예방의학회지 : 제 27 권 제 1 호
Korean J. of Preventive Medicine
Vol. 27, No. 1, March 1994

수은에 의한 마우스의 면역반응 조절장애

기 노 석[1] · 고 대 하[1] · 김 종 서[1] · 이 정 상[1] · 김 남 송[1] · 이 황 호[2]

전북의대 예방의학교실[1], 미생물학교실[2]

= **Abstract** =

$HgCl_2$ Dysregulates the Immune Response of Balb/c Mice

No Suk Ki[1], Dai Ha Koh[1], Chong Suh Kim[1], Jung Sang Lee[1],
Nam Song Kim[1], Hwang Ho Lee[2]

Department of Preventive Medicine[1], Department of Microbiology[2]
College of Medicine, Chonbuk National University

The studies reported here were undertaken to investigate the effects of mercury chloride on immune system of Balb/c mouse employing a flexible tier of in vitro and in vivo assays. Mercury chloride inhibited the proliferative responses of spleen cells to lipopolysaccharide, pokeweed mitogen, and phytohemagglutinin as a dose-dependent manner. This inhibitory effect was observed not only when $HgCl_2$ was added 2nd or 3rd day of 3 days culture period but also when spleen cells was pretreated with $HgCl_2$ for 2 hours. Mercury chloride, however, potentiated the production of IgM and IgG from spleen cells. During the $HgCl_2$ administration by drinking for 3 weeks, the weight gain of mice was significantly blunted than that of control group mice, while no overt signs related to mercury toxicity were noted in any mice of experimental group. There was no change in thymus and spleen weights, and in histological findings of kidney, bone marrow of femur, thymus, spleen, and popliteal lymph node after 3 weeks of mercury exposure. However, $HgCl_2$ induced a significant increase of total serum IgM, IgG including IgG_1, IgG_{2a} and IgG_{2b}, and IgE in Balb/c mice. Treatment in vivo with anti-IL-4 monoclonal antibody significantly abrogated the $HgCl_2$-induced increase in total serum IgG1 and IgE. Whereas $HgCl_2$ potentiated total serum IgM and IgG, there was no difference in total serum hemagglutinin to SRBC (Sheep Red Blood Cell) between experimental and control group mice when these mice were immunized with SRBC. All these findings observed in Balb/c mice suggest that mercury perturbates well-orchestrated regulation of immune responses before developing histopathological changes in lymphoid tissues.

Key words : mercury chloride, immune response

서 론

수은 원소, 무기수은 및 유기수은 등의 3가지 형태로 자연계에 존재하는 수은(mercury chloride)은 오랜 옛날부터 인류의 관심을 끌어왔으며, 또한 사람에게 알려진 독물질 중 가장 오래된 것의 하나이다. 수은은 산업 및 의학적으로 이용되고 있으며 이에 따른 중독증을 일으키기도 한다(Key 등, 1977; McLaughlin 등, 1980 Snodgrass 등, 1981; Wide, 1986). 수은중독은 작업환경 내에서 수은에 지속적으로 노출된 결과 발생하는 근로자들의 직업성 중독과 무기 및 유기수은을 함유한 산업폐수에 의한 환경오염으로부터 생물학적 먹이연쇄(biological food chain)를 통한 간접적인 중독으로 구분된다(Clarkson, 1972; Mailman, 1980 Goyer, 1991). 산업혁명 이후 수은에 의한 환경오염은 점차 증가되고 있으며, 특히 산업폐수에 의하여 물고기와 갑각류에 유기수은이 축적된 결과 1950년대에 일본의 Niigata 지역에서 발생된 소위 Minamata병(Joselow 등, 1972; Grandjean, 1992)은 불특정 대상에 큰 피해를 야기시킨 것으로 이후 수은중독에 대한 경각심을 불러일으킨 바 있다.

수은중독에 관한 현재까지의 연구는 주로 임상적인 면에서의 기질적, 기능적 장애와 더불어 생체조직내 수은의 축적농도와 독성발현과의 관련성 규명 및 환경오염평가에 집중되어 온 편이다(Wojtalik, 1971: Rustam 등, 1975 Donaldson과 Gubler, 1978; Roles 등, 1985). 근래에 이르러서야 수은을 비롯한 각종 환경오염물질이 면역계에 미치는 영향에 관한 연구들이 이루어지고 있는 실정이다. 수종의 환경오염 물질들은 면역계에 독작용을 나타내거나 병원체에 대한 숙주의 저항성을 감소시킨다(Hemphill 등, 1971; Koller와 Kovach, 1974; Koller 등, 1976; Faith와 Moore, 1977; Luster 등, 1978 Blakley 등, 1980; Blakley와 Archer, 1981). 실험동물에 낮은 농도의 수은을 단기간 또는 장기간 노출시켰을 때 면역계의 변화가 초래된다는 보고(Koller, 1973)도 있다. 그러나 현재까지의 대부분의 연구는 수은에 감수성이 높은 실험동물을 대상으로 한 자가면역질환을 연구한 것들(Hirsch 등, 1982; Bellon 등, 1982; Sapin 등, 1982 Chalopin과 Lockwood, 1984; Aten 등, 1988; Pelletier 등, 1988; Goldman 등, 1991)이고, 일부의 연구자들(Koller, 1973; Spyker, 1975; Ohi 등, 1976; Blakley 등 1980)만이 수은의 면역독성학적 연구결과를 보고하였을 뿐만 아니라 몇가지의 면역기능 측정으로 수은노출에 따른 면역계의 손상을 평가한 연구였다. 본 연구는 시험관내 및 생체내 면역능을 단계적으로 측정함으로써 수은이 마우스의 면역계에 미치는 영향을 구명하기 위하여 실시하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물

생후 3주된 Balb/c 마우스를 한국화학연구소(대전)로 부터 구입하여 전북대학교 의과대학 예방의학교실의 실험동물 사육실에서 실험에 사용하기 전 적어도 3주 동안 증류수와 펠렛사료(제일사료주식회사, 대전)를 공급하면서 적응시켰다.

2. 슬와 림프절 측정 (popliteal lymph node assay)

PLNA가 수은에 의해서 발생되는 면역학적 증후군에 대한 랫트와 마우스의 전반적인 감수성 유무를 반영한다는 보고(Gleichmann, 1981; Gleichmann 등, 1984; Pelletier 등, 1985 Hurtenbach 등, 1987; Kamm ller 등, 1987)를 참작하여 Balb/c 마우스의 수은에 대한 반응성을 알아보고자 Stiller-Winkler 등(1988)의 방법에 따라 슬와 림프절 측정을 실시하였다. 간기하면, 수은($HgCl_2$, Sigma)을 Dulbecco's phosphate-buffered saline(PBS, GIBCO)에 녹이고 여과 멸균한 후 마우스의 우측 후족척 피하에 50 $\mu\ell$를 주사하였다. 이때 수은의 양은 0, 15, 30 및 60 μg이었으며,

각 군은 6~8주된 암수 각각 4마리씩으로 구성하였다. 수은을 주사한 6일 후에 마우스를 에테르 마취하에서 경추탈골로 희생시키고 좌우측 슬와 림프절을 적출하여 각 각의 무게를 화학천칭으로 측정하였다. 슬와 림프절 무게지수는 좌측 슬와 림프절의 무게에 대한 실험측 슬와 림프절의 무게비로 표시하였다.

