

## SD Rat에 있어서 출생 전·후에 걸친 Di(*n*-butyl) Phthalate 노출에 의한 발생면역독성

엄준호 · 정승태 · 이종권 · 박재현 · 권태우 · 김지영 · 오혜영 · 김형수\*  
식품의약품안전청, 국립독성연구소 독성부

## Developmental Immunotoxicity in SD Rat Pups Exposed by Di(*n*-butyl) Phthalate through Pre and Postnatal

Juno Ho Eom, Seung-Tae Chung, Jong Kwon Lee, Jae Hyun Park, Tae-Woo Kwon,  
Ji Young Kim, Hae Young Oh and Hyung Soo Kim\*

Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and  
Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Ku, Seoul 122-704, Korea

(Received November 1, 2002)

(Accepted November 21, 2002)

**ABSTRACT :** Phthalate esters have possible effects on the endocrine system. Di-*n*-butyl phthalate (DBP) is one of the most commonly used phthalic acid esters (PAEs). It is extensively used as a plasticizer in elastomers, as a solvent for printing inks and resins, and as a textile lubricating agent. It is also present in the formulations of various cosmetic products. DBP has been identified as a reproductive toxicant in several animal species and also known as an endocrine disruptor. The objective of this study was to investigate the effect of DBP on developmental immune function using rat pups as experimental animals. Timed-bred pregnant SD rats were orally dosed with 0, 250, 500, or 750 mg DBP/kg body weight once a day from gestational day (GD) 5 to 18 and postpartum day (PD) 3 to 18. On PD22, the dams and their pups were euthanized and examined for alteration in parameters associated to immune function. The results showed no significant changes in body weight, thymus weight, thymus and spleen cellularities, the polyclonal activation responses of splenocyte with ConA and LPS, and also the distribution of arterial blood cells and thymocyte subsets in both rat dams and pups. However DBP exposure on rat dams resulted in increases of liver weights of dams and their pups except 750 mg DBP/kg, and body and spleen weights in pups except 750 mg DBP/kg. On the other hands, distribution rates of CD8<sup>+</sup> T cells at 500 mg DBP/kg and B cells at 750 mg DBP/kg among splenocyte subsets were significantly increased in rat pups, unlike dams. Reasons of these distribution alterations of CD8<sup>+</sup> T cells and B cells in rat pups are under study.

**Key Words :** Di(*n*-butyl) phthalate (DBP), Gestational day (GD), Postpartum day, Developmental immunotoxicity

### I. 서 론

물질문명의 발전은 수많은 새로운 화학물질의 탄생을 가져왔으며, 1950년대 이후 화학물질의 시장 유통량이 비약적으로 증가시켰고, 이로 말미암아 인류의 생활은 과거에 비해 크게 편리하고 윤택해졌으나, 화학물질에 의한 중독사건이나 환경오염이 뒤따라 일어나기 시작하였다. 자연 생태계로 방출된 일부 화학물질들이 동물의 내분비계 기능의 이상을 유발하여 기형 발생률을 높이거나 생식능의 감소를 야기하는 것으로 보고되고 있다. 인공적인 화학물

질이 내분비계 기능의 이상을 유발하는 기전은 아직 연구해야 할 부분이 많이 남아있긴 하지만 내분비계 활성물질의 유사체로 작용하여 내분비계 기능을 증강 또는 저해시킴으로써 비정상적인 생리 반응을 일으키는 것으로 보고되고 있다(Colborn 등, 1993).

이러한 내분비계장애물질의 영향은 먹이사슬을 통하여 직·간접적으로 전체 생태계에 미칠 수 있고, 생태계의 최고에 있는 인간에 축적되는 생물농축에 따른 독성을 발현하기 마련이다. 이런 장애물질중 플라스틱 가소제로 사용되는 프탈레이트류는 우리 생활환경에 필수적인 폴리비닐 클로라이드(polyvinyl chloride, PVC), 니트로셀룰로오스(nitrocellulose) 또는 폴리비닐아세테이트(polyvinyl acetate)

\*To whom correspondence should be addressed

를 포함하는 제품에 유연성을 부여하기 위하여 사용되는 물질로 어린이 장난감, 일회용 음식포장용기, 의료용구, 화장품 용기 등 각종 생활용품 등의 원료로서 사용되고 있다. Di(*n*-butyl) phthalate(DBP)는 프탈레이트류의 주요 물질 중 하나이며, 접착제, 종이코팅, 프린팅잉크, 분무제, 손톱광택제 및 헤어스프레이 등의 성분이며 화장품에서 윤활제, 피부연화제, 용제 등으로도 사용되고 있다. DBP는 유럽에서 1994년에 약 49,000톤이 생산되었고(Long 등, 1997), 1987년에 미국에서 11,400톤이 생산되었으며(ATSDR, 1990), 현재도 많은 양이 사용되고 있어 일상 생활 환경에서 인체는 DBP에 직·간접적으로 노출될 가능성이 높다. 이러한 DBP는 세포를 사용한 *in vitro* 시험에서 estrogen receptor에 결합하는 것이 확인되면서 내분비계장애물질로 추정되어 많은 관심이 집중되어 왔다(Jobling 등, 1995; Harris 등 1997). 일반적으로 일어나는 대부분의 DBP 노출은 직업적인 면을 제외하면, DBP로 오염된 식품을 통해 이루어진다. DBP는 식품포장재로 사용되는 플라스틱 랩을 통해 식품에 오염되거나 일반적인 환경오염에 의해 식품으로 들어갈 수 있다. 공기, 음용수 및 식품을 통해서 사람에게 섭취될 수 있는 일일 총 추정량은 7.4 µg/kg/day으로 보고되었다(NTP, 1991). DBP는 섭취 후 주로 mono(*n*-butyl) phthalate(MBP)로 분해된 후 위장관계를 통하여 빠르게 흡수되며, 랫드의 경우, 혈액에서의 MBP 반감기는 24시간 이내로 알려져 있다(NTP, 1991). 한편 DBP 등 프탈레이트류의 독성은 성숙한 랫드보다 미성숙한 신생자 랫드에 더 민감한 것으로 보고되었다(Dostal 등, 1988). DBP와 같은 내분비계장애물질이 체내에 흡수되면 내분비계 기능의 교란을 통한 간접적인 방법으로 또는 직접적으로 여러 조직과 세포에 영향을 주게 되는데 면역조직과 세포도 그 대상의 예외는 아니다. 특히 아직 발달 과정에 있는 면역계가 보다 민감한 반응을 보일 것으로 추정된다.

