoz et al, 1959; Ribl et al, 1959)으로 세포벽(cell wall)과 원형질(protoplasm)로 구분하고 전체세포(whole cell)를 대조로 택하여 방어성 항원, 히스타민 감작성, 독성들을 검토하였다. 그러나 전보고에서의 방어성 실험(N.I.H. U.S.A., 1959)에서 흰쥐의 뇌내에 백일해균으로 공격시 균의 병원성(독성) 이외에 기계적 자극이나 다른 인자로 인하여 사망한 흰쥐도 방어가 산정에 포함 시켰을 가능성이 진유되고 있는 것이다.

일면 Wood(1951), Florey(1958)등이 식균현상이 숙주를 보호하는 중요 방어기전임을 말하였다.

따라서 본 실험에서는 흰쥐 방어 실험 대신 이상의 자체제로 면역한 흰쥐의 복강에서 유인된 거식세포들의 식균율에 의한 방어성으로 연구검토 하였다.

1. 균 주

국립보건연구원에서 분양된 18380, 18323을 사용하였다.

2. 동 물

체중 약 12gm의 흰쥐들(albino mice)을 사용하였다.

3. 배지(백일해균) 및 배양

20% sheep blood를 포함한 Bordet Gengou 배지를 사용하여 37°C에서 2~3일 부란되었다.

4. 세포벽과 원형질을 얻는 방법

주로 Munoz나 Ribl의 방법(Munoz et al, 1959; Ribl et al, 1959)을 약간 변경하여 아래와 같이 제조되었다.

전체세포(whole cell): 냉각생리적 식염수로 부유시킨 세균 부유액을 두층의 whatman filter paper를 통하여 여과되었고 세균세포를 international refrigerated centrifuge에 의하여 5,500G로 원심 침전한후 상층을 버리고 균체는 냉각생리적 식염수에 부유되었다.

균세포는 다시 두번 더 원심되어 세척되었다. 2회에 걸쳐 균 세포를 원심한후 냉 증류수로 Klett summerson photoelectrometer로 600W의 농도가 되도록 재 부유되었다. sample을 얼리어 진공으로 말리어 전체세포로 하였다.

원형질: 이상의 전체세포 제조과정에서 세척된 균액을 50opacity unit의 농도 균액을 sonifier converter로 2~4분 처리하였으며 처리에 적절한 시간은 sample을

This study was supported by CMB Grant (73-300-11) from China Medical Board of New York, Inc.

※ 지도 이 승 훈 교수
<1976. 1. 20 접수>

전자현미경으로 관찰하여 결정되었다. 선택된 시간은 전체세포의 80~90%가 파괴되도록 결정되었다. 세포가 파괴된 것을 확인한후 실험관을 세워서 상층을 모아서 원심 실험관에 pooling 한다. 상층을 다시 원심침전하고 pooling 한다. 이 pooling 된 상층을 10,000G 로 1시간 동안 원심침전하고 다시 얻어진 상층을 capillary pipette로 옮기고 잔유된 하층물을 제거하기 위하여 다시 두번 더 10,000G 로 원심침전하여 투명 혹은 약간 반투명한 부분을 냉동건조하여 원형질로 표시하였다.

세포벽: 세포 파괴후 처음 원심침전관으로 부터 전체 세포, 세포벽 및 원형질을 포함한 하층(침전층)을 냉각수에 다시 재 부유시켜 10,000G 로 1시간 원심 침전한 다음 맨 밑에 전체세포와 세포벽의 혼합물이 있고 상층에 세포벽이 있게 된다. 상층을 옮기고 상위부위를 다시 100ml의 냉각수에 부유시키고 다시 이 과정을 반복한 다음 중층을 버리고 상위부위의 세포벽만을 집합한다. 이런 세척은 대부분의 원형질 물질을 제거하기 위하여, 또 세포벽으로 부터 온전한 세포들을 제거하기 위한 필연적인 과정이었다. 세포벽은 문치어서 감별 원심침전(differential centrifuge)에 의하여 순수화가 불가능했다. 세포벽은 세번 세척한 후 conical centrifuge tube 에 재 부유시킨 다음 4,000RPM 으로 원심 침전한 후 가벼운 상층을 액하게 된다.

