

[報 文]

유기인계 농약 Chlorpyrifos가 생쥐에 미치는 급성 면역 독성

김 강 석

한국환경정책·평가연구원

Acute Immunotoxic Effects of Chlorpyrifos in CBA Male Mice

Kang Seok Kim

Korea Environment Institute(KEI)

ABSTRACT

Chlorpyrifos, *o,o*-diethyl *o*-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate, is a broad spectrum organophosphate insecticide. The use of chlorpyrifos has been increased more and more as pesticide. But the effects of chlorpyrifos on the immune alterations has not been yet observed. Therefore, we investigated the effects of chlorpyrifos on the immune alterations in CBA male mice.

Chlorpyrifos was administered to mice by a single intraperitoneal injection for the purpose of observing acute effects.

On the one hand to get the information on immunopathologic alterations we observed hematological values, counted total circulating leukocytes and assessed the ratio of lymphocytes and neutrophils from the peripheral blood, measured the ratio of organ/body weight and counted splenic cellularity in CBA male mice which treated chlorpyrifos intraperitoneally. But we could not find any significant immunopathologic alterations statistically by a single intraperitoneal injection. Also, the exposure of chlorpyrifos caused no significant change in the number of PFC/10⁶ spleen cells at any three given doses.

On the other hand a single intraperitoneal injection of chlorpyrifos decreased the lymphocyte proliferation response slightly to ConA or LPS stimulation at a dose of 6 mg/kg b.w.

Administrations of chlorpyrifos reduced mixed leukocyte response (MLR). MLR was decreased moderately at doses of 3mg/kg b.w. and 6mg/kg b.w.

Therefore, all these findings suggest that chlorpyrifos may alter the immune functions acutely, especially by the changes of T lymphocyte activity.

서 론

농약의 인간 및 환경에 대한 유해성은 물질의 개

발 당시에 검토되고 있으며 일정한 유해성 기준을 초과하는 경우에는 규제되고 있다. 그러나, 농약의 모든 유해성을 완벽하게 검토한 후 사용하기는 현실적으로 매우 어렵고 사용 승인을 받은 농약의 경우

에도 오랜 시간이 경과한 후 유해성이 나타날 가능성은 항상 존재한다. 더욱이 농약의 독성 검색에 무한한 원과 시간을 투자할 수는 없으므로 설정된 유해성심사 기준에 국한되어 독성 검색이 이루어지며 그 결과에 따라 승인여부가 결정되고 있다.

이러한 독성 검색에 있어서 면역 기능에 대한 영향은 대부분의 경우 포함되어 있지 않은데 생체 방어 수단인 면역 기능은 인간과 환경 생물의 생존에 매우 중요하므로 농약의 유해성 검토시 면역 독성은 비중있게 검토되어야 할 것이다. 이러한 맥락에서 현재 한국내에서 농업 현장 및 가정용 살충제로서 그 수요가 급증하고 있는 유기인계 농약 chlorpyrifos를 대상으로 생체 면역 기능에 미치는 영향을 검토해 보는 것은 충분한 학술적, 실용적 의미가 있다고 사료된다.

Chlorpyrifos는 o,o-diethyl-o-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl)로서 Dursban이라는 상품명으로 널리 알려져 있는 유기인계 농약이다.

Chlorpyrifos는 살충제로서 흙이나 나뭇잎의 곤충, 풀치림, 잔디밭, 숲 등에 서식하는 곤충 제거 및 가정용 살충제로서 사용되고 있다. Chlorpyrifos는 곤충의 acetylcholinesterase 활성을 저해하여 살충작용을 나타내고 있다. 유기인계 살충제는 일반적으로 소화기, 피부, 호흡기, 눈 등을 통하여 용이하게 체내에 침투되는데 이 물질은 흡입, 경구, 피부흡수 등 여러가지 경로로 체내에 흡수된다. 흡수된 물질은 대사를 받거나 소량의 대사되지 않은 물질은 체내 지방 조직에 축적되기도 한다.

Chlorpyrifos에 의한 중독 증상은 일반적으로 유기인계 중독에서 나타나는 anticholinesterase 활성 때문이며 anticholinesterase에 의한 muscarine 효과, nicotine 효과, 중추신경에 대한 영향 등 다양하다. Chlorpyrifos의 독성에 대하여 살펴보면 실험 동물에 대한 경구 반치사량을 종합하여 볼 때 유기인계 살충제 중 중간 정도의 독성을 갖고 있는 것으로 판단된다.

포유류에 대한 일반 독성을 살펴보면 개 및 랫드의 경우 만성적인 투여에 의한 No-observed-effect-level (NOEL)은 3.0 mg/kg/day, 만성적인 투여에 의한 랫드의 생식 독성의 NOEL은 1.0 mg/kg/day, 만성적인 투여에 의한 랫드의 최기형

The LD₅₀ of chlorpyrifos in experimental animals.

