

## Di-(2-ethyl hexyl) phthalate가 mouse의 면역반응에 미치는 영향

임수한 · 홍사욱 · 안영근\* · 정규혁

성균관대학교 약학대학 · \*원광대학교 약학대학

## Effect of Di-(2-ethyl hexyl) Phthalate on Immune Response in Mice

Soo Han Lim, Sa Uk Hong, Young Keun Ahn\* and Kyu Hyuck Chung

*College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University*

*\*College of Pharmancy, Won Kwang University*

### ABSTRACT

Recently pathotoxicological study of lymphoid organs by administration of some phthalate ester in rats, indicated marked effect of architechure of thymus, spleen, and lymphonodes. Dioctyl phthalate (DOP), one of the phthalate ester, caused statistically significant reduction in the weights of various lymphoid organs.

This sensitivity of the lymphoid organ to phthalate toxicity which could lead to adverse effects on the immune response and also suppression of immuno system. Therefore it is possible the presense of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), one of the phthalate ester as well as DOP, in spleen and other organs might have some moderately effect on the function of the immune system, So our present study was proceeded to assess the effect of DEHP on the immunotoxicity in mouse.

In the immune response of DEHP administered mice, HA, HY, Arthus reaction and Rosette forming cell were decreased but DTH was increased.

Furthermore, in the DEHP plus ethanol group, HA, HY, Arthus reaction and Rosette forming cell were remarkably decreased and elevation of DTH was inhibited.

### I. 서 론

근래 plastic 공업의 비약적인 발전으로 취사용 용구를 위시하여 각종 생활용품에 plastic 제품이

널리 사용되고 있다<sup>1-2)</sup>.

그뿐만 아니라 건축자재 등 건축 토목분야에서도 사용하고 있으며 근자에 와서는 의료용구에 이르기 까지 더욱 광범위하게 사용하고 있다.

그간 plastic은 그 자체의 축합불완(蓄合不完)으로 인하여 혼재할 수 있는 monomer 등의 유해성에 대하여서는 허다히 논의되어 왔다. 그러나 이 보다도 plastic의 가소제나 첨가제로 사용되고 있는 물질 중 phthalic acid의 ester류가 널리 사용되고 있어 그 유해성의 검토가 점차 문제로 대두되어 가고 있다<sup>3-5)</sup>. 이 phthalic acid의 ester류 중에서도 Di-2 (ethyl hexyl) phthalate (DEHP)는 가소제로 사용빈도가 가장 많아 plastic제의 각종용기와 건축자재 등을 매개로 하여 접촉되거나 호흡 등을 통하여 점차 우리에게 폭로될 기회가 많아져 DEHP의 독성이 매우 우려되고 있다<sup>6-7)</sup>.

DEHP의 독성에 관한 연구로서 병리조직학적 연구 및 각종 장기내의 생화학적변화에 관한 연구와 더불어 기타 일반독성에 대하여 허다히 구명되고 있다. 그러나 DEHP의 면역에 미치는 영향에 대해서는 별로 연구된 바가 없다. 다만 Dogra 등<sup>8)</sup>은 dioctyl phthalate (DOP)가 lymph 조직에 이상을 주며 체액성 면역에 영향을 주고 있다고 보고한 바 있다. 독성물질은 신장을 위시한 내장 장기에 손상이 오기 전에 면역반응에 예민하게 반응하므로 최근 면역학적 실험방법에 의한 독성탐구가 점차 활발히 진행되어 가고 있다.

이러한 관점에서 저자 등은 시중에서 널리 사용되고 있는 DEHP가 ICR mouse의 면역에 미치는 영향을 관찰하는 동시에 DEHP와 ethanol을 병용투여하여 ethanol이 DEHP로 인한 면역반응에 미치는 영향을 보기 위하여 본 실험에 착수하여 몇 가지 지점을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 실험방법

### 1. 실험동물 및 약물투여방법

생후 5~6주령으로 체중 17~21g의 ICR계 웅성 mouse를 시판사료로 1주간 사육하여 실험실 환경

에 적응시킨 후에, 8~10마리를 1군으로 하고 전체를 4개 실험군으로 구분하여 약물을 1일 1회씩 4주간 각각 경구투여하여 2주 및 4주에 실험하였다.