이런 과정을 다시 세번 반복한 다음 냉동상으로 세포벽 부분을 세워놓게 된다. 다음날 아침 다시 이상과 같이 원심 침전한 다음 상층부를 집합해서 세포벽으로 하였다.

이상과 같이 제조된 세포벽, 원형질 및 전체세포를 아래 각항에 해당되는 방어성 항원, 히스타민 감작성, 독성등에 대하여 동일한 중량을 근거로 비교실험 되었다.

5. 면 역

세포벽, 원형질 및 전체세포들을 동일한 중량(1mg/ml)으로 0.1ml씩 1주 간격으로 3회 피하 접종하였다.

6. 거식세포

Suter, Choi의 방법(Suter, 1952; Choi, 1972)에 따라서 0.02mg/ml의 glycogen 용액 1ml를 각분획 면역 후 1주에 흰쥐의 복강에 주입하였다.

glycogen 주입후 1주에 흰쥐를 죽이고 5ml의 세포채취액으로 복강에 주입하여 배를 마사하지 한뒤 복강을 절개하고 무균적으로 모세 pipette를 사용하여 삼출액을 채취 하였다.

Wu의 방법(Wu et al, 1963)에 따라서 삼출액을

1,000R.P.M.에 10분 원심 침전시킨 후 상층액을 제거 하였다.

7. 거식세포 채취액 및 유지액

세포 채취액(cell collecting fluid; C.C.F로 약함)과 세포유지액(cell maintenance fluid; C.M.F로 약함)의 기본액으로 Earle's balanced salt solution(B.S.S.로 약함)을 사용하였다.

세포 채취액은 B.S.S.와 Lactalbumin hydrolysate를 5% 유용시킨 Lactalbumin hydrolysate 용액(L.A.H로 약함)을 9:1의 비율로 혼합하고 heparin을 20units/ml씩 가하였다.

세포 유지액은 B.S.S., L.A.H. 및 편역 혹은 대조 혈청을 8:1:1의 비율로 혼합 하였고 pH. 7.2-7.3으로 맞추었다.

8. 식균물에 의한 방어성 시험(균·세포 혼합액 및 관찰)

Corevslip이 들어 있는 Leighton 관에 C.M.F.를 분주하고 백일해 균수와 편역(혹은 대조) 거식 세포수는 약 10:1의 비율로 혼합한 다음 관의 평면이 아래로 향하여 약 25도 각도로 기울게 배열하여 37°C 부란기에 방치하였다.

시간별로 Leighton 관 한개씩으로 부터 coverslip을 꺼내고 Giemsa 염색을 한후 slide glass에 옮기고 balsam으로 고정하여 식균율을 현미경으로 검색하였다.

9. 히스타민 감작성 시험

전 방법(Choi, 1971)에 따라 세포벽, 원형질 및 전체 세포들을 생리적 식염수로 부유액을 만들어 이열성 독소를 제거하기 위하여 50-55°C로 5분동안 가열한 다음 5배 단계희석(250µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml)으로 하여 10마리의 흰쥐에 1ml씩 복강으로 면역한후 4일에 Histamine dihydrochloride (base로 0.5mg)로 복강으로 공격하여 1일후 생사를 판독하였다.

10. 독성 시험

전방법(Choi, 1971)을 따라 세포벽, 원형질 및 전체 세포들로 5배 단계(50µg/ml, 10µg/ml, 2µg/ml)로 희석하여 10마리의 흰쥐에 주입하여 얻은 LD₅₀(lethal dose 50)와 여러 온도(5, 56, 100°C)로 처리하여 가토의 측후면(lateral dorsal surface)에 주입하여 피부괴사 및 발적으로 판독하였다.

실험 성적

실험 1. 거식세포 식균율에 의한 방어성 항원능

백일해균의 각 분획(세포벽, 세포질, 전체세포)을 1mg/ml의 농도로 하여 1주 간격으로 3회 면역한 각회별 세마리의 흰쥐들로부터 각각의 복강에서 C.C.F.로 거식세포를 채취하여 혼합한 다음 각각의 면역혈청 및 대조혈청으로 부유시킨 C.M.F.로 백일해균의 혼합액을 만들어 시간별로 식균율을 측정하여 도 1, 2, 3과 같은 성적을 얻었다.