3. 비장세포

생후 6~8주된 암컷 Balb/c 마우스를 에테르 마취하에서 경추탈골로 희생시킨 후 무균적으로 비장을 적출하였다. 그 후 비장을 한냉 RPMI 1640(GIBCO) 배지에서 teasing한 다음 2분동안 정치시켜 가라앉은 세포괴를 제외한 세포부유액을 얻었다. 이를 RPMI 1640 배지로 1회 원심세척한 후 저장성 쇽(hypotonic shock)으로 적혈구를 파괴시키고 상기한 것과 같은 방법으로 세포부유액을 얻어 RPMI 1640 배지로 3회 원심세척한 후 세포배양액에 실험에 따라 필요한 농도가 되도록 조정하여 실험에 사용하였다. 세포배양액은 RPMI 1640배지에 fetal bovine serum(FBS) 10%, 페니실린 100 units/㎖, 스트렙토마이신 100㎍/㎖, L-glutamine 2 mM 및 2-mercaptoethanol 5×10^{-5}M이 되도록 하였다.

4. 림프구 증식반응

수은처치에 따른 림프구 증식반응은 flat-bottomed 96 well microculture plate(Nunc, Denmark)를 이용하였으며, 비장세포를 세포배양배지에 2×10^6 cell/㎖가 되도록 부유시켜 3중 배양하였다. 사전실험으로 정한 적정농도의 lipopolysaccharide(LPS, 8㎍/㎖, Sigma), pokeweed mitogen (PWM, 1㎍/㎖, Sigma) 또는 phytohemagglutinin (PHA-P, 4㎍/㎖, Sigma) 등으로 비장세포(2×10^5 cells/200㎕/well)의 증식을 유도하였다. 세포배양은 37℃, 가습 5% CO_2 배양기에서 3일간 실시하였다. 이때 다양한 농도의 수은을 배양 전기간, 배양 후반 2일간 또는 배양후반 1일간 비장세포에 노출시켰다. 증식반응은 혈(well)당 0.5㎕ Ci의 ^{3}H-thymidine(^{3}H-TdR, specific activity 2.0 Ci/m mol, New England Nuclear, MA)을 배양종료 18시간 전에 pulse한 후 multiple cell harvester로 세포를 수확하여 ^{3}H-TdR이 임파구의 DNA에 incorporation된 정도를 liquid scintillation counter(Packard Tri-Carb 460C, Il)를 이용하여 측정하였다(Gaworski와 Sharma, 1978). 또한 생체에 수은이 노출된 것과 비슷한 상황을 나타내보기 위하여 세포배양배지에 부유시킨 비장세포를 2시간 동안 여러농도의 $HgCl_2$로 37℃, 가습 5% CO_2 배양기에서 전처치한 후 림프구 증식반응을 측정하였다. 수은 전처치 비장세포는 미토겐(mitogen)으로 자극하기 전에 37℃의 RPMI 1640 배지로 3회 원심세척하였으며, 증식반응은 앞에서 기술한 것과 같이 측정하였다(O'Gorman과 Oger, 1989). 비장세포의 증식반응 정도는 실험에 따른 변동을 최소화하기 위하여 다음 공식에 따라 % control로 표시하였다.

$$\% \text{ control} = \frac{\text{cpm of mercury exposed, mitogen-stimulated cultures}}{\text{cpm of nonexposed, mitogen-stimulated cultures}} \times 100$$

5. 림프구의 항체생산능

수은처치에 따른 림프구의 항체생산능은 flat-bottomed 24 well culture plate(Nunc)를 이용하여 비장세포를 세포배양배지에 2.5×10^6 cell/ml/well이 되도록하여 $HgCl_2$(10^{-7} 및 10^{-6} M) 존재하에서 사전실험으로 정한 적정농도의 PWM(1㎍/ml)으로 세포를 자극하여 항체생산을 유도하였다. 비장세포를 37℃, 가습 5% CO_2 배양기에서 7일간 배양한 후 배양상청액을 수확하여 배양상청액내에 존재하는 마우스의 IgM과 IgG 함량을 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)로 측정하였다(O'Gorman과 Oger, 1989). 비장세포의 항체생산능에 미치는 수은의 영향은 다음 공식에

따라 % control로 표시하였다.

$$\% \text{ control} = \frac{\text{Ig level of mercury-exposed, PWM-stimulated cultures}}{\text{Ig level of nonexposed, PWM-stimulated cultures}} \times 100$$

6. 실험동물에의 수은투여

생후 6주된 암컷 Balb/c 마우스에 수은이 0.5 mM 함유된 1차 증류수를 음료수로 3주간 공급하였고, 대조군 마우스에는 계속 1차 증류수를 음료수로 공급하였다. 하나의 polycarbonate 쥐장에 필요에 따라 5마리 또는 10마리의 마우스를 사육하였다. 실험동물의 체중변화 및 음료수 소모량을 측정하였다. 수은 노출 3주후 마우스를 에테르 마취하에서 심천자로 전채혈하여 희생시켰다.

7. 흉선과 비장의 무게변화

수은 투여 3주 후 대조군 및 실험군 마우스의 흉선과 비장을 적출한 다음 섬유성 결체조직을 제거하고 한냉 PBS(Phosphate Buffered Ealine)에 담근 다음 짧은 시간내에 화학천칭을 이용하여 각각의 무게를 측정하였다. 체중은 희생 직전에 측정하였다.

8. 림프조직의 조직병리학적 관찰

수은투여 3주 후 전술한 것과 같이 희생시킨 마우스의 대퇴골, 흉선, 비장 및 슬와 림프절 등을 적출하였다. 적출장기는 헤마톡실린-에오신(Hematoxylin-eosin) 염색하여 조직학적 변화유무를 광학현미경으로 관찰하였다. 이때 신장의 조직학적 변화도 관찰하였다.

9. 혈청 면역글로불린 측정

수은투여 3주 후 대조군 및 실험군 마우스의 혈청 면역글로불린 농도를 ELISA로 측정하였다. 동일군 마우스의 혈청을 동량씩 섞어서 면역글로불린 농도를 측정하였다. 수은투여에 의한 혈청 면역글로불린 농도의 변화는 다음공식에 따라 % control로 표시하였다.

$$\% \text{ control} = \frac{\text{serum Ig level of experimental mice}}{\text{serum Ig level of control mice}} \times 100$$

10. 수은투여 마우스에의 IL-4에 대한 항체 투여

수은투여 마우스에 있어서 IgE 및 IgG_1 항체의 증가에 IL-4가 관여한다는 보고(Ochel 등, 1991)를 참작하여 전북대학교 의과대학 미생물학교실로부터 분양받은 IL-4에 대한 단클론 항체(monoclonal antibody, 11B11, Rat IgG_1) 및 DNP(Dinitrophenyl)에 대한 단클론 항체(J4-1, Rat IgG_1)를 수은투여 하루전과 7일째에 실험군 마우스에 각각을 1 mg씩 복강내 주사하였다. 수은투여 3주 후 각 군 마우스의 혈청 IgG_1 및 IgE 함량을 ELISA로 측정하였다. 이때 혈청내 이들 항체 함량의 변화는 전술한 것과 같이 표시하였다.