(1) 대조군 : saline solution을 5.0 ml/kg씩 투여하였다.

(2) DEHP 단독투여군 : DEHP를 5.0 ml/kg씩 투여하였다.

(3) Ethanol 단독투여군 : 20 v/v% ethanol을 5.0 ml/kg씩 투여한 후 DEHP를 5.0 ml/kg씩 투여하였다.

### 2. 체중 및 장기의 중량측정

실험동물의 체중은 약물투여 개시일과 최종일에 측정하고 장기의 중량은 실험동물의 경동맥을 절단, 채혈한 후 간장비장 및 흉선을 적출하여 외관을 관찰하고 그 중량을 측정, 대체중 백분비로 표시하였다.

### 3. 항원의 조제 및 면역

(1) 항원 : Yoshikai<sup>9)</sup>의 방법에 의해 제조하여 4°C보관중인 S-RBC를 사용 직전 phosphate buffered saline (이하 PBS)로 3회 원심 세척한 후  $1 \times 10^8$  S-RBC/ml의 농도로 PBS에 부유시켜 사용하였다.

(2) 면역 : 하등<sup>10)</sup>의 보고를 참고하여 상기 항원 부유액 0.1 ml ( $1 \times 10^7$  S-RBC)를 mouse의 미정맥에 주사하여 1차 면역을 실시한 다음 4일 후에 mouse 좌측후지족 척피내에  $2 \times 10^8$  S-RBC/ml 부유액 0.05 ml ( $1 \times 10^8$  S-RBC)를 다시 주사한 후 2차 면역을 시켰다.

### 4. 적혈구 응집소가 및 응집소가의 측정

(1) 혈청의 분리 및 비동화 : mouse의 경동맥에서 혈청을 채취하여 혈청을 분리하고 56°C에서 30분간 비동화시킨 다음 4°C에서 보존하여 사용하였다.

(2) 적혈구 응집소가(hemagglutination titer; 이하 HA titer)의 측정 : S-RBC의 응집소가는 microtitration tray (nunclon micro test tray)를 사용하여 각 실험동물로부터 얻은 각각의 비동화 혈청

을 각 well culture plate에 Hanks balanced salt solution (이하 HBSS)로 2배 계열로 희석한 후 HBSS에 부유시킨 0.5% S-RBC 0.025 ml를 잘 혼합한 다음 37°C에서 18시간 방치하였다. 방치후 혈구의 응집유형을 관찰 관독하여 응집을 일으키는 혈청의 최고 희석도를 그 혈청의 응집소가로 하였다.

(3) 적혈구 용혈소기(hemolysin titer; 이하 HY titer)의 측정<sup>11)</sup>: S-RBC의 양 및 혈청의 희석은 응집소가 측정시와 동일하게 하고 S-RBC와 희석혈청이 들어있는 각 well에 20배 희석한 guinea pig complement 0.025 ml에 가한 다음 37°C에서 1시간 방치하여 용혈여부를 관찰하였다. 이 때에 완전 용혈을 일으키기는 혈청의 최고 희석도를 그 역가로 관독하였다.

5. 족척종창반응 측정(foot pad swelling test)

Arthus 반응 (antibody medicated hypersensitivity) 및 지연형 과민반응(delayed type hypersensitivity) 이하 DTH<sup>12)</sup>는 하등<sup>10)</sup>의 기술한 방법에 준하여 실시하였다. 1차면역 4일 후에 S-RBC 0.05 ml (1×10<sup>8</sup>)을 mouse의 좌측후지 족척에 피내주사한 후 일정시간이 경과한 다음 종창의 두께를 0.01 mm 눈금의 micro caliper로 측정하였다. 종창정도의 측정이 측정에 따른 오차를 피하기 위하여 2회 측정된 수치를 평균하였다.

관독의 기준은 Bach등<sup>13)</sup> 및 하등<sup>10)</sup>의 관독기준에 따라 3시간 반응을 Arthus반응, 24시간 경과 후의 반응을 지연형 과민반응으로 간주하였다. 족척종창지수(foot pad swelling index)는 다음과 같이 계산하였다.

