

Captafol mouse의 면역반응에 미치는 영향

박귀례 · 홍사욱 · 정규혁 · 안영근*

성균관대학교 약학대학 · 원광대학교 약학대학*

Effect of Captafol on the Immune Response in Mice

Kui Lea Park, Sa Uk Hong, Kyu Hyuch Chung, Young Keun Ahn*

(College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University)

*College of Pharmacy, Won Kwang University)

ABSTRACT

The effect of captafol on the immunity and also the influence of ethanol to this immune response treated with captafol were investigated in two experimental groups of mice, that one was treated with captafol and the other was treated with captafol and ethanol.

The weight of spleen and thymus were reduced by treatment of captafol and the HY titer. HA titer and Arthus reaction were also suppressed in both of two treated groups, it showed that the captafol exerts depressive effect on humoral immune response in mice. The DTH and RFC were also impaired in captafol treated mice, so that the captafol exerted effect on the cellular immune response.

According to this experiment immunity, the ethanol had influence on immune response by the treatment of captafol. Therefore the ethanol accelerated the suppression of humoral and cellular immune response.

서 론

근래 농약의 개발이 현저히 이루어져 많은 농약이 시판 사용되고 있으며 이들 화합물이 농업용뿐 아니라 공업용에 이르기 까지 광범위하게 사용되고 있다. 따라서 이들 약품에 노출될 기회가 늘

어감에 따라 인간의 건강에 미치는 해독작용이 점차 문제시되고 있다. 그간 농약중독시의 임상학적 연구와 아울러 일반독성이나 안전성에 관한 연구는 허다하다. 그러나 이보다 중요한 해독작용은 면역반응에 미치는 작용이라 하겠다.

그간 *in vivo* 실험에서 PCBs, lindane, hexachlorocyclohexane, TCDD등 수종의 유기염소제에

대한 면역기능 저해에 관하여 연구된 바 많다^{1~8)}. 최근에는 captan⁹⁾과 paraquat¹⁰⁾에 대해서도 면역 반응에 미치는 영향에 관하여 보고된 바 있다. 그러나 우리나라에서 사용되고 있는 captafol은 captan 및 folpet와 동일계의 fungicide로서 이의 면역반응에 미치는 영향에 관해서는 연구된 바가 없다.

따라서 금번 저자 등은 본 연구에 착수하여 captafol이 면역반응에 미치는 영향을 연구하는 동시에 ethanol과 병용투여하여 면역억제 작용을 비교하여 이에 보고하는 바이다.

실험 방법

1. 실험동물 및 약물투여방법

생후 5~6주 체중 16~20g의 ICR 계 male mouse를 경남축산(경기도 화성군 소재)에서 분양받아 시판사료로 1주간 사육하여 실험실 환경에 적응시킨 후에 10마리를 1군으로 하고 전체를 4군으로 구분하여 다시 2주간 사육하였다.

1) 대조군 : DMSO 5 ml/kg을 복강내 투여한 직후 saline 5 ml/kg을 경구투여하였다. 2일 간격으로 계속 5회 투여하였다.

2) Captafol 단독투여군 : Captafol 92% 분말을 DMSO에 용해하여 1.5 ml/kg을 2일 간격으로 계속 5회 복강내에 투여하였다.

3) Ethanol 단독투여군 : Ethanol 1 g/kg을 2일 간격으로 계속 5회 경구투여하였다.

4) Captafol 및 ethanol 병용투여군 : Captofol 1.5 mg/kg을 복강내 투여한 직후 ethanol 1 g/kg 을 경구투여하였다.

2. 체중 및 장기의 중량 측정

실험동물의 mouse의 체중은 각 군의 약물투여 개시일과 최종일에 측정하였다.

장기중량은 실험동물의 경동맥을 절단 채혈한 후 간, 비장 및 흉선을 각각 적출하여 외관을 관찰하고 중량을 측정하여 대체중(對體重) 백분율을 구하였다.