11. 특정항원에 대한 항체반응

수은투여 2주 후 대조군과 실험군 마우스에 1×10^8 SRBC/0.2 ml를 미정맥에 주사하여 면역하였다. 항원감작 7일 후에 전술한 것과 같이 채혈하여 혈청을 분리한 후 56℃ 항온수조에서 30분간 보체를 비동화시킨 다음 Eidinger와 Pross 등(1967)의 방법에 따라 대조군과 실험군 각 각 5마리의 마우스의 SRBC에 대한 항체가를 측정하였다. 항체가 측정시 V-shaped microtitration plate(Flow Laboratories, Virginia)를 이용하였으며 항원의 농도는 2×10^8 SRBC/ml로 하였다. 2-mercaptoethanol에 대한 감별 감수성을 이용하여 19S 및 7S 항체가를 측정하였다. 또한 동일군 마우스의 혈청을 동량씩 섞어서 혈청 IgM 및 IgG 함량을 ELISA로 측정하여 수은투여 마우스의 SRBC에 대한 항체가와 혈청 IgM 및 IgG 함량과의 관련성을 비교하였다.

12. ELISA

비장세포 배양 상청액 및 혈청의 immunoglobulin 함량은 ELISA plate(Costar, MA)를 이용하여 이중 측정하였다. 이 때 사용한 제1차 항체는 가토 항 마우스 IgM 항체, 가토 항 마우스 IgG 항체, 가토 항 마우스 IgG_1 항체, 가토 항 마우스 IgG_{2a} 항체, 가토 항 마우스 IgG_{2b} 항체, 가토 항 마우스 IgG_3 항체 및 면양 항 마우스 IgE 항체 등이고, 제2차 항체는 peroxidase가 결합(conjugation)된 면양 항 마우스 IgM 항체, 면양 항 마우스 IgG 항체, 면양 항 마우스 IgG_1 항체, 면양 항 마우스 IgG_{2a} 항체, 면양 항 마우스 IgG_{2b} 항체, 면양 항 마우스 IgG_3 항체 및 렛트 항 마우스 IgE 항체 등이었다. 이들 항체는 모두 Serotec(Kidlington, England)으로 부터 구입하였다.

13. 통계처리

대조군과 실험군의 차이를 검정하기 위해 사용한 통계기법은 t-test이었다.

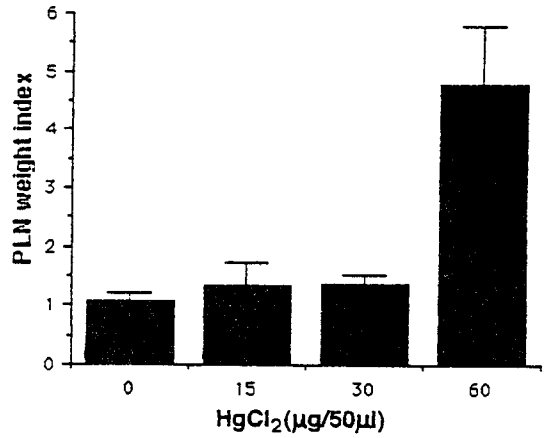

Fig. 1. Primary popliteal lympe node reactions to $HgCl_2$ in Balb/c mice. Groups of 8 mice were injected s.c. into right hind foot-pad with either PBS alone or increasing concentrations of $HgCl_2$ in 50 $\mu\ell$ PBS on day 0, as indicated. The PLN weight index was determined on day 6. For each group mean values ± SEM are shown. Within each group the response induced by Hg^{2+} were compared to the PBS response, and the statistical significance of the difference was calculated; * $p < 0.001$.

실험성적

1. Balb/c 마우스의 슬와 림프절 측정

Balb/c 마우스의 수은에 대한 반응성을 알아보고자 슬와 림프절 측정을 실시하였다. 그 결과 Balb/c 마우스는 낮은 농도의 수은에 대하여 거의 반응을 보이지 않았지만 수은(60 μg/50 $\mu\ell$ of PBS)에 대해서 4.56의 슬와 림프절 무게지수를 나타냈다(그림 1). 이러한 결과는 본 실험에 사용한 Balb/c 마우스가 수은의 농도에 따라서는 다르지만 상당한 정도의 감수성을 보인 것으로 Balb/c 마우스를 대상으로 한 수은의 면역 독성에 관한 연구가 유의함을 의미한다.

2. 수은이 비장세포의 증식능에 미치는 영향

세포배양 전기간 동안 수은을 비장세포에 노출시켰을 때 미토겐의 종류에 관계없이 비장세포의 증식능은 수은의 농도에 의존적으로 억제되었다. 10^{-8}M 수은은 비장세포의 증식능에 영향을 미치지 못했으나 10^{-5}M 수은은 그것을 완전히 억제시킬 정도로 그 독작용이 아주 심했다(그림 2).

세포배양 3일 중의 후반 2일간(표 1) 또는 1일간(표 2) 수은을 비장세포에 노출시켰을 때 그 증식능은 세포배양 전기간 동안 수은에 노출시켰을 때와 비슷하게 억제되었다. 이러한 결과는 이미 증식이 진행되고 있는 림프구에도 수은의 독작용이 나타남을 의미한다.

시험관내에서 비장세포에 수은을 2시간 동안 전처치한 후 비장세포의 증식반응을 측정한 결과 비장세포를 전처치하지 않았을 때와 아주 흡사한 결과를 얻었다(표 3). 즉, 적어도 림프구에 대한 수은의 시험관내 독작용은 비가역적임을 알 수 있었다.

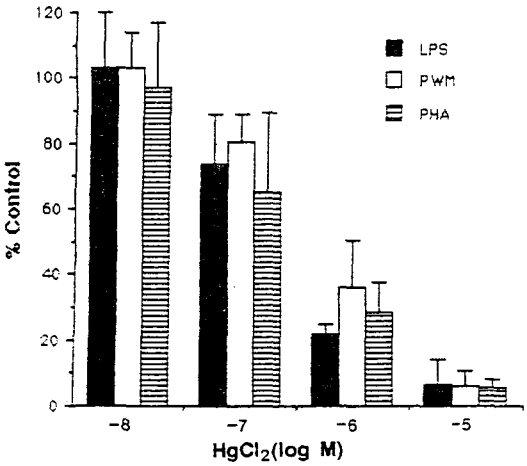

Fig. 2. Proliferations of mitogen-stimulated spleen cells exposed to various concentrations of $HgCl_2$ throughout the culture period in 3 days culture. Values are expressed as percentage of the control response induced by mitogen in the abscence of mercury. Each bar represent mean ± SEM from 5 mice.

Table 1. Proliferation of mitogen-stimulated spleen cells exposed to various concentrations of $HgCl_2$ for the last 2 days in 3 days culture period[a].

	Mitogen		$HgCl_2$ (Log M)[b]		
			−8	−7	−6
Exp. 1	LPS	83[c]	55	5	0.4
	PWM	79	52	17	3
	PHA	51	38	13	3
Exp. 2	LPS	95	71	8	1.5
	PWM	83	57	24	4
	PHA	109	59	26	11

a) Culture of 2×10^5 female Balb/c spleen cells were initiated in the presence of mitogen.
b) Indicated concentrations of $HgCl_2$ was added into the culture at 1 day after initiation of culture.
c) Values are expressed as percentage of the control response induced by mitogen in the absence of mercury.

