

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin 노출과 관련한 인체면역기능 변화를 판단할 수 있는 지표치 개발에 관한 연구

허 용* · 김은미 · 유지연¹ · 홍승권¹ · 전성훈² · 김형아³ · 조대현⁴ · 한순영⁴
대구가톨릭대학교 자연대학 산업보건학과, ¹서울대학교 보건대학원, ²울산대학교 의과대학 서울중앙병원,
³가톨릭대학교 의과대학 예방의학교실, ⁴식품의약품안전청 국립독성연구원

Immune-alteration Demonstrated at the Korean Vietnam War Veterans Exposed to Agent Orange

Yong Heo*, EunMi Kim*, Ji-Yeon Yu¹, Seung-Kwon Hong¹, Seong Hoon Jeon²,
HyoungAh Kim³, Dae-Hyun Cho⁴ and Soon-Young Han⁴
Catholic University of Daegu, College of Natural Sciences, Dept. Occupational Health,
¹Seoul National University School of Public Health,
²University of Ulsan College of Medicine Asan Medical Center,
³Catholic University of Korea College of Medicine, Dept. Preventive Medicine,
⁴Korea Food & Drug Administration, National Institute of Toxicological Research

(Received May 27, 2002 / Accepted June 28, 2002)

ABSTRACT: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) has been reported to exert detrimental toxicities on various organ systems including reproductive, cardiovascular, nervous, or dermal system. Immunomodulatory effects of TCDD is thymic atrophy, downregulation of cytotoxic T or B lymphocyte differentiation and activation, which were demonstrated using experimental animals, whereas immunotoxicity in human has not been investigated well. This study was proceeded to evaluate general immunologic spectrum of the Korean Vietnam War veterans exposed to TCDD during their operation, and compare with that of the non-exposed control subjects with similar age. Regarding composition and quantity, immune cells in peripheral blood collected from the TCDD-exposed was not much different from those of the control except decreased red blood cell, hemoglobin and hematocrit level. Furthermore, plasma IgG2, G3, and G4 isotype distribution was similar between two groups, but IgG1 level was significantly lowered in the TCDD-exposed, indicating a TCDD-mediated functional alteration of B cells. Significantly enhanced level of IgE in plasma, a hallmark of dermal or respiratory allergic response, was also observed in the TCDD-exposed compared with that of the control. Elevated generation of IL-4 and IL-10 was resulted from *in vitro* stimulation of T cells with PMA plus ionomycin or PHA, respectively, from the TCDD-exposed in comparison to those of the control, suggesting a skewed type-2 response. In addition, the level of IFN γ , a multifunctional cytokine for T cell-mediated immunity, was lowered in the TCDD-exposed with upregulation of tumor necrosis factor α . The present study suggests that TCDD exposure disturbs immunohomeostasis in humans observed as an aberrant plasma IgE and IgG1 levels and dysregulation of T cell activities.

Keywords : TCDD, Korean Vietnam War Veterans, Immunotoxicity, IgG1, TNF α

서 론

우리나라의 경우 1964년부터 1973년까지 연 인원 약 32만명의 월남전 파병군인들 중 약 25,000여명 정도가 월남전 수행당시 노출되었던 다이옥신과 관련한 건강장애를 가지고

있는 것으로 국가 보훈처에서 잠정 집계하고 있다. 또한 우리나라 비무장지대에서도 1968년부터 1969년에 걸쳐 월남전에 사용됐던 제초제인 Agent Orange가 살포되었음이 확인되어 고엽제, 즉 다이옥신의 인체 및 생태계에 미치는 유해성에 대해 국민적 관심이 집중되고 있는 상황이다. 이처럼 고엽제 노출 후유증이 국내에서도 중대한 사회문제로 인식되면서 국가 보훈처를 중심으로 한 대규모의 역학조사가 예비

*To whom correspondence should be addressed

조사(김정순 등, 1994), 1차조사(김정순 등, 2000)를 거쳐 현재 제 2차 조사가 진행중인 상황이나 고엽제를 통한 TCDD(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin) 노출로 인한 건강장애에 대해서는 국내 학계에서는 김철현 등의 고엽제에 노출된 월남 참전 보훈대상자들의 건강상태에 대한 연구(김철현 등, 1998)등 10편 미만의 논문만이 발표되는 정도로 본격적인 연구는 미미하다. 상기역학조사등에 기초하여 정부에서는 비호지킨림프선암(Non-Hodgkin's lymphoma), 연조직육종암(soft-tissue sarcoma), 염소성여드름(chloracne), 말초신경병(peripheral neuropathy), 만발성피부포르피린증(porphyrria cutanea tarda), 호키킨병(Hodgkin's disease), 폐암(lung cancer), 후두암(laryngeal cancer), 기관암(tracheal cancer), 다발성골수종(multiple myeloma), 전립선암(prostate cancer), 버거병(Buerger's disease) 등을 유병하고 있는 재향군인들을 고엽제후유증환자로 정하고 있으며, 일광과민성피부염, 지루성피부염, 중추신경장애, 허혈성심혈질환 등 21개 질환 유병자를 고엽제후유증환자로 결정하여 치료지원 등을 시행하고 있다(법률 제 6264호, 2000년 2월 3일 개정).

우리나라 TCDD 노출 환자들에게서 발병하고있는 질환이 상지에서 기술한 바와 같이 각종 악성종양, 피부질환, 혈관계 및 신경계 병변(reviewed in Sanders, 1997 & Sweeney 등, 2000) 등 면역체계 변화와 어느 정도 상관관계가 있을 것으로 추정되는 질환들을 감안할 때 이들 고엽제 노출군의 면역기능 평가는 상기질환들의 진행 또는 발생과 관련한 배경기전 연구에 중요한 부분을 차지할 것이다. 특히 다이옥신의 인체 면역독성에 대해 국제적으로도 충분한 연구가 시행되고 있지 못한 현실점에서 유전적 배경의 차이에 따라 면역독성의 중등도가 달라지는 실험동물 연구결과에 바탕하면 미국, 유럽등 인종적으로 다른 국가에서 연구된 면역기능 평가를 우리나라 고엽제 노출자들에게 그대로 적용하기에는 무리가 있다. 또한 면역기능 평가는 고엽제 노출자들의 각종 병원체나 신생물 발생 등에 대한 감수성 정도를 예측하여 볼 수 있는, 즉 숙주 저항성의 지표라는 점에서도 연구의 의미가 있다. 아울러 최근 환경오염을 통해 저농도로 장기간 불특정 다수의 국민들에 다이옥신 노출이 우려되고 있는 점을 감안하면 TCDD 노출의 만성적 면역독성 연구는 향후 환경정책 수립에도 일조를 할 것이다. 이러한 연구의 의의를 가진 본 연구는 월남전에 참전시 고엽제 살포지역에 복무하였던 재향군인들을 대상으로 이들의 말초혈액내 주요세포들의 구성, 혈장내 각종 항체 수준, in vitro T 임파구 활성화 정도 등을 평가하고 이를 비노출 대조군의 수준과 비교하여 다이옥신 노출이 초래하는 만성적인 면역체계 변화를 분석하고자 하였다. 아울러 다이옥신의 독성 특히 면역체계에 미치는 영향에 대한 이해를 넓히기 위해 기존에 발표된

면역독성에 대한 논문들을 종합적으로 분석, 고찰하였다.

재료 및 방법

대상자 선정

가. 고엽제 노출자(Vietnam War Veterans)

서울시내 소재 1개 특수목적 종합병원에 고엽제 후유증 관정을 위해 종합 건강검진차 내원한 사람중에서 월남전 당시 고엽제 살포지역에 복무했던 28명(55.2±4.2세)을 무작위로 선정하였다. 이들 중 24명은 여러 형태의 만성질환을 유병하고있는 사람들이었다(patients; 55.3±4.3세). 이들의 의무기록은 재활의학전문의와 가정의학전문의 2인에 의해 분석되었다.

나. 비노출 대조군(Un-exposed control subjects)

서울시내 소재 1개 종합병원 건강증진센터에 일반건강검진차 내원한 남자중 특별한 만성질환이 없다고 전문의에 의해 진단된 사람들로써 고엽제 노출군의 연령과 5세 이내의 차이가 있는 사람들을 무작위로 28명 선정하였다(Healthy control; 48.0±2.9세). 또한 노출군의 월남파병 복무가 일종의 직업개념에 바탕되었다는 점을 고려하여 현재 직업군인으로 월남전 파병 경험이 없는 사람들 28명을 무작위로 선정하였다(Job-based control; 37.1±8.6세). 이중 연령이 고엽제노출군이나 Healthy control과 비슷한 8명의 경우 연령은 48.8±1.7세였다(Age-matched control).