화학물질에 의한 독성 평가시에는 간장과 신장이 주요 대상 장기이지만, 면역기능 이상을 조사할 때 주요 대상이 되는 장기는 흉선과 비장이다. 흉선은 골수에서 생산된 전구 림프세포들이 성숙한 CD4<sup>+</sup> T 세포와 CD8<sup>+</sup> T 세포로 분화가 이루어지는 1차 림프기관중 하나이며(Boyd 등, 1991), 비장은 각각 흉선과 골수에서 성숙한 T 세포와 B 세포가 APCs(antigen presenting cells)에 의해 전달된 항원의 자극을 받아 특이적 면역반응을 일으키는 2차 림프기관이다. 따라서 흉선이나 비장의 무게 등과 같은 거시적 변화는 물론 이들 기관을 구성하고 있는 세포들의 구성비율과 표현형 변화는 면역기능 이상을 측정하는 중요한 지표로서 이용되고 있으며(Gehrs 등, 1997), 이러한 지표들을 활용하여 사람과 설치류에서 chemotherapeutics, corticosteroids, polycyclic hydrocarbones와 polyhalogenated

hydrocarbones 등에 대해 면역독성 평가가 이루어졌으며 그 결과 이들 물질의 노출 영향력은 성인 때보다 이 시기의 노출이 더 강하고 영구적인 것으로 보고있다(Holladay, 1999).

근래에는 의약품 등이 전임상 시험에서 독성이 심도 있게 검토되어 활용되므로 약물에 의한 독성사전 유발보다는 생활 환경에서 서서히 다가오는 독성이 더 크므로 모체와 태아에서의 영향평가가 상대적인 중요성이 증가되고 있다. 따라서 플라스틱 가소제로 사용되어 각종 생활용품이 포함되기 때문에 일상생활에서 인체가 직·간접적으로 노출될 가능성이 매우 높고, 내분비계장애물질로 추정되고 있는 프탈레이트류의 화학물질이 긴 임신기간과 수유기간으로 인하여 모체에 흡수되어 태자 나아가 신생자의 발생 및 생리기능에 이상을 초래할 가능성이 매우 높을 것으로 추정되고 있다. 이에 본 연구에서는 랫드를 실험동물로 사용하여 어미 랫드가 장기간 Dibutyl phthalate(DBP, 프탈레이트류의 일종)에 노출되었을 경우, 어미 및 산자(새끼) 랫드의 면역계 기능 및 발달에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험재료

Di(*n*-butyl) phthalate(DBP), concanavalin A(Con A), lipopolisaccharide(LPS), phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4), sodium azide는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)에서 구입하였고, RPMI-1640은 Gibco(NY, USA), fatal bovine serum(FBS)은 Hyclone Lab.(NC, USA), MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)은 Promega(Madison, USA)에서 각각 구입하였다. Phycoerythrin(PE)-conjugated mouse anti-rat CD3, Cy-Chrome-conjugated mouse anti-rat CD4, fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated mouse anti-rat CD8b는 PharMingen(San Diego, USA)에서 구입하였다. 그외의 시약은 Sigma Chem. Co.(St. Louis, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

### 2. 실험동물 및 사육조건

실험동물은 국립독성연구소 실험동물관리실에서 생산된 8주령의 Sprague-Dawley(SD)계의 랫드를 분양 받아 1주 동안 새로운 환경에 적응시킨 후 사용하였고, 사육조건은 온도 23±1°C, 상대습도 55±5%, 명암교대 12시간을 유지하도록 하였다. 암컷 랫드를 수컷과 2:1로 교배시켜 다음날 아침 질액도말법으로 정자가 확인된 암컷을 임신 0

일로 정하였다.

### 3. 시험물질 투여

Di(*n*-butyl) phthalate(DBP, Sigma Chemical Co.)를 corn oil(Sigma Chemical Co.)에 적정 농도로 희석하여 사용하였다. 수태된 암컷 랫드를 대조군(corn oil 투여)과 DBP 투여용량에 따라 250, 500, 750 mg/kg body weight 투여군으로 나누었고, DBP 및 corn oil은 수태 5일째부터 18일 및 분만후 3일째부터 18일까지 총 30일간 1회 경구투여하였다. 각 군당 8~10마리의 랫드를 사용하였으며, 분만 후 출생자수 차이로 인한 DBP 투여 효과의 오차를 최소화하기 위해 한배새끼의 수를 12마리로 조정하였다.

### 4. 체중 및 면역 관련 장기 무게 측정

발생면역독성시험의 평가요소 측정시 분만후 22일(post-partum day 22, PD22)이 지난 어미 랫드 및 새끼 랫드를 사용하였다. PD22의 어미 및 새끼 랫드의 각각의 체중, 그리고 비장, 흉선 및 간장의 무게를 측정하였다.

### 5. 흉선 및 비장세포분리

PD22인 어미 및 새끼 랫드로부터 흉선 및 비장을 적출한 후 stainless steel mesh(#100)을 이용하여 비장 및 흉선 세포를 분리하였다. RBC lysing buffer(0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 1.0 mM KHCO<sub>3</sub>, 및 0.1 mM EDTA·2Na; pH 7.2)에 흉선 및 비장세포를 부유시킨 다음, 5분간 아이스에 방치하여 적혈구를 제거한 후 FBS가 들어있지 않은 RPMI-1640(100 µg/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin 및 2 ml L-glutamine 함유) 배지로 3회 세척하였다. 최종적으로 FBS 가 포함되어 있는 RPMI-1640 배지에 비장세포를 부유시킨 후 세포수를 측정하여 사용하였다.