Table 2. Proliferation of mitogen-stimulated spleen cells exposed to $HgCl_2$ for the last 1 day in 3 days culture period[a].

	Mitogen		$HgCl_2$ (Log M)[b]		
			−8	−7	−6
Exp. 1	LPS	97[c]	64	9	4
	PWM	94	63	20	4
	PHA	93	27	18	3
Exp. 2	LPS	82	61	12	2
	PWM	84	81	26	1
	PHA	73	67	42	9

a) Culture of 2×10^5 female Balb/c spleen cells were initiated in the presence of mitogen.
b) Indicated concentrations of $HgCl_2$ was added into the culture at 2 day after initiation of culture.
c) Values are expressed as percentage of the control response induced by mitogen in the absence of mercury.

Table 3. Effect of $HgCl_2$ pretreatment on proliferation of mitogen-stimulated female Balb/c spleen cells[a].

	Mitogen	$HgCl_2$ (Log M)	
			−6
Exp. 1	LPS	84[b]	45
	PWM	59	50
	PHA	63	62
Exp. 2	LPS	73	48
	PWM	66	52
	PHA	48	36

a) Spleen cells were incubated for 2 hours at 37℃, either alone or with indicated concentrations of $HgCl_2$. See Materials and Methods.
b) Values are expressed as percentage of the control response induced by mitogen in the absence of mercury.

3. 수은이 비장세포의 항체생산에 미치는 영향

수은이 시험관내에서 림프구의 증식반응 뿐만 아니라 항체생산능도 억제하는지 알아보기 위하여 본실험을 실시하였다. 10^{-7}M 수은은 시험관내에서 비장세포로부터의 IgM 및 IgG 항체생산을 현저히(1.5~2.2배), 그리고 10^{-6}M 수은은 20% 정도 증가시켰다(표 4).

Table 4. In vitro effect of $HgCl_2$ on immunoglobulin production from spleen cells[a].

Exp.	Immunoglobulin[b]	$HgCl_2$ (log M)	
		−7	−6
1	IgG	205[c]	121
	IgM	216	119
2	IgG	172	116
	IgM	151	126

a) Spleen cells (2.5×10^6 cell/ml) were cultured with PWM (1 μg/ml) in the presence or absence of $HgCl_2$ for 7 days.
b) Immunoglobulin levels in culture supernatants were determined by ELISA.
c) Each number represents the percentage of immunoglobulin level of control culture with PWM only.

Table 5. Effect of mercury chloride on water consumption in female balb/c mice during a 3-week exposure period[a].

Mercury in Drinking Water (mM)	Water Consumption[b] (ml/mouse/day)	Percentage of Control
0	3.24	100
0.5	1.73	53.4

a) Mercury chloride administration in drinking water.
b) Mean water consumption from 10 mice in a cage.

Table 6. Selected organ weight effect in mercury exposed female Balb/c mice.

	Group[a]	
	Control	Exp
Body Wt (gm)[b]	20.68 ± 0.34	19.60 ± 0.39
Thymus Wt (mg)	60.21 ± 4.01	58.86 ± 3.65
Thymus Wt Index[c]	2.91 ± 0.09	3.01 ± 0.20
Spleen Wt (mg)	132.63 ± 6.51	134.09 ± 3.65
Spleen Wt Index[d]	6.41 ± 0.20	6.84 ± 0.42

a) Ten female Balb/c mice in each group fed DW (control) or 0.5 mM $HgCl_2$ (Exp) for 3 wks. The results are recorded as the mean ± SEM.
b) Body weight after 3 wks exposure to mercury.
c) Thymus weight × 1000 / body weight.
d) Spleen weight × 1000 / body weight.

4. 수은투여가 마우스의 체중증가에 미치는 영향

생후 6주된 Balb/c 마우스를 0.5 mM 수은이 함유된 음료수로써 3주간 노출시키고 노출기간의 경과에 따른 체중변화를 측정한 결과 대조군 마우스는 실험 3주동안 1주당 5% 내외의 지속적인 체중증가를 보였고 실험군 마우스는 1% 내외의 체중증가를 보여 3주 후에는 대조군 20.68 g과 실험군 19.60 g의 체중을 나타냈다.

한편 실험기간 중 수은투여 마우스의 외형적 변화는 관찰할 수 없었으나, 수은투여군 마우스의 음료수 소모량은 대조군 마우스의 약 절반정도 밖에 되지 았았다(표 5).

5. 수은투여가 흉선과 비장의 무게 및 림프조직에 미치는 영향

수은이 면역계에 미치는 대체적인 영향을 알아보고자 수은투여 3주 후에 흉선 및 비장의 무게를 측정하였다. 음용에 의한 3주간의 수은투여는 Balb/c 마우스의 흉선 및 비장의 절대무게에 변화를 일으키지 않았다(표 6).

수은투여 3주후 대퇴골, 흉선, 비장 및 슬와 림프절 등을 적출하여 이들의 조직소견을 광학현미경으로 관찰한 결과 수은투여에 따른 이들 조직의 변화는 없었다. 또한 실험군 마우스의 신장조직에서도 병변을 관찰할 수 없었다.

6. 수은에 의한 혈청 면역 글로불린 농도의 증가

수은투여군 마우스의 혈청 면역 글로불린 농도는 대조군 마우스의 그것보다 약 20% 정도 높았다(그림 3). 특히 혈청 IgE의 증가는 B세포로부터의 IgE 생산에 IL-4가 중요하다는 보고(Coffmann 등, 1986)를 감안할 때 아주 흥미있었다. 따라서 수은투여 마우스에 IL-4에 대한 단클론 항체를 수은투여 하루전 및 일주일 후에 각각 1 mg씩 복강내 투여하고, 이에 대한 대조로 DNP에 대한 단클론 항체를 동일한 방식으로 투여하고 수은투여 3주 후에 혈청 IgM, IgG_1 및 IgE 농도

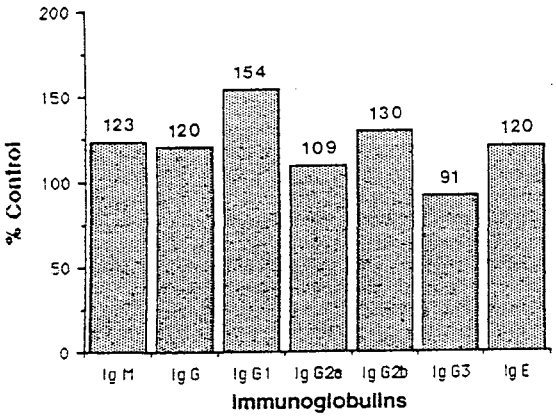

Fig. 3. *Total serum immunoglobulin levels determined by ELISA in female Balb/c mice after 3 week exposure to 0.5mM $HgCl_2$ by drinking. All values refer to pooled sera from 5 mice. Each bar represents the percentage of immunoglobulin level of control sera.*

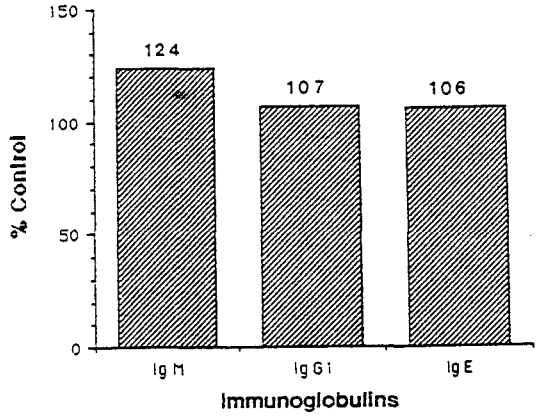

Fig. 4. *Suppressed immunoglobulin levels of female Balb/c mice exposed to 0.5mM $HgCl_2$ for 3 weeks by twice injection i.p. of 1 mg 11B11 (Rat anti IL-4 IgG_1) antibody to experimental mice on day 0 and 7 of mercury exposure. All values refer to pooled sera from 5 mice. Each bar represents the percentage of immunoglobulin level of control (J4-1, Rat anti-DNP IgG_1) sera.*

를 측정하였다. 그 결과 혈청 IgG_1 및 IgE 농도가 거의 정상수준으로 되었으나 혈청 IgM 농도에는 변화가 없었다(그림 4). 이러한 결과들은 수은이 생체내에서 B세포의 polyclonal activation을 유발하며 이에는 적어도 T세포로 부터의 IL-4분비가 관련되어 있음을 의미한다.

