

## Di(*n*-butyl) Phthalate가 태자와 신생자 SD Rat의 면역계 발생에 미치는 영향

정승태 · 엄준호 · 박재현 · 정형진 · 황인창 · 김동섭 · 하광원 · 김형수\*  
식품의약품안전청, 국립독성연구소 독성부

### Effects of Di(*n*-butyl) Phthalate on the Developing Immune System of Fetal and Neonatal SD Rats

Seung-Tae Chung, Juno Ho Eom, Jae Hyun Park, Hyung-Jin Chung, In-Chang Hwang,  
Dong Sup Kim, Kwang Won Ha 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 April 20, 2001)  
(Accepted May 7, 2001)

**ABSTRACT** : Some of endocrine disruptors with sexual hormone-like effects have been increasingly reported to be immunotoxic in many species in recent several years. Phthalate esters have possible effects on the endocrine system. Prenatal exposure to di(*n*-butyl) phthalate (DBP) has been reported to impair the androgen-dependent development of the male reproductive tract in rat. Therefore, the immunomodulatory effect of DBP was investigated in the developing immune system of fetal and neonatal Sprague-Dawley rats. Timed-bred pregnant SD rats were given to the doses of 0, 250, 500, and 750 mg DBP/kg · body weight /day by gavage once a day from gestational day (GD) 5 to 18. On GD19 or GD22/postnatal day one (PD1), the dams were euthanized, and the changes in organ weights and thymus phenotypes were examined for their offsprings. At 750 mg DBP/kg · b.w./day in maternal exposure group, GD19 fetuses showed decreases in body weight. The spleen/body weight ratios were reduced in GD19 fetuses from the dams exposed to 500 and 750 mg DBP/kg · b.w./day. There were no significant changes in thymus and spleen cellularities though these cellularities showed a tendency to decrease in a dose dependent way. In the DBP-exposed GD22/PD1 offsprings, the body weights, the relative organ weights and the cellularities did not exhibit alteration. Additionally, the percentages of CD3<sup>+</sup>(CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, and CD4<sup>+</sup>CD8) and CD3(CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, and CD4<sup>+</sup>CD8) thymocyte subsets were not changed in any DBP-treated group. The proliferative responses of splenic T cells to Con A and B cells to LPS were decreased in all DBP-exposed GD22/PD1 offsprings.

**Key Words** : Di(*n*-butyl) phthalate (DBP), Gestational day, CD3, Developmental immunotoxicity

## I. 서 론

자연생태계의 이상이 발견된 지역에서는 수컷이 수컷으로서 특성을 잃고 중성화되는 경향을 나타내는 등 환경오염물질은 생식기계에 이상을 일으켜 번식에 직접적인 영향을 미치거나, 많은 동물의 내분비계에 대사 이상을 일으키거나, 내분비계 활성물질과 유사체로 작용하여 특정 내분비 기능을 증강 또는 저해시키거나, 작용 경로를 달리하

여 내분비계에 장애를 일으킨다는 연구결과가 보고되고 있다(Colborn 등, 1993). 이러한 내분비계 장애 물질은 먹이사슬을 통하여 직·간접적으로 전체 생태계에 미칠 수 있어 환경 호르몬이라고도 불려진다.

특히 플라스틱 가소제로 사용되는 프탈레이트류는 우리 생활환경에 필수적인 폴리비닐클로라이드(polyvinyl chloride), 니트로셀룰로오스(nitrocellulose) 및 폴리비닐아세테이트(polyvinyl acetate)를 포함하는 제품에 유연성을 부여하기 위해서 사용되는 물질로서 어린이 장난감, 일회용 음식포장용기, 의료용구, 화장품 용기 등 각종 생활용품 등의 원료로서 사용되고 있다. Di(*n*-butyl) phthalate(DBP)는

\*To whom correspondence should be addressed  
ABBREVIATIONS: DBP, di(*n*-butyl) phthalate; GD, gestational day; PD, postnatal day