Foot pad swelling index

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

6. 비장세포 부유액의 조제

Garvy<sup>14)</sup>등의 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<sup>7</sup> cell/ml가 되도록 PBS에 부유시켰다. 매 실험때마다 생존을 검사는 trypan blue dye exclusion method로 시험관에 0.3 ml의 세포부유액을 넣은 후 0.1 ml의 trypan blue dye solution을 가하여 5분간 경과 후 혈구계산판에서 무색 생세포와 청색의 염색된 사세포의 수를 계측한 후 그 백분율을 계산하였다.

7. 비장세포의 Rosette 형성세포(RFC)의 검출

비장세포의 Rosette 형성세포의 검사는 하등<sup>10)</sup>이 기술한 방법에 준하여 실시하였다. 비장세포 부유액 0.25 ml (5×10<sup>6</sup> cell)와 S-RBC 부유액 0.25 ml (5×10<sup>7</sup> cell)를 시험관에 넣고 혼합한 후 200×g에서 12분간 원심분리하였다. 4°C에서 2시간 방치후 조심스럽게 그 액을 재부유시켜 그 1적을 혈구계산판으로 RFC(Rosette forming cell)를 검경 관찰하였다. 검경시 비장세포에 S-RBC가 3개 이상 부착한 세포를 RFC로 판정하여 다음 공식에 의하여 계산 하였다.

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

Table 1. Effect of DHEP and ethanol on body weights in mice.

Groups	2 weeks			4 weeks		
	initial (g)	final (g)	increased (%)	initial (g)	final (g)	increased (%)
Control	16.60±0.437	18.49±0.843	11.26	16.41±0.420	21.54±1.677	19.93
DEHP	16.79±0.573	17.98±0.693	6.07	15.98±0.507	17.27±0.813	7.41
Ethanol	16.23±0.440	17.51±0.677	6.37	16.93±0.383	22.11±1.047	22.05
DEHP+Ethanol	16.58±0.103	18.09±0.937	6.97	15.79±0.360	20.51±0.953	21.26

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

### III. 실험결과 및 고찰

#### 1. 체중 및 간장의 중량변화

Mouse의 체중변화는 Table 1에서 보는바와 같이 DEHP 단독투여군은 대조군에 비하여 투여기간에 따라 감소하였다. DEHP와 ethanol의 병용투여군은 DEHP 단독투여군에 비하여 2주에는 감소되었던 것이 억제되었으며 4주에는 대조군과 같은 정상치로 회복되었다.

간장의 대체중량비의 변화는 Table 2에서 보는 바와 같이 DEHP 단독투여군은 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였다. DEHP와 ethanol의 병용투여군은 대조군에 비하여 유의성있게 증가하였으

나 DEHP 단독투여군에 비하여 증가함이 억제되었다.

#### 2. 면역장기의 대체중비의 변화

면역장기중 비장의 대체중비는 Table 3에서 보는 바와 같이 DEHP 단독투여군은 대조군에 비하여 2주에는 감소하였으나 4주에는 증가하는 경향을 보였다. ethanol 단독투여군은 대조군에 비하여 2주에는 유의성있게 감소하였으나 4주에는 다시 감소함이 억제되고 회복하는 경향을 보였다. DEHP와 ethanol의 병용투여군은 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였다.

흉선의 대체중비는 Table 에서 보는 바와 같이 DEHP 단독투여군은 대조군에 비하여 2주에는 감

Table 2. Effect of DEHP and ethanol on liver weights in mice.

Groups	Liver wt (g)		$\frac{\text{Liver wt}}{\text{Body wt}} \times 100(\%)$	
	2 weeks	4 weeks	2 weeks	4 weeks
Control	0.85±0.030	1.07±0.083	4.52±0.133	5.04±0.270
DEHP	1.60±0.100**	1.74±0.077**	8.96±0.583**	10.08±0.230**
Ethanol	0.77±0.057	0.92±0.073	4.69±0.287	4.16±0.307*
DEHP+Ethanol	1.57±0.103**	1.69±0.107**	8.68±0.357**	8.26±0.470**

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

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

Table 3. Effect of DEHP and ethanol on Organ weights in mice.