### 6. 세포염색 및 유세포분석(flow cytometry analysis)

PD22인 어미 및 새끼 랫드로부터 분리된 흉선세포 부유액을 각 투여군별로 2개의 1.5 ml 원심분리용 튜브에 각각  $1 \times 10^6$  cells씩 넣은 후 원심분리하여 상등액은 버리고 50 µl PBS/2%FBS/0.1% sodium azide(PBSAZ) 용액에 부유시켰다. CD3/CD4/CD8의 표현형을 조사하기 위해 흉선세포 부유액을 phycoerythrin(PE)-conjugated mouse anti-rat CD3, Cy-Chrome-conjugated mouse anti-rat CD4, fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated mouse anti-rat

CD8b으로 형광 염색하였다. 형광항체를 넣고 30분간 4°C에 방치한 후 염색된 세포를 PBSAz으로 두 번 세척하였다. 세척된 세포는 0.5% paraformaldehyde를 넣어 고정하였다. 형광 염색된 세포는 488nm 파장의 argon-ion laser를 광원으로 하는 EPIC XL flow cytometer(Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 525 nm 투과간섭필터를 사용하여 FITC 방출파장을 측정하였고, 575 nm 투과 간섭필터를 사용하여 PE 방출파장을 측정하였으며, 680 nm 투과간섭필터를 사용하여 Cy-chrome 방출파장을 측정하였다. 형광물질간의 방출파장이 중복되는 부분의 색상보정을 위하여 단일 형광물질로 염색된 세포를 대조로 사용하였다. 전방산란(forward scatter)과 측방산란(side scatter)을 사용하여 정해진 림프구 집단에서 죽은 세포나 불순물을 제외하고 측정하였다. 적당한 형광물질 isotype 항체를 사용하여 음성 및 양성대조군을 설정하였으며, CD3/CD4/CD8 의 분포도를 분석하기 위해 CD3 집단을 먼저 설정한 다음 이차적으로 CD4/CD8을 분석하였다.

### 7. 비장세포의 증식능 시험

PD22인 어미 및 새끼 랫드의 비장 임파구의 증식능을 측정하기 위해서 96 well flat-bottomed microtiter plate의 각 well에 비장세포( $2 \times 10^6$  cells/ml) 50 µl와 T cell mitogen인 Con A(최종농도 1 µg/ml) 또는 B cell mitogen인 LPS(최종농도 20 µg/ml)를 각각 50 µl 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 84시간 배양하였다. 배양 후 MTS/PMS 20 µl를 첨가하여 다시 4시간 배양한 후 ELISA (Molecular Devices Co., USA) reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 8. 혈액세포의 분포 조사

PD22인 어미 및 새끼 랫드의 심장에서 채혈한 후 혈액분석기(Technicon H·1 system, Technicon Instruments Co., USA)를 사용하여 혈액중 Lymphocyte, Monocyte, Neutrophil, Eosinophil, Basophil 별로 각 혈구종의 분포퍼센트를 측정하였다.

### 9. 통계학적 분석

본 실험에서 얻은 측정치는 통계프로그램인 SigmaStat의 one-way analysis of variance(ANOVA)를 적용하여 통계처리 하였고, 각 군간의 비교는 Dunnett's and Duncan's test를 사용하여 유의수준  $p < 0.05$ 로 대조군과 용량군 사이에 통계학적 유의성을 검정하였다.

### III. 결 과

임신중인 SD rat에 di(n-butyl) phthalate(DBP, 250, 500, 750 mg/kg)를 임신 5일부터 18일 및 분만 후 3일부터 18일까지 매일 1회씩 경구투여한 후 분만 후 22일째에 어미 및 새끼 랫드의 체중 변화 및 비장, 흉선, 간장의 중량 변화를 조사하였다. 또한 비장 및 흉선 cellularity의 변화를 측정하였으며 어미 및 새끼 랫드의 흉선 및 비장아세포군의 분포에 대한 영향도 유세포분석으로 측정하였다. 그리고 B 임파구 및 T 임파구의 mitogen인 LPS 와 Con A에 의한 어미 및 새끼 랫드 비장세포의 증식능시험을 수행하여 B 세포 증식능 및 T 세포 증식능에 미치는 DBP 영향도 평가하였다.

#### 1. 임신기 및 수유기에 걸친 DBP 투여가 어미 랫드의 체중, 면역관련 장기 중량, 그리고 비장 및 흉선 세포수에 미치는 영향

임신중인 SD 랫드에 DBP를 250, 500, 750 mg/kg 용량으로 임신 5일부터 18일 및 분만 후 3일부터 18일까지 매일 1회씩 총 30일간 투여한 결과, 모든 DBP 투여군에서 체중, 면역관련장기중량, 그리고 비장 및 흉선세포수에 있

어 대조군에 비해 어떠한 유의한 변화도 관찰할 수 없었다. 다만 간장의 상대적 무게가 모든 투여군에서 대조군에 비해 의미 있는 증가를 보였는데 이러한 결과는 DBP에 대한 장기간의 노출이 간장 기능에 이상을 초래할 가능성 을 시사하는 것으로 사료된다(Table 1).

#### 2. 임신기 및 수유기에 걸친 어미 랫드에 대한 DBP 투여가 새끼 랫드의 체중, 면역관련 장기 중량, 그리고 비장 및 흉선 세포수에 미치는 영향

임신기 및 수유기에 걸친 DBP에 노출된 어미로부터 태어난 새끼 랫드의 면역계 발달 및 기능에 대한 DBP의 영향을 평가하기 위해 임신중인 SD 랫드에 DBP를 250, 500, 750 mg/kg 용량으로 임신 5일부터 18일 및 분만 후 3일부터 18일까지 매일 1회씩 총 30일간 경구투여 하였다. 또한 새끼에게 영향을 줄 DBP(또는 DBP metabolites)는 모유를 통해 전달되는데 한 마리의 새끼가 섭취하는 모유의 양은 한배새끼의 수에 따라 달라짐으로 한배새끼의 수 차이로 인한 오차를 줄이기 위해 분만직 후 모든 어미 랫드의 새끼 수는 12마리로 조정되었다. PD22인 새끼 랫드의 체중, 흉선 무게 그리고, 비장 및 흉선세포수에서는 대조군에 대해 통계학적으로 의미 있는 어떠한 변화도 관찰

Table 1. Effects of DBP exposure on rats dosed orally on gestational days 5~18 and days 3~18 postpartum

	Dose of DBP (mg/kg/day)		
	Control	250	500
Body weight (g)	317.8±7.7	327.2±8.1	318.9±7.4
Relative organ weights (mg/g body wt.)			
Spleen	1.99±0.11	2.13±0.10	2.18±0.11
Thymus	0.71±0.07	0.77±0.08	0.81±0.07
Liver	63.72±1.49	69.37*±1.42	68.68*±1.41
Splenic cellularity ( $\times 10^6$ )	348.0±21.7	314.0±40.5	365.0±25.9
Thymic cellularity ( $\times 10^6$ )	307.0±69.9	269.3±45.4	295.0±24.1
			241.6±48.3

The control rats were treated with corn oil alone (vehicle control). There were 8~10 animals in each exposure group. Results expressed as means±S.E.