7. 수은이 특정항원에 대한 항체반응에 미치는 영향

실험 제14일에 대조군 및 실험군 마우스를 면양적혈구로 면역하고 면역 7일 후에 감작항원에 대한 항체반응을 혈구응집시험으로 측정하였다. 실험군 마우스의 면양적혈구에 대한 총응집소가는 대조군 마우스의 그것과 차이가 없었으나 2-mercaptoethanol 내성 혈구응집소가(7S 항체)는 대조군 마우스의 그것보다 낮았다(표 7). 한편 각 군 마우스의 혈청 IgM 및 IgG 농도를 측정한 결과 실험군에 있어서 혈청 IgM과 IgG 농도는 대조군보다 각각 약 40% 및 14% 높았다(그림 5). 이러한 결과는 수은에 의하여 생체내 면역 글로불린 농도가 증가되더라도 수은노출 중의 개체에 있어서 특정항원에 대한 항체반응은 오히려 증가되지 않을 수 있다는 것을 의미한다.

고 찰

본 실험은 수은이 면역계에 미치는 영향을 밝히고자 이루어졌다. 본 실험에서는 우선적으로 Balb/c 마우스의 수은에 대한 감수성 정도를 슬와 림프절 측정을 확인하였으며, 정상 마우스의 비장세포를 배양하면서 림프구에 대한 수은의 시험관내 독작용을 평가하였고, 수은을 3주간 마우스에 음용시켜 면역계에 대한 수은의 생체내 면역독작용을 일련의 실험을 통하여 구명하고자 하였다.

본 실험결과 수은은 시험관내에서 정상 비장세포의 증식반응을 농도에 의존적으로 억제시켰으며(그림 2), 이미 증식반응이 진행중인 비장세포에도 그 독작용을 나타냈다(표 2와 표 3). 이 억제작용은 사용한 미토겐의 종류에 관계없이 비슷

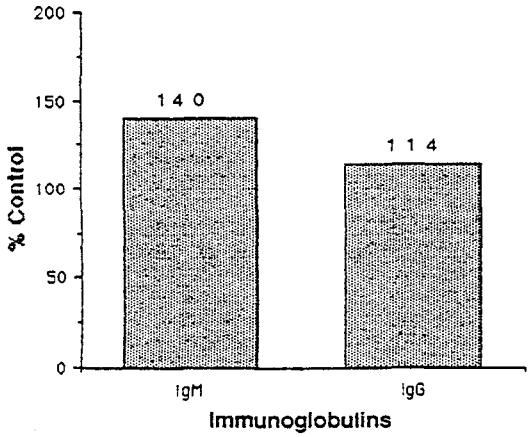

Fig. 5. Total Serum Immunoglobulin levels of female Balb/c mice exposed to $HgCl_2$ through drinking for 3 weeks. Mice were immunized with 10^8 SRBC i.v. on day 14, and total immunoglobulin level of pooled sera from 5 mice was assayed by ELISA on day 21. Data was expressed as the percentage of serum immunoglobulin level from control (DW) mice.

한 정도로 나타났다. 그러나 수은은 PWM으로 유도한 정상 비장세포로부터의 IgM 및 IgG 항체 생산을 항진시켰다(표 5). 실험동물에 수은을 3주동안 음용시켰을 때 체중증가는 대조군 마우스에 비하여 현저히 낮았으나 실험군 마우스의 흉선 및 비장의 무게변화는 없었을(표 6) 뿐만 아니라 신장, 대퇴골의 골수, 흉선, 비장 및 슬와 림프절의 광학현미경상의 조직소견에도 이상이 관찰되지 않았다. 실험군 마우스의 혈청 면역 글로불린 농도는 대조군의 그것보다 20% 이상 높았는데(그림 3) IL-4에 대한 단클론 항체에 의해서 혈청 IgG_1 및 IgE 농도는 거의 정상수준으로 복귀되었다(그림 4). 그러나 수은은 면양적혈구에 대한 항체반응을 항진시키지는 못했다(표 7과 그림 5).

미토겐에 대한 림프구 증식반응은 임파구의 시험관내 반응성을 측정하기 위하여 광범위하게 이용되고 있다. 미토겐에 대한 림프구 증식반응은 비특이적이지만 항원자극시 생체내에서 일어나는 면역세포의 증식반응과 유사한 것이어서 생체

Table 7. In vivo anti-SRBC antibody response of control and mercury exposed mice.

Group[a]	Antibody titer (Log_2, mean ± SEM ; n = 5)[b]	
	THA[c]	MER-HA[d]
Control	6.9 ± 0.3	1.8 ± 0.1
$HgCl_2$	6.8 ± 0.2	1.1 ± 0.1
	($p > 0.05$)	($p < 0.005$)[e]

a) Mice drank distilled water (control) or 0.5 mM $HgCl_2$ for 3 weeks.
b) Mice were immunized i.v. with 10^8 SRBC on day 14 of mercury exposure, and antibody titers were assayed 7 days after immunization.
c) Total-hemagglutinin.
d) 2-Mercaptoethanol-resistant hemagglutinin.
e) $HgCl_2$-exposed group was compared with control by student's t-test.

내 림프구의 활성을 알아보기 위하여 이용되고 있다(Catalona 등, 1975). 본 실험에서 미토겐에 대한 비장세포의 증식반응은 수은농도에 의존적으로 억제되었다. 이러한 결과는 10 μM 및 20 μM 수은이 PHA 및 PWM에 대한 비장세포의 증식반응을 50% 정도 억제시켰다는 보고(Gaworski와 Sharma, 1978)와는 수은이 임파구의 증식반응을 억제시킨다는 점에서 서로 상응한 결과라고 볼 수 있다. 그러나 1 μM 수은이 비장세포의 증식반응을 70% 정도 억제시킨 본 실험결과와는 아주 다르다고 생각한다. 화학물질을 시험관에 첨가하는 세포배양시 화학물질의 세포독성은 세포의 생존능력과 반응성 또는 미토겐의 interference 및 미토겐에 의한 림프구의 자극등을 감소시킬 수 있다(Neher, 1974)는 보고가 있는데 본 실험에서는 10 μM 수은이 비장세포에 대한 세포독작용이 아주 심하였던 것을 관찰할 수 있었다. 증식반응이 유도된 비장세포에 다양한 농도의 수은을 세포배양 3일 중 2일간 또는 1일간 처리하였을 때도 앞에서와 같은 결과를 얻었다. 또한 비장세포를 시험관내에서 2시간 동안 수은에 노출시킨 후 림프구 증식반응을 측정한 결과 앞에서 기술한 3종류의 림프구 증식반응과 아주 비슷한 결과

를 얻었다. 미토겐에 대한 비장세포의 증식반응은 실험에 따라 약간의 변동은 있으나 미토겐의 종류에 따른 증식반응에는 차이가 없었다. 중금속에 대해서 T세포가 B세포보다 약간 더 감수성이 크다는(Koller 등, 1975) 보고를 참작할 때 또 다른 실험을 통하여 세포군에 따른 수은의 독작용을 구명할 필요가 있다고 생각된다.