3. 항원의 조제 및 면역

1) 항원 : 본 실험에서는 면양적혈구¹¹⁾ (sheep red blood cell:이하 S-RBC)를 사용하였다. 즉 웅성 면양의 경동맥으로부터 heparin을 가한 주사기로 채혈한 후 동량의 Alserver 씨액(pH 6.1)을 가하여 4°C에서 보존하여 2주일 이내에 사용하였다. 보존중인 S-RBC를 사용할 때는 사용 직전 PBS로 3회 원심세척한 후 1% (2×10^8 S-RBC/ml) 농도로 PBS에 부유시켜 사용하였다.

2) 면역 : 河 등¹²⁾의 보고를 참고하여 상기 항원 부유액 0.1 ml (2×10^7 S-RBC)를 mouse의 미정맥에 주사하여 일차면역을 실시하고 일차면역을 실시 4일 후에 mouse 좌측후지족적피내에 2×10^9 S-RBC/ml 부유액 0.005 ml (1×10^8 S-RBC)를 주사하여 이차면역을 시켰다.

4. 적혈수 응집소가 및 용혈소가의 측정

1) 혈청의 분리 및 비동화(非動化) : mouse의 경동맥을 절단하여 혈액을 채취 응도시킨 후에 원심분리하여 혈청을 분리하고 56°C에서 30분간 비동화시킨 후 4°C에서 보존하여 사용하였다.

2) 적혈수 응집소가(hemagglutination titer) : 이하 HA titer)의 측정 : S-RBC의 응집소가를 microtitration tray (nunclon micro test tray)를 사용하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 각 실험동물로 부터 얻은 개개의 비동화 혈청을 각 well에 HBSS로 2배 계열로 희석한 후 HBSS에 부유한 0.5% S-RBC 0.025 ml를 잘 혼합한 다음 37°C에서 18시간 방치하여 적혈구의 응집유형을 관찰·판독하였으며 응집을 일으키는 혈청의 최고희석도를 그 혈청의 응집소가로 하였다.

3) 적혈구 용혈소가(hemolysin titer) : 이하 HY titer)의 측정¹³⁾ : S-RBC의 양 및 혈청의 희석은 응집소가 측정시와 동일하게 실시하였으며 S-RBC와 희석 혈청이 들어 있는 각 well에 guinea pig complement를 20배로 희석하여 0.025 ml씩 가한 다음 37°C에서 1시간 방치하여 용혈여부를 관찰하였다. 이때에 완전 용혈을 일으키는 혈청

의 최고회석도를 그 역가로 판독하였다.

5. 족적종창반응(足蹠腫脹反應) 측정

Arthus 반응(Antibody mediated hypersensitivity) 및 지연형 과민반응(Delayed type hypersensitivity: 이하 DTH)를 측정하기 위하여 河 등¹²⁾의 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉 일차면역 4일 후에 S-RBC 0.05 ml (1×10^8)을 mouse의 좌축후지족적에 피내주사하고 일정시간이 경과한 다음 종창의 두께를 0.01 mm 눈금 microcaliper로 측정하였으며 종창정도의 측정에 따른 오차를 피하기 위하여 2회 측정한 수치를 평균하였다. 판독의 기준은 Bach 등¹⁴⁾ 및 河 등¹²⁾의 판독기준에 따라 3~4시간 반응을 Arthus반응, 24시간 경과 후의 반응을 지연형과민반응으로 간고하였다. 족적종창지수는(Foot pad swelling index)는 다음과 같이 표시하였다.

Foot pad swelling index

$$= \frac{\text{종창시두께} - \text{정상두께}}{\text{정상두께}} \times 100$$

6. 비장세포 부유액의 조제

Garvy 등¹⁵⁾의 방법에 준하여 비장을 mouse로부터 무균적으로 적출하여 Minimum essential medium(이하 MEM)에 조심스럽게 분쇄한 후 nylon mesh(200 mesh)로 여과하여 한냉 MEM으로 4°C에서 3회 원심세척한 후 비장세포가 2×10^7 cell/ml가 되도록 PBS에 부유하였다. 매 실험마다 생존율 검사는 trypan blue dye exclusion

method으로 다음과 같이 하였다. 즉 시험관에 0.3 ml의 세포부유액을 넣은 후 0.1 ml의 trypan blue dye solution을 가하여 5분간 경과 후 혈구계산판에서 무색 생세포와 청색으로 염색된 사세포(死細胞)의 수를 센 후 그 을을 계산하였다.