Routes	Animals	LD ₅₀ (mg/kg)	
		male	female
oral	rat	118 ~ 270	96 ~ 174
ihhl	rat	78	
skin	rat	202	1505
oral	mouse	60	
ihhl	mouse	94	
ip	mouse	192	
oral	guinea pig	500	504
sc	guinea pig	100	
oral	sheep	800	
oral	rabbit	1000 ~ 2000	
skin	rabbit	1400	2000
oral	pigeon	10	27
oral	chicken	25.4	63
oral	quail	13.3	
oral	duck	76	
oral	wild bird	5	
oral	goat	500 ~ 1000	

성 NOEL은 15.0 mg/kg/day, 생쥐의 최기형성 NOEL은 10.0 mg/kg/day이며 25 mg/kg/day 용량에서는 태자의 길이가 감소하고 골격의 이상이 나타나는 것으로 밝혀졌다. 생물에 대한 chlorpyrifos의 급성독성은 다음과 같다.

한편, 유기인계의 농약으로서 chlorpyrifos와 똑같은 organophosphorothioate 구조이며 물질의 ethyl기를 methyl기로 치환한 chlorpyrifos-methyl에 생쥐가 노출된 결과 면역 기능에 중요한 역할을 하는 흉선 지수가 상승하였다는 보고가 있다.¹¹⁾ 이러한 사실은 chlorpyrifos 역시 면역계에 영향을 미칠 가능성이 있음을 시사한다고 볼 수 있다.

따라서, chlorpyrifos에 의한 생물의 면역 기능 변화 여부를 확인하는 기초 실험 수행의 필요성이 제기되어 chlorpyrifos 투여가 급성적으로 생쥐의 면역기능 변화에 미치는 영향을 알아보았다.

Chlorpyrifos가 실험 동물의 면역 기능에 미치는 영향을 알아보기 위한 기초 실험으로서 시료가 면역 병리에 미치는 영향과 ConA, LPS에 의한 임파구의 분열능에 미치는 영향 및 이종 비장 세포를 인지하여 분열하는 혼합 임파구 배양시의 분열능에 미치는 영향 등을 알아보았다.

실 험 방 법

1. 실험동물 및 사육

본 실험에서 사용된 CBA 웅성 생쥐는 서울대학교 실험동물 사육장에서 공급받아 최소 4주간 사육장 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육장의 조명은 인공적으로 오전 7:00부터 오후 7:00까지 12시간으로 조절하였으며 온도는 22°C, 습도는 55%로 조절하였다. 사료는 고품사료를 사용하였으며 식용수는 수도물을 사용하였고 사료와 식용수는 제한하지 않았다.

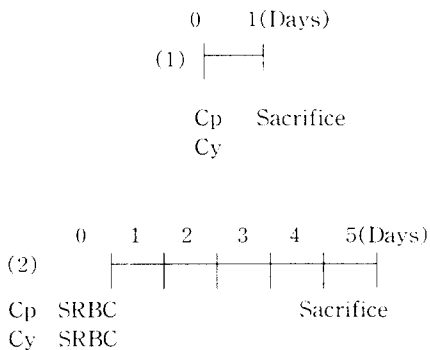
2. Chlorpyrifos 및 Cyclophosphamide (Cy) 시료 용액의 조제 및 투여

Chlorpyrifos(DowElanco, 97.4%, technical grade)는 한농(주)에서 공급받아 사용하였으며 투여 직전 용량별로 DMSO에 녹인 후 생리식염수로 적정 농도가 되도록 조제한 후 체중 kg당 5 ml씩 1회 투여하였다. 이때 DMSO의 최종 농도는 0.4% 이하로 하였다.

Cyclophosphamide (Sigma)는 투여 직전 생리식염수에 20 mg/ml로 용해하여 체중 kg당 5 ml씩 1회 복강내 주사하였으며 SRBC도 생리식염수로 세척 및 조제하여 (2×10^7 /ml) 0.2 ml씩 복강내 주사하였다.

Scheme

Time schedule and routes of administration(ip)



Cp: Chlorpyrifos
Cy: Cyclophosphamide

3. 면역 독성 검색

1) 혈액학적 검사

체중 25~30g 되는 CBA 웅성 생쥐의 안구 정맥 총에서 헤파린 처리된 모세관을 이용하여 채혈한 후 Coulter counter를 이용하여 complete blood cell count를 시행하였다. 측정 내용은 red blood cell, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration 등이며, white blood cell 및 그 중의 lymphocyte와 neutrophil segment의 비율을 측정하였다.

2) 면역 장기 중량의 변화

혈액학적 검사에 사용한 생쥐의 흉선과 비장을 절제하여 그 무게를 달고(g) 각 개체의 체중을 측정하여 무게비(g/g)를 구한 다음 평균값을 내었다.