$HgCl_2$는 시험관 내에서 임파구 증식반응을 억제시켰으나 B세포로부터의 항체생산은 오히려 현저히 증가시켰다. 이는 시험관내에서 수은이 적어도 B세포의 증식반응과 B세포로 부터의 항체생산에 서로 의존하지 않는 경로로 영향을 미친 결과라고 생각된다. 물론 본 실험에서는 한 배양계에 T세포도 공존하기 때문에 수은에 의하여 T세포로부터 유리되는 물질들이 있을 수 있고, 이들이 B세포로부터의 항체생산에 중요한 인자들로 작용하였을 지도 모른다는 문제점을 배제할 수 없다. 세포배양시 T세포 또는 B세포를 각각 순수분리하여 실험을 하면 이러한 문제점을 극복할 수 있을 것이다.

본 실험에서 수은을 마우스에 3주간 투여하였을 때 이들 마우스의 체중증가는 현저히 둔화되었다. 그러나 수은을 투여한 3주째의 체중 증가 정도는 대조군 마우스의 증가율과 비슷하였다. 이는 음료수의 소모량이 전과 같이 계속 감소한 것에 비교하면 이상한 결과였다. 체중의 정상적인 증가는 아주 복잡한 생리학적 기전에 의한 것이기 때문에 수은이 마우스의 음료수 소모량을 감소시킨 결과 체중증가가 둔화되었다고 해석하기 보다는 수은이 음료수 소모량의 감소를 포함하여 생체내에서 기능적 또는 기질적 변화를 초래한 결과 체중증가의 둔화현상이 일어났다고 해석함이 좋을 것 같다.

면역계에 대한 화학물질의 독작용을 평가하는데 있어 흉선 및 비장의 무게변화는 아주 민감한 지표로 인정되는 바(Dean 등, 1982) 수은투여 3주 후 마우스의 흉선 및 비장의 무게를 측정한 결과 대조군과 실험군간의 차이는 없었다. 실험군 마우스의 림프조직의 변화를 알아보기 전에 수은 중독시 표적장기로 알려진 신장(Gritzka와 trump, 1968)의 조직학적 변화를 검사한 결과 병변을 관찰할 수 없었다. 실험군 마우스의 골수, 흉선, 비장 및 슬와 림프절의 조직학적 소견 또한 대조군의 그것과 차이가 없었다. 0.5 mM 농도의 수은을 음료수로써 마우스에 노출시킨 4주째에 신사구체 및 신세뇨관의 경미한 위축이 있었으며 1.0 mM 수은 음용시 2주째에 상기한 것과 유사한 변화를 관찰할 수 있었다는 보고(이재형 등, 1993) 및 만성 수은중독에 의한 신증후군에 있어서 신장의 조직학적 변화를 관찰한 보고(Becker 등, 1962; Bariety 등, 1971; Couser 등, 1975; Tubbs 등, 1982; Henry 등, 1988)를 감안할 때 실험동물을 장기간 또는 많은 양의 수은에 노출시켜야 림프조직에 병변이 발생될 것으로 생각된다.

3주간의 수은노출은 마우스의 혈청 면역 글로불린 함량을 20% 정도 증가시켰다. 여러 연구자들의 보고(Hultman과 Enestrom, 1987; Hultman과 Enestrom, 1988; Mirtcheva 등, 1989; Pietsch 등, 1989)에 의하면 수은에 감수성이 있는 마우스에 수은을 subtoxic dose로 반복 주사하면 혈청 IgG, 특히 IgG_1 및 IgE 농도가 크게 증가된다고 한다. 본 실험에서도 비슷한 결과를 얻었는데 그 증가정도는 상대적으로 낮았다. 이러한 차이는 마우스 strain에 따른 수은에 대한 감수성의 차이(Hultman과 Enestrom, 1988; Mirtcheva 등, 1989; Pietsch 등, 1989)와 수은의 투여 양 및 투여경로의 차이 등에 기인한 것으로 생각된다. Ochel 등(1991)은 수은 투여 마우스의 혈청 IgE 및 IgG_1 농도의 증가에는 TH 세포로부터 생산되는 IL-4가 요구되며 IL-4에 대한 항체를 수은 투여 마우스에 주사하면 혈청 IgE 농도는 완전히, 그리고 혈청 IgG_1 농도는 부분적으로 그 증가가 억제된다고 보고하였는데, 본 실험에서도 비슷한 결과를 얻었다. 그러나 수은 투여 마우스의 혈청 IgM, IgG_{2a} 및 IgG_{2b} 등의 항체 농도가 증가된 본 실험결과 및 타 연구자의 보고(Hultman과 Enestrom,

1987)를 감안하면 수은투여 마우스의 혈청 면역글로불린의 증가에는 다른 기전들도 관여하리라 생각된다. 또한 IL-4는 IFN-γ의 합성은 물론 IFN-γ의 여러 면역학적 작용을 억제한다(Snapper와 Paul, 1987; Bertron 등, 1989; Lohoff 등, 1990; Vercelli 등, 1990)고 알려져 있기 때문에 IL-4에 대한 항체를 수은투여 마우스에 주사한 경우 IFN-γ에 의한 생체내 작용도 고려해야 할 것으로 여겨진다.

한편 수은투여 마우스를 SRBC로 면역하고 SRBC에 대한 혈구응집반응으로 특정항원에 대한 항체 반응을 평가하였던 바 SRBC에 대한 총 응집소가는 대조군의 그것과 차이가 없었으나 7S 항체가는 대조군의 그것보다 유의하게 낮았다. 그러나 실험군 마우스의 혈청 IgM 및 IgG 농도는 오히려 대조군의 그것보다 각각 40% 및 14% 높았다. Prouvost-Danon 등(1981)은 Brown Norway rat에 수은을 반복적으로 투여하였을 때 ovalbumin에 대한 항진된 IgE 항체반응이 비특이적으로 항진된 혈청 IgE 농도의 극히 일부를 점유하였다고 보고하였다. 본 실험결과는 상기한 보고와 어느정도 일치를 보이지만 특이적 항체반응도 항진되었다는 그들의 보고와는 서로 다르다. 이러한 차이는 사용한 실험동물, 수은 투여량 및 투여경로, 항원 및 아주반트(adjuvant)를 이용하여 항원에 대한 항체반응을 촉진시킨 점 등이 서로 다른데 기인하는 것 같다.