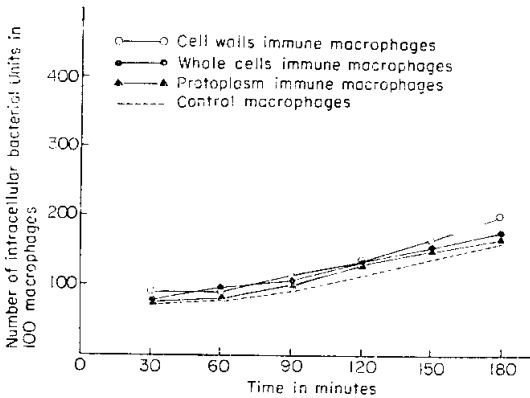


Fig 1. Number of intracellular units of B. pertussis in control, whole cells-immune, cell walls-immune, and protoplasm-immune, macrophages 2 weeks after 1st immunization.

도 1:은 1회 면역후 2주후에 채취한 거식세포의 식균율로 세포벽, 세포질 및 전체세포로 면역한 동물의 거식세포와 백일해균을 혼합한후 부란시켜 시간별로 관찰된 성적으로 세포벽, 원형질 및 전체세포로 면역한 거식세포와 대조 거식세포의 식균율은 30분에 90, 76, 75와 74, 60분에 90, 100, 76과 76, 90분에 110, 105, 100과 90, 120분에 140, 140, 125과 110, 150분에 170, 160, 150과 140, 180분에 200, 175, 170과 160으로 대조 거식세포보다 세포벽, 원형질 및 전체 세포의 면역 거식세포의 식균율이 더 증진되었으나 원형질 면역 거식세포보다 세포벽, 전체세포면역 거식세포에서 더 식균율이 증진되었다. 세포벽과 전체세포면역 거식세포의 차이에서 시간경과에 따라서 근소하게 세포벽 면역 거식세포에는 전체세포 면역 거식세포보다 더 식균율이 증진되었으나 현저한 차이는 없었다.

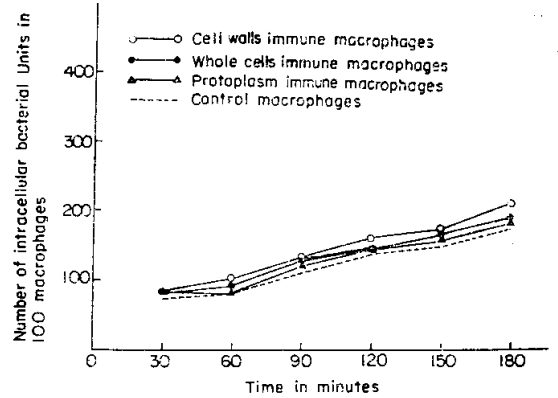


Fig 2. Number of intracellular units of B. pertussis in control, whole cells-immune, cell walls-immune, and protoplasm-immune, macrophages 2 weeks after 2nd immunization.

도 2:는 2회 면역후 2주에 채취한 거식세포의 식균율로 세포벽, 원형질 및 전체세포로 면역한 흰쥐의 거식세포와 백일해균의 혼합후 부란하여 얻은 성적으로 세포벽, 원형질 및 전체세포로 면역한 거식세포와 대조 거식세포의 식균율은 30분에 77, 75, 76과 75, 60분에 110, 90, 76과 76, 90분에 135, 125, 120과 110, 120분에 160, 150, 145와 140, 150분에 175, 170, 160과 150, 180분에 210, 190, 180과 175로 대조 거식세포보다 세포벽,

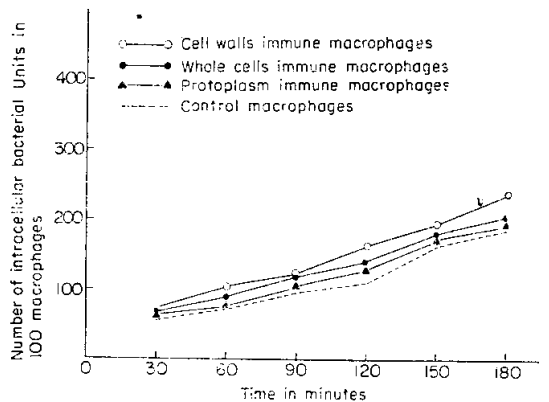


Fig 3. Number of intracellular units of B. pertussis in control, whole cells immune, cell walls-immune, and protoplasm-immune macrophages 2 weeks after 3rd immunization.