Organs	Groups	Organ wt (mg)		$\frac{\text{Organ wt}}{\text{Body wt}} \times 100(\%)$	
		2 weeks	4 weeks	2 weeks	4 weeks
Spleen	Control	156.67±51.700	135.40±18.353	0.61±0.077	0.65±0.090
	DEHP	84.67±10.530	123.54±20.643	0.48±0.067	0.72±0.130
	Ethanol	68.64± 6.637	125.67±23.120	0.42±0.033*	0.55±0.080
	DEHP+Ethanol	97.89±11.540	111.25±12.973	0.56±0.080	0.55±0.063
Thymus	Control	34.25± 4.620	28.89± 5.753	0.18±0.020	0.12±0.020
	DEHP	26.17± 3.660	21.00± 4.270	0.14±0.020	0.12±0.023
	Ethanol	29.09± 3.893	25.42± 1.430	0.18±0.020	0.19±0.013
	DEHP+Ethanol	24.89± 6.790	21.63± 4.853	0.13±0.030	0.10±0.023

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

Significant difference from control. (\*,  $p < 0.05$ ).

소하는 경향을 보였으나 4주에는 대조군과 같은 정상치로 회복되었다. DEHP와 ethanol의 병용투여군은 DEHP 단독투여군에 비하여 감소하는 경향을 보였으나 유의성은 없었다.

DEHP 단독투여시 중요 1차면역장기인 흉선의 대체중비는 대조군에 비하여 감소가 있었으나 투여기간에 따라 회복하는 경향을 보였으며 ethanol 단독투여군은 증가하는 경향을 보였다. 특히 DEHP와 ethanol 병용투여군은 투여기간에 따라 대조군과 차이가 없었다.

한편 비장의 대체중비에 있어서 DEHP 단독투여군은 대조군에 비하여 2주 투여군은 감소하였으나 4주 투여군은 증가하였다.

또한 ethanol 단독투여군은 대조군에 비하여 감소를 보였으며 DEHP와 ethanol 병용투여군은 투여기간에 따라 감소하였다.

이는 Tennenbaun등<sup>15)</sup>이 보고한 rat에 만성적인

로 ethanol을 투여하였을 때 비장의 위축을 초래하고 2차 체액성 면역을 억제한다는 점과 Dorga등<sup>8)</sup>의 dioctyl phthalate (DOP) 0.2×LD<sub>50</sub> 양을 투여시 단기간내에 임파구의 감소를 일으킨다는 보고로 미루어 DEHP의 체액성 및 세포성면역독성은 단기간내에 영향을 미친것으로 사료된다.

### 3. 체액성 면역 반응에 미치는 영향

적혈구응집소가는 Table 4에서 보는 바와 같이 DEHP 단독투여군은 대조군에 비하여 2주에는 유의성있게 감소하였으며 4주에는 감소율이 억제되었다. Ethanol 단독투여군은 대조군에 비하여 투여기간에 따라 유의성있게 감소하였으며 DEHP와 ethanol의 병용투여군도 DEHP 단독투여군에 비하여 유의성있게 감소하였다.

적혈구응혈소가는 Table 5에서 보는 바와 같이 DEHP 단독투여군은 대조군에 비하여 감소하는 경

**Table 4. Effect of DEHP and ethanol on the antibody production in mice.**

Groups	HA titer (log <sub>2</sub> )		HY titer (log <sub>2</sub> )	
	2 weeks	4 weeks	2 weeks	4 weeks
Control	4.89±0.657	3.22±0.263	3.30±0.213	3.08±0.253
DEHP	2.50±0.167**	2.75±0.747	2.90±0.100	2.63±0.287
Ethanol	2.20±0.133**	2.00±0.150**	2.30±0.153**	2.30±0.213*
DEHP+Ethanol	2.22±0.140**	1.27±0.207**	2.00±0.157**	1.33±0.570**

Mice were challenged with 1×10<sup>8</sup> S-RBC/ml for on 4th days after sensitization.

The HA and HY titer were assayed on 5th day.