프탈레이트류의 주요 그룹 중의 하나이며, 접착제, 종이코팅, 프린팅잉크, 분무제, 손톱광택제 및 헤어스프레이 등의 성분이다. DBP의 또 다른 주요 용도는 화장품에서 윤활제, 피부 연화제, 용제 등으로 된다. DBP는 유럽에서 1994년에 약 49,000톤이 생산되었고(Long and Meek, 1997), 1987년에 미국에서 11,400톤이 생산되었다(ATSDR, 1990). 이러한 DBP는 생활환경에서 인체에 직·간접적으로 노출되며, 세포를 사용한 *in vitro* 시험에서 estrogen receptor에 결합하는 것으로 알려져 있기 때문에 내분비계장애 추정물질로서 많은 관심을 가져왔다(Jobling 등, 1995; Harris 등, 1997). 한편 DBP는 수컷에서 생식기의 androgen 의존성 발달에 영향을 미치는 보고도 있다(Mylchreest 등, 1998). 이렇듯 성호르몬에 관련하는 DBP는 플라스틱 랩을 통해 식품에 오염되거나 일반적인 환경오염에 의해서 식품으로 들어갈 수 있고, 공기, 음용수 및 식품을 통해서 사람에게 섭취될 수 있는 일일 추정 총사용량은 7.4 µg/kg/day으로 보고되었다(Long and Meek, 1997). DBP가 섭취되는 경우 주로 mono(*n*-butyl) phthalate(MBP)로서 분해되어 위장관계를 통하여 빠르게 흡수되며, 흰쥐에서 혈액에서 MBP의 반감기는 24시간 이내로 알려져 있고(NTP, 1991), DBP 등의 프탈레이트류의 독성은 성숙한 흰쥐보다 미성숙한 신생자 흰쥐에 더 민감한 것으로 보고되었다(Dostal 등, 1988).

흉선은 상피세포, 대식세포, 수상세포 등이 존재하는 흉선기질의 영향하에 미성숙한 흉선세포가 면역기능을 지닌 성숙한 흉선세포로 발달하는 중요한 면역기관이다(Boyd 등, 1993). 독성물질에 노출될 경우의 흉선 위축에 관여하는 초기표적세포 및 조직은 간세포(stem cell)(Fine 등, 1989), 흉선세포(McConkey 등, 1988), 흉선상피(Greenlee 등, 1985; DeWaal 등, 1992), 기질(Kremer 등, 1994)인 것으로 알려져 있다. 흉선으로 이동하는 전구세포의 표면항원 표현형은 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>이다. 마우스와 흰쥐의 경우 흉선세포는 주요 표현형인 CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>로 되기 전에 CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 세포로 성숙한다. 다음 단계로 낮은 CD3 발현수준의 CD3<sup>low</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 세포로 발달되며 긍정선택(positive selection) 후 높은 CD3 발현을 보이는 CD3<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 세포로 되고 궁극적으로 흉선의 주요 성숙세포인 CD4 또는 CD8 세포로 발달한다. 중요한 면역 관련 세포인 보조 T 세포(T helper cell)의 표현형은 CD3<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>이고, 세포용해성 T 세포(cytotoxic T cell)의 표현형은 CD3<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>이다(Boyd and Hugo, 1991).

동물은 발생기에 있어 생명현상이 가장 활발하기 때문에 최근에는 건강의 중요 시발점이자 거의 완성되는 시기로 관심을 모으고 있어, 태교는 물론이고 자궁내의 물리·화학적 환경도 보다 중요시되고 있으며, 특히 발생기의 독성 발현현상 또한 가장 예민하게 받아들여지고 있다. 내분

비계장애물질의 작용에서도 발생기에 미치는 영향이 가장 뚜렷하리라 사려되며 면역계 장기의 발생에도 예외는 아니어서 환경오염물질 등에 의한 내분비에 대한 위해성을 평가하는데 발생면역독성 평가는 불가분의 관계에 있다고 사려된다. 따라서 내분비계장애물질로 추정되는 DBP를 임신중인 어미 흰쥐에 투여하여 태자 및 신생자의 중요한 면역기관인 흉선에서 분리한 세포의 세포표면 표현형의 변화 등을 조사하여 발생단계에서 면역계 발달에 미치는 영향을 보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험물질 재료

Di(*n*-butyl) phthalate(DBP), concanavalin A(Con A), lipopolysaccharide(LPS), phosphate buffered saline(PBS, pH7.4), phenazine methosulfate(PMS), sodium azide는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)에서 구입하였고, RPMI-1640은 Gibco(NY, USA), fetal 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. 그 외의 모든 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

### 2. 실험동물 및 사육조건

실험동물은 식품의약품안전청 국립독성연구소 실험동물 관리실에서 생산한 10~12주령의 Sprague-Dawley(SD)계의 흰쥐를 분양 받아 1주일간 순화시킨 후 사용하였으며, 사육조건은 온도 23±1°C, 상대습도 55±10%, 명암교대 12시간을 유지하도록 하였다. 암컷 흰쥐를 수컷과 2 : 1로 교배시켜 다음날 아침 질액도말법으로 정자가 확인된 암컷을 임신 0일로 정하였다.