7. 비장세포의 Rosette 형성세포의 검출

비장세포의 Rosette 형성세포(RFC)의 검사는 河 등¹²⁾이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 즉 비장세포 부유액 0.25 ml(5×10^6 cell)와 S-RBC 부유액 0.25 ml(5×10^7 cell)를 시험관에 넣고 혼합하여 200 g에서 12분간 원심분리하여 4°C에서 2시간 방치 후 조심스럽게 그 액을 재부유하여 1작을 혈구계산판에 떨어뜨리고 RFC를 검경 관찰하였다. 검경 시 비장세포에 S-RBC가 3개이상 부착한 세포를 RFC로 판정하여 다음 공식에 준하여 계산하였다.

RFC (%)

$$= \frac{\text{Number of Rosette forming cell}}{\text{Total cell counted} \times \text{Viability}} \times 100$$

실 험 결 과

1. 체중, 간장, 비장 및 혈선의 중량변화

1) 체중의 변화

각 군의 실험개시일 및 2일 간격으로 5회 약물을 투여 후 측정한 체중변화는 Table 1과 같다.

대조군에 비해 captatol 단독투여군은 증가폭이 둔화되었고 captafol과 ethanol 병용투여군은 대조군과 유사하게 증가하였고, ethanol 투여군

Table 1. Effects of captafol and ethanol on body weight in mice.

Group	Body	Initial wt. (gm)	Final wt. (gm)	wt. gained (%)
Control		13.89 ± 0.51	18.56 ± 1.42	22.86 ± 4.53
Captafol (1.5 mg/kg)		13.78 ± 0.29	15.63 ± 0.89	$10.43 \pm 3.42^*$
Ethanol (1 g/kg)		13.82 ± 0.25	21.78 ± 0.98	$35.58 \pm 2.89^*$
Captatol (1.5 mg/kg) + Ethanol (1 g/kg)		13.75 ± 0.13	19.60 ± 1.50	25.57 ± 7.05

Each value is the mean \pm S.E. of 8-10 mice.

Significant difference from control group. (*P<0.05)

은 대조군보다 증가하였다.

2) 간의 중량변화

간의 중량과 대체중중량비는 Table 2와 같다. Captafol 단독투여군, ethanol 단독투여군 및 captafol과 ethanol 병용투여군 모두 대조군에 비해 대체중중량비가 약간 감소하는 경향은 보이나 유의성은 없었다.

Table 2. Effects of captafol and ethanol on liver weight/body weight in mice.

Group	Weight (gm)	%
Control	0.95±0.10	5.26±0.48
Captafol (1.5 mg/kg)	0.87±0.10	5.12±0.39
Ethanol (1 g/kg)	0.97±0.04	4.53±0.18
Captatol (1.5 mg/kg) + Ethanol (1 g/kg)	1.00±0.07	4.75±0.20

Each value is the mean±S.E. of 8-10 mice.

3) 비장 및 흉선의 중량변화

비장 및 흉선의 중량과 대체중중량비는 Table 3과 같다. 비장과 흉선의 중량은 captafol 단독투여군에서 현저히 감소하였으며 captafol과 ethanol 병용투여군에 있어서 비장의 무게에 별 변화는 없었으나 흉선의 중량은 현저히 감소하였다.

2. 적혈구 응집소가 및 용혈소가

적혈구 응집소가 및 용혈소가를 Table 4와 같다.

Captafol 단독투여군의 응집소가는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하는 경향이 있었으며 ethanol 투여군은 감소하는 경향이 있었으나 유의성은 없었다. 또한 captafol과 ethanol 병용투여군은 captafol 단독투여군보다 더욱 감소하였다. 용혈소가도 각 군 모두 응집소가와 유사한 경향을 보였다.