3) 비장 세포수

적출한 3개의 비장에서 비장 세포를 분리한 후 K-0 또는 K-10 (Table 1) 배지를 가하여 총 6 ml로 맞추고 생리 식염수로 20배 희석후 0.4% trypan blue액으로 동량 희석하고 hemacytometer를 이용하여 cell viability를 측정하고(95% 이상) 비장 세포수를 세었다.

4) 항체 생성 세포수(IgM PFC)의 측정

B 임파구의 항체 생성능을 측정하기 위하여 Cunningham의 liquid slide monolayer 방법²⁾을 이용하여 항체 생성 세포수를 측정하였다. 항체 생성 세

Table 1. Composition of K-0, K-10 media

Component (Final Concentration)	/Liter
RPMI 1640 (Sigma)	10.4 g
L-Glutamine (2 mM, Sigma)	292.0 mg
Sodium Pyruvate (1 mM, Sigma)	110.4 mg
HEPES (10 mM, Sigma)	2.38 g
Sodium Bicarbonate (Sigma)	2.0 g
Nonessential Amino Acid (0.1 mM, Gibco)	10.0 ml
2-Mercaptoethanol (50 uM, Sigma)	1.0 ml
Penicillin/Streptomycin (100 U/ml, Gibco)	10.0 ml

* Sterilization was made by Milipore membrane filtration.
* Composition of K-5 media : K-0 media supplemented with 5% Fetal bovine serum (Gibco)
* Composition of K-10 media : K-0 media supplemented with fetal bovine serum (Gibco)

포는 면양적혈구로 면역화 후 4~5일에 비장에서 최고에 도달하므로 면역 후 4일째에 행하였다. 실험에 사용된 시약 및 기구는 아래와 같다.

면양적혈구 용액의 조제는 Alseber씨 용액(한국 메디아)에 보관된 면양적혈구 3 ml와 PBSS 6 ml를 15 ml conical tube (Falcon)에 가하고 3,000 rpm에서 6분간 3회 원심분리하여 세척하였다. Pellet 1 ml 당 2 ml의 PBSS를 가하여 면양적혈구 용액을 조제하였다. 생리식염수로 800배 희석한 후 hemacytometer를 이용하여 면양적혈구 수를 세고 최종 면양적혈구 용액(2×10^6 /ml)을 조제하였다.

PBSS (Phosphate buffered salt solution)의 조제는 Stock I (Glucose 2.5 g, KH_2PO_4 0.15 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.9 g, Phenol red 0.025 g, DDW 250 ml) 100 ml에 400 ml의 DDW를 가하여 혼합한 후 Stock II (CaCl_2 0.465 g, KCl 1 g, NaCl 20 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, DDW 400 ml) 100 ml와 DDW를 가하여 1 l가 되게 하고 PH를 7.2로 조정하였다. 항체 생성 세포수를 측정할 때 탄소를 함유한 배지는 배양시 CO_2 를 생성하여 chamber내에 기포를 발생시키므로 사용하지 않는다. 따라서, 본 실험에서는 PBSS를 사용하였다.

보체는 Guinea pig serum (Gibco)을 PBSS로 1/4 희석하여 사용하였다. Dual chamber의 제작은 Microscope slide 중앙과 측면에 양면 테이프를 붙이고 그 위에 같은 slide를 포개 붙여 완전히 접착되도록 하였다. 각 chamber의 크기는 26 mm \times 26 mm이며 용량은 53 μ l였다.

비장 세포 부유액은 생쥐의 비장을 절제하여 PBSS 배지를 넣은 homogenizer tube에 절편으로 썰어서 넣고 teplon pestle을 이용하여 비장 세포를 유리시켰다. 200# stainless steel seive를 통과시켜 조직을 제거하고 15 ml conical tube (Falcon)에 담아 원심분리하여 3회 세척 후 0.4% trypan blue액으로 세포수를 세고 8×10^6 /ml, 4×10^6 /ml, 2×10^6 /ml로 조제하였다.

반응액의 조제 및 항체 생성 세포수 측정을 위하여 각 숫자대로 조제된 비장 세포 부유액 20 μ l, 1/4로 희석된 보체와 조제된 면양적혈구와의 동량으로 혼합된 혼합액 80 μ l, PBSS 100 μ l를 가하고 혼합하였다. 이 혼합액을 37°C로 미리 덩혀진 dual chamber에 53 μ l씩 채우고 즉시 40°C로 용해된

paraffin wax-vaselin (1:1)에 chamber의 4면 가장자리를 잠시 닫근 후 꺼내어 밀봉하였다. 37°C에서 1시간 유지하였다가 생성된 항체 생성 세포수를 목측하였다.