원형질 및 전체세포 면역거식세포에서 식균율이 증진되었고 세포벽 면역거식세포가 전체세포 면역거식세포, 원형질 면역거식세포보다 식균율이 높았고 전체세포, 면역거식세포가 원형질 면역거식세포보다 근소하게 식균율이 더 증진되었다.

도 : 3은 3회 면역한후 2주에 채취한 거식세포의 식균율로 세포벽, 원형질 및 전체세포로 면역한 흰쥐의 거식세포와 백일해 균의 혼합후 부란시켜 얻은 성적으로 세포벽, 원형질 및 전체세포로 면역한 거식세포와 대조거식세포의 식균율은 30분에 75, 74, 73과 72로 60분에 100, 90, 75와 74, 90분에 125, 120, 100과 90, 120분에 160, 140, 125과 110, 150분에 190, 175, 170과 160, 180분에 240, 210, 190과 185로 세포벽, 원형질 및 전체세포들의 면역거식세포가 대조거식세포보다 식균율이 높았고 면역거식세포들의 식균율은 세포벽, 전체세포 및 원형질의 면역 거식세포순으로 식균율이 증진되었다.

실험 2. 히스타민 감작시험

세포벽, 원형질 및 전체세포들을 생리적 식염수로 부유액을 만들어 5단계 (250µg/ml, 50µg/ml, 10µg/ml의 농도)로 계대희석하여 10마리의 흰쥐에다 1ml씩 면역후 4일후 Histamine dihydrochloride (base로 0.5mg)로 복강으로 공격하여 1일후 생사를 판독하였다.

Table 1. Histamine sensitization test with cell walls, protoplasm and whole cells of *B. pertussis*

Preparation	Results			SD ₅₀ *
	microgram per mouse			
	10	50	250	
Cell walls	6/10**	9/10	10/10	<10µg
Protoplasm	3/10	7/10	9/10	19.1
Whole cells	4/10	8/10	10/10	10.7

* SD₅₀=Sensitizing dose 50

** Death/Total challenged

표 1에서 보는 바와 같이 세포벽의 SD₅₀(sensitizing dose 50)가 10µg 이하이고 전체 세포보다 더 흰쥐를 감작시켰으며 원형질의 SD₅₀은 19.1이고 전체세포의 SD₅₀은 10.7로 전체세포가 원형질보다 더 흰쥐를 감작시켰다. 히스타민 감작인자는 세포벽에 주로 위치 하였다.

실험 3. 독성 시험

각 분획으로 흰쥐에 주입하여 얻은 LD₅₀(lethal dose 50)과 가토의 측후면 (lateral dosal surface)에 주입하여 피부괴사 및 발적으로 판독하였다.

Table 2. Mouse toxicity test with cell walls, protoplasm and whole cells of *B. pertussis*

Preparation	Results			LD ₅₀ *
	microgram per mouse			
	2	10	50	
Cell walls	0/10**	1/10	3/10	>50µg
Protoplasm	2/10	5/10	10/10	6.7
Whole cells	1/10	3/10	6/10	17.4

* LD₅₀=Lethal dose 50

** Deaths/Total injected

LD₅₀: 세포벽, 원형질 및 전체세포를 5단계 계대희석하여 10마리의 흰쥐에 복강으로 1ml씩 접종하여 3일까지 생사를 관찰한 다음 Reed muench 방법으로 산출하여 판독하였다.

표; 2에서 보는 바와같이 독성은 원형질에서 6.7로 제일 강했고 전체세포가 중간에 위치했고 반면 세포벽에서 제일 약했다.

괴사반응 : 가토 피부괴사 반응은 이열성 독소를 검토하기 위하여 시행된 것으로 5, 56, 100°C로 10분 처리한 각 분획(세포벽, 원형질 및 전체세포)을 10µg/ml의 농도로 가토의 측후면에 0.2ml씩 접종후 3일 관찰하여 괴사 및 발적을 측정하였다. 아울러 가열 처리한 각 분획의 독성도 검토되었다.