### 3. 시험물질 투여

Di(*n*-butyl) phthalate를 corn oil에 적정 농도로 희석하여 사용하였다. 임신된 암컷 흰쥐를 대조군(corn oil 투여)과 DBP 투여용량은 NTP에서 모체나 태자의 사망을 일으키지 않고 수컷새끼의 생식계에 기형을 유발하기 위한 농도를 참고하여 250, 500, 750 mg/kg body weight/day 투

여군으로 나누었고(NTP, 1991), 각 군에는 3-4 마리의 흰쥐를 할당하였다. DBP 및 corn oil은 임신 5일째부터 18일까지 14일간 매일 경구투여하였다(1 mg/kg body weight/day).

#### 4. 체중 및 면역 관련 장기 무게 측정

발생면역독성시험의 평가요소 측정시 임신 19일째(gestational day 19, GD19)의 태자 및 임신 22일째/신생자 1일령(GD22/postnatal day 1, PD1) 흰쥐를 사용하였다. 후자인 신생자 그룹은 GD21 또는 GD22일에 태어났다. GD22/PD1의 신생자들은 이유기간을 최소화하기 위해서 어미와 분리하였다. GD19일의 태자와 GD22/PD1의 신생자의 체중을 측정하였으며, 태자 및 신생자에서 비장, 흉선, 간장을 분리하여 각각의 장기무게를 측정하였다.

#### 5. 흉선 및 비장 세포 분리

GD19 태자 및 GD22/PD1의 신생자에서 적출한 흉선 및 비장을 stainless steel mesh(#100)을 이용하여 비장 및 흉선 세포를 분리하였다. RBC lysis buffer(0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 1.0 mM KHCO<sub>3</sub>, 및 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 7.2)로 흉선 및 비장 세포를 부유시킨 다음 5분간 4°C에 방치하여 적혈구를 제거한 후, FBS가 들어있지 않은 RPMI-1640(100 µg/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin 및 2 mM-glutamine 함유) 배지로 3회 세척하였다. 최종적으로 FBS가 포함되어 있는 RPMI-1640 배지에 비장세포를 부유시킨 후 세포수를 측정하였다.

#### 6. 세포 염색 및 유세포 분석(flow cytometry analysis)

GD19 태자 및 GD22/PD1의 신생자에서 분리된 흉선 세포 부유액을 각 투여군 별로 2개의 1.5 ml 원심분리용 튜브에 각각 1×10<sup>6</sup> cells씩 넣고 원심분리하여 상등액은 버리고 50 µl PBS/2%FBS/0.1% sodium azide(PBSAz)액에 부유시켰다. T림파구의 세포표면 CD 항원의 표현형을 조사하기 위해 흉선 세포 부유액을 PE-conjugated mouse anti-rat CD3, Cy-Chrome™-conjugated mouse anti-rat CD4, FITC-conjugated mouse anti-rat CD8b 단클론 항체를 사용하여 형광 염색하였다. 형광 항체를 넣고 4°C에서 30분간 방치한 후 염색된 세포는 PBSAz으로 두번 세척하였다. 세척된 세포는 0.5% paraformaldehyde로 고정시켜 유세포 분석(flow cytometry analysis)하였다.

형광으로 염색된 세포는 argon-ion laser를 가지고 있는 EPICS XL flow cytometry(Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. T림파구 표면의 CD항

원 표현형의 분포도를 분석하기 위해 CD3 집단을 먼저 설정한 다음 이차적으로 CD4/CD8를 분석하였다.

#### 7. 비장 림파구의 증식능 시험

PD1 신생자의 비장 림파구의 증식능을 측정하기 위해서 96 well flat-bottomed microplate의 각 well에 비장세포 50 µl(2×10<sup>6</sup> cells/ml)와 T cell mitogen인 Con A(2 µg/ml) 또는 B cell mitogen인 LPS(10 µg/ml)를 각각 50 µl 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 72시간 배양하였다. MTS/PMS 20 µl를 첨가하여 다시 3시간 배양한 후 ELISA reader(Molecular Devices Co., USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 8. 통계학적 분석