5) Mitogen에 의한 임파구 분열능의 측정

임파구는 각종 mitogen에 의하여 blastoid 형태의 세포로 변화되는데 이러한 자극은 임파구들을 분열시키며 이때 lymphokine들이 생성된다.³⁾ 본 실험에서 사용한 mitogen은 ConA와 LPS로서 ConA는 임파구중 미성숙 및 성숙한 T 임파구를 분열시키며 LPS는 B 임파구만을 특이적으로 분열시킨다고 알려져 있다.⁴⁾ 본 실험에서는 세포 분열시에 새로이 합성되는 DNA에 ^3H -thymidine을 incorporation 시켜서 그 방사선량을 측정하였다.⁵⁾ 실제 측정은 scintillation cocktail (PPO 5 g, POPOP 100 mg, toluene 1 l) 5 ml와 filter disc를 scintillation vial에 넣어서 liquid scintillation counter (LKB 1211 Rackbeta, Pharmacia LKB, Finland)를 이용하여 방사선량을 측정하였다.

비장 세포 부유액은 4)항과 동일한 방법으로 K-0 배지를 이용하여 조제하였으며 실험 목적에 따라서 K-0 또는 K-10 배지로 최종 용량으로 맞추고 0.4% trypan blue액으로 동량 희석한 후 hemacytometer를 이용하여 cell viability를 측정하고 (95% 이상) 얼음에 보관하였다.⁶⁾ 임파구 분열능 측정 방법은 다음과 같다.

K-10 배지에 조제된 8×10^6 /ml의 비장 세포 부유액 50 μ l, ConA (5 μ g/ml, Sigma, type III) 또는 LPS (5 μ g/ml, Difco, E. Coli 055 : B5) 50 μ l와 K-10 배지 100 μ l를 96 well flat bottomed plate (Falcon)에 가하여 총 200 μ l로 하였다. 5% CO_2 배양기에서 54시간 배양한 후 25 μ l의 ^3H -thymidine (0.5 μ Ci/well, NEN)을 가하고 18시간 더 배양한 다음 Titertek cell harvester (Flow)로 세포를 glass fiber filter (Flow)에 얻어 방사선량을 측정하였다.

6) 혼합 임파구 배양 반응(MLR)

혼합 임파구 배양 반응은 T 임파구가 적정량의 X-ray 조사(1,000 Rad from 60 kV) 또는 Mitomycin-C 처리로 불활성화된 B 임파구 또는 대식세포의 MHC Class II 분자를 인지하여 분열하는

반응으로서⁸⁾ 반응 세포의 대부분은 primary의 경우 helper T 임파구이며 일정시간 경과후 secondary의 경우는 cytolytic T 임파구라고 알려져 있다. 본 실험에서는 CBA 생쥐의 비장 세포를 반응 세포(responder)로 하고 C57BL/6 생쥐의 비장 세포를 자극 세포(stimulator)로 하여 allogeneic MLR을 행하였다.

CBA 생쥐의 비장 세포 부유액을 임파구 분열능 측정에서와 동일한 방법으로 조제하여 반응세포로 사용하였으며 자극세포의 조제 방법은 C57BL/6 생쥐에서 K-0 배지로 조제한 8×10^6 /ml의 비장 세포 부유액 1 ml 당 Mitomycin-C (0.5 mg/ml) 50 μ l를 가한 후 차광하고 40분간 CO₂ 배양기에서 반응시켰다. 반응 후 즉시 K-10 배지를 3배량 가하여 혼화하여 반응을 중지시켰으며 원심분리를 3회 이상 실시하여 Mitomycin-C를 완전히 제거한 후 배지를 K-10으로 바꾸고 다시 세포수를 8×10^6 /ml로 조정하였다. Mitomycin-C stock은 K-0 배지에 0.5 mg/ml씩 용해하여 멸균 및 차광하여 냉동보관 하였으며 침전물이 생성되지 아니한 것만을 사용하였다.⁹⁾ 혼합 임파구 배양 반응 측정은 다음과 같다.

96 well round bottomed plate (Falcon)에 반응세포와 자극세포를 각각 25 μ l씩 가한 다음 K-10 배지를 가하여 총 200 μ l가 되게 하였다. CO₂ 배양기에서 96시간 배양후 25 μ l의 ³H-thymidine (0.5 μ Ci/well, NEN)을 가하여 24시간 더 배양한 다음 방사선량을 측정하였다.

결과 및 고찰

시료를 투여한 실험 동물은 모두 생존하여 죽지

않았으며 전신적인 독성은 나타나지 않았다. 실험 결과 시료는 면역 억제 작용을 나타내는 것으로 확인되었다.

면역 병리에 미치는 영향으로서 혈액에 미치는 영향, 말초 순환 백혈구에 미치는 영향, 면역 장기 중량에 미치는 영향, 비장 세포수에 미치는 영향, 항체 생성 세포수에 미치는 영향, Mitogen 유도 임파구 분열능에 미치는 영향, ConA 유도 비장 세포 분열능에 미치는 영향, LPS 유도 비장 세포 분열능에 미치는 영향, 혼합 임파구 배양에 미치는 영향을 알아보았으며 각각의 결과는 다음과 같다.