채혈 및 말초혈액학적 분석

연구대상자들에게 연구목적을 설명하고 동의를 얻은 다음, 약 6 ml의 말초혈액을 EDTA-vacutainer tube에 채혈하고 이중 1 ml을 이용해 Coulter counter(Ac.Tdiff; Beckmancoulter, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 주요 분석항목으로는 총 백혈구수, 적혈구수, 임파구수, 단핵구(monocyte) 수, 과립구(granulocyte)수, 상기 면역세포들의 구성비(%), hematocrit(%), 헤모글로빈 농도(g/dl) 등이었다. 또한 2 ml의 혈액은 2400 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하고 분리된 혈장은 사용전까지는 -80°C 냉동 보관하였다.

임파구 분리 및 활성화 배양

최종적으로 남은 약 3 ml의 혈액에서 Ficoll-paque density gradient centrifugation 방법에 (Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Sweden) 의해 임파구를 분리하였다(Pepper 등, 1968). 분리된 임파구는 DPBS(BioWhittaker, Walkersville, Maryland, USA)로 3회 세척한 후 complete RPMI 세포배양배지(1 mM nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 1% sodium bicarbonate, 2 mM

glutamine, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin-fungizone mixture 첨가)를 사용하여 24 well plate에 well 당 1×10^6 cells을 넣고 활성화 배양을 하였다. 활성화 물질로는 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate; 5 ng/ 1×10^6 cells; Sigma, Saint Louis, Missouri, USA)와 ionomycin(500 ng/ 1×10^6 cells; Sigma)을 혼합하여 사용하거나 PHA (phytohemagglutinin, 5 μ g/ 1×10^6 cells)을 사용하였다(Heo 등, 1998; Jung 등, 1998). cytokine을 측정하기 위한 세포배양액은 배양 후 72시간에 얻어졌는데 72시간 배양이 48시간 배양보다 cytokine 생성 수준이 높음을 예비실험에서 확인하였다 (data not shown). 세포배양액은 사용전까지 -80°C 냉동 보관하였다.

ELISA 방법에 의한 cytokine 정량

세포배양액에 생성된 interleukin-4, interleukin-10, interleukin-13, interferon gamma($\text{IFN}\gamma$), tumor necrosis factor alpha($\text{TNF}\alpha$)을 정량하기 위해 sandwich enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 방법을 사용하였다(Heo 등, 1996). 간단하게 방법을 기술하면 먼저 Immulon IV plate(Dynatech, Chantilly, VA, USA)에 각 cytokine에 대한 capture antibody(2 μ g/ml) 100 μ l/well을 넣고 4°C 에서 overnight 정치시켰다. 다음날 plate자동세척기(Biotek ELx 50, Biotek Instruments, Burlington, VT, USA)로 3회 세척한 뒤 비특이적 부착을 제거하기 위해 10% FBS (fetal bovine serum)-PBS를 (200 μ l/well) 넣고 2시간 실온에서 정치시켰다. 정치후 다시 3회 세척하고 세포배양액과 각 cytokine standard를 넣은 뒤 4°C 에서 overnight 정치시켰다. 다음날 7회 세척하고 detection antibody(1 μ g/ml) 100 μ l/well을 넣고 실온에서 2시간 정치시킨 다음 다시 7회 세척 후 avidin-peroxidase(2.5 μ g/ml) 100 μ l/well을 넣고 1시간 실온에서 정치시켰다. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, Sigma)를 사용하여 발색 후 흡광도를 405 nm에서 Biotek ELISA reader(EL800)로 측정하였다. cytokine별 사용된 antibody pair(capture vs detection, PharMingen, San Diego, CA, USA)는 다음과 같다: IL-4(8D4-8/MP4-25D2), IL-10(JES3-19F1/JES3-12G8), IL-13(JES10-5A2/B69-2), $\text{IFN}\gamma$ (NIB42/4S.B3), $\text{TNF}\alpha$ (MAb1/MAb11). 각 cytokine 별 lower detection limit는 다음과 같다: IL-4(15 pg/ml), IL-10(30 pg/ml), IL-13(15 pg/ml), $\text{IFN}\gamma$ (100 pg/ml), $\text{TNF}\alpha$ (60 pg/ml).

ELISA 방법에 의한 Immunoglobulin 정량

혈장내 존재하는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4의 수준을 정

량화하기 위해 isotype-specific ELISA 방법을 사용하였다(Silvy 등, 1996; Braun 등, 1999). 간단하게 방법을 기술하면 먼저 Immulon II plate(Dynatech)에 각 항체에 대한 capture antibody(2 μ g/ml, PharMingen) 100 μ l/well을 넣고 4°C 에서 overnight 정치시켰다. 다음날 3회 세척한 뒤 비특이적 부착을 막기 위해 1% BSA(bovine serum albumin)-PBS를 (200 μ l/well) 넣고 2시간 실온에서 정치시켰다. 정치 후 다시 3회 세척하고 1% BSA-PBS로 희석한 혈장(IgG1, 1/10000; IgG2, 1/50000; IgG3, 1/5000; IgG4, 1/25000)과 각 IgG isotype standard(Sigma)를 넣은 뒤 4°C 에서 overnight 정치시켰다. 다음날 7회 세척하고 biotin-mouse anti-human IgG(1 μ g/ml, PharMingen) 100 μ l/well을 넣고 실온에서 2시간 정치시킨 다음 다시 7회 세척 후 avidin-peroxidase(2.5 μ g/ml) 100 μ l/well을 넣고 1시간 실온에서 정치시켰다. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid, Sigma)를 사용하여 발색 후 흡광도를 405 nm에서 ELISA reader로 측정하였다. 각 isotype 별 lower detection limit는 다음과 같다: IgG1(5 ng/ml), G2, G3(15 ng/ml), IgG4(1.5 ng/ml). 아울러 IgG subclass 정량에 대한 정도관리는 WHO reference serum(National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, UK)과 Human IgG subclass profile ELISA kit(Zymed Laboratories, South San Francisco, USA)를 이용하여 실시하였다. 혈장내 total IgE는 IBL kit를 사용하여 450 nm에서 정량하였다(ABL, Hamburg, Germany).

통계처리

노출군과 대조군간 각 측정치의 유의한 차이는 SigmaPlot 통계프로그램(SPSS, Chicago, USA)을 이용하여 검토하였다. 일차적으로 자료의 정규분포 여부를 검증한 뒤 single factor ANOVA와 Dunnett's *t*-test 혹은 Kruskal-Wallis ANOVA와 Dunn's test로 유의성을 검정하였다. 필요에 따라 Student's *t*-test 또는 Mann-Whitney test로 추가 유의성 검정을 시행하였고 *p* value가 0.05 이하일 때를 유의한 차이로 판정하였다. 결과에 제시된 각 그림에서 *는 $p < 0.05$ 수준에서 통계적으로 유의한 차이가 있음을 나타낸다.

결 과

고엽제에 노출된 사람들의 유병 양상

고엽제 노출자들의 병원 진단명을 분석하였을 때, 12명이 심혈관계 질환을(43%), 5명이 신경계 질환을(18%), 4명이 피부질환을(14%) 유병하였으며, 이외에도 내분비계, 근골격계 질환이 각 3명(11%)이었고, 종양의 경우는 2명(7%)이었

Table 1. Classification of diseases diagnosed to the TCDD-exposed Vietnam War Veterans

Case Number	Diagnosis *	Disease Classification
SMC1	Lumbar radiculopathy, Hypertension, Diabetes Mellitus	Nervous, Cardiovascular, Endocrine
SMC2	Carvical myelopathy	Nervous
SMC3	Right hemiplegia	Cardiovascular
SMC4	Cerebral infarction, Dementia	Cardiovascular, Neurologic
SMC5	Left hemiplegia, Diabetes Mellitus, Hypertension	Cardiovascular, Endocrine
SMC6	Total hip replacement due to avascular necrosis	Cardiovascular
SMC7	Hypertension, asthma, spinal cord tumor	Cardiovascular, Respiratory, Neoplasm
SMC8	Total hip replacement due to avascular necrosis	Cardiovascular
SMC9	Total hip replacement due to avascular necrosis, Diabetes Mellitus, Hyperlipoidemia	Cardiovascular, Endocrine
SMC10	Rheumatoid arthritis	Musculoskeletal
SMC11	Folliculitis	Dermal
SMC12	Chronic superficial gastritis	Gastrointestinal
SMC13	Degenerative change in C-spine	Musculoskeletal
SMC14	Telangiectasia	Cardiovascular
SMC15	Seborrheic dermatitis	Dermal
SMC16	Peripheral neuropathy	Nervous
SMC17	none	
SMC18	Hypertension	Cardiovascular
SMC19	Back strain	Musculoskeletal
SMC20	none	
SMC21	none	
SMC22	Radiculopathy, Dermographic urticaria	Nervous, Dermal
SMC23	none	
SMC24	Nervus spilus	Dermal
SMC25	Hypertension, Avascular necrosis, Radiculopathy	Cardiovascular, Nervous
SMC26	Lipoma	Neoplasm
SMC27	Eczema nummulare	Dermal
SMC28	Telangiectasia	Cardiovascular

으며 정신과적 질환과 호흡기 질환도 각각 1명이(4%) 있었다. 환자 1인당 평균 1.5개의 질환을 앓고 있었으며 특별한 질환을 앓고있지 않은 정상의 경우가 4명(14%)으로 고엽제 노출자들의 대부분이 만성적으로 경과하는 질환을 앓고 있었다(Table 1). 이들의 월남전 복무 지역은 Nha Trang, Cam Ranh, Qui Nhon, Tuy Hoa, Nin Hoa, Da Nang 등 이었다.