Table 3. Rabbit skin test with cell wall, protoplasm and whole cells of *B. pertussis*

Preparation	Results		
	Temperature treated		
	5	56	100
cells walls	4×4	(2×3)	(2×1)
protoplasm	6×7	(3×5)	(2×2)
whole cells	5×6	(2×4)	(2×2)

() : size of erythema never turned in necrosis

표 : 3에서 보는 바와 같이 괴사 정도는 원형질이 제일 강했고 전체세포, 세포벽의 순서로 나타났다. 100°C 처리된 분획들의 발적은 현저한 차이가 없었다.

고 안

백일해균의 독성과 방어성 항원 및 히스타민 감작성은 근래 많이 논의된 문제점의 하나로 앞으로 좀더 독성이 저고 효과있는 예방약 개발에 대한 연구와 검토를

목적으로 본시험이 시행되었던 것으로 방어성 시험은 흰쥐의 뇌내에 접종하여 방어가를 산출한 것 보다 면역 동물에서 유인된 거식세포의 식균율로서 검토함으로써 뇌내 접종시 기계적 자극의 결합을 어느정도 피할수 있고 좀더 효과있는 방법으로 간주하여 시행하였던 것이다.

Munoz 등(1959)은 세균 파괴시 Mickle disintegrate 를 사용하였고 본 실험에서는 sonifier converter 를 사용 하였으므로 다소간 차이점이 예상되며 본실험에서는 백일해 균체를 완전히 파괴 시켰음으로 원형질이 원심 침전시 거의 완전히 제거된 세포벽들을 끄집어 낼수 있었다고 사려되었다. 그러나 세포벽 성분이 더 파편화 되어 원형질 쪽으로 변입되었을 가능성이 내포되어 있었다.

도 : 1~3과 표 : 1를 살펴보면 세포벽에서 식균율에 의한 방어가와 히스타민 감작성이 제일 높았고 다음에 전체 세포, 원형질의 순서로 원형질이 방어성과 히스타민 감작성이 제일 약했다. 세포벽이 방어성과 히스타민 감작성이 제일 현저하였으므로 방어가와 히스타민 감작성의 동질적이란 보고(Joo et al, 1960; Munoz et al 1963)와 일치 하였다고 사려되었다. 그러나 방어성 항원과 히스타민 감작인자가 분리될 수 있는 이질적인 것이라는 보고(Dolby, 1958; Nagel, 1967)도 있으므로 앞으로 더 검토하여야 할 것이다.

Munoz 등(1959)의 성적과 다소의 차이는 세포 파괴시 다소 다른 방법을 택한데 기인된 것으로 사려되었다.

독성은 원형질에 많이 존재하고 있는 것으로 사려되었다. Munoz 등(1959)의 성적과 거의 일치하고 있으나 다소의 차이는 균체 파괴방법의 차이로 세포벽 성분이 더 원형질 쪽으로 분쇄되어 함유된데 기인한 것으로 사려 되었다.

블론 본 실험중 반복된 세척과정에서 방어성 항원 성분이나 독성 물질성분의 일부분을 상실하였고 다소간 분획간에 상호 침범이 있었다고 사려되었으며 전보고자들의 방법(Munoz et al, 1959; Ribi et al, 1959)에서도 피할수 없었다.

본 연구는 저자의 전 연구(Choi, 1971)인 균주상호간의 항원성 차이의 검토에 이어 한 균체를 깨뜨려서 원심침전으로 구분된 세포벽과 원형질로 전체세포를 대조로 하여 방어성항원, 히스타민 감작성 및 독성들이 검토되었으나, 세포벽의 방어성과 히스타민 감작성의 동질성 여부는 앞으로 더 검토되어야 할 것이다.

총 관

백일해 균체를 파괴하여 세포벽, 원형질로 구분하고

대조로 전체세포를 택하여 면역후 얻은 면역거식세포와 대조 거식세포를 면역 혹은 대조혈청으로 부유시켜 식균율로 방어성을 검토하고 아울러 히스타민 감작성 및 독성들을 검토하여 아래와 같은 성적을 얻었다.

① 거식세포 식균율에 의하여 검색한 백일해균의 방어성 항원은 주로 세포벽에 위치했다.

② 백일해균의 히스타민 감작성인자는 주로 세포벽에 위치하였다.