Table 3. Effects of captafol and ethanol on immuno organ weight in mice. (unit; gm)

Group	Spleen	%	Thymus	%
Control	0.127±0.018	0.71±0.11	0.032±0.006	0.172±0.030
Captafol (1.5 mg/kg)	0.086±0.103**	0.66±0.14	0.013±0.001**	0.083±0.010**
Ethanol (1 g/kg)	0.134±0.016	0.63±0.10	0.04 ±0.003	0.186±0.012
Captatol (1.5 mg/kg) + Ethanol (1 g/kg)	0.132±0.022	0.62±0.08	0.018±0.004*	0.081±0.014**

Each value is the mean±S.E. of 8-10 mice.

Significant difference from control group. (*p<0.05, **p<0.01)

Table 4. Effects of captafol and ethanol on antibody production and Arthus reaction in mice.

Group	HA titer (log 2)	HY titer (log 2)	Arthus reaction
Control	2.92±0.27	2.67±0.17	11.82±1.24
Captafol (1.5 mg/kg)	2.20±0.14*	2.30±0.23	7.86±1.31*
Ethanol (1 g/kg)	2.50±0.23	2.53±0.17	8.27±1.75
Captatol (1.5 mg/kg) + Ethanol (1 g/kg)	2.17±0.13**	2.17±0.13*	7.48±0.11**

Mice were challenged with 10^8 S-RBC for 4 days sensitization.

On the 5th day HA and HY titer were assayed.

Foot pad swelling was measured after intradermal challenge of 10^8 S-RBC

Foot pad swelling index = $\frac{\text{Thickness of foot pad (after challenge} \pm \text{before challenge})}{\text{Thickness of foot pad before challenge}} \times 100$

At 3 hours reaction was Arthus reaction.

Each value is the mean±S.E. 8-10 mice.

Significant difference from control group. (*p<0.05, **p<0.01)

3. Arthus 반응

면양적 혈구로 감작한 mouse에 4일 후 다시 1×10^8 개 면양적 혈구를 좌측후지족적피내에 주사하여 3시간 후에 측정한 Arthus 반응은 Table 4와 같다. captafol 단독투여군에서는 대조군에 비해 Arthus 반응이 현저히 감소하였으며 captafol과 ethanol을 병용투여한 군은 captafol 단독투여군보다 더욱 감소하였다.

4. 자연형 과민반응

감작 mouse에 1×10^8 개 면양적 혈구를 좌측후지족적피내주사 24시간 후에 측정한 자연형 과민반응은 Table 5와 같다.

Captafol 단독투여군, ethanol 단독투여군 및 captafol과 ethanol 병용투여군 모두 대조군에 비해 자연형과 과민반응이 현저히 감소하였으며 captafol과 ethanol 병용투여군은 captafol 단독투여군에 비해 더욱 감소하였다.

5. Rosette 형성세포

면양적 혈구로 추가 색역(色瘦)한 mouse로부터 분리한 비장의 Rosette 형성세포는 Table 5와 같다. captafol 단독투여군은 대조군에 비해 현저히

Table 5. Effects of captafol and ethanol on DTH reaction and RFC in mice.

Group	DTH reaction	RFC (%)
Control	5.23 ± 1.46	4.35 ± 0.37
Captafol (1.5 mg/kg)	$4.22 \pm 0.98^{**}$	$2.12 \pm 0.62^{**}$
Ethanol (1 g/kg)	$4.08 \pm 1.60^{**}$	4.06 ± 0.30
Captafol (1.5 mg/kg) + Ethanol (1 g/kg)	$2.85 \pm 0.21^{**}$	$1.62 \pm 0.18^{**}$

Foot pad swelling was measured after intradermal challenge of 10^8 S-RBC.

Foot pad swelling =

Thickness of foot pad (after challenge - before challenge)
Thickness of foot pad before challenge

$\times 100$

At 24 hours reaction was DTH reaction.