말초혈액세포 구성 분석

말초혈액에서 순환되고 있는 각종 면역세포들의 절대적 수 및 그 세포들의 구성비를 분석하였다. 고엽제 노출군의 평균 총백혈구수는 $6.68 \pm 0.25 \times 10^3 / \mu\text{l}$ 였는데 본 연구대상자 모두 정상범위($4.5 - 11.0 \times 10^3 / \mu\text{l}$; Wyngaarden 등, 1988; 홍창의, 1997)에 속해 있었으며 대조군과의 차이 역시 유의하지 않았다(Fig. 1左). 노출군의 평균 임파구수($2.33 \pm 0.11 \times 10^3 / \mu\text{l}$), 단핵구수($0.50 \pm 0.03 \times 10^3 / \mu\text{l}$), 과립구수($3.84 \pm 0.17 \times 10^3 /$

μl) 역시 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 이들 세포들의 백혈구내 구성비를 살펴보면, 임파구($35.08 \pm 1.22\%$), 단핵구($7.44 \pm 0.35\%$), 과립구($57.47 \pm 1.22\%$)로 대조군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 1右). 이러한 결과는 노출군에서 무소견자 4명을 제외한 24명과 비노출 대조군중 Job-based control에서 연령이 노출군과 비슷한 Age-matched control 8명, 병원대조군인 Healthy control 28명을 상호 비교하였을 때도 마찬가지로 유의한 차이를 발견할 수 없었다(data not shown).

다음으로 말초혈액의 적혈구와 관련된 지표치들을 비교 분석하였다. 이를 위해 적혈구수, 적혈구내 혈색소(hemoglobin) 함유량, 전체 혈액량 중 적혈구가 차지하는 용적을 나타내는 헤마토크리트 검사치를 분석하였는데 이들 수치들은 종합적으로 빈혈 판정을 내리는데 유용하게 이용된다. 노출군의 각 검사치들의 평균값을 보면 적혈구수 $4.44 \pm 0.09 \times 10^6 / \mu\text{l}$, 혈색소 $14.38 \pm 0.33 \text{ g/dl}$, 헤마토크리트 41.77

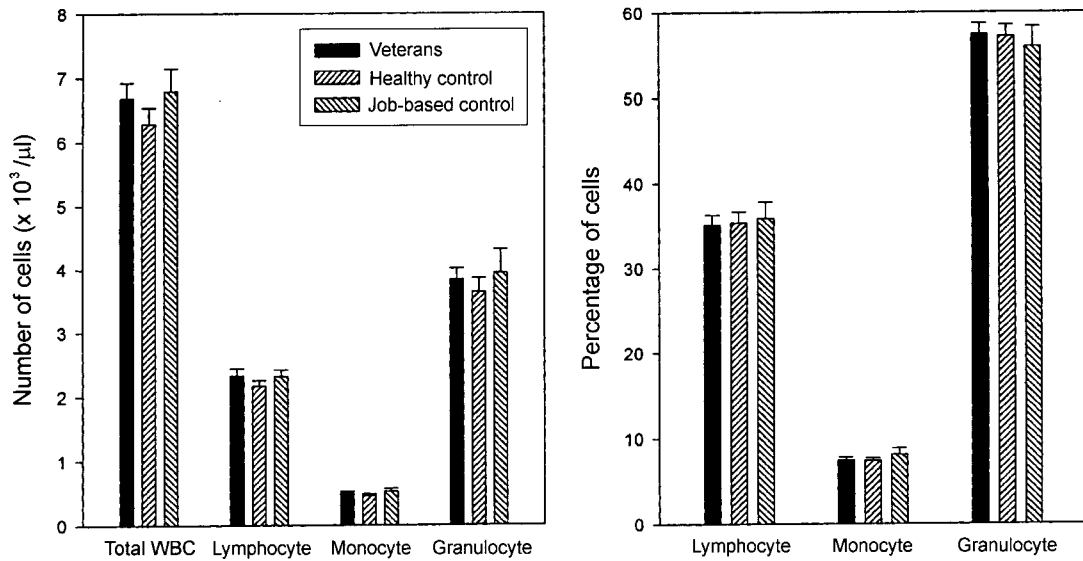


Fig. 1. No significant alteration in white blood cell parameters in the Veterans compared with those of the control subjects.

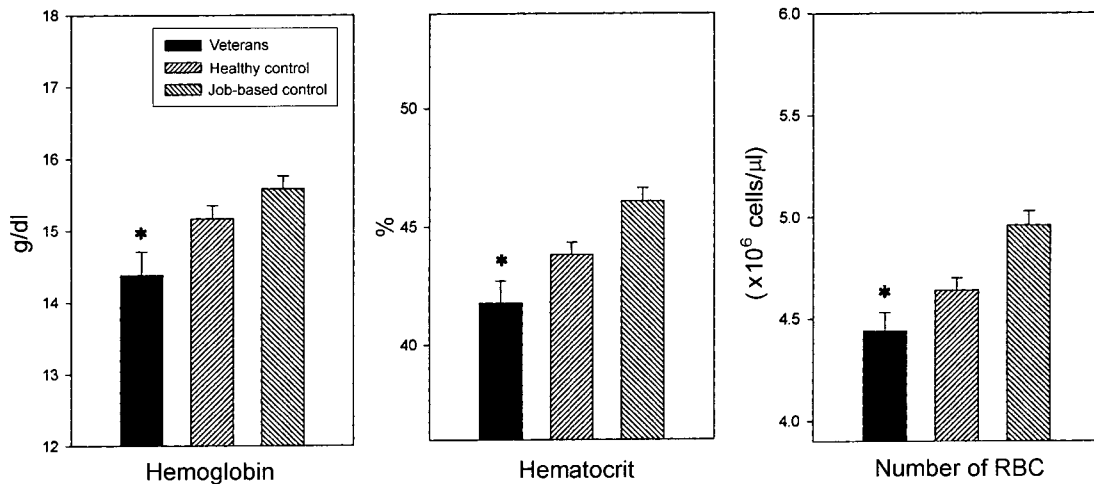


Fig. 2. Lowered red blood cell parameters without significant abnormalities in the Veterans compared with those of the control subjects.

±0.93%로 Healthy control의 $4.64 \pm 0.06 \times 10^6/\mu\text{l}$, $15.17 \pm 0.18 \text{ g/dl}$, $43.81 \pm 0.53\%$ 나 Job-based control의 $4.96 \pm 0.07 \times 10^6/\mu\text{l}$, $15.58 \pm 0.18 \text{ g/dl}$, $46.06 \pm 0.56\%$ 보다 각각 유의하게 낮았다(Fig. 2). 그러나 이들 노출군의 측정치들 각각 모두 정상범위인 $3.9\text{-}6.0 \times 10^6/\mu\text{l}$, $12.0\text{-}18.0 \text{ g/dl}$, $36\text{-}54\%$ 내에 속하고 있어 빈혈 유소견자로 진단된 사람은 없었다.

혈장내 total IgE 수준 비교

고열제에 노출된 사람들에게서 나타나는 여러 가지 피부질환의 과민반응 관련성을 예측해보기 위해 혈장내 total IgE를 측정하였다. IgE-mediated hypersensitivity는 피부 또는

호흡기 과민반응의 면역학적 표식자로 사용되는데 상기 알레르기성 질환 유병시에 혈청내 IgE 수준이 증가함이 일반적 소견이다(Mudde 등, 1995; Peden, 2000). 노출군의 평균 IgE 수준은 1813 ng/ml 로 두 대조군의 IgE 수준(Healthy control, 732 ng/ml ; Job-based control, 617 ng/ml)에 비해 유의하게 높았다(Fig. 3左). 노출군에서 무소견자 4명을 제외한 24명과 비노출 대조군중 Job-based control에서 연령이 노출군과 비슷한 Age-matched control 8명, 병원대조군인 Healthy control 28명을 상호 비교하였을 때도 노출군에서 IgE 수준은 여전히 유의하게 ($p < 0.07$) 높았다(Fig. 3右). 그러나 이러한 IgE 증가와 본 노출군중 피부질환 유소견 여부와