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

### III. 결 과

임신중인 SD rat에 DBP를 250, 500, 750 mg/kg 용량으로 임신기 5일부터 18일까지 어미에게 경구투여한 후 태자(임신 19일째) 및 임신22일/출생 1일째의 신생자 체중의 변화 및 비장, 흉선, 간장의 중량을 측정하였다. 또한 비장 및 흉선구성 세포수의 변화를 측정하였다. 그리고 태자 및 신생자에서 CD3<sup>+</sup>(CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) 및 CD3<sup>+</sup>(CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) 흉선 아세포군의 분포도에 대한 영향을 측정하였다. 그리고 증식 유도물질인 LPS 와 Con A에 대한 흉선 및 비장세포 증식능 시험을 수행하여 B세포 증식능 및 T세포 증식능을 미치는 DBP의 영향을 알아보았다.

#### 1. 임신기 DBP 투여가 태자(임신 19일째)의 체중, 장기중량, 비장 및 흉선 세포수에 미치는 영향

임신중인 SD계 흰쥐에 DBP를 250, 500, 750 mg/kg 용량으로 임신기 5일부터 18일까지 어미에게 경구투여한 결과 750 mg/kg 투여군에서 유의적인 체중의 감소가 나타났으며, 비장의 상대중량이 500 및 750 mg/kg 투여군에서 유의적으로 감소하였다. 흉선의 상대중량은 500 mg/kg 투여군에서 증가하였으나 다른 투여군에서 유의적인 변화가 나타나지 않았으며 간장의 상대중량은 증가하는 경향이

**Table 1.** Effects of DBP on gestational day 19 rat fetuses whose dams were dosed orally from gestational day 5 to gestational day 18<sup>a,b</sup>

	Dose of DBP (mg/kg/day)			
	0	250	500	750
Body weight (g)	2.11±0.02	2.04±0.05	1.99±0.06	1.88±0.06*
Relative organ weight (mg/g body weight)				
Spleen	0.67±0.03	0.60±0.03	0.51±0.05*	0.46±0.03*
Thymus	1.60±0.10	1.64±0.08	1.74±0.09*	1.65±0.10
Liver	88.2±1.3	92.1±1.7	94.6±0.6	91.4±1.6
Splenic cellularity (×10 <sup>6</sup> )	0.34±0.05	0.25±0.03	0.21±0.05	0.18±0.03
Thymic cellularity (×10 <sup>6</sup> )	5.77±0.53	5.04±0.41	4.67±0.55	4.19±0.47

<sup>a</sup>Results expressed as mean±SE.<sup>b</sup>n = 12 or 13 litters/dosage group.

\*p &lt; 0.05 versus vehicle control.

**Table 2.** Effects of DBP on gestational day 22/postnatal day 1 rats whose dams were dosed orally from gestational day 5 to gestational day 18<sup>a,b</sup>

	Dose of DBP (mg/kg/day)			
	0	250	500	750
Body weight (g)	7.29±0.16	7.40±0.16	7.22±0.16	7.33±0.17
Relative organ weight (mg/g body weight)				
Spleen	2.60±0.36	2.44±0.39	2.26±0.53	2.41±0.56
Thymus	1.96±0.14	1.88±0.12	1.81±0.06	1.69±0.03
Liver	44.6±1.0	46.1±1.2	45.8±1.0	42.6±0.7
Splenic cellularity (×10 <sup>6</sup> )	7.30±1.13	6.95±1.24	8.16±1.34	6.46±1.07
Thymic cellularity (×10 <sup>6</sup> )	18.2±3.0	20.0±4.6	16.5±2.8	15.3±3.3

<sup>a</sup>Results expressed as mean±SE.<sup>b</sup>n = 5 or 6 litters/dosage group.

나타났으나 유의적인 변화는 없었다. 비장 및 흉선 세포수는 용량이 증가함에 따라 감소하는 경향이 있었으나 유의적 변화는 나타나지 않았다(Table 1).

## 2. 임신기 DBP 투여가 신생자(임신22일/출생1일째)의 체중, 장기중량, 비장 및 흉선세포수에 미치는 영향

임신중인 SD 흰쥐에 DBP를 250, 500, 750 mg/kg 용량으로 임신기 5일부터-18일까지 어미에게 경구투여한 후, 임신22일/출생1일째 신생자의 체중 및 비장, 흉선, 간의 중량 변화를 조사한 결과 유의적인 변화는 나타나지 않았다. 또한 DBP는 신생자의 비장 및 흉선세포수에도 유의적인 변화를 초래하지는 않았다(Table 2).