시료를 0.6 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg 용량으로 1회 복강내 투여하고 24시간 후에 혈액에 대한 영향을 확인한 결과 시료를 투여한 모든 농도에 있어서 정상 생쥐에 비하여 적혈구 숫자, 헤모글로빈 양, 헤마토크릿치, 평균 적혈구 체적, 평균 적혈구 혈색소량, 평균 적혈구 혈색소 농도 등에서 특별한 변화는 나타나지 않았다(Table 2). 이로써 시료는 급성적으로 혈액에 대하여 영향을 주지 않는다고 말할 수 있다.

말초 혈액 속의 순환되는 백혈구 수와 그 백혈구 중의 주요 면역 세포의 비율에 미치는 시료의 영향을 알아보기 위하여 시료를 0.6 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg 용량으로 1회 복강내 투여하고 24시간 후에 differential counting을 한 결과 순환 백혈구 수, 임파구의 비율, 호중구의 비율 등에 있어서 모든 투여 용량에서 별다른 변화는 나타나지 않았다(Table 3). 이로써 시료의 투여는 급성적으로 말초 혈액 속으로 순환하고 있는 백혈구의 세포 비율을 변화시키지는 않는 것이 확인되었다.

주요 면역 장기인 흉선과 비장에 대한 시료의 영향을 알아보기 위하여 시료를 0.6 mg/kg, 3 mg/kg

Table 2. Effects of a single intraperitoneal injection of chlorpyrifos on the hematological values in CBA male mice.

Group	RBC(1×10^3 /mm ³)	Hb(g/dl)	HCT(%)	MCV(fl)	MCH(pg)	MCHC(%)
Control	9.3 \pm 1.0	15.5 \pm 0.2	47.5 \pm 0.3	51.3 \pm 0.5	16.5 \pm 0.3	32.8 \pm 0.3
0.6 mg/kg	8.5 \pm 0.2	14.8 \pm 0.4	45.0 \pm 1.7	52.7 \pm 0.9	17.3 \pm 0.3	33.0 \pm 0.6
3 mg/kg	8.7 \pm 0.3	14.9 \pm 0.3	46.3 \pm 1.2	53.7 \pm 0.3	17.3 \pm 0.3	32.3 \pm 0.3
6 mg/kg	8.8 \pm 0.1	15.4 \pm 0.1	46.5 \pm 0.5	52.5 \pm 0.5	17.5 \pm 0.5	33.5 \pm 0.5
CY 100 mg/kg	8.8 \pm 0.2	15.0 \pm 0.5	46.0 \pm 1.0	52.0 \pm 0.6	17.3 \pm 0.2	32.3 \pm 0.3

A single intraperitoneal injection of chlorpyrifos and cyclophosphamide (CY) were made at 24 hours before sacrifice. Blood was collected from retro-orbital plexus and complete blood count was performed by using Coulter counter. Results are the mean \pm SE of 3 different experiments. Each group consists of 5 mice. Abbreviations: RBC: Red Blood Cell, Hb: Hemoglobin, HCT: Hematocrit, MCV: Mean corpuscular volume, MCH: Mean corpuscular hemoglobin MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration

Table 3. Effects of a single intraperitoneal injection of chlorpyrifos on the white blood cell differential count in CBA male mice.

Group	WBC ($1 \times 10^3/\text{mm}^3$)	Lymphocyte (%)	Neutrophil (%)
Control	6.1 \pm 0.6	68.5 \pm 5.5	28.5 \pm 4.9
0.6 mg/kg	5.5 \pm 1.2	69.3 \pm 4.7	28.3 \pm 5.5
3 mg/kg	6.0 \pm 0.3	70.5 \pm 0.5	27.5 \pm 2.5
6 mg/kg	4.6 \pm 1.1	66.7 \pm 2.3	31.3 \pm 2.1
CY 100 mg/kg	*2.6 \pm 0.2	65.0 \pm 5.1	33.7 \pm 4.8

A single intraperitoneal injection of chlorpyrifos and cyclophosphamide (CY) were made at 24 hours before sacrifice. Blood was collected from retro-orbital plexus and white blood cell differential count was performed by using Coulter counter. Results are the mean \pm SE of 3 different experiments. Each group consists of 5 mice. Asterisk: significantly different at * $p < 0.001$ from the control group.

Table 4. Effects of a single intraperitoneal injection of chlorpyrifos on the changes of organ/body weight in CBA male mice.