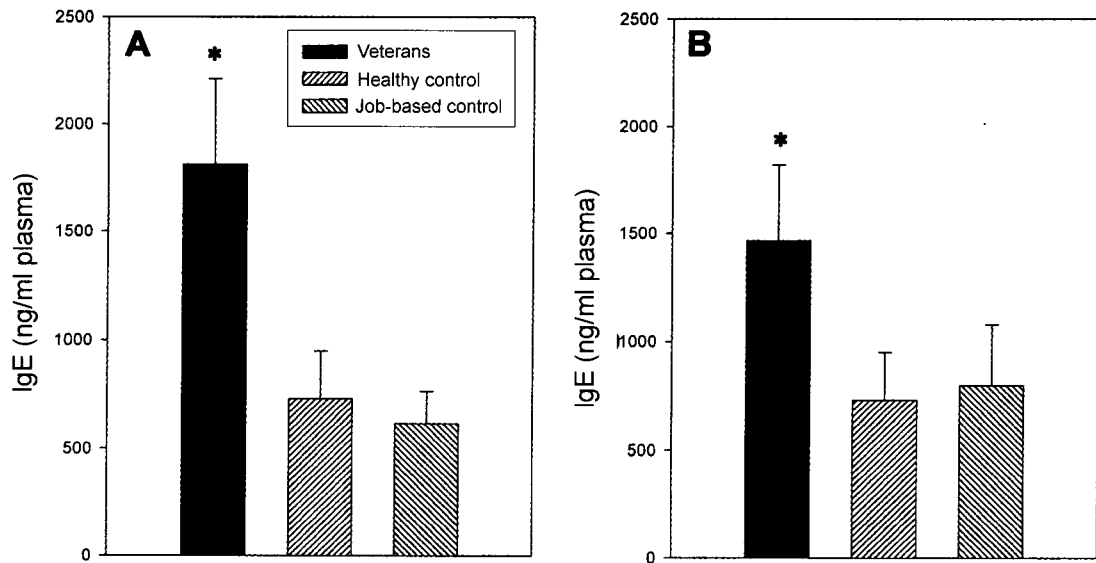


Fig. 3. Elevated plasma IgE levels in the Veterans compared with those of the control Subjects (A) and similar results obtained comparing those Veteran patients with the age-matched controls (B).

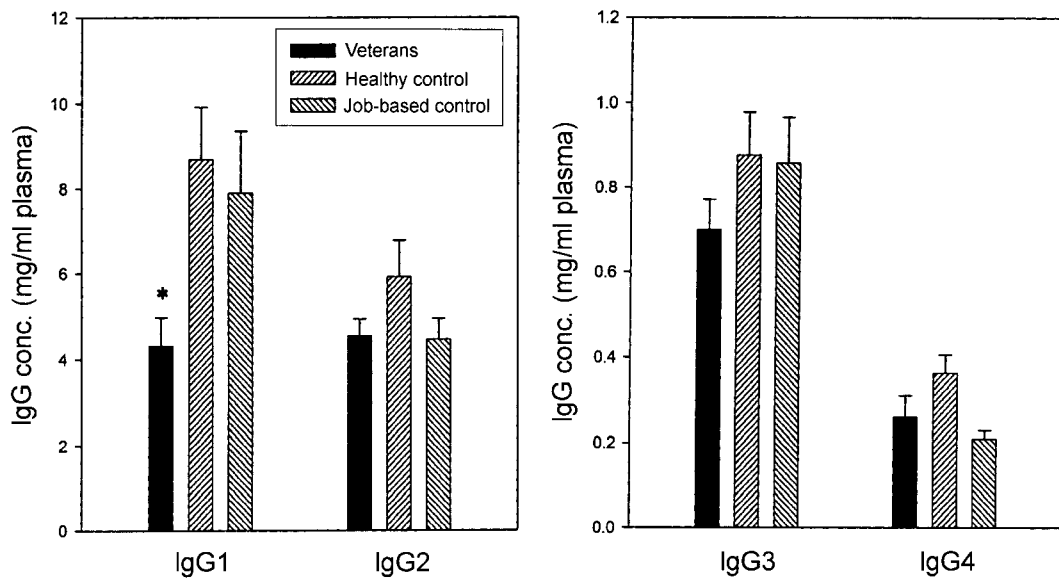


Fig. 4. Slightly lowered IgG levels in the plasma of the Veterans with a significance in IgG1 subclass.

는 상관성을 찾을 수 없었는데, 이는 피부질환 종류가 다양하였고(Seborrheic dermatitis, Dermographic urticaria, Nevus spilus, Eczema nummulare), 또한 각 피부질환별 환자수가 1명씩으로 상관성을 평가하기에는 충분하지 못한 대상자수였기 때문이지 않을까 생각된다.

혈장내 IgG isotype 분석.비교

IgG는 체액면역의 매개체로서 IgG의 혈청내 정상 수준

여부는 일반적으로 정상적인 B 임파구 기능을 의미한다. 그러나 특정 질환과 관련되어 IgG subclass 증감에 대해서는 아직까지 확립되어 있지는 않지만(Jefferis 등, 1990) IgG4를 위주로 IgG1 혹은 IgG3가 알레르기성 과민반응에 어떠한 역할을 수행함이 보고되고 있다(Kimata 등, 1996). 특히 IgG는 세균, 바이러스 등 외부병원체에 대한 인체의 방어능력에 직결되어있는 항체이기에 혈청내 수준을 정량화하여 정상 대조군과 비교하는 것은 중요한 의미를 갖는다.

Total IgG의 수준은 고엽제 노출군의 평균이 9.77 mg/ml로 Healthy control의 15.84 mg/ml, Job-based control의 13.42 mg/ml 보다 낮았으나 유의한 차이는 아니었다(data not shown). 그러나, IgG의 subclass를 비교해 볼 때, IgG1의 수준은 노출군에서 4.29 ± 0.66 mg/ml로 Healthy control의 8.68 ± 1.23 mg/ml과 Job-based control의 7.89 ± 1.44 mg/ml에 비해 유의하게 낮았다(Fig. 4左). 이와 같은 추세는 노출군에서 무소견자 4명을 제외한 24명과 비노출 대조군중 Job-based control에서 연령이 노출군과 비슷한 Age-matched control 8명, 병원대조군인 Healthy control 28명을 상호 비교하였을 때도 비슷해 노출군의 IgG1은 대조군에 비해 여전히 낮은 수준이었다(data not shown). 이는 TCDD에 노출된 근로자들에 있어서 작지만 통계적으로 유의한 혈장내 IgG1 감소가 있었다는 독일에서의 연구 결과와도 일치되는 점이다(Neubert 등, 2000). 반면, IgG1 이외의 subclass 수준에 있어서는 고엽제 노출군과 대조군간 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 4右).

T 임파구 활성화에 따른 cytokine 생성 능력 비교

T 임파구는 우리 몸의 면역체계의 중심에 있는 세포로서 그 기능은 체내에서 일어나는 거의 모든 면역반응에 관계되어 있을 정도로 다양하고 중요하다(Davis 등, 1999; Anfossi 등, 2000). 특히 환경오염물질 대부분이 T 임파구의 기능에 영향을 주어 체액면역 수준을 비정상적으로 항진시키고 세포면역 수준은 저하시키는 특성을 갖고 있음이 발표되면서(Nel 등, 1998; Krieger 등, 1998) T 임파구의 기능에 대한 환경독성인자인 TCDD의 영향에 관심을 갖게 되

었으나 아직까지 사람을 대상으로는 연구가 본격적으로 수행되고있지 않다.

TCDD의 T 임파구에 대한 면역독성을 일차적으로 검색하기 위해 임파구를 말초혈액으로부터 분리하고 이 세포를 in vitro에서 T 임파구 선택적 활성화물질인 PMA와 ionomycin 또는 PHA로 활성화시킨 뒤 생성되는 각종 cytokine을 정량화하여 대조군과 비교하였다. Healthy control의 경우 채혈된 혈액량이 적은 관계로 본 실험은 수행되지 못하였으며 이에 따라 노출군과 Job-based control간 cytokine 생성수준을 비교하였다. IL-4와 IL-13의 생성수준은 PMA와 ionomycin으로 활성화시켰을 때가, IL-10은 PHA로 활성화시켰을 때가 각각 PHA, PMA와 ionomycin의 경우보다 각각 높아 전자의 결과만을 제시하였다(Fig. 5). 일반적으로 대표적 type-2 cytokine으로 알려진 IL-4, IL-10, IL-13 (Mosmann 등, 1989; Paul 등, 1994)중 IL-4와 IL-10의 생성수준은 노출군(IL-4, 140.82 ± 67.49 pg/ml; IL-10, 2421.82 ± 393.67 pg/ml)이 대조군(IL-4, 45.34 ± 12.35 pg/ml; IL-10, 1864.78 ± 45.53 pg/ml)보다 높았다. 그러나 IL-4의 경우는 통계적으로 유의한 차이는 아니었으며 또한 IL-13은 노출군과 대조군 모두 생성수준이 비슷하였다(Fig. 5). type-1 cytokine으로 알려진 $IFN\gamma$ 는 PHA로 활성화시켰을 때가, TNF α 는 PMA와 ionomycin으로 활성화시켰을 때가 생성수준이 각각 PMA와 ionomycin, PHA의 경우보다 각각 높아 전자의 결과만을 제시하였다(Fig. 6). 고엽제 노출군의 T 임파구에서 생성된 $IFN\gamma$ 수준은 11164 ± 4103 pg/ml로 대조군의 25965 ± 4539 pg/ml보다 $p < 0.057$ 수준에서 유의하게 낮았으나(Fig. 6 左), 반면 TNF α 는 노출군에서 8250 ± 1877