## 3. 임신기 DBP 투여가 태자의 흉선 아세포군에 미치는 영향

세포 염색 및 유세포 분석법으로 태자에서 DBP 투여가 CD3<sup>+</sup>(CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) 및 CD3<sup>-</sup>(CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) 흉선 아세포군의 분포도에 미치는 영향을 측정된 결과 대조군에 비해 DBP 투여군에서 유의적인 변화가 관찰되지 않

**Table 3.** Effects of DBP on gated CD3<sup>+</sup> thymocyte subpopulations of gestational day 19 rat fetuses whose dams were dosed orally from gestational day 5 to gestational day 18<sup>a,b</sup>

	Dose of DBP (mg/kg/day)			
	0	250	500	750
Percentage CD3 <sup>+</sup> cells	41.6±1.2	43.6±0.8	39.1±1.0	42.1±1.0
% CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	3.9±0.4	4.3±0.2	2.9±0.0	2.7±0.0
% CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	80.4±0.6	77.2±2.8	72.5±1.0	80.6±0.5
% CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	5.2±0.2	7.2±1.6	8.6±0.5	6.6±0.2
% CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	10.5±0.2	11.3±1.4	16.1±1.4	10.2±0.7

<sup>a</sup>Results expressed as mean±SE.<sup>b</sup>Pooling of twelve or thirteen fetuses/dosage group.**Table 4.** Effects of DBP on gated CD3<sup>-</sup> thymocyte subpopulations of gestational day 19 rat fetuses whose dams were dosed orally from gestational day 5 to gestational day 18<sup>a,b</sup>

	Dose of DBP (mg/kg/day)			
	0	250	500	750
Percentage CD3 <sup>-</sup> cells	58.3±1.2	56.3±0.7	60.7±1.0	57.9±1.1
% CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	1.0±0.1	1.3±0.3	0.8±0.1	0.8±0.0
% CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	80.1±2.0	75.7±4.3	77.4±0.2	77.7±0.5
% CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	10.0±1.6	12.0±1.6	10.2±0.1	12.6±0.2
% CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	9.0±0.2	11.1±2.4	11.6±0.4	9.0±0.3

<sup>a</sup>Results expressed as mean±SE.<sup>b</sup>Pooling of twelve or thirteen fetuses/dosage group.

**Table 5.** Effects of DBP on gated CD3<sup>+</sup> thymocyte subpopulations of gestational day 22/postnatal day 1 rat pups whose dams were dosed orally from gestational day 5 to gestational day 18<sup>a,b</sup>

	Dose of DBP (mg/kg/day)			
	0	250	500	750
Percentage CD3 <sup>+</sup> cells	60.5±1.3	66.1±1.1	58.4±2.5	61.2±2.5
% CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	14.4±0.4	13.0±0.4	11.4±0.4	13.8±0.1
% CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	76.71±0.1	80.5±0.6	80.2±0.1	77.4±0.7
% CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	4.0±0.2	3.0±0.1	3.9±0.3	4.3±0.2
% CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	5.0±0.3	3.6±0.1	4.5±0.1	4.6±0.2

<sup>a</sup>Results expressed as mean±SE.

<sup>b</sup>Pooling of five or six neonates/dosage group.

**Table 6.** Effects of DBP on gated CD3<sup>+</sup> thymocyte subpopulations of gestational day 22/postnatal day 1 pups rat whose dams were dosed orally from gestational day 5 to gestational day 18<sup>a,b</sup>

	Dose of DBP (mg/kg/day)			
	0	250	500	750
Percentage CD3 <sup>+</sup> cells	39.4±1.3	33.8±1.1	41.6±2.6	38.8±2.5
% CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	0.7±0.2	1.1±0.0	1.0±0.1	0.9±0.1
% CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	82.0±0.8	82.6±0.3	82.2±0.9	81.2±0.3
% CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup>	9.6±1.2	7.5±0.1	9.7±0.8	12.2±0.0
% CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	7.7±0.6	8.8±0.2	7.2±0.1	5.7±0.2

<sup>a</sup>Results expressed as mean±SE.

<sup>b</sup>Pooling of five or six neonates/dosage group.

았다(Tables 3, 4).