\* $p < 0.05$  versus vehicle control.

Table 2. Effects of DBP on 3-week-old rats pups<sup>a</sup> whose dams were dosed orally on gestational days 5~18 and days 3~18 postpartum

	Dose of DBP (mg/kg/day)		
	Control	250	500
Body weight (g)	50.86±0.47	55.59*±0.36	55.65*±0.56
Relative organ weights (mg/g body wt.)			
Spleen	4.43±0.06	4.94*±0.08	4.83*±0.07
Thymus	4.95±0.06	4.90±0.07	5.00±0.07
Liver	49.31±0.43	52.06*±0.65	54.03*±0.56
Splenic cellularity ( $\times 10^8$ )	179.2±14.0	212.7±89.8	197.8±18.2
Thymic cellularity ( $\times 10^8$ )	868.0±40.4	891.7±79.2	857.8±85.9
			776.7±131.0

<sup>a</sup>The number(n) of tested rat dams was 8~10 per exposure group, and their litters were adjusted to contain 12 pups. The control rats were treated with corn oil alone (vehicle control). Results expressed as means±S.E.

\* $p < 0.05$  versus vehicle control.

할 수 없었다. 그러나 간장 및 비장의 상대적 무게는 250 및 500 mg/kg 투여군에서 유의한 증가 경향을 나타내었다. 한편 비장의 상대적 무게는 증가하였지만 비장세포수는 변화가 없었기 때문에 비장 무게 증가의 원인은 비장 조직의 어떤 생리적 변화의 결과로 추정된다(Table 2).

### 3. DBP 투여가 어미 및 새끼 랫드 비장세포의 증식능에 미치는 영향

면역관련세포들이 자극을 받으면 일으키는 주요 반응중 하나는 증식이다. 따라서 면역관련세포들의 증식능에 이상이 초래된다면 이는 면역기능의 이상과 연관될 가능성이 매우 높다. DBP 투여 후 어미 및 새끼 랫드의 비장세포를 측하여 각각 T 세포 및 B 세포 mitogen인 Con A와 LPS 자극에 대한 증식반응의 이상을 조사한 결과, DBP 투여군에서는 대조군과 비교하여 비장세포의 증식반응에 있어 통계학적으로 어떠한 유의적 차이를 발견할 수 없었다(Table 3).

### 4. 임신기 및 수유기에 걸친 DBP 투여가 어미 및 새끼 랫드의 혈액세포들의 상대적 분포비에 미치는 영향

혈액은 면역관련세포들을 체내의 모든 조직으로 운반하는 운송 수단중 하나이다. 따라서 면역기능의 이상은 혈액 내 면역관련세포들의 비정상적 분포도로 반영될 가능성이 있다. DBP 투여후 어미 및 새끼 랫드의 심장으로부터 혈액을 취하여 lymphocyte는 물론 neutrophil, eosinophil, basophil 및 monocyte등 면역관련 세포들의 수를 세어 그 상대적 분포비를 구하고, 대조군과 비교한 결과, 어미 및 새끼 랫드 모두에서 대부분의 면역관련 세포들의 상대적 분포비에 의미있는 차이가 관찰되지 않았다. 그러나 새끼

**Table 3.** Effects of DBP on splenocyte proliferative responses in SD rat dams and pups

		Dose of DBP (mg/kg/day)			
		Control	250	500	750
Dam	ConA	1.15±0.75	1.06±0.12	1.00±0.18	0.84±0.57
	LPS	0.22±0.08	0.25±0.05	0.26±0.03	0.22±0.04
Pup	ConA	0.49±0.40	0.46±0.21	0.41±0.42	0.50±0.42
	LPS	0.52±0.26	0.52±0.16	0.52±0.28	0.51±0.20

Pregnant SD rats were dosed orally with DBP once a day on gestational days 5~18 and days 3~18 postpartum. On postpartum day 22, spleens were removed from rat dams and 12 pups' spleens of the same dose group were pooled. The proliferative responses of the splenocytes were tested with concanavalin A (Con A) and lipopolysaccharide (LPS). For mitogen responsiveness assay,  $1.0 \times 10^5$  cells of splenocytes in RPMI supplemented with 10% FBS were added to the wells of 96-well plates and incubated with Con A (1 µg/ml) or LPS (20 µg/ml) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 84 hrs. Then 20 µl/well of combined MTS/PMS solution was added. After 4 hrs at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, the absorbance at 490 nm was recorded using an ELISA reader. Results are expressed as the OD<sub>490</sub> means ( $\pm$ S.E) value.