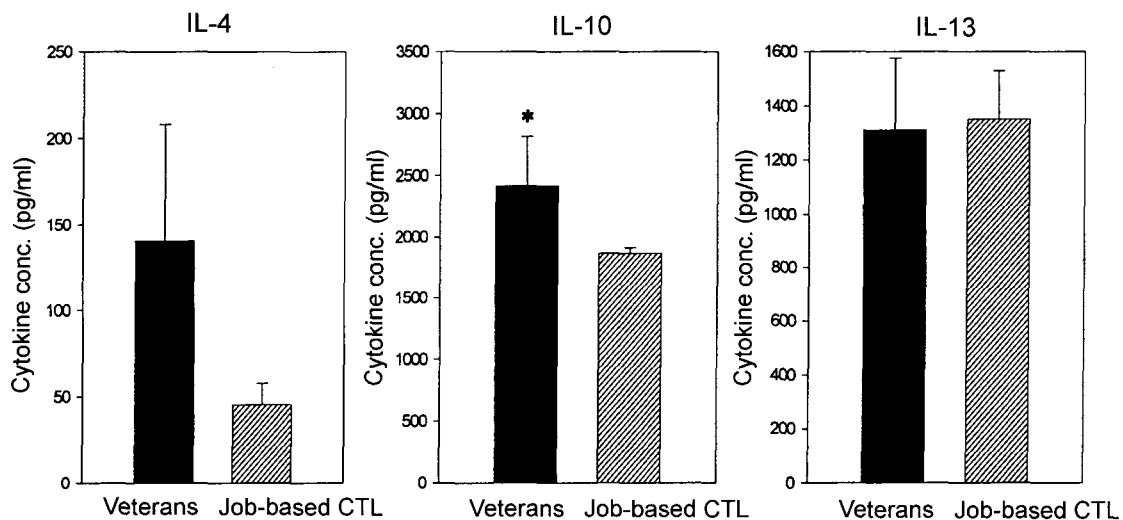


Fig. 5. Upregulatory production of IL-4 and IL-10 from T cells obtained from the Veterans and stimulated with PMA plus ionomycin (IL-4 and IL-13) or PHA (IL-10) for 72 hours.

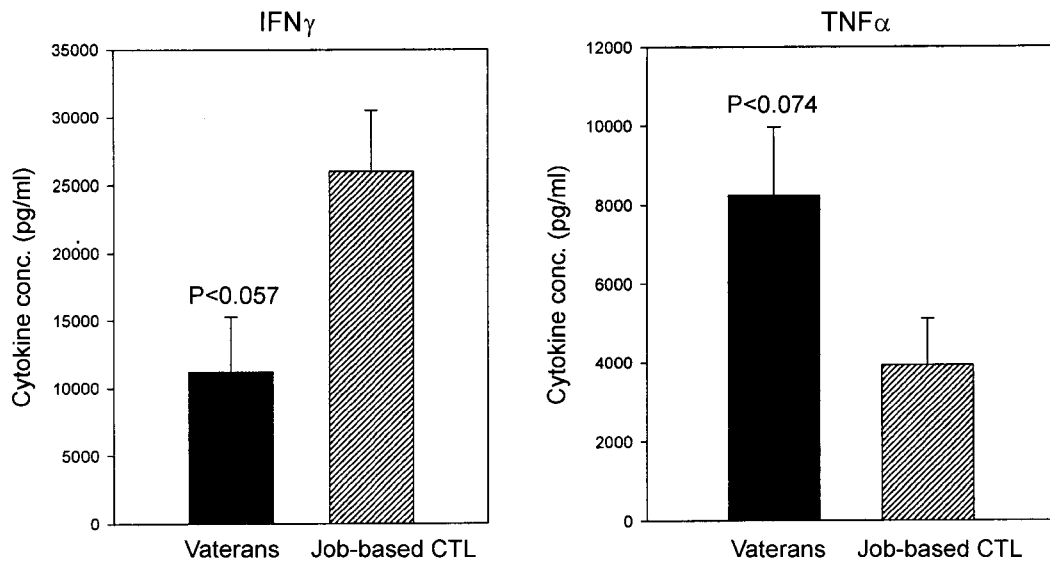


Fig. 6. Downregulatory production of IFN γ and upregulation of TNF α from T cells obtained from the Veterans stimulated with PHA and PMA plus ionomycin, respectively.

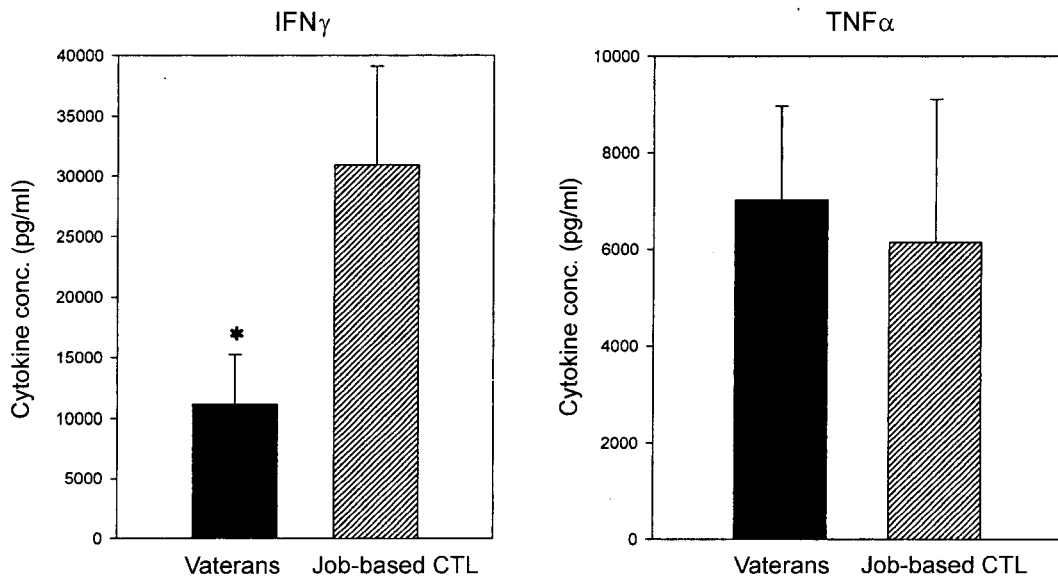


Fig. 7. Significantly lowered production of IFN γ in the Veterans comparing that of the Veteran patients with the age-matched controls.

pg/ml로 대조군의 3939 ± 1172 pg/ml보다 $p < 0.074$ 수준에서 유의하게 높은 생성수준을 보였다(Fig. 6右). 이러한 IFN γ 와 TNF α 의 생성수준의 차이는 노출군에서 관련질환 무소견자를 제외하고 Job-based control에서 연령이 노출군과 비슷하지 않은 사람들을 제외한 Age-matched control과 비교하였을 때도 비슷한 결과를 얻었는데(Fig. 7), TNF α 의 경우 두 군간의 차이는 무시할 정도로 줄어들었는데 이는 연령이 혼

란변수로 작용하였을 가능성을 추측케하는 결과이다.

고 찰

고엽제 또는 다이옥신 노출이 인체의 면역체계에 미치는 급·만성적 영향에 대해서는 아직까지 국내에서는 발표된 바가 없으며 1차적으로 고엽제 노출 월남전 재향군인들의 전

반적 면역기능을 평가한 본 연구가 처음이라는 의미를 갖고 있다. 따라서 본 고찰에서는 우선 다이옥신 노출이 인체의 면역체계에 미치는 독성에 대한 주요 연구결과들을 소개함으로써 학계에서는 아직 TCDD의 인체 면역독성에 대해 공통된 견해를 설정하지 못하고 있는 점을 드러내고자 한다. 1976년 이탈리아의 Seveso에서 발생하였던 trichlorophenol 제조제 공장 폭발사고(Bertazzi 등, 1998), 독일 BASF trichlorophenol 생산공장에서 1953년 발생한 다이옥신 노출 사고(Zober 등, 1994), 월남전 파병중 Agent Orange 살포 작전에 참여하였던 미공군 재향군인들에 대한 면역기능 조사(Michalek 등, 1999) 등 노출후 부터 연구시점까지의 기간이 본 연구대상이 되었던 우리나라 월남전 재향군인들의 노출후 연구시점까지 시간인 약 30년과 비슷한 대상집단에 대한 연구 결과를 중심으로 분석하였다.

Environmental Exposure Episodes

가. 미국 Missouri 주민 연구

41명의 TCDD 노출 거주민을 대상으로 한 연구에서 TCDD의 지방조직내 농도가 높을수록 cytotoxic T cell 및 CD3⁺ total T cell의 말초혈액내 상대적 분포 및 절대적 숫자, 그리고 혈청내 IgA의 수준은 증가하였으나 helper T cell의 분포 및 숫자에는 변함이 없음을 보고하였다. 또한 Con A(concanavalin A), PHA, PWM(pokeweed mitogen) 등의 in vitro 임파구 활성화물질을 사용한 결과 임파구증식 정도와 TCDD 농도와는 상관관계가 없었다(Webb 등, 1989). 반면 Quail Run의 TCDD 노출군 152명과 비노출군 151명을 대상으로한 연구에서는 (Hoffman 등, 1986; Evans 등, 1988) 말초혈액내 helper T cell 비율 및 helper T cell/cytotoxic T cell의 비가 비노출군에 비해 노출군에서 감소하였으며 흉선의 상피조직에서 유래하며 T 임파구의 분화에 관여하는 Thya-1 단백질의 수준역시 감소함을 발표하였다.