③ 백일해균의 이열성 독성은 원형질에서 주로 출현되었다.

-ABSTRACT-

A Study on the Antigenic Activities of Cell Wall and Protoplasm of B. pertussis.

Sung-Bce, Choi

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

Many investigators have reported that B. pertussis cells possess protective antigen, histamine sensitizing factor, heat stable and labile toxin, hemagglutinin, agglutigen and the others.

However, the location in the cell of the active material is not known with certainly.

The present experiments were made to determine the antigenic structure of B. pertussis.

In this study, the method of preparation of cell wall, protoplasm and whole cell of B. pertussis was described and the protective antigenicity studied by phagocytic rate of peritoneal macrophage obtained from immune or control mice, histamine sensitizing activity and toxicity of these preparations of B. pertussis were presented.

Material and Method:

1) Strains of B. pertussis:

Laboratory stock strains, routinely used for vaccine preparation in N.I.H. Korea, were employed

2) Media and Culture:

Culture on Bordet Gengou Agar containing 20% defibrinated sheep blood was incubated at 37°C for 2 days.

The growth from plate was suspended in cold physical saline.

3) The method of obtaining of cell wall and protoplasm:

The preparations of cell wall and protoplasm from these cells were followed, with minor modification, the method previously described by Munoz (1959) and Ribi (1959)

4) Protective antigenicity by phagocytic rate of immune or control macrophage:

Following immunizing injections of whole cell, cell wall and protoplasm of *B. pertussis*, peritoneal exudates were induced in the immunized and control mice by intra peritoneal injection of sterile glycogen.

Collected macrophages were infected by cells of *B. pertussis* and then the mixtures were incubated to allow phagocytosis.

Phagocytic rate was based on the number of intra cellular bacterial units per 100 macrophages counted in random field.

5) Histamine sensitizing test:

Suspensions of whole cell, cell wall and solutions of protoplasm were made in physiological saline, and then 5 fold dilutions were made in physiological saline.

Groups of 10 mice were challenged (I.P.) with 0.5mg of histamine base 4 days after the sensitizing injection.

6) Toxicity test:

a) Each preparation was weighed and resuspended in 10ml of physiological saline, 5 fold dilutions were then made. Groups of 10 mice each were injected intraperitoneally with 1ml of the various concentrations of the three different preparations.

LD 50 values of these fractions were determined in mice (12 ± 1 gm). The results were calculated according to the method of Reed Muench after 3 days observation.

b) Suspensions of these fractions were adjusted by Klett summerson photoelectriccolorimeter and then 0.2 ml of these suspensions treated at various temperature was injected intra dermally into lateral dorsal surface of clipped normal rabbit.

The results were summarized as follows:

1) Protective antigen of *B. pertussis* investigated by immune or control macrophage in the presence of immune or control serum was mainly located in cell wall preparation.

2) Histamine sensitizing factor of *B. pertussis* was mainly located in cell wall preparation.

3) Heat labile toxin of *B. pertussis* was mainly

present in the protoplasm preparation.

REFERENCES

1. Banerjee, A., and Munoz, J.: *Antigens of Bordetella pertussis II purification of Heat-labile toxin*, *J. Bact.* 84, 269-274, 1962.
2. Choi, S.B.: *A study on the antigenicities of Bordetella pertussis Strain*, *J. Int. med.* 14, 9-15, 1971.
3. Choi, S.B.: *An Experimental Study on Inoculation Method of Typhoid Vaccine and Immunological Responses by Macrophages*. *Korean Central Journal of Medicine* 23:271-278, 1972.
4. Dolby, J.M.: *The separation of the histamine-sensitizing factor from the protective antigen of Bordetella pertussis*. *J. Immunol.* 1: 328-377, 1958.
5. Eldering, G., Eveland, W.C., and Kendrick, P.L.: *Fluorescent antibody staining and agglutination reactions in Bordetella pertussis cultures*, *J. Bact.* 83, 745-749, 1962.
6. Evans, D.G., and Maitland, H.B.: *The preparation of the toxin of H. pertussis: its properties and relation to immunity*, *J. Path. Bact.* 45, 715-731, 1937.
7. Florey, H.W.: *Chemotaxis, phagocytosis and the formation of abscess*, *In General pathology*, 67-97, W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1958.
8. Flosdorf, E.W., and McGuinness, A.C.: *Studies with Haemophilus pertussis. VIII. The antigenic structure of Haemophilus pertussis and its clinical significance*. *Am. J. Dis. Child.* 64, 43-50, 1942.
9. Joo, I., and Z. pusztai.: *Interconnection between the protective antigen and the histamine-sensitizing factor of Bordetella pertussis*. *Nature* 188: 331-332, 1960.
10. Keogh, E.V., North, E.A., and Warburton, M. F.: *Haemagglutinins of the Haemophilus group*, *Nature, London* 160, 63, 1947.
11. Masry, F.L. G.: *Production, extraction and purification of the haemagglutin of Haemophilus pertussis*, *J. Gen. Microbiol.* 7, 201-210, 1952.
12. Munoz, J., E. Ribi, and C.L. Larson.: *Antigen of Bordetella pertussis*, *J. Immun.* 83, 496-501, 1959.
13. Munoz, J., and B:M: Hestekin.: *Antigens of*