**4. 임신기 DBP 투여가 신생자의 흉선 아세포군에 미치는 영향**

신생자에서 CD3<sup>+</sup>(CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) 및 CD3<sup>+</sup>(CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) 흉선 아세포군의 분포도에 대한 DBP의 영향을 측정된 결과 대조군에 비해 DBP 투여군에서 유의적인

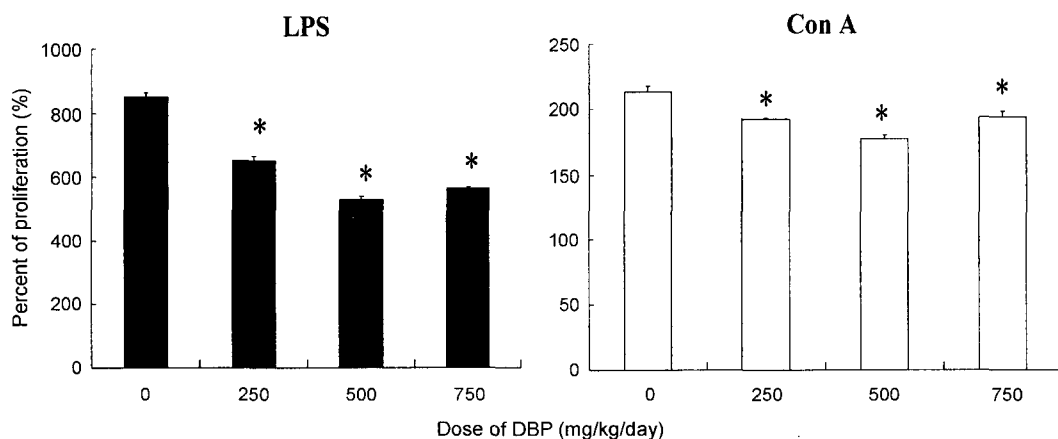
변화가 관찰되지 않았다(Tables 5, 6).

**5. 임신기 DBP 투여가 신생자의 B 및 T 림프구 증식능에 미치는 영향**

DBP를 임신중에 투여한 후 신생자의 비장 세포 증식능 측정시험을 한 결과, 투여용량이 증가함에 따라 LPS 및 Con A에 대한 B 및 T 림프구 증식능이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1).

**IV. 고 찰**

사람과 동물이 각 장기가 발달하는 임신기에 환경에 존재하는 면역독성물질에 노출된 경우, 나타날 수 있는 면역기능의 변화에 대한 연구자료는 극히 제한적인 상태이다. 그러나 실험동물을 사용한 연구에서 임신기에 면역독성물질에 노출되면 그 새끼에서는 완전히 성장한 동물에서 보다 훨씬 현저하고 지속적인 면역기능의 영향을 나타낸다고 보고된 바 있다(Holladay and Luster, 1994). 예를 들면 마우스에서 유기염소계인 chlordane을 임신기간 동안 노출하였을 때 태어난 새끼는 태어난 후 100일 까지 세포매개성 면역반응의 억제가 보고되었다(Spyker-Cranmer 등, 1982; Barnett 등, 1985). 또한 이러한 마우스에서 골수세포 집락수의 변화가 태어난 후 200일까지 유지되는 것으로 나타났다. 특히 골수 세포 집락수에 대한 영향은 이미 완전하게 자란 마우스에게 동일하게 chlordane을 투여하였을 때는 나타나지 않았다. Chlordane과 유사하게, 방향족 화합물(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)인 benzo[a]pyrene을 임신중인 마우스에 투여한 후 태어난 새끼에서도 항체 생성능, 이식편대숙주 반응 및 혼합백혈구 반응이 억제되었다는 보고가 있다(Urso 등, 1984). 이러한



**Fig. 1.** Lymphocyte proliferation responses in gestational day 22/postnatal day 1 rat pups whose dams were dosed orally from gestational day 5 to gestational day 18. \*p<0.05 versus vehicle control. n = 5 or 6 litters/dosage group.

연구 보고들은 면역독성물질의 자궁내 노출이 태자의 면역계 발달에 영향을 줄 수 있고, 또한 이러한 영향이 새끼가 태어나 완전히 자란 후까지 심각하고 지속적으로 이어질 수 있음을 시사하고 있다. 농약, 항진균제, 중금속, 발암성물질인 PAHs 및 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 등 polycyclic halogenated hydrocarbons(PHAH)을 포함하는 환경면역독성물질에 노출된 설치류에서 면역계의 영향에 대한 연구들이 보고된 바 있다(Holladay and Luster, 1994; d'Argy 등, 1989; Comment 등, 1992). 또한 에스트로겐성 화학물질이 면역계의 발달에 영향을 준다는 보고(Holladay 등, 1993)도 있어 임신된 동물이 내분비계 장애물질로 알려진 환경오염물질에 노출되면 태자의 면역계 발달에 영향을 줄 가능성이 제시되었다.