**Table 4.** Effects of DBP on hematological value of arterial blood cells in rat dams and pups

	Dose of DBP (mg/kg/day)			
	0	250	500	750
<b>Dams</b>				
% Neutrophil	7.2±2.4	12.6±3.1	11.0±4.6	11.8±2.6
% Lymphocyte	77.0±1.8	74.7±2.5	74.7±2.9	75.9±2.0
% Monocyte	9.0±1.0	6.6±1.2	8.5±1.9	6.0±0.7
% Eosinophil	0.2±0.1	0.5±0.1	0.7±0.3	0.6±0.1
% Basophil	1.3±0.2	1.0±0.19	1.0±0.13	1.2±0.4
<b>Pups</b>				
% Neutrophil	3.6±0.3	5.6*±0.8	3.6±0.4	3.1±0.6
% Lymphocyte	77.7±0.7	73.8±2.3	78.1±1.0	78.1±1.0
% Monocyte	11.2±0.5	11.7±1.2	11.0±0.6	11.8±1.2
% Eosinophil	0.3±0.1	0.2±0.0	0.4±0.1	0.2±0.0
% Basophil	1.1±0.1	1.0±0.2	1.7±0.3	2.0±0.6

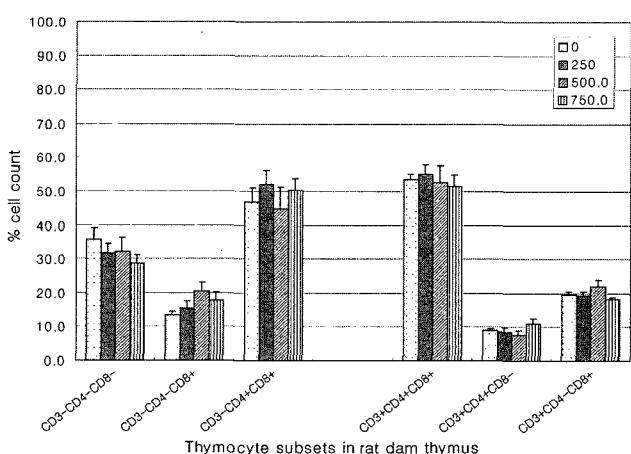
Pregnant rats were dosed orally with DBP on gestational days 5~18 and days 3~18 postpartum. On postpartum day 22, arterial blood were taken from hearts of rat dams and pups. Blood cells of each type were counted using blood analyzer. Results expressed as the relative % distribution, means±S.E.

\* $p < 0.05$  versus vehicle control.

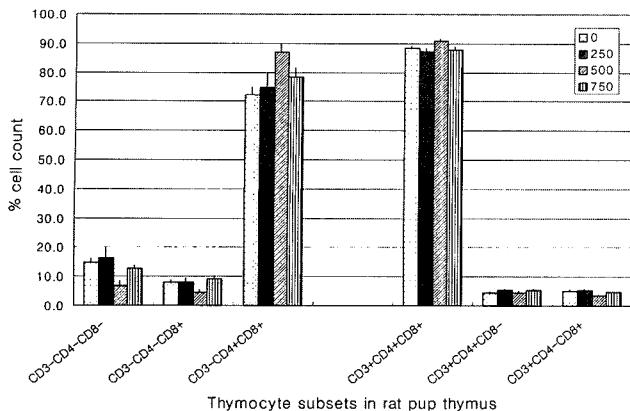
랫드 neutrophil의 상대적 분포비는 250 mg/kg DBP 투여군에서 유의하게 증가되는 것으로 나타났다(Table 4).

### 5. 임신기 및 수유기에 걸친 DBP 투여가 어미 및 새끼 랫드에서 흉선아세포군의 상대적 분포비에 미치는 영향

DBP 투여가 어미 및 새끼 랫드 흉선에서 T 세포의 분화 발생에 미치는 영향을 flow cytometry를 사용하여 분석



**Fig. 1.** Effects of DBP on the constituent of thymocyte subsets in rat dams. Pregnant rats were dosed orally with DBP on gestational days 5~18 and days 3~18 postpartum. On postpartum day 22, thymuses were removed. Thymocytes were stained with anti-CD3, anti-CD4 and anti-CD8 Abs, and then the relative components of thymocyte subsets were analyzed using flow cytometer. The number (N) of rat dams tested was 8~10 per dose group and their litters were adjusted to contain 12 pups. The control rats were dosed with corn oil (vehicle). Results expressed as distribution ratio (%), means S.E.

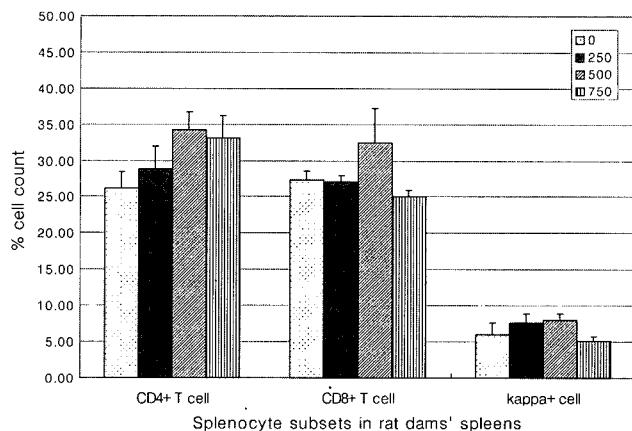


**Fig. 2.** Effects of DBP on the development of thymocyte subsets in rat pups whose dams were dosed orally with DBP on gestational days 5~18 and days 3~18 postpartum. On postpartum day 22, thymuses were removed and 12 pups' thymocytes from the same dam were pooled. The pooled thymocytes were stained with anti-CD3, anti-CD4 and anti-CD8 Abs, and then the relative components of thymocyte subsets were analyzed using flow cytometer. The number (N) of rat dams tested was 8~10 per dose group and their litters were adjusted to contain 12 pups. The control rats were dosed with corn oil (vehicle). Results expressed as distribution ratio (%), means±S.E.

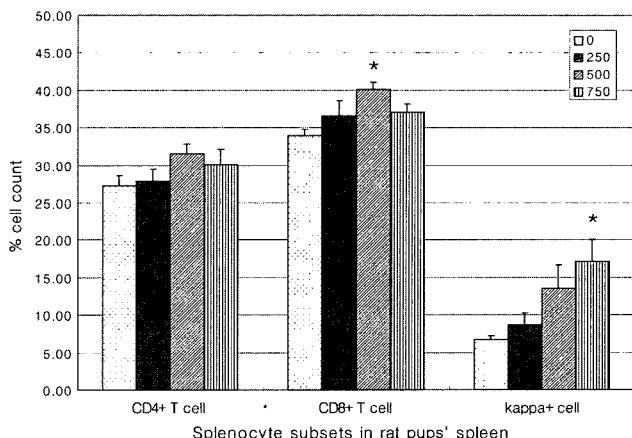
하였다. Flow cytometry 분석할 때 흥선 T 세포는 우선 CD3 표면항원에 대하여 양성군과 음성군(CD3<sup>+</sup> 및 D3<sup>-</sup>)으로 구분되고, 각 군은 CD4와 CD8 표면항원 발현 유무에 대하여 세부적으로 분석(CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>)되었다. 따라서 CD3<sup>+</sup> 흥선아세포군과 CD3<sup>-</sup> 흥선아세포군에 대한 분포를 각각 백분율로 하였다. 흥선아세포군의 분포도에 대한 DBP의 영향을 측정한 결과 대조군에 비해 DBP 투여군에서 상대적 분포비의 유의적인 변화가 관찰되지 않았다(Figs. 1, 2).