나. 이탈리아 Seveso 주민 연구

1976년 trichlorophenol 제조제 공장 폭발로 인한 TCDD 노출 6년 후 어린이들을 대상으로 시행한 연구에서 노출된 어린이들의 말초혈액내 임파구 수, 혈청내 보체수준이 증가되었으나 이들 어린이들에 있어서 특별한 건강장애는 없었음이 보고되었다(Mocarelli 등, 1986 & 1991). 또한 PHA 및 PWM를 이용한 in vitro 임파구증식 역시 노출 어린이들에 있어서 증가됨이 보고되었다.

다. 월남전 참전 Operation Ranch Hand unit 미 공군 재향군인에 대한 연구

1961년부터 1975년까지의 월남전 동안 미 공군은 약 7천 2백만 리터의 고엽제를 살포하였고 이 중 TCDD가 오염된 것으로 추정되는 Agent Orange는 약 60%를 차지한다. 이

론적으로 약 230 kg의 TCDD가 남부 베트남 지역 환경에 살포되었음이 추정되고 있다(Kramarova 등, 1998). 약 670명의 재향군인들의 면역기능을 평가한 1992년 논문에 의하면(Wolfe WH *et al.*, 1992) 말초혈액 면역세포 구성, 혈청 중 IgM, IgG, IgA 수준, PHA를 이용한 임파구 증식, natural killer cell 기능 등에 있어서 다이옥신 노출과 관련된 유의한 변화를 관찰하지 못하였다. 단지 이론적으로 산출한 노출 초기 다이옥신 수준과 혈청중 IgA 증가가 유의한 상관관계를 보였을 뿐이다. 이후 952명의 노출군과 1281명의 대조군을 대상으로한 추구조사에서는(Michalek 등, 1999) 저농도 노출군에서 B 임파구의 말초혈액내 수가 유의하게 증가되었음과 고농도 노출군에서 T 임파구의 수가 저하되었음을 보고하였다. 반면 혈청중 각 항체 수준 및 임파구 증식력, NK cell 기능 등에 있어서는 다이옥신 노출과의 유의한 관련성을 발견하지 못하였다.

Occupational Exposure Episodes

1988년 발표된 Jennings 등의 연구 결과에 의하면 (Jennings 등, 1988) 2,4,5-trichloro phenoxy acetic acid 제조제 제조공장에서 TCDD에 노출된 18명의 근로자들의 면역기능을 노출로부터 17년이 지난 뒤 분석하였을 때, 말초혈액내 T 또는 B 임파구의 수는 대조군에 비해 유의한 차이가 없었던 반면 natural killer cell의 수는 노출군에서 높았다. 또한 자가항체인 antinuclear antibody가 노출군의 혈청에서 유의하게 검출됨을 보고하였다. 1953년 BASF 공장에서 trichlorophenol 생산공정을 통해 TCDD에 노출된 138명의 근로자들을 대상으로 노출후 약 40년이 경과한 시점에서 면역기능을 평가한 바에(Ott 등, 1994) 따르면 노출 당시 뿐만 아니라 조사 현재에도 TCDD농도가 높은 근로자들이 혈청내 IgA와 IgG의 수준이 상대적으로 높았으며 말초혈액내 T cell, natural killer cell, helper T cell의 비율이 약간 저하되어 있음이 보고되었다. 한편 45세에서 63세 나이로 약 20년 전에 상기 trichlorophenol 생산 공장에서 TCDD에 노출된 11명의 근로자들을 대상으로 한 연구결과에 따르면(Tonn 등, 1996) 대조군과 비교하여 말초혈액내 각 면역세포의 구성비는 차이가 없었으나 mixed lymphocyte culture시는 임파구 증식이 저하됨이 관찰되었다. 또한 독일의 Hamburg 소재 제조제 공장에서 다이옥신, 벤젠 등에 노출됐던 근로자 29명과 노출되지 않은 대조군을 대상으로 혈청내 IgG, IgM 등 일반항체 수준과, antinuclear antibody 등 11종의 자가항체 수준, 말초혈액내 면역세포 구성, 말초혈액 분리 임파구의 in vitro에서 PHA, PWM등을 이용한 증식 정도 등을 노출후 10년에서 23년이 지난 1992년부터 1994년에 분석·비교하였다(Jung 등, 1998). 분석결과

TCDD Equivalent Dose(TEQ)와 CD3⁺/CD8⁺ T cell 비율 간에 유의한 역상관 관계를 보였고 다이옥신을 포함한 종합적인 면역독성인자의 체내누적으로 인한 임파구활성 저해 지표인 chromate resistance의 저하를 노출군에서 관찰하였다. 상기 제초제 공장에서 다이옥신에 노출된 또 다른 근로자들을 대상으로 말초혈액에서 분리한 각 면역세포들의 숫적 변화와 그들의 활성정도를 대조군과 비교한 결과(Ernst 등, 1988) memory CD8⁺ T cell 수는 노출군에서 높고 naive CD8⁺ T cell 수는 감소된 양상이었으며 전혈배양시 tetanus toxoid와 purified protein derivative of tuberculin을 각각 항원으로 사용했을 때 IFN γ 와 TNF α 생성 수준이 노출군에서 현저히 저하됨이 관찰되었다.

TCDD 면역독성에 대한 in vitro 실험적 연구

Neubert 등은(Neubert 등, 1991) 정상인의 말초혈액을 in vitro에서 1 pM 이하의 저농도 TCDD를 첨가하여 PWM으로 활성화시킬 때 memory T cell과 B cell의 수가 TCDD 농도에 비례하여 저하됨을 발표하였다. 반면 100 nM에서 10 pM의 비교적 고농도의 TCDD를 첨가하여 PWM 또는 anti-CD3로 말초 임파구를 활성화 시켰을 때 임파구의 증식에는 영향이 없음도 발표되었다(Lang 등, 1994). 한편, TCDD가 B 임파구의 분화단계에서 발현되었다가 항체생성 plasma B cell 단계에서는 소실되는 CD19 표면항원의 발현을 억제함이 발표되어 B 임파구가 TCDD의 표적세포중의 하나임이 제시되기도 하였다(Masten 등, 1995).

TCDD의 인체 면역독성에 대한 현재까지의 결론

상기 인체 면역독성의 연구결과들을 종합하면 현재까지는 TCDD 노출과 직접적인 관련성을 가지고 만성적으로 변화하는 면역지표치를 설정하기 어렵다는 점이다. 즉, 말초혈액 면역세포들의 상대적 구성비나 절대적 수는 TCDD 노출정도와 관련한 일정성 있는 변화를 나타내지 않으며 혈청내 존재하는 항체수준에 있어서도 IgA를 제외하고는 특별하게 대조군과 다르지 않다는 점이다. 반면 각종 면역세포들의 기능에 대해서는 실험동물 연구에서처럼 다양한 표적기관에 대한 연구가 사람을 대상으로는 진행되고 있지 못한 점을 지적할 수 있다. 즉, 말초혈액내 존재하는 helper T cell, cytotoxic T cell, B 임파구, 단핵구, 과립구 등 다양한 면역세포들의 기능에 대한 TCDD의 in vitro/in vivo 영향에 대한 구체적인 연구가 필요하리라 생각된다.

본 연구의 주요 결과에 대한 토의

본 연구에서는 고엽제 노출군의 임파구를 in vitro에서 활

성화시켜 생성되는 각종 cytokine의 수준을 측정하였다. 이는 과거 대부분의 연구에서 T 임파구에 대한 TCDD의 영향을 분석하고자할 때, TCDD 노출자들에서 얻은 임파구의 증식수준을 대조군과 비교한 결과를 제시하거나 말초혈액내 T 임파구의 수 또는 비율을 측정된 것에 비해 T 임파구의 활성화 산물인 cytokine을 정량화함으로써 그 기능을 평가하였다는 점에서 진일보한 연구 시도라 할 수 있다. 과거 연구결과에 의하면 임파구의 수는 TCDD 노출자와 비노출자간 차이가 없다는 점에서는 어느정도 일치된 결과를 얻고 있는 반면, 임파구증식에서는 억제 또는 영향없음의 다소 상반된 결과를 보고하고있다. 본 연구에서는 IFN γ 생성수준이 고엽제노출군의 T 임파구 활성화시 대조군의 경우보다 유의하게 낮았다(Fig. 6 & 7). IFN γ 는 탐식세포를 활성화시켜 외부에서 침입하는 바이러스, 세포내 기생 세균 등을 제거하는데 중요한 cytokine임을 감안하면(Young 등, 1995), 이 cytokine의 생성이 고엽제 노출군에서 저하되었다는 점은 이들 노출자들의 병원균에 대한 숙주 저항력이 정상인에 비해 상대적으로 저하될 가능성이 있음을 제시한다(Warren 등, 2000). 또한 IFN γ 는 helper T cell이나 cytotoxic T cell의 type-2 helper T cell이나 type-2 cytotoxic T cell로의 분화를 억제하고 B 임파구의 IgE isotype switching을 억제하는 것으로 알려져 있다(Snapper 등, 1987; Paul 등, 1994). 고엽제 노출군에서 IFN γ 생성저하가 역으로 type-2 helper T cell이나 type-2 cytotoxic T cell에서 생성되는 IL-4, IL-10의 수준이나(Fig. 5) 혈장내 IgE의 수준(Fig. 3) 증가로 이어졌을 가능성을 예측케 하는 결과를 얻었음은 주목할 만하다. 본 결과는 전혈배양 IFN γ 생성 수준이 TCDD 노출군에서 현저히 저하됨이 관찰되었던 보고와도(Ernst 등, 1988) 일치되는 점이다.