임신된 어미 동물이 다양한 환경 면역독성물질에 노출되었을 때 태자의 흉선 및 간세포(stem cell)가 발생면역독성물질에 대한 민감한 측정지표로 사용될 수 있다고 알려져 있다. 특히 임신기에 면역독성물질에 노출된 후 자란 동물에서 나타날 수 있는 일반적인 현상은 흉선세포수의 감소로 알려져 있다. 또한 태자 흉선세포 표현형의 변화가 발생기 독성물질 노출로 인한 면역독성을 평가할 수 있는 측정항목으로 제시되었다(Holladay and Luster, 1996).

따라서, 본 연구에서는 최근에 내분비계장애물질로 추정되고 있고, 접착제, 종이코팅, 프린팅잉크, 분무제, 손톱광택제 및 헤어스프레이 등의 성분이며, 화장품의 첨가제로도 쓰이는 등 일상생활에서 많이 노출될 수 있는 DBP를 가지고 면역계의 발달에 미치는 영향을 평가하였다. 임신 중인 어미 흰쥐에 임신기 5일부터 18일간 DBP를 250, 500, 750 mg/kg/day로 경구투여하였을 때, GD19 태자와 GD22/PD1 신생자에서 흉선 T임파구의 표면항원 표현형(CD3, CD4, CD8)에 큰 변화가 없었다(Tables 3, 4, 5, 6). 또한 GD19 태자와 GD22/PD1 신생자에서 체중 변화 및 기관 중량 변화 그리고 비장 및 흉선 세포수의 변화를 측정된 결과, GD19의 태자에서 고용량군인 750 mg/kg 투여군에서 유의적으로 체중의 감소가 나타났으며, 비장의 상대중량이 500 및 750 mg/kg 투여군에서 유의적으로 감소하였다. 흉선의 상대중량은 500 mg/kg 투여군에서 증가하였으나 다른 투여군에서 유의적인 변화가 나타나지 않았으며 간장의 상대중량은 증가하는 경향이 나타났으나 유의적인 변화는 없었다. 비장 및 흉선세포수는 용량이 증가함에 따라 감소하는 경향이 있었으나 유의적 변화가 나타나지는 않았다(Table 1). GD22/PD1 신생자에서는 체중 및 기관 중량 그리고 비장 및 흉선세포수에 대한 영향이 관찰되지는 않았으나(Table 2), 비장세포 증식능 측정시험을 한 결과 투여용량이 증가함에 따라 LPS 및 Con A에 대한 B 와 T 림프구 증식능을 감소시키는 것이 관찰되었다(Fig. 1).

태자 발생기는 세포 증식률과 세포, 조직 및 기관의 분화과정에서 활발하여 독성물질에 민감하게 반응하는 시기이므로(Neubert 등, 1987), 본 연구에서는 DBP가 태자 및 생후1일째의 신생자의 면역계 발생에 미치는 영향을 평가하였다. 실험결과 고용량군인 500 및 750 mg/kg/day에서 비장의 상대중량은 유의성 있게 감소하였으며 비장 세포수도 감소하는 경향을 보였으나, 신생자에서는 회복된 결과를 보였으며 비장세포의 증식능 시험결과에서는 투여군에서 증식능을 저하시키는 것으로 보아 면역장기와 구성세포의 기능을 약간 저하시키는 경향이 있는 것으로 보여진다. 비장에 있어 구성 세포수는 투여군에서 용량 의존적으로 감소하는 경향은 있으나 유의성은 없었으며, 흉선 세포의 구성비율에 있어서도 유의성 있는 변화는 없었다. 태자나 신생자에서 특이할만한 독성은 관찰되지 않았으나, DBP의 발생면역독성 가능성에 대한 종합적인 위해성 평가를 위해서는 인간의 면역 발달 시기와 다른 설치류의 면역 발달 시기 등을 고려하여 수유기 및 임신기에 노출된 후 태어난 동물을 일정한 기간 동안 사육한 후 면역독성을 평가하는 추가적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청의 2000년도 내분비계 장애물질 연구사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), (1990): Toxicological Profile for Di-n-butyl phthalate, TP-90-10. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.
- Barnett, J.B., Soderbeg, L.S.F. and Menna J.H. (1985): The effect of prenatal chlordane exposure on the delayed hypersensitivity response of BALB/c mice. *Toxicol. Lett.*, **25**, 173-183.
- Boyd, R.L. and Hugo, P. (1991): Toward an integrated view of thymopoiesis. *Immunol. Today*, **12**, 71-79.
- Boyd, R.L., Tucek, C.L., Godfrey, D.I., Izon, D.J., Wilson, T.J. Davidson, N.J. Bean, A.G.D., Ladyman, H.M., Ladtman, H.M., Ritter, M.A. and Hugo, P. (1993): The thymic environment. *Immunol. Today*, **14**, 445-459.
- 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.
- Comment, C.E., Blaylock, B.L., Germolec, D.R. and Pollock, P.L., Kouchi, Y., Brown, H.W., Rosenthal, G.J. and Luster, M.I. (1992): Thymocyte injury after *in vitro*