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

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

**Table 5. Effect of DEHP and ethanol on the Arthus and DTH reaction in mice.**

Groups	Arthus		DTH	
	2 weeks	4 weeks	2 weeks	4 weeks
Control	12.08±1.753	16.27±1.453	3.70±0.663	5.35±1.047
DEHP	15.73±1.633	15.82±1.530	8.61±1.080**	7.70±1.203
Ethanol	9.26±1.713	19.93±1.883	3.08±0.680	6.99±1.317
DEHP+Ethanol	10.53±1.387	9.98±0.873**	3.04±0.467	3.22±0.757

At 3 hours FPSI was arthus and 24 hours FPSI was DTH.

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

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

**Table 6. Effect of DEHP and ethanol on rosette forming cell in mice.**

Groups	RFC (%)	
	2 weeks	4 weeks
Control	4.32±0.643	5.85±0.610
DEHP	3.05±0.707	3.41±0.470**
Ethanol	2.07±0.227**	4.28±0.347*
DEHP+Ethanol	1.00±0.577**	3.91±0.787

$$\text{RFC}(\%) = \frac{\text{No. of rosette forming cells}}{\text{total cell counted} \times \text{viability}} \times 100$$

향을 보였고 ethanol 단독투여군은 유의성있게 감소하였다. DEHP와 ethanol의 병용투여군은 DEHP 단독투여군에 비하여 더욱 현저하게 감소하였다.

Arthus 반응은 Table 6에서 보는바와 같이 DEHP 단독투여군은 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였다. ethanol 단독투여군은 대조군에 비하여 2주에 감소하였다가 4주에 증가하는 경향을 보였다. DEHP와 ethanol의 병용투여군은 DEHP 단독투여군에 비하여 현저하게 감소하였다.

체액성 면역반응을 관찰하기 위한 적혈구응집소가 및 용혈소가는 감작면양적혈구에 대한 항체와 항원과의 반응으로 응집 또는 용혈을 일으키는 현상으로 혈중 면역항체의 소장을 측정하는데 널리 이용되고 있다.

본 실험에서 실험군은 대조군에 비하여 감소하는 경향을 보였으나 투여기간에 따라 회복하였으며 특히 DEHP와 ethanol의 병용투여군에서 현저하게 감소한 바 이는 장기간 ethanol 투여에 의한 체액성 항체생산을 감소시킨 것으로 사료된다.

한편 Arthus 반응은 감작숙주에 주사된 항원이 항원-항체복합체와 보체 등이 결합된 대분자들의 탐식으로 유리되는 lysosomal enzyme에 의하여 발생되는 항체매개형 과민반응현상이다. 대조군에 비하여 Arthus반응이 별로 변화가 없었으나 적혈구응집소가 및 용혈소가의 감소와 더불어 DEHP와 ethanol의 병용투여군이 체액성면역을 약간 감소시킨 것으로 사료된다.

#### 4. 세포성 면역 반응에 미치는 영향

지연성과민반응(DTH)을 Table 5에서 보는바와 같이 DEHP 단독투여군은 대조군에 비하여 2주에는 유의성있게 증가하였다가 4주에 증가가 억제되었다. DEHP와 ethanol의 병용투여군은 DEHP 단독투여군에 비하여 현저하게 감소하였다.

Rosette 형성세포는 Table 6에서 보는 바와 같이 DEHP 단독투여군은 대조군에 비하여 4주에는 유의성있게 감소하였다. Ethanol 단독투여군도 투여기간에 따라 유의성있게 감소하였다. DEHP와 ethanol의 병용투여군은 DEHP 단독투여군에 비하여 2주에는 현저하게 감소하였으나 4주에는 감소가 억제되었다.

세포성 면역을 관찰하기 위한 반응인 지연성과민 반응은 감작임파구에 의한 lymphokine등의 화학전달인자의 유리에 의하여 성립되며 특히 대식세포가 깊이 간여하는 것으로 알려져 있는 바 DEHP를 mouse에 투여하였을 때 단기간내에 체액성 면역반응은 억제된 반면, 지연형 과민반응(DTH)은 유의성있게 증가되었고 더욱 그 반응이 장기간되었는데도 증가하였다.