또한 염증반응을 유발시키는데 중요한 cytokine인 TNF α (Matsukawa 등, 1998; Veronesi 등, 1999)의 노출군에서 생성수준이 대조군에 비해 높았다는 점 역시 흥미롭다. 특히 TNF α 와 비슷한 기능을 수행하는 interleukin-1 β 는 TCDD 노출자들에게서 과다 생성됨으로써 염소성좌창(chloracne) 발생에 관여할 수 있다는 보고는(Sutter 등, 1991) 본 연구결과와 관련지어볼 때 시사하는 바가 있다. 즉, 우리나라 고엽제 노출자들에게 발생되고있는 염증성 피부질환이나 무혈성 괴사의 진행에 TNF α 과다 생성이 배경에 자리잡고 있지 않을까 추측되는 결과를 본 연구에서 얻었다는 점이다. TNF α 과다생성은 혈관의 투과성을 비정상적으로 증가시켜 혈류에서 각종 항체, 보체 등 세포파괴에 관여하는 단백질의 주변 조직 유입을 가속화시킬 가능성이 있기 때문이다. 이처럼 TCDD 노출시 TNF α 분비가 증가되었다는 보고는 TCDD에 노출된 원숭이의 말초혈액을 활성화시켰을 때도 보

고된 바 있다(Rier 등, 2001).

혈청내 IgE 수준의 증가는 type-I hypersensitivity나 type-IV hypersensitivity와 관련되어 임상적으로 알레르기성 호흡기질환이나 아토피성 피부염 발생시 관찰된다(Nel 등, 1998; Peden, 2000). 이러한 연구에서 혈청중 IgE 수준은 어린이들의 천식 또는 아토피성 피부염 발생에 중요한 면역학적 지표치로 이용된다. 본 연구에서는 고엽제 노출군이 비노출 대조군에 비해 상대적으로 높은 혈장중 IgE 수준이었는데, 노출군에서 여러 양태의 피부질환이(각 피부질환별 환자수는 1명) 산재되어 분포하였기에 본 연구결과를 노출군에서 나타나는 피부질환과 관련지어 해석하기는 쉽지않다는 제한점이 있다. 그러나, 경유연소물질에서 추출한 다환방향족탄화수소군을 사람의 B 림파구에 노출시켰을 때, IgE 생성이 증가되었다는 보고는(Takenaka 등, 1995) TCDD 역시 다환방향족탄화수소군에 속한다는 점을 고려할 때 본 연구 결과를 어느정도 뒷받침한다고 생각된다. 그러나 기존의 인체를 대상으로한 다이옥신 독성 연구에서 IgE 수준은 보고된 적이 없어 본 연구결과에 대해 적절한 평가를 짓기는 어렵다. 한편, TCDD를 마우스에 노출시켰을 때 알레르기 항원 특이 IgE 및 total IgE 모두 저하되었던 결과와는(Heo 등, 2001) 본 연구결과는 상반되었던 점 역시 언급이 되어야 할 것이다.

결 론

이상의 고찰을 바탕으로 연구대상이 된 고엽제 노출군의 수(28명)가 충분하지 못하여 우리나라 전체 고엽제 노출 일 남전 참전 재향군인들에 대한 대표성이 있는 결과를 도출하기에는 한계점이 있지만 연령이 비슷한 Healthy control(28명)과 Job-based control(28명)을 선정하여 비교실험한 결과, 다음과 같은 결론을 이끌어낼 수 있었다.

첫째, 말초혈액 각 구성세포의 절대 수 및 상대적 분포는 노출군과 대조군간 유의한 차이가 없었는데, 이는 말초혈액 면역세포들의 상대적 구성비나 절대적 수는 TCDD 노출 정도와 관련한 일정성 있는 변화를 나타내지 않는다는 기존의 대부분 연구결과와 일치하는 점이다.

둘째, 혈장내 total IgE 및 IgG subclass 수준 측정은 관련 학계에 처음 보고하는 내용으로, total IgE는 대조군에 비해 유의하게 노출군에서 높아 TCDD 노출로 인한 아토피 내지는 알레르기 발생 가능성을 예측케 하고 있다. 이는 노출군중 보다 많은 수의 호흡기 또는 피부질환 유병자를 대상으로 추적조사가 필요함을 제시하고 있다. total IgG에서는 군간 차이가 없었는데, 이는 기존의 발표들과 비슷한 결과이다. 그러나 IgG의 subclass를 분석하였을 때, IgG1의 수준이 노출군에서 낮았는데, IgG1이 외부에서 침입하는 병

원균의 단백질 항원에 대한 주요 항체로 보체고착항체임을 감안하면 IgG1 저하가 체내 특정 B 림파구의 기능저하와 어느 정도 상관관계가 있을지는 계속 연구할 점이다.

셋째, T 림파구를 in vitro에서 PMA와 ionomycin 또는 PHA로 활성화시켜 생성 cytokine의 수준을 평가한 것은 학계 처음으로, 바이러스나 여러 세균들에 대한 저항성을 나타내는데 중요한 cytokine중 하나인 IFN γ 이 대조군에 비해 노출군에서 상대적으로 낮게 생성된 점은 IFN γ 가 매개하는 각종 세포면역기능이 저하되어있을 가능성을 제시하고 있다. 아울러 염증반응에 중요한 cytokine중 하나인 TNF α 나 알레르기 또는 아토피성 질환 발생과 관련있는 IL-4 및 IL-10이 노출군과 대조군간 차이가 있었던 점은 TCDD 노출이 T 림파구 기능변화를 유도할 가능성에 대한 의미있는 근거를 제공하는 것으로 여겨진다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청 국립독성연구소의 용역연구 사업 지원에 의해 이루어졌습니다.

참고문헌

- 김정순, 임현술, 이홍복, 이원영, 박영주, 김성수(1994): 파월국군장병의 고엽제 위해에 대한 예비적 역학조사. *예방의학회지*, 27, 711-734.
- 김정순, 임현술, 정해관, 이원영, 김성수, 임민경, 문 용(2000): 파월국군장병의 고엽제 위해 중에 관한 역학적 연구. 고엽제 피해 실태와 대책방안 심포지엄 자료집.
- 김철현, 김풍택, 이양수, 박 현(1998): 고엽제에 노출된 월남 참전 보훈대상자들의 건강상태에 대한 연구. *대한재활의학회지*, 22, 40-45.
- 홍창의(1997): 소아과학, 6판, 대한교과서주식회사, pp.825-830.
- Anfossi, N., Pascal, V., Vivier, E. and Ugolini, S. (2000): Biology of T memory type 1 cells. *Immunol. Rev.*, 181, 269-278.
- Bertazzi, P.A., Bernucci, I., Brambilla, G., Consonni, D. and Pesatori, A.C. (1998): The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure: a review. *Environ. Health Perspect.*, 106(Suppl 2), 625-633.
- Braun, A., Wiebe, P., Pfeufer, A., Geßner, R. and Renz, H. (1999): Differential modulation of human immunoglobulin isotype production by the neuropeptides substances P, NKA, and NKB. *J. Neuroimmunol.*, 97, 43-50.
- Davis, L.S., Schulze-Koops, H. and Lipsky, P.E. (1999): Human CD4+ T cell differentiation and effector function: implications for autoimmunity. *Immunol. Res.*, 19, 25-34.
- Ernst, M., Flesch-Janys, D., Morgenstern, I. and Manz, A. (1998): Immune cell functions in industrial workers after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: dissociation of antigen-specific T-cell responses in cultures of diluted whole blood and of isolated peripheral blood mononuclear