Group	Thymus(wt.)/ b.w. (%)	Spleen(wt.)/ b.w. (%)
Control	0.11 \pm 0.01	0.34 \pm 0.02
0.6 mg/kg	0.12 \pm 0.01	0.33 \pm 0.01
3 mg/kg	0.13 \pm 0.02	0.33 \pm 0.03
6 mg/kg	0.12 \pm 0.02	0.33 \pm 0.02
CY 100 mg/kg	* 0.08 \pm 0.01	* 0.24 \pm 0.02

A single intraperitoneal injection of chlorpyrifos and cyclophosphamide (CY) were made at 24 hours before sacrifice. Results are the mean \pm SE of 3 different experiments. Each group consists of 5 mice. Asterisks: significantly different at * $p < 0.001$ from the control group.

Table 5. Effects of a single intraperitoneal injection of chlorpyrifos on the changes of splenic cellularity in CBA male mice.

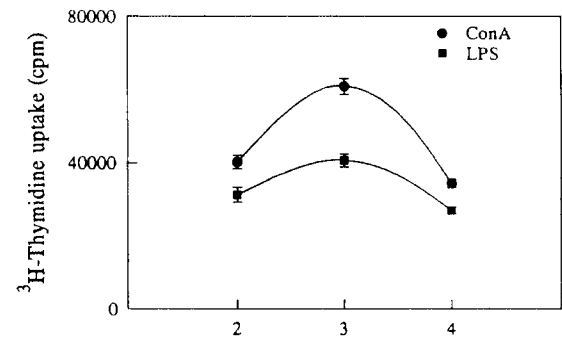
Group	Splenic cellularity (% of Control)
Control	100
0.6 mg/kg	97 \pm 6.5
3 mg/kg	91 \pm 3.5
6 mg/kg	90 \pm 6.8
CY 100 mg/kg	* 60 \pm 5.7

A single intraperitoneal injection of chlorpyrifos and cyclophosphamide (CY) were made at 24 hours before sacrifice. Spleen cells were counted using trypan blue exclusion test. Results are the mean \pm SE of 3 different experiments. Each group consists of 5 mice. Asterisk: significantly different at * $p < 0.001$ from the control group.

Table 6. Effects of a single intraperitoneal injection of chlorpyrifos on the splenic IgM PFC in SRBC immunized CBA male mice.

Group	IgM PFC/ 10^6 spleen cells
Control	2,135 \pm 78
0.6 mg/kg	2,325 \pm 58
3 mg/kg	2,250 \pm 50
6 mg/kg	2,140 \pm 130
CY 100 mg/kg	* 273 \pm 17

A single intraperitoneal injection of chlorpyrifos and cyclophosphamide (CY) were made at 24 hours before SRBC sensitization. Mice were immunized with 4×10^8 SRBC intraperitoneally. IgM PFC of spleen cells were counted at the 4th day after immunization. Results are the mean \pm SE of 3 different experiments. Each group consists of 3 mice. Asterisk: significantly different at * $p < 0.001$ from the control group.

**Fig. 1.** Time course of the ConA or LPS induced splenocyte proliferation.

Normal spleen cells from CBA male mice cultured at 4×10^5 cells/well in 200 μ l K-10 media using 96 well flat bottomed microplate and stimulated with ConA (5 μ g/ml) or LPS (5 μ g/ml). Cultures were incubated 2, 3, 4 days and were pulsed with 0.5 mCi/well ^3H -thymidine for the last 18 hours of incubation. ^3H -thymidine uptake was determined by liquid scintillation counter. Results are the mean \pm SE of 3 different experiments. Spleens were pooled from 3 mice.

kg, 6mg/kg 용량으로 1회 복강내 투여하고 24시간 후에 흉선과 비장을 절개하여 각 개체별로 무게를 달고 각 개체의 체중에 대한 무게비를 내어 면역 장기 중량에 미치는 시료의 영향을 알아 보았다. 그 결과 모든 투여 용량에서 변화는 나타내지 않았다 (Table 4). 이로써 시료는 흉선과 비장의 위축

등을 나타내지 않는 것이 확인 되었다.

비장 면역 세포수에 미치는 시료의 영향을 알아보기 위하여 시료를 0.6 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg 용량으로 1회 복강내 투여하고 24시간 후에 비장의 무게를 달고 비장 세포를 분리한 다음 hemacytometer를 사용하여 분리한 세포 수를 세고 측정된 비장의 무게를 이용하여 보정하였다. 그 결과 모든 투여 용량에서 변화를 나타내지 않았다 (Table 5).

항체 생성에 미치는 시료의 영향을 알아보기 위하여 0.6 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg 용량으로 1회 복강내 투여하고 24 시간 후에 면역적혈구로 생쥐를 감염시킨 후 4 일째에 IgM PFC 수를 측정하였다. 그 결과 변화가 나타나지 않았다 (Table 6). 이로써 시료는 B 림파구의 항체 생성능에 영향을 미치지 않는다는 것이 확인되었다.

Mitogen 유도 림파구 분열능에 미치는 영향으로서 ConA 유도 비장 세포 분열능에 미치는 영향과 LPS 유도 비장 세포 분열능에 미치는 영향을 알아보았다.