요 약

수은($HgCl_2$)이 마우스의 면역계에 미치는 영향을 밝히고자 Balb/c 마우스를 대상으로 시험관내 및 생체내 단계적 시험을 실시하였다. Lipopolysaccharide, pokeweed mitogen 및 phytohemagglutinin 등의 미토겐(mitogen)에 대한 비장세포의 반응성은 수은농도에 의존적으로 억제되었다. 수은에 의한 비장세포의 증식반응억제는 배양기간 중 수은 노출시기에 관계 없었으며 수은 전처치에 의해서도 그 증식반응은 억제되었다. 그러나 수은은 pokeweed mitogen으로 유도한 비장세포의 항체생산은 항진시켰다. 실험동물을 음용에 의하여 수은에 3주간 노출시켰을 때 투여기간 중 체중의 증가는 현저히 둔화되었으나, 흉선 및 비장의 무게, 신장, 골수, 비장 및 슬와 림프절의 병리학적 변화는 유발되지 않았다. 그러나 혈청 면역 글로불린(immunoglobulin) 농도는 현저히 증가되었다. 증가된 혈청 IgG_1 및 IgE 농도는 interleukin-4(IL-4)에 대한 항체투여로 현저히 감소되었다. 수은투여 마우스의 면양적혈구(SRBC)에 대한 항체반응을 측정한 결과 면양적혈구에 대한 총응집소가에는 대조군의 그것과 차이가 없었으나 혈청 IgM 및 IgG 농도는 오히려 대조군의 그것보다 현저히 높았다. 이상의 성적들은 수은의 면역계에 대한 독작용은 그 측정방법에 따라 다를 수 있으며, 수은노출에 따른 림프조직의 병변이 발생하기 전에 면역계의 기능적 변화가 일어나고, 수은에 의한 혈청 면역 글로불린 농도의 증가는 특정항원에 대한 항체반응과는 무관할 수 있는 등 수은이 면역반응에 이상을 초래함을 시사한다.

참 고 문 헌

이재형, 이정상, 김종서, 정영호, 이황호, 고대하, 기노석. Mercury chloride 투여에 의한 마우스의 조직내 수은농도와 LDH 활성치 및 병리학적 변화. 전북의대 논문집 *1993;17:33*

Aten J, Bosman CB, Rozing J, Stijnen T, Hoedemaeker PJ, Weening JJ. *Mercuric chloride-induced autoimmunity in the Brown Norway rat. American J Pathol 1988;133:127*

Bariety J, Gruet P, Laliberte F. Sapin C. *Glomerulonephritis with gamma and beta-1-c globulin deposits induced in rats by mercury chloride. Am J Pathol 1871;65:293*

Becker CG, Becker EL, Maher JF, Schreiner GE. *Nephrotic syndrome after contact with mercury. A report of cases, three after the use of ammoniated mercury. Arch Intern Med 1962;110:178*

Bellon B, Capron M, Cruet E, Verroust P, Vial M-C, Sapin C, Girard JF, Foidart JM, Mahieu P, Druet P. *Mercuric chloride induced autoimmune disease in Brown-Norway rat: sequential search for anti-basement membrane antibodies and circulating immune complexes. Eur J Clin Invest 1982; 12: 127-133*

Bertron. MT, Uhr JW, Vitetta ES. *Synthesis of germline γ1 immunoglobulin heavy-chain transcripts in resting B cells: induction by interleukin 4 and inhibition by interferon γ. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 2929*

Blakley BR and Archer DL. *The effect of lead acetate on the immune response in mice. Toxicol Appl Pharmacol 1981; 61: 18*

Blakley BR, Sisodia CS and Mukkur TK. *The effect of methylmercury, tetraethyl lead, and sodium arsenite on the humoral immune response in mice. Toxicol Appl Pharmacol 1981; 52: 245*

Catalona WJ, Tarpley JL, Potvin C, Chretien PB. *Correlations among cutaneous reactivity to DNCB, PHA-induced lymphocyte blastogenesis and peripheral blood E rosettes. Clin Exp Immunol 19; 327*

Chalopin JM, Lockwood CM. *Autoregulation of autoantibody synthesis in mercuric chloride nephritis in the Brown Norway rat Ⅱ. Presence of antigen-augmentable plague-forming cells in the spleen is associated with humoral factors behaving as auto-anti-idiotypic antibodies. Eur J Immunol 1984; 14: 470*

Cherian MG, Goyer RA. *Methallothiones and their role in the metabolism and toxicity of metals. Life Science 1978; 23: 1*

Clarkson TW. *The pharmacology of mercury compounds. Ann Rev Pharmacol 1972; 12: 375*

Coffmann RL, Ohara J, Bond MW, Carty J, lotnik A, Paul WE. *B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. J Immunol 1986; 136: 4538*

Couser WG, Spargo BH, Stilmant MM, Lewis EJ. *Experimental glomerulonephritis in guinea pig. Ⅱ. Ult rastructural lesions of the basement membrane associated with proteinuria. Lab Invest 1975; 32: 46*

Dean JH, Luster MI, Boorman GA, Leubke RW, Lauer LD. *Application of tumor, bacterial, and parasite susceptibility assays to study immune alterations induced by environmental chemicals. Environ Health Perspect 1982; 43: 81*

Donaldson ML, Gubler CJ. *Biochemical effects of mercury poisoning in rat. Am J Clin Nutri 1978; 31: 859*

Eidinger D, Pross HF. *The immune response to sheep erythrocytes in the mouse. I, A study of the immunological events utilizing the plague technique. Exp Med 1967; 126: 15*

Faith RE, Moore J. Aa. *Impairment of thymus-dependent immune functions by exposure of the developing immune system to 2, 3, 7, 8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD). J Toxicol Environ Health 1977; 3: 451*

Gaworski CL, Sharma RP. *The effects of heavy metals on [3H] thymidine uptake in lymphocytes. Toxicol Appl Pharmacol 1978; 46: 305*

Gleichmann H. *Studies on the mechanism of drug sensitisation: T-cell-dependent popliteal lymph node reaction to diphenylhydantoin. Clin Immun Immunopath 1981; 18: 203*

Gleichmann E, Pals St, Rolink AG, Radaszkewicz T, Gleichmann H. *Graft-versus-host reactions: clues to the etiopathology of a spectrum of immunological diseases. Immun Today 1984; 5: 324*

Goldman M, Philippe D, Gleichmann E. *TH2 cells in systemic autoimmunity: insights from allogeneic diseases and chemically-induced autoimmunity. Immunology Today 1991; 12: 223*

Goyer RA. *Toxic effects of metals. In Amdur MO, Doul l J, Klaassen CD (eds.) Casarett and Doull's Toxicology. 4th ED., Pergamon Press, Inc., New York, 1992. pp. 646*

Grandjean P. *Health significance of metals. In Last JM, Wallace RB (eds.), Maxcy-Rosenau-Last Public Health & Preventive Medicine. 13th ED., Appleton & Lange, Conneticut, 1992: 881*

Gritzka TL, Trump BF. *Renal tubular lesions caused by mercuric chloride. Am J Pathol 1968; 52: 1225*

Hemphill FE, Kaeberle Ml, Buck WB. *Lead suppression of mouse resistance to Salmonella typhimurium Science. 1971; 172: 1031*

Henry GA, Jarnot BM, Steinhoff MM, Bigazzi PE. *Mercury-induced autoimmunity in the MAXX rat. Clin Immunol Immunopathol 1988; 49: 187*