이는 DEHP에 의한 세포성 면역반응의 항진은 DEHP의 선택적인 B-세포과파작용에 의해서 DTH를 억제하는 소위 suppressor cell이 억제되었기 때문이 아닌가 사료된다.

비장세포의 Rosette 형성세포는 하등<sup>10)</sup>에 의하면 T-cell 및 대식세포가 모두 Rosette cell을 형성할 수 있으나 대부분 T-cell이 깊이 간여한다고 한다. 본 실험에 DEHP 단독투여군은 대조군에 비하여 감소하였으며 투여기간에 따라 유의성있게 감소하였다.

특히 DEHP와 ethanol의 병용투여군에서 더욱 뚜렷하였다. 이는 DEHP와 ethanol 병용투여에 의한 흉선의 위축 및 이에 따른 T-lymphocyte의 감소에 기인하는 것으로 사료된다.

## V. 결 론

면역반응에 있어 DEHP를 단독투여할 때 적혈구 응집소가 및 용혈소와 Rosette 세포형성능은 감소하였다. Arthus 반응은 별로 변화가 없었으며 지연형과 민반응은 약간 증가하였다.

Ethanol과 병용투여할 때 적혈구 응집소가 및 용혈소가, Arthus 반응 및 Rosette 세포형성능은 더욱 감소하였으며 지연형 과민반응도 감소되었다.

#### 참 고 문 헌

1. Marcel Y.L. and Noel S.P.: A plasticizer in lipid extracts of human blood. *Chem. Phys. Lipids* 4, 417-418(1980).
2. Jaeger R.J. and Rubin R.J.: Contamination of blood stored in plastic packs. *Lancet* 2, 151(1970).
3. Ingemar Kihlström: Placental transfer of diethylhexyl phthalate in the guinea pig placentas perfused in situ. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 53, 23-27(1983).
4. Tavares L.A. and Vine N.D.: Phthalic acid esters inhibit arachidonate metabolism by rat peritoneal leucocytes. *J. Pharm. Pharmacol.* 37, 67-68(1985).
5. Singh A.R., Lawrence W.H. and Autian J.: Tetragenicity of phthalate esters in rats. *J. Pharm. Sci.* 61, 51-55(1972).
6. Lawrence W.H. and Tuell S.F.: Phthalate esters: The question of safety-an update. *Clin. Toxicol.* 15, 447-466(1979).
7. Overturf M.L., Druilher R.E., Lieh J.G., Kirken-dall W.M. and Caprioli R.M.: Phthalate esters in normal and phthal human kidneys. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 536-542(1979).
8. Dogra R.K.S., Khanma S., Nagale S.L., Shukula L.J., Srivastava S.N., Bhatnagar M.C. and Gupta P.K.: Effect of Dioctyl phthalate on immune system of rat. *Indian J. Exp. Biol.* 23, 315-319(1985).
9. Yoshikai Y., Miake S., Matsuma T. and Takey K.: Effect of stimulation and blockade of mononuclear phagocyte system on the delayed foot pad reaction on SRBC in mice. *Immunol.* 38, 57(1981).
10. Ha T.Y. and Rhee H.K.: Effect of inosiplex on cellular and humoral immunity. *J. Kor. Micr.* 16, 57(1981).
11. Ganning A.E., Klasson., Bergman A., Brunk U. and Dallner G.: Effect of phthalate ester metabolites on rat liver. *Acta. Chm. Scand.* B368, 563-565(1982).
12. Stavitsky A.B.: Micro, methods for the study of proteins and antibodies. *J. Immunol.* 72, 360(1954).
13. Bach J.F. and Darderne M.: Antigen recognition, by T-lymphocyte. *Cell Immunol.* 3, 1(1972).
14. Garvy J.S., Crener M.E. and Sussdorf D.H.: Method in immunology third Ed. 414(1980).
15. Tennenbaum J.I., Ruppert R.D., ST. Pierre R.L. and Green Berger N.J.: The effect of chronic alcohol administration on the immune responsiveness of rats. *J. Allergy* 44, 272(1969).