우선 Mitogen에 의한 비장 세포 분열능에 미치는 시료의 영향을 알아보기 위하여 0.6 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg 용량으로 1회 복강내 투여하고 24시간 후에 비장 세포를 분리하여 T 림파구만을 분열시키는 ConA (5 µg/ml)를 가한 후 그 분열능을 측정하였다. 비장 세포의 최적 배양 시간을 실험한 결과 3일 배양이 적당하였으며 (Fig. 1) ConA에 의한 분열능은 6 mg/kg 용량에서만 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 따라서, 시료는 일단 T 림파구의 기능에 변화를 주는 것으로 간주 할 수 있다.

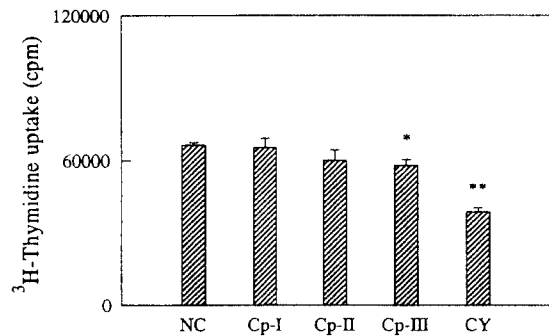


Fig. 2. Effects of a single intraperitoneal injection of chlorpyrifos on the ConA induced splenocyte proliferation.

Spleen cells from CBA male mice were cultured at 4×10^5 cells/well in 200 µl K-10 media using 96 well flat bottomed microplate and stimulated with ConA (5 µg/ml). Cultures were incubated for 3 days and were pulsed with 0.5 µCi/well ³H-thymidine for the last 18 hours of incubation. ³H-thymidine uptake was determined by liquid scintillation counter. Results are the mean \pm SE of 3 different experiments. Each group consists of 3 mice. Asterisks: significantly different at * $p < 0.001$ from the control group.

- NC : Normal Control
- Cp-I : Chlorpyrifos 0.5 mg/kg b. w.
- Cp-II : Chlorpyrifos 3 mg/kg b. w.
- Cp-III : Chlorpyrifos 6 mg/kg b. w.
- Cy : Cyclophosphamide 100 mg/kg b. w.

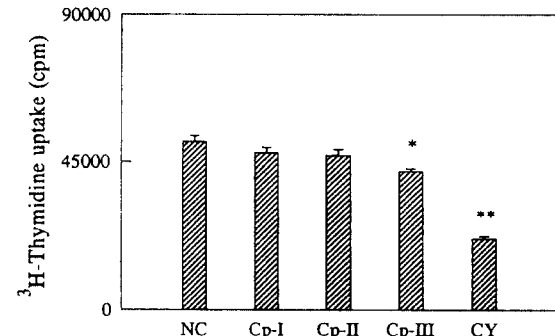


Fig. 3. Effects of a single intraperitoneal injection of chlorpyrifos on the LPS induced splenocyte proliferation.

Spleen cells from CBA male mice were cultured at 4×10^5 cells/well in 200 µl K-10 media using 96 well flat bottomed microplate and stimulated with LPS (5 µg/ml). Cultures were incubated for 3 days and were pulsed with 0.5 µCi/well ³H-thymidine for the last 18 hours of incubation. ³H-thymidine uptake was determined by liquid scintillation counter. Results are the mean \pm SE of 3 different experiments. Each group consists of 3 mice. Asterisks: significantly different at * $p < 0.001$ from the control group.

- NC : Normal Control
- Cp-I : Chlorpyrifos 0.6 mg/kg b. w.
- Cp-II : Chlorpyrifos 3 mg/kg b. w.
- Cp-III : Chlorpyrifos 6 mg/kg b. w.
- Cy : Cyclophosphamide 100 mg/kg b. w.

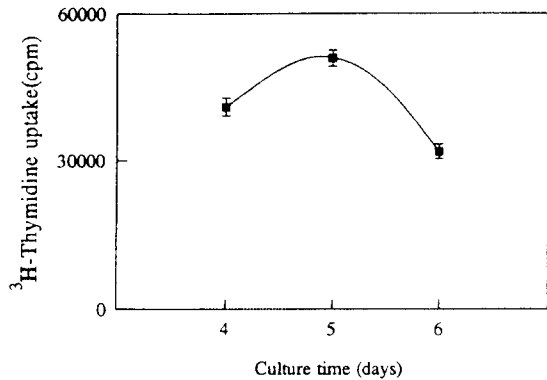


Fig. 4. Time course of the one way allogeneic mixed leukocyte response.

Normal spleen cells from CBA male mice were cultured at 2×10^5 cells/well (responder) in 200 μ l K-10 media stimulated with 2×10^5 cells/well Mitomycin-C inactivated splenocytes from C57BL/6 male mice (stimulator) using 96 well round bottomed microplate. Cultures were incubated for 4, 5, 6 days and were pulsed with 0.5 μ Ci/well 3 H-thymidine for the last 24 hours of incubation. 3 H-thymidine uptake was determined by liquid scintillation counter. Results are the mean \pm SE of 3 different experiments. Spleens were pooled from 3 mice.