Hirsch F, Couderc J, Sapin C, Fournie G, Cruet P. *Polyclonal effect of $HgCl_2$ in the rat, its possible role in an experimental autoimmune disease. Eur J Immunol 1982; 12: 620*

Hultman P, Enestrom S. *The induction of immune complex deposits in mice by peroral and administration*

of mercuric chloride : strain dependent susceptibility. Clin Exp Immunol 1987 ; 67 : 283

Hultman P, Enestrom S. *Mercury induced antinuclear antibodies in mice : characterization and correlation with renal immune complex deposits. Clin Exp Immunol 1988 ; 71 : 269*

Hurtenbach U, Gleichmann H, Nagata N, Gleichmann E. *Immunity to D-penicillamine : genetic, cellular, and chemical requirements of popliitcal lymph node enlargement in the mouse. J Immun 1987 ; 139 : 441*

Joselow MM, Louria DB, Browder AA. *Mercuralism : Environmental and occupational aspects. Ann Intern Med 1972 ; 76 : 119*

Kamm ller ME, Penninks JM, De Bakker JM, Thomas C, Bloksma N, Seinen W. *An experimental approach to chemically induced systemic (auto)-immune alterations : the spanish toxic oil syndrome as an example. In Mechanisms of Cell Injury : Implications for Human Health (ed. Fowler, B.A.) pp. 175. John and Wiley, New York. 1987 ; 175*

Key MM, Henscel AF, Butler J, et al. *Occupational diseases. A guide to thier recognition. Washington DC, US department of health education and welfare. 1977 ; 370*

Koller LD. *Immunosuppression produced by lead, cadmium or mercury. Amer J Vet Res 1973 ; 34 : 1457*

Koller LD, Exon JH, Roan JG. *Antibody suppression by cadmium. Arch Environ Health 1975 ; 30 : 598*

Koller LD, Exon JH, Roan JG. *Humoral antibody response in mice after single dose exposure to lead or cadmium. Proc Soc Exp Biol Mede 1976 ; 151 : 339*

Koller LD, Kovach S. *Decresed antibody formation in mice exposed to lead. Nature (London) 1974 ; 250 : 148*

Lohoff ME, Marsig, R llinghoff M. *Murine IL-4 antagonized the protective effects IFN on virus mediated lysis of murine L929 fibroblast cells. J Immunol 1990 ; 144 : 960*

Luster ML, Faith RE, Moore J. AS. *Effects of polybrominated biphenyls (PBB) on the immune response in rodents. Environ Health Perspect 1978 ; 23 : 227*

Mailman RB. *Heavy metal. In Guthrie FE, Perry JJ (eds.), Introduction to environmental toxicology. Elsevier North. Holland. Inc., New York, 1980 ; 34*

McLaughlin JF, Teizrow RW, Scott CM. *Neonatal mercury vapor exposure in an infant incubator. Pediatrics 1980 ; 66 : 988*

Mirtcheva J, Pfeiffer C, De Bruijn JA, Jacquesmart F Gleichmann E. *Immunological alterations inducible by mercuric compounds. H-2A acts as an immune response and H-2E as an immune "suppression" locus for $HgCl_2$ induced antinuclceolar autoantibodies. Eur J Immunol 1989 ; 19 : 2257*

Neher GH. *Nicotine-induced depression of lymphocyte growth. Toxicol Appl Pharmacol 1974 ; 27 : 253*

Ochel M, Vohr H-W, Pfeiffer C, Gleichmann E. *IL-4 is required for the IgE & IgG_1 increase and IgG_1 autoantibody formation in mice treated with mercuric chloride. J Immunol 1991 ; 146 : 3006*

O'Gorman MRG, Oger JJ-F. *Regulation of in vitro. PWM-induced IgG secretion in Humans. Cellular Immunol 1989 ; 118 : 435*

Ohi G, Fukuda M, Sit H, Yagyu H. *Effect of methylmercury on humoral immune response in mice under conditions simulated to practical situations. Bull Envion Contam Toxicol 1976 ; 15 : 175*

Pelletier L, Pasquier R, Guettier C, Vial M-C, Mandet C, Nochy D, Bazin H, Druet P. *$HgCl_2$ induced T and B cells to proliferate and differentiate BN rats. Clin Exp Immunol 1988a ; 71 : 336-342*

Pelletier L, Pasquier R, Hirsch F, Sapin C, Druet P. *In vivo self reactivity of mononuclear cells to T cells and macrophages exposed to $HgCl_2$. Eur J Immun 1985 ; 15 : 460*

Pelletier L, Pasquier R, Rossert J, Vial M-C, Mandet C, Druet P. *Autoreactive T cells in mercury-induced autoimmunity : ability to induce the autoimmune disease. J Immunol 1988b ; 140 : 750*

Pietsch P, Vohr H-W, Degitz K, Gleichmann E. *Immunological alterations inducible by mercuric compounds. Ⅱ. $HgCl_2$ and gold sodium thiomalate enhance serum IgE and IgG concentrations in susceptible mouse strains. Int Arch Allergy Appl Immunol 1989 ; 90 : 47*

Prouvost-Danon A, Abadie A, Sapin C, Bazin H, Philippe druet. *Induction of IgE synthesis and Potentiation of anti-ovalbumin IgE antibody response by HgCl2 in the rat. J Immunol 1981 ; 126 : 699*

Roels HA, Gennart JP, Lauwerys R, Buchet JP, Malchaire J, Bernard A. *Surveillance of workers exposed to mercury vapor ; validation of previously proposed biological threshold limit value for mercury concentration in urine. Am J Ind Med 1985 ; 7 : 45*

Rustam H, Burg RV, Hassani SE. *Evidence for a neuromuscular disorder in methylmercury poisoning. Arch Environ Health 1975; 30: 190*

Sapin C, Mandet C, Druet E, Gunther E, Druet P. *Immune complex type disease induced by $HgCl_2$ in Brown-Norway rats: genetic control of susceptibility. Clin Exp Immunol 1982; 48: 700*

Snapper CM. Paul WE. *Interferon-γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regular isotype production. Science 236: 944*

Snodgrass W. Sullivan JB Jr, Rumack BH, Hashimoto C. *Mercury poisoning from home gold processing. JAMA 1929; 246*

Spyker JM. *Assessing the impact low level chemicals on development: Behavioral and latent effects. Fed Proc 1975; 1835: 34*

Stiller-Winker R, Radaszkiewicz T, Gleichmann E. *Immunopatho-logical signs in mice treated with mercury compounds-I. Identification by the popliteal lymph node assay of responder and nonresponder strains. Int J Immunopharmac 1988; 10: 475*

Tubbs RR, Gephardt GN, McMahon JT, Phol. MC, Vidt DG, Barenberg SA, Valenzuela R. *Membranous glomerulonephritis associated with industrial mercury exposure; Study of pathogenic mechanisms. Am J Clin Pathol 1982; 77: 409*

Vercelli D, Jabara HH, Lauener RP, Geha RS. *IL-4 inhibits the synthesis of IFN-γ and induced the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures. J Immunol 1990; 144: 570*

Wide C. *Mercury hazards arising from the repair sphygnomanometers. Br Med J 1409, 1986; 293: 1409*

Wojtalik TA. *Accumulation of mercury and its compounds. J WPCF 1971: 1290: 43*