#### 6. 임신기 및 수유기에 걸친 DBP 투여가 어미 및 새끼 랫드의 비장 아세포군의 상대적 분포비에 미치는 영향

비장은 다양한 면역관련세포들간의 상호작용을 통해 주요 면역반응이 일어나는 장소이며 이러한 반응에서 핵심적인 역할을 하는 것은 T 세포와 B 세포이다. 흥선의 경우와 마찬가지로 flow cytometry를 활용하여 CD3, CD4, 그리고 CD8 표면항원 발현 유무 조사자를 통해 다양한 비장 T 세포아군들에 대한 상대적 분포비를 조사하였으며 추가로 항 kappa chain 항체를 사용하여 B 세포군의 분포비 변화도 조사하였다. 조사 결과 어미의 비장에서는 조사된 어떠한 아세포군에서도 대조군과 비교하여 분포비에 차이를 보이지 않았다(Fig. 3). 그러나 새끼 랫드의 비장에서는 CD8<sup>+</sup> T 세포(500 mg/kg 투여군에서)와 B 세포(750 mg/kg 투여군에서)의 상대적 분포비가 일부 DBP 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 4).



**Fig. 3.** Effects of DBP on the constituent of splenocyte subsets in rat dams. Pregnant rats were dosed orally with DBP on gestational days 5~18 and days 3~18 postpartum. On postpartum day 22, spleens were removed. Splenocytes were stained with anti-CD3, anti-CD4 and anti-CD8 Abs, and then the relative components of splenocyte subsets were analyzed using flow cytometer. The number (N) of rat dams tested was 8~10 per dose group and their litters were adjusted to contain 12 pups. The control rats were dosed with corn oil (vehicle). Results expressed as distribution ratio (%), means±S.E.



**Fig. 4.** Effects of DBP on the development of splenocyte subsets in rat pups whose dams were dosed orally with DBP on gestational days 5~18 and days 3~18 postpartum. On postpartum day 22, spleens were removed and 12 pups' splenocytes from the same dam were pooled. The pooled splenocytes were stained with anti-CD3, anti-CD4 and anti-CD8 Abs, and then the relative components of splenocyte subsets were analyzed using flow cytometer. The number (N) of rat dams tested was 8~10 per dose group and their litters were adjusted to contain 12 pups. The control rats were dosed with corn oil (vehicle). Results expressed as distribution ratio (%), means±S.E.

\*p < 0.05 versus vehicle control.

#### IV. 고 칠

내분비계장애물질이 내분비계 기능의 교란을 통해 기형 발생이나 생식기능의 이상을 초래한다는 사실은 잘 알려져 있다. 그러나 내분비계와 면역계의 밀접한 상호작용 그리고 내분비계장애물질의 물리·화학적 안정성, 높은 생체

이용률과 축적성 등을 고려할 때, 내분비계장애물질이 면역계에 어떠한 영향을 미칠 당위성이 충분함에도 불구하고 내분비계장애물질이 면역기능에 미치는 영향에 관한 연구는 TCDD(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)를 비롯한 일부 물질을 제외하고는 미미한 실정이다(Camacho 등 2001; Gehrs 등, 1997). 또한 인간을 포함한 포유동물의 수유중인 새끼는 영양을 어미에게 전적으로 의존하고 있고 아직 면역계의 발달이 진행중이므로 만약 임신기나 수유기에 어미가 내분비계장애물질에 노출된다면 새끼의 면역기능에도 적·간접적 영향을 줄 가능성 또한 매우 높아 실험동물을 사용한 연구에서 임신기에 면역독성물질에 노출되면 그 새끼에게서는 완전히 성장한 동물에서 보다 훨씬 현저하고 지속적인 면역기능의 영향을 나타낸다고 보고된 바 있으나(Holladay 등, 1994), 이 분야에 대한 연구는 빈약한 현실이다.

DBP(di-n-butyl phthalate)는 내분비계장애물질로 추정되고 있는 물질로 접착제, 종이코팅, 프린팅 잉크, 분무제, 손톱광택제 및 헤어스프레이 등의 성분이며, 화장품의 첨가제로도 사용되고 있어 일상생활에서 많이 노출될 가능성이 있는 물질이며, 최근에는 유아용 플라스틱 장난감에서 유출되어 성장기 어린이의 건강에도 위협적인 존재로 부각되고 있다. 대부분의 내분비계장애물질처럼 DBP에 노출시 랫드 등의 실험동물에서는 기형이나 생식기능 이상이 초래된다(Mychreest 등, 1999, 2000; Ema 등, 1998)는 연구 보고들이 있으나 면역기능에 대한 영향에 관해서는 거의 보고된 바가 없다. 다만 최근에 Chung 등은 임신 중 DBP에 노출된 랫드로부터 태어난 새끼 랫드에서 비장 세포 증식능의 감소를 보고함으로써 어미랫드의 DBP 노출이 새끼 랫드의 면역기능에 부정적 영향을 줄 가능성을 시사하였다(Chung 등, 2001). 이를 배경으로 본 연구에서는 임신중인 어미 랫드에 대한 DBP 투여 기간을 연장하고(임신기 및 수유기에 모두 투여), 이유기初에 새끼 랫드에 대해 면역기능을 조사함으로써 모유를 통해 전달되는 DBP 또는 DBP 대사산물이 새끼 랫드의 면역기능에 미치는 영향을 평가하고자 하였다.