RFC (Rosette forming cell)

$$= \frac{\text{No. of Rosette forming cell}}{\text{Total cell counted viability}} \times 100$$

감소하였으며 captafol과 ethanol 병용투여군은 captafol 단독투여군에 비해 더욱 감소하였다.

고 찰

면역반응에 관한 실험 중 간장, 비장 및 흉선 대 체중증량비는 captafol 투여군에서 현저히 감소하였으며 특히 비장과 흉선의 위축은 육안으로도 관찰되었다. Simonsen¹⁶⁾은 비장과 흉선의 증량변화는 면역기능의 변화를 임시하는 지표라고 하였다. ethanol 단독투여군은 장기증량에 별 변화를 보이지 않았으며 ethanol과 captafol 병용투여군은 captafol 단독투여군보다 더욱 감소하는 경향을 보였다.

체액성 면역반응을 관찰하기 위하여 S-RBC 항체형성 실험으로 적혈구 응집소가 및 용혈소가를 측정하였다. 이는 감작 면양적 혈구에 대한 항체와 항원과의 직접 또는 간접적인 반응으로 응집 또는 용혈을 일으켜 혈중 면역항체의 소장(消長)을 측정하는데 널리 이용되고 있다.

Vos와 De Roij¹⁷⁾는 PCB (Aroclor 1260)의 10 및 50 ppm을 guinea pig에서, Kutg 등⁵⁾은 Aroclor 1248과 1254의 in vitro에서 실험하였을 때 항체형성이 억제됨을 보고하였다. Lafarge 등⁹⁾은 captafol도 적혈구 응집소가를 감소시키며 항체형성을 억제하여 체액성 면역에 영향을 준다고 보고하고 있다. Rosival 등¹⁷⁾은 Lindane에 급성 중독된 rat에서도 체액성 면역반응이 억제됨을 보았다. 본 실험에서는 captafol 단독투여군은 적혈구 응집소가 및 용혈소가를 감소시켰으며 적혈구 응집소가에 영향이 더 큰 것으로 나타나 이를 보고와 동일한 결과를 얻었다. Captafol 단독투여군에 비해 captafol과 ethanol을 병용투여한 군에서는 더욱 현저하게 적혈구 응집소가 및 용혈소가가 감소하여 ethanol이 체액성 면역에 어느 정도 영향을 미침을 알 수 있었다.

Arthus 반응을 감작 속주에 주사된 항원이 항체-항원 복합체와 보체 등이 결합된 大分子들의 탐식(貪食)으로 유리되는 lysosomal enzyme에 의하여 발생되는 항체 매개형 과민현상으로

captafol 단독투여군은 대조군에 비해 현저히 감소하였다. Captafol과 ethanol을 병용투여한 때 Arthus 반응이 더욱 감소되어 ethanol이 foot pad swelling index (FPSI)에 영향을 미친 것으로 사료된다. 적혈구 응집소가, 용혈소가, Arthus 반응의 감소와 흥선 중량의 감소 등으로 captafol이 체액성 면역반응을 억제하여 ethanol에 의하여 더욱 억제하는 것으로 사료된다.

지연형 과민반응은 세포성 면역을 관찰하기 위한 실험으로 감작 임파구에 의한 lymphokine 등의 화학전달인자의 유리에 의하여 성립되어 특히 대식세포(大食細胞)에 깊이 관여하는 것으로 알려져 있다. Lafarge 등⁹⁾은 captafol과 ethanol이 체액성 면역 뿐만 아니라 세포성 면역도 저해함을 보고하고 있다.

Faith와 Moore³⁾는 TCDD도 지연형 과민반응을 저해하는 작용이 있어 cellular immune function에도 영향을 주고 있으나 helper cell에는 영향을 주지 않는다고 보고하고 있다. Captafol도 지연형 과민반응을 억제하고 비장세포의 Rosette 형성 역시 감소시켜 세포성 면역반응에 영향을 주며 이로 미루어 captafol은 T-lymphocyte에 영향을 주는 것으로 사료된다. Ethanol과 병용투여시에는 더욱 감소하여 ethanol이 세포성 면역반응에도 영향을 주는 것으로 사료된다.