LPS 자극에 의한 비장 세포 분열능에 미치는 시료의 영향을 알아보기 위하여 0.6 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg 용량으로 1회 복강내 투여하고 24 시간 후에 비장 세포를 분리하여 B 임파구만을 분열시키는 LPS(5 μ g/ml)를 가한 후 그 분열능을 측정하였다. 비장 세포의 최적 배양 시간을 실험한 결과 3일 배양이 적당하였으며(Fig. 1) LPS에 의한 분열능은 6 mg/kg 용량에서만 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

이중 비장 세포를 인지하여 분열하는 혼합 임파구 배양에 미치는 시료의 영향을 알아보기 위하여 0.6 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg 용량으로 1회 복강내 투여하고 24시간 후에 비장 세포를 분리하여 불활성화시킨 C57BL/6 생쥐의 비장 세포를 가하여 혼합 배양하여 분열능을 측정하였다. 혼합 배양시의 최적 배양 시간을 실험한 결과 5일 배양이 적당하였다(Fig. 4). 혼합 배양에 의한 분열능은 3 mg/kg, 6 mg/kg 용량에서 유의적으로 감소하는 것으로 나

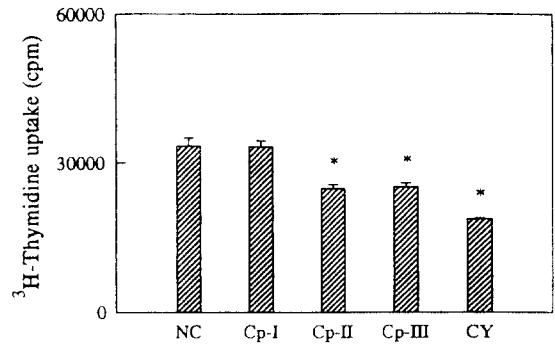


Fig. 5. Effects of a single intraperitoneal injection of chlorpyrifos on the one way allogeneic mixed leukocyte response.

Spleen cells from CBA male mice were cultured at 2×10^5 cells/well Mitomycin-C inactivated splenocytes from C57BL/6 male mice (stimulator) using 96 well round bottomed microplate. Cultures were incubated for 5 days and were pulsed with 0.5 μ Ci/well 3 H-thymidine for the last 24 hours of incubation. 3 H-thymidine uptake was determined by liquid scintillation counter. Results are the mean \pm SE of 3 different experiments. Each group consists of 3 mice. Asterisks: significantly different at * $P < 0.01$ from the control group.

NC : Normal Control

Cp-I : Chlorpyrifos 0.6 mg/kg b.w.

Cp-II : Chlorpyrifos 3 mg/kg b.w.

Cp-III : Chlorpyrifos 6 mg/kg b.w.

Cy : Cyclophosphamide 100 mg/kg b.w.

타났다(Fig. 5).

이상 Chlorpyrifos가 생쥐 T 임파구의 분열능이나 항원 인지 능력 등을 억제하는 것으로 보아 환경생물의 생체 방어 능력을 저하시킬 가능성이 있다고 사료된다.

참고 문헌

- Lai, Z., Song, R., Chang, P., Yang, L., Liu, Y. Subacute and subchronic effects of chlorpyrifos-methyl on immune function of mice. *Weisheng Dulixue Zazhi*, 3(2), 87-89 (1989).
- Cunningham, A.J., and Szenberg, A., Further improvement in the plaque techniques for detecting single antibody forming cells. *Immu*

- nol.*, **14**, 599-600 (1968).
3. Parker, C.W., Biochemical changes taking place in mitogen treated lymphocyte. *Method. Enzymol.*, **150**, 29-82, 1987.
 4. Lis, H., and Sharon, N., Lectins. Their chemistry and application to immunology. The antigen, **4**, 429-529 (1977).
 5. Florentin, I., Maral, J., De Sousa, M., Berardet, M., Hertz, F. and Cloarec, A., Modulation of immune responses in mice by oral administration of niflumic acid. I. *J. Immunopharmacol.*, **11**, 173-83 (1989).
 6. Kleiman, N.J., Friedman, D.L., and Sabato, G.D. Preparation of single cell suspensions from lymphoid organs. *Method. Enzymol.*, **108**, 43-49, 1984.
 7. Swain, S.L., Mitomycin-C. in "Selected methods in cellular immunology" edited Mishell, B. B. and Shiigi, S.M. W.H. Freeman and Company. pp.240-241 (1980).
 8. Battisto, J., and Dustoor, M.M. Allogeneic and autologous mixed lymphocyte reactions. *Method. Enzymol.*, **150**, 83-91, 1987.