연구 결과, DBP 투여된 어미 랫드에서 체중, 흥선과 비장 등 면역관련장기 무게, 흥선 및 비장의 세포수, 흥선 및 비장세포의 증식능, 혈액세포들의 구성 분포비, 흥선 및 비장의 T 세포아군들의 분포비 그리고 비장의 B 세포 분포비등 조사된 어떠한 면역독성 관련 지표에 있어서도 뚜렷한 영향이 관찰되지 않았다. 이는 성숙한 랫드의 면역계가 외부 독성물질에 대해 상당한 저항성을 보유하고 있거나 간장 등에서 충분히 해독 기능을 수행하고 있기 때문인 것으로 사료된다. 그리고 DBP 투여시 나타나는 어미 랫드의 체중 대비 상대적 간장 무게 증가는 간장이 과도하게 촉진되는 대사기능과 관련이 있을 가능성도 있다. 한

편 임신기 및 수유기 동안 DBP에 노출된 어미로부터 태어나 성장한 새끼 랫드의 경우에는 어미 랫드와 마찬가지로 흥선과 비장 등 면역관련장기 무게, 흥선 및 비장의 세포수, 흥선 및 비장세포의 증식능, 그리고 흥선 T 세포아군들의 분포비등에서는 뚜렷한 영향이 관찰되지 않았다. 그러나 혈액중 neutrophil의 상대적 분포비, 비장의 CD8<sup>+</sup> T 세포와 B 세포의 상대적 분포비가 각각 250, 500 그리고 750 mg/kg 등 일부 DBP 투여군에서 유의성 있게 증가하는 양상을 보였으며 체중, 비장 및 간장의 상대적 무게 또한 250 및 500 mg/kg DBP 투여군에서 증가하였다. 혈액내 neutrophil과 비장내 B 세포의 분포비 증가는 서로 관련이 있다고 사려되며, 두 세포의 IL-8 수용체 발현 감소나 감수성 감소를 반영할 가능성이 있다. 왜냐하면 neutrophil은 IL-8의 자극을 받으면 활성화되어 adhesion molecule인 CD11b등의 발현이 증가되기(Detmers 등, 1990) 때문이다. 그 결과 neutrophil은 혈관내피세포에 강하게 결합하게 되고 최종적으로 혈관내피세포들 사이로 빠져나가 조직에 이르게된다(Follin 등, 1991). 따라서 neutrophil 표면의 IL-8 receptor 발현 감소는 결과적으로 neutrophil이 조직내로 빠져나가는 것을 억제함으로써 혈액내 분포비를 증가시킬 수도 있을 것이다. 한편 IL-8은 B 세포의 활성화에도 부정적 영향을 미친다. 즉 B 세포에 대한 IL-8 자극은 IL-4 생산을 억제함으로써 B 세포의 활성 및 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다(Kimata 등, 1992). 따라서 만약 B 세포의 IL-8 receptor 발현이 감소된다면, IL-8에 의한 억제 효과가 차단되어 상대적으로 IL-4 등에 의한 활성화 자극을 더 많이 받게 된 결과 B 세포 증식이 유도될 가능성이 있을 것이다. 실제로 IL-8 receptor knock-out 마우스에서 neutrophil 증가와 B 세포 증식 촉진이 보고된 바 있다(Cacalano 등, 1994). 그리고 혈액내 neutrophil의 상대적 분포비 증가는 IL-8 receptor 발현 감소 외에도 어미 랫드의 모유를 통해 제공된 DBP 또는 그 대사산물에 의해 neutrophil 생산(mycelopoesis) 자체의 증가를 통해 이루어졌을 가능성도 배제할 수는 없지만 비장 B 세포 분포비 증가와 연계시킨다면 extravasation 감소가 원인일 가능성도 있을 것으로 사료된다.

다음으로 새끼 랫드의 비장 CD8<sup>+</sup> T 세포아군이 500 mg/kg DBP 투여군에서 증가된 원인을 설명하기에는 너무 많은 관련 요소들이 있을 것으로 사려된다. 다만 Fig. 1에서 보듯이 흥선의 다양한 T 세포아군의 분포비가 대조군과 차이가 없었기 때문에 T세포의 분화 과정에 대한 영향을 통한 결과는 아닌 것으로 추정된다. 더구나 CD4<sup>+</sup> helper T 세포가 B 세포의 활성화 및 증식을 유도한다는 잘 알려진 사실에 비추어 볼 때 CD8<sup>+</sup> T 세포아군의 증가를 B 세포 분포비 증가의 원인으로 이해하기도 어렵다. 따라서 어미로부터 전달된 DBP 또는 그 대사산물이 비장 CD8<sup>+</sup> T

세포아군의 세포주기(cell cycle)에 직접 영향을 주었을 가능성이 있다. 다른 한편 Homann 등(1998)은 B 세포의 활성과 증식이 T 세포에 의해 일방적으로 조절된다는 일반적 사실과는 달리 B  $-/-$  마우스에서 CD4 및 CD8 T 세포의 활성 결합을 관찰함으로써 T 세포와 B 세포의 관계가 일방적인 것이 아니라 상호 영향을 주는 쌍방적 관계임을 보고하였다. 따라서 CD8 $^{+}$  T 세포아군의 분포비 증가가 B 세포 분포비 증가와 연계되어 있을 가능성도 배제할 수는 없다. 또한 CD8 $^{+}$  T 세포가 T/B 세포비가 매우 낮은 특수한 상황에서는 Th2-유사 기능을 발휘하여 B 세포의 활성화 및 증식을 촉진한다는 많은 보고들이 있다(Hall 등, 1999; Hermann 등, 1995; Simonelli 등, 1992). 이러한 연구 결과들은 CD8 $^{+}$  T 세포와 B 세포 분포비 증가간의 연관성을 또 다른 측면에서 설명해 줄지도 모른다.