결 론

Captafol의 면역반응에 대한 영향을 조사하는 동시에 captafol과 ethanol을 병용투여하여 captafol의 면역반응에 미치는 ethanol의 영향을 검토하였다.

면역반응에서 비장, 흥선의 무게와 적혈구 응집소가, 용혈소가, Arthus 반응, 지연형 과민반응, Rosette 형성세포가 모두 감소되어 captafol의 체액성 면역 뿐만 아니라 세포성 면역반응을 억제함을 알았다.

captafol과 ethanol 병용투여군에서 captafol 단독투여군보다 더욱 체액성 및 세포성 면역반응이 억제되어 ethanol이 양 면역반응에 영향을 주

고 있음을 알았다.

REFERENCES

- Vos, J.G. and De Roij, Th.: Immunosuppressive Activity of a Response in Guinea Pigs, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **21**, 549 (1972)
- Street, J.C. and Sharnma, R.P.: Alteration of induced cellular and humoral immune responses by pesticides and chemicals of environmental concern: Quantitative Studies of immunosuppression by DDT, Aroclor 1254, carbaryl, carbofuran, and methylparation, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **32**, 587 (1975)
- Faith, R.E. and Moore, J.A.: Impairment of Thymus-dependent immune functions by exposure of the developing immune systems, *Environ. Health*, **3**, 451 (1977)
- Fraker, P.J.: The Antibody mediated and delayed type hypersensitivity response of mice exposed to polybrominated biphenyls, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **53**, 1 (1980)
- Kutz, S.A., Hindsill, R.D. and Weltman, D.J.: Evaluation of chemicals for immunomodulatory effects using an *in vitro* antibody producing assay, *Environ. Res.*, **22**, 368 (1980)
- Kensler, T.W. and Mueller, G.C.: Effects of hexachlorocyclohexane isomers on the mitogenic response of bovine lymphocytes, *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 667 (1978)
- Roux, F., Treich, I., Brum, C., Desoize, B. and Fournier, E.: Effect of lindane on human lymphocyte responses to phytohaemagglutinin, *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 2419 (1979)
- Luster, M.I., Clark, G., Lawson, L.D. and Faith, R.E.: Effects of brief *in vitro* exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on mouse lymphocytes, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **2**, 965 (1979)
- Lafarge-Frayssinet C. and Declointre F.: Modualtory effect of the pesticide captan on the immune response in rats and mice. *J. Immunol.*

- pharmacology* 4, 43-52, (1982)
10. 洪思澳, 安榮根, 金鍊判: Paraguat 毒性의 Mouse의 免疫反應에 미치는 影響, *Kor. J. Environ. toxicol.*, Vol. 2, Nos. 3-4, (1987)
 11. Yoshikai Y., Miake S., Matsuma T. and Takey K.: Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed foot pad reaction to S-RBC in mice. *Immunol.* 38: 57 (1981)
 12. Ha, T.Y. and Rhee H.K.: Effect of inosiplex on cellular and humoral immunity, *J. Kor. Soc. Micr.*, 16,57 (1981)
 13. Stavitsky A.B.: Micro methods for the study of proteins and antibodies. *J. Immunol.* 72: 360 (1954)
 14. Bach J.F. and Darderne M.: Antigen recognition by T-lymphocyte. *Cell Immunol.* 3, 1 (1972)
 15. Garvy J.S., Cremer N.E., Sussdorf D.H.: Method in immunology. third ed. 414 (1980)
 16. Simmonsen M.: Graft versus host reaction: Their natural history and applicability as tools of research progr. *Allergy* 6: 349 (1961)
 17. Rosival, L. and Szokolay, A.: Abstr. Book, 3rd, Int. Congr. Pestic. Chem. Helsinki, 489 (1974)