- cells. *Environ. Health Perspect.*, **106**(Suppl 2), 701-705.
- Evans, R.G., Webb, K.B., Knutsen, A.P., Roodman, S.T., Robers, D.W., Bagby, J.R., Garrett, W.A. and Andrews, J.S. (1988): A medical follow-up of the health effects of long-term exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Arch. Environ. Health*, **43**, 273-278.
- Heo, Y., Parsons, P.J. and Lawrence, D.A. (1996): Lead differentially modifies cytokine production in vitro and in vivo. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **138**, 149-157.
- Heo, Y., Lee, W.T. and Lawrence, D.A. (1998): Differential effects of lead and cAMP on development and activities of Th1- and Th2-lymphocytes. *Toxicol. Sciences*, **43**, 172-185.
- Heo, Y., Saxon, A. and Hankinson, O. (2001): Effect of diesel exhaust particles and their components on the allergen-specific IgE and IgG1 response in mice. *Toxicological Sciences*, **159**, 143-158.
- Hoffman, E.C., Reyes, H., Chu, F-F., Sander, F., Conley, L.H., Brooks, B.A. and Hankinson, O. (1991): Cloning of a factor required for activity of the Ah (Dioxin) receptor. *Science*, **252**, 954-958.
- Jefferis, R. and Kumararatne, D.S. (1990): Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. *Clin. Exp. Immunol.*, **81**, 357-367.
- Jennings, A.M., Wild, G., Ward, J.D. and Ward, A.M. (1988): Immunological abnormalities 17 years after accidental exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Br. J. Ind. Med.*, **45**, 701-704.
- Jung, D., Berg, P.A., Edler, L., Ehrenthal, W., Fenner, D., Flesch-Janys, D., Hubber, C., Klein, R., Koitka, C., Lucier, G., Manz, A., Muttray, A., Needham, L., Papke, O., Pietsch, M., Portier, C., Patterson, D., Prellwitz, W., Rose, D.M., Thews, A. and Konietzko, J. (1998): Immunologic findings in workers formerly exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and its congeners. *Environ. Health Perspect.*, **106**(Suppl 2), 689-695.
- Kimata, H., Fujimoto, M., Ishioka, C. and Yoshida, A. (1996): Histamine selectively enhances human immunoglobulin E (IgE) and IgG4 production induced by anti-CD58 monoclonal antibody. *J. Exp. Med.*, **184**, 357-364.
- Kramarova, E., Kogevinas, M., Anh, C.T., Cau, H.D., Dai, L.C., Stellman, S.D. and Parkin, D.M. (1998): Exposure to Agent Orange and occurrence of soft-tissue sarcomas or non-Hodgkin lymphomas: an ongoing study in Vietnam. *Environ. Health Perspect.*, **106**(Suppl 2), 671-678.
- Krieger, J., Heo, Y. and Lawrence, D.A. (1998): Oxidative stress and heavy metal modification of T lymphocyte subsets in *T-Lymphocyte Subpopulations in Immunotoxicology* (Kimber, I. and Selgrade, M.K. eds), John Wiley & Sons, England, pp 103-119.
- Lang, D.S., Becker, S., Clark, G.C., Devlin, R.B. and Koren, H.S. (1994): Lack of direct immunosuppressive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on human peripheral blood lymphocyte subsets in vitro. *Arch. Toxicol.*, **68**, 296-302.
- Matsukawa, A. and Yoshinaga, M. (1998): Sequential generation of cytokine during the initiative phase of inflammation, with reference to neutrophils. *Inflamm. Res.*, **47**(Suppl 3), S137-144.
- Masten, S.A. and Shiverick, K.T. (1995): The Ah receptor recognizes DNA binding sites for the B cell transcriptional factor, BSAP: a possible mechanism for dioxin mediated alteration of CD19 gene expression in human B lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **212**, 27-43.
- Michalek, J.E., Ketchum, N.S. and Check, I.J. (1999): Serum dioxin and immunologic responses in veterans of Operation Ranch Hand. *Am. J. Epidemiol.*, **149**, 1038-1046.
- Mocarelli, P., Marocchi, A., Brambilla, P., Gerthoux, P., Young, D.S. and Mantel, N. (1986): Clinical laboratory manifestations of exposure to dioxin in children, a six-year study of the effects of an environmental disaster near Seveso, Italy. *J. Am. Med. Assoc.*, **256**, 2687-2695.
- Mocarelli, P., Needham, L.L., Marocchi, A., Patterson, D.G., Brambilla, P., Gerthoux, P.M., Meazza, L. and Carreri, V. (1991): Serum concentrations of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and test results from selected residents of Seveso, Italy. *J. Toxicol. Environ. Health*, **32**, 357-366.
- Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989): Th1 and Th2 cells; Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.*, **7**, 145-173.
- Mudde, G.C., Bheekha, R. and Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M. (1995): IgE-mediated antigen presentation. *Allergy*, **50**, 193-199.
- Nel, A.E., Diaz-Sanchez, D., Ng, D., Hiura, T. and Saxon, A. (1998): Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **102**(4 pt 1), 539-554.
- Neubert, R., Jacob-Muller, U., Helge, H., Stahlmann, R. and Neubert, D. (1991): Polyhalogenated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and the immune system. 2. In vitro effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on lymphocytes of venous blood from man and a non-human primate (*Calithrix jacchus*). *Arch. Toxicol.*, **65**, 213-219.
- Neubert, R., Maskow, L., Triebig, G., Broding, H.C., Jacob-Muller, U., Helge, H. and Neubert, D. (2000): Chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and the human immune system: 3. Plasma immunoglobulins and cytokines of workers with quantified moderately-increased body burdens. *Life Sci.*, **66**, 2123-2142.
- Ott, M.G., Zober, A. and Germann, C. (1994): Laboratory results for selected target organs in 138 individuals occupationally exposed to TCDD. *Chemosphere*, **29**, 2423-2437.
- Paul, W.E. and Sedar, R.A. (1994): Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*, **76**, 241-251.
- Pepper, R.J., Tina, W.Z. and Mickelson, M.M. (1968): Purification of lymphocytes and platelets by gradient centrifugation. *J. Lab. and Clin. Med.*, **72**, 842-848.
- Peden, D.B. (2000): Development of atopy and asthma; candidate environmental influences and important periods of exposure. *Environ. Health Perspect.*, **108**(Suppl 3), 475-482.
- Rier, S.E., Coe, C.L., Lemieux, A.M., Martin, D.C., Morris, R., Lucier, G.W. and Clark, G.C. (2001): Increased tumor necrosis factor-alpha production by peripheral blood leukocytes from TCDD-exposed rhesus monkeys. *Toxicol. Sci.*, **60**, 327-337.

- Sanders, V.M. (1997); Neuroimmunology in *Toxicology of the Immune System* (Lawrence D.A., ed.). Elsevier Science Ltd., New York, pp 175-186.
- Silvy, A., Lagresle, C., Bella, C. and Defrance, T. (1996): The differentiation of human memory B cells into specific antibody-secreting cells is CD40 independent. *Eur. J. Immunol.*, **26**, 517-524.
- Snapper, C.M. and Paul, W.E. (1987): Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*, **236**, 944-947.
- Sutter, T.R., Guzman, K., Dold, K.M. and Greenlee, W.F. (1991): Targets for dioxin: genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin-1 β . *Science*, **254**, 415-418.
- Sweeney, M.H. and Mocarelli, P. (2000): Human health effects after exposure to 2,3,7,8-TCDD. *Food Addit. Contam.*, **17**, 303-316.
- Takenaka, H., Zhang, K., Diaz-Sanchez, D., Tsien, A. and Saxon, A. (1995): Enhanced human IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust: direct effects on B-cell IgE production. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **95**, 103-115.
- Tonn, T., Esser, C., Schneider, E.M., Steinmann-Steiner-Haldenstatt, W. and Gleichmann, E. (1996): Persistence of decreased T-helper cell function in industrial workers 20 years after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Environ. Health Perspect.*, **104**, 422-426.
- Veronesi, B., Oortgiesen, M., Carter, J.D. and Devlin, R.B. (1999): Particulate matter initiates inflammatory cytokine release by activation of capsaicin and acid receptors in a human bronchial epithelial cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **154**, 106-115.
- Warren, T.K., Mitchell, K.A. and Lawrence, B.P. (2000): Exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) suppresses the humoral and cell-mediated immune responses to influenza A virus without affecting cytolytic activity in the lung. *Toxicol. Sci.*, **56**, 114-123.
- Webb, K.B., Evans, R.G., Knutsen, A.P., Roodman, S.T., Roberts, D.W., Schramm, W.F., Gibson, B.B., Andrews, J.S., Needham, L.L. and Patterson, D.G. (1989): Medical evaluation of subjects with known body levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *J. Toxicol. Environ. Health*, **28**, 183-193.
- Wyngaarden, J.B., Smith, L.H. and Bennett, J.C. (1988): Cecil Textbook of Medicine (19th edition), W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA., pp.2370-2380.
- Young, H.A. and Hardy, K.J. (1995): Role of interferon- γ in immune cell regulation. *J. Leukocyte Biol.*, **58**, 373-381.
- Zober, A., Ott, M.G. and Messerer, P. (1994): Morbidity follow-up study of BASF employees exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) after a 1953 chemical reactor incident. *Occup. Environ. Med.*, **51**, 479-486.