이상에서 살펴 본 바와 같이 어미 랫드의 DBP 노출은 아직 인과관계를 충분히 설명하기는 어렵지만 새끼 랫드의 면역기능과 관련된 표현형들에 영향을 줄 충분한 개연성이 있는 것으로 사료된다. 이는 앞서 언급한 바 있는 Chung 등의 연구 결과를 뒷받침하는 연장선상에 있는 결과라 할 수 있을 것이다. 그러나 본 연구 결과 나타난 면역계의 표현형 변화를 좀 더 세부적으로 설명하기 위해서는 DBP 또는 MBP(monobutylphthalate)와 같은 DBP 대사산물이 1) neutrophil과 B 세포의 IL-8 receptor 발현을 억제하는가? 2) CD8 $^{+}$  T 세포의 세포주기에 영향을 줄 수 있는가? 3) CD8 $^{+}$  T 세포의 활성에 직·간접적 영향을 주는가? 등의 의문에 답할 수 있는 추가적인 *in vivo* 및 *in vitro* 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청의 2001년도 내분비계 장애 물질 연구사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

### 참고문헌

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR): Toxicological Profile for Di-*n*-butylphthalate, TP-90-10. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA., 1990.
- Boyd, R.L. and Hugo, P. (1991): Toward an integrated view of thymopoiesis. *Immunol. Today*, **12**, 71-79.
- Cacalano, G., Lee, J., Kikly, K., Ryan, A.M., Pitts-Meek, S., Hultgren, B., Wood, W.I. and Moore, M.W. (1994): Neutrophil and B cell expansion in mice that lack the murine IL-8 receptor homolog. *Science*, **265**(5172), 682-684.
- Camacho, I.A., Hassuneh, M.R. and Nagarkatti, M. (2001): Nagarkatti PS. Enhanced activation-induced cell death as a mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced immunotoxicity in peripheral T cells. *Toxicology*, **165**(1), 51-63.
- Chung, S.T. et al. (2001): Effects of Di(*n*-butyl) phthalate on the developing immune system of fetal and neonatal SD rats. *J. Toxicol. Pub. Health*, **17**, 115-121.
- Colborn, T., vom Saal, F. and Soto, A. (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and human. *Environ. Health Perspect*, **101**, 667-749.
- Detmers, P.A., Lo, S.K., Olsen-Egbert, E., Walz, A., Bagioli, M. and Cohn, Z.A. (1990): Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J. Exp. Med.*, **1**, 1155-1162.
- Dostal, L.A., Chapin, R.E., Stefanski, S.A., Harris, M.W. and Schwetz, B.A. (1988): Testicular toxicity and reduced Sertoli cell numbers in neonatal rats by di(2-ethylhexyl) phthalate and the recovery of fertility as adults. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **95**, 104-121.
- Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (1998): Further evaluation of developmental toxicity of di-*n*-butyl phthalate following administration during late pregnancy in rats. *Toxicol. Lett.*, **98**, 87-93.
- Follin, P., Wymann, M.P., Dewald, B., Ceska, M. and Dahlgren, C. (1991): Human neutrophil migration into skin chambers is associated with production of NAP-1/IL8 and C5a. *Eur. J. Haematol.*, **47**, 71-76.
- Gehrs, B.C., Riddle, M.M., Williams, W.C. and Smialowicz, R.J. (1997): Alterations in the developing immune system of the F344 rat after perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: II. Effects on the pup and the adult. *Toxicology*, **122**(3), 229-240.
- Hall, L.R., Lass, J.H., Diaconu, E., Strine, E.R. and Pearlman, E. (1999): An essential role for antibody in neutrophil and eosinophil recruitment to the cornea: B cell-deficient (microMT) mice fail to develop Th2-dependent, helminth-mediated keratitis. *J. Immunol.*, **163**(9), 4970-4975.
- Harris, C.A., Henttu, P., Parker, M.G. and Sumpter, J.P. (1997): The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*. *Environ. Health Perspect.*, **105**, 802-811.
- Hermann, P., Van-Kooten, C., Gaillard, C., Banchereau, J., Blanchard, D. (1995): CD40 ligand-positive CD8 $^{+}$  T cell clones allow B cell growth and differentiation. *Eur. J. Immunol.*, **25**(10), 2972-2977.
- Holladay, S.D. (1999): Prenatal immunotoxicant exposure and postnatal autoimmune disease. *Environ. Health Perspect.*, **107**, 687-691.
- Holladay, S.D. and Luster, M.I. (1994): Developmental

- immunotoxicology. In: Developmental Toxicology, 2d ed (Kimmel, C.A. and Buelke-Sam, J., eds.). New York: Raven, 93-118.
- Homann, D., Tishon, A., Berger, D.P., Weigle, W.O., von Herrath, M.G. and Oldstone, M.B. (1998): Evidence for an underlying CD4 helper and CD8 T-cell defect in B-cell-deficient mice: failure to clear persistent virus infection after adoptive immunotherapy with virus-specific memory cells from muMT/muMT mice. *J. Virol.*, **72**, 9208-9216.
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G. and Sumpter, J.P. (1995): A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.*, **103**, 582-587.
- Kimata, H., Yoshida, A., Ishioka, C., Lindley, I. and Mikawa, H. (1992): Interleukin 8(IL-8) selectively inhibits immunoglobulin E production induced by IL-4 in human B cells. *J. Exp. Med.*, **176**, 1227-1231.
- Long, G. and Meek, E. (1997): Environmental Health Criteria 189: Di-n-Butyl phthalate, World Health Organization. Geneva.
- Mychreest, E., Sar, M., Cattley, R.C. and Foster, P.M. (1999): Disruption of androgen-regulated male reproductive development by Di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **156**, 81-95.
- Mychreest, E., Wallace, D.G. and Fostre, P.M. (2000): Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to Di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol. Sci.*, **55**, 143-151.
- National Toxicology Program (NTP) (1991): Final report on the reproductive toxicity of Di(n-butyl) (CAS No. 84-74-2) in Sprague-Dawley Rats. NYIS Publication No. PB92111996, National Technical Information Service (NTIS), US Department of Commerce, Springfield, VA.
- Simonelli, C., Rugiu, F.S., Manetti, R., Parronchi, P., Piccinni, M.P., Almerigogna, F., Romagnani, S. and Maggi, E. (1992): Both CD8<sup>+</sup> and CD16<sup>+</sup> human T cell clones can provide B cell help for immunoglobulin production. *Int J. Clin. Lab. Res.*, **22**(1), 36-39.