- Bordetella pertussis*. The protective antigen, *proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 112:799-805, 1963.
14. Nagel, J.: Isolation from *Bordetella pertussis* of protective antigen free from toxic activity and histamine sensitizing factor. *Nature.* 214: 96-97, 1967.
 15. N.I.H. U.S.A.: Minimum requirement, pertussis vaccine, 31, 1952.
 16. Ribi, E., Milner, K.C. and Perrine, T.D.: Endo toxic and Antigenic Fraction from the Cell wall of *Salmonella Enteritidis*. *Methods for Separation and some Biologic Activities*, *J. Immun.* 82, 75-84, 1959.
 17. Robbins, K.C., and Pillemer, L.: The separation of a protective antigen from a toxin-producing strain of *Hemophilus pertussis*, *J. Immun.* 65, 393-406, 1950.
 18. Suter, E.: The Multiplication of Tubercle Bacilli within Normal Phagocyte in Tissue Culture. 1973. *J. Exp. Med.* 86:137-150, 1952.
 19. Wood, W.B., Smith, M.R., Perry, W.D., and Berry, J.W.: Studies on the cellular immunology of acute bacteremia, I Intra vascular leucocytic reaction and surface phagocytosis, *J. Exptl. Med.* 94, 521-524, 1951.
 20. Wu, W.G. and S. Marcus: Humoral Factors in Cellular Resistance I. The Effect of Heated and Unheated Homologous Sera on Phagocytosis and Cytopenesis by Normal and Immune Macrophage. *J. Immun.* 91-313-322, 1963.
-

▷ 최성배 논문 사진 부도 ◁

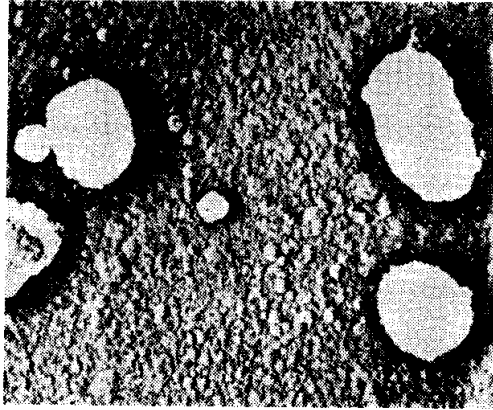


Fig 4. Electron micrograph of intact cells of *B. pertussis* ($\times 35,000$)

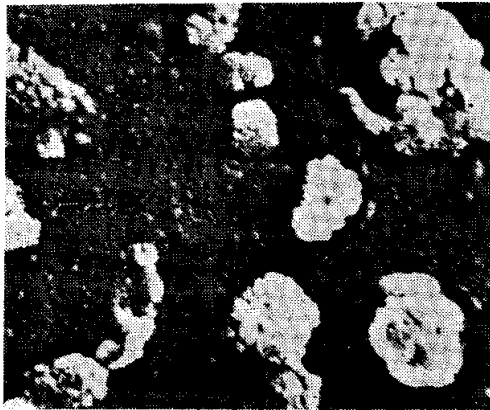


Fig 5. Electron micrograph of disrupted cells of *B. pertussis* ($\times 35,000$)