- exposure: potential mechanisms for thymic atrophy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **262**, 1267-1273.
- d'Argy, R., Bergman, J. and Dencker, L. (1989): Effects of immunosuppressive chemicals on lymphoid development in fetal thymus organ cultures. *Pharmacol. Toxicol.*, **64**, 33-38.
- DeWaal, E.J., Schuurman, H.-J., Loeber, J.G., Van Loveren, H. and Vos, J.G. (1992): Alterations in cortical thymic epithelium of rats after in vivo exposure 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD): An immunohistological study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **115**, 80-88.
- 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.
- Fine, J.S., Gasiewicz, T.A. and Silverstone, A.E. (1989): Lymphocyte stem cell alterations following perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Mol. Pharmacol.*, **35**, 18-25.
- Greenlee, W.F., Dold, K.M., Irons, R.D. and Osborne, R. (1985): Evidence for direct action of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on thymic epithelium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **79**, 112-120.
- 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.
- Holladay, S.D. and Luster, M.I. (1996): Alterations in fetal thymic and liver Hematopoietic cells as indicators of exposure to developmental immunotoxicants. *Environ. Health Perspect.*, **104**(Supp. 14), 809-813.
- Holladay, S.D., Blaylock, B.L., Comment, C.E., Heindel, J.J., Fox, W.M., Korack, K.S. and Luster, M.I. (1993): Selective prothymocyte targeting by prenatal diethylstilbesterol exposure. *Cell Immunol.*, **152**, 131-142.
- Holladay, S.D., Luster, M.I.: Developmental immunotoxicology. In (1994): *Developmental Toxicology*, 2d ed (Kimmel CA, Buelke-Sam J, eds). New York: Raven, pp. 93-118.
- 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.
- Kremer, J., Gleichman, E. and Esser, C. (1994): Thymic stroma exposed to arylhydrocarbon receptor-binding xenobiotics fails to support proliferation of early thymocytes but induces differentiation. *J. Immunol.*, **153**, 2778-2786.
- Long, G. and Meek, E. (1997): Environmental Health Criteria 189: Di-*n*-Butyl phthalate. World Health Organization, Geneva.
- McConkey, D.J., Hartzell, P., Duddy, S.K., Hakansson, H. and Orrenius, S. (1988): 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) alters intrathymic T-cell development in mice. *Chem. Biol. Interactions*, **74**, 179-193.
- Mylchreest, E., Cattley, R.C. and Foster, P.M.D. (1998): Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(*n*-butyl) phthalate: An antiandrogenic mechanism? *Toxicological Sciences*, **43**, 47-60.
- National Toxicology Program (NTP) (1991): Final report on the reproductive toxicity of di(*n*-butyl) phthalate (CAS No. 84-74-2) in Sprague-Dawley Rats. NYIS Publication No. PB92111996, National Technical Information Service(NTIS), US Department of Commerce, Springfield, VA.
- Neubert, D., Chahoud, I., Platzet, T. and Meister, R. (1987): Principles and problems in assessing prenatal toxicity. *Arch. Toxicol.*, **60**, 238-245.
- Spyker-Cranmer, J.M., Barnett, J.B., Avery, D.L. and Cranmer, M.F. (1982): Immunoteratology or chlordane: cell-mediated and humoral immune responses in adult mice exposed in utero. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **62**, 402-408.
- Urso, P. and Gengozian, N. (1984): Subnormal expression of cell-mediated and humoral immune responses in progeny disposed toward a high incidence of tumors after in utero exposure to benzo(a)pyrene. *J. Toxicol. Environ. Health*, **14**, 569-584.