

## 실험동물을 이용한 화분섭취의 면역안전성 평가

박희성\* · 허영주\* · 변정아\*\* · 허 용†

대구가톨릭대학교 자연대학 산업보건학과, \*대구가톨릭대학교 자연대학 생명공학과  
\*\*식품의약품안전청 식품규격평가부 건강기능식품규격과

## Immunotoxicological Evaluation of Pollen Intake Using Mice Model

Hee Sung Park\* · Young Jue Heo\* · Jung-A Byun\*\* · Yong Heo†

Catholic University of Daegu, College of Natural Sciences, Department Occupational Health,  
Kyongsan si 712-702 Korea

\*The Catholic University of Korea, College of Natural Sciences, Department Plant Biotechnology,  
Kyongsan si 712-702, Korea

\*\*Korea Food & Drug Administration, Center for Food Standard Evaluation,  
Division of Health Supplement Standard, Seoul 122-704, Korea

(Received June 5, 2005; Accepted July 20, 2005)

### ABSTRACT

Pollen has been used for prevention or treatment of certain diseases such as diabetes, arthritis, or cancer in traditional medicine. In addition, pollen is under investigation as a host cell for a gene expression. This study was undertaken to evaluate the immunologic safety of pollen intake. BALB/c mice were administered with 500, 50, 5, or 0.5 mg/kg bw of lily pollen for five times a week for four weeks through gastric intubation. Comparing the control mice administered with distilled water, no significant changes were observed in body weight gain, weight of liver, spleen, lung, and histopathological findings of liver and kidney of the mice groups administered with the pollen. Plasma level of IgG1, IgG2a, and IgE was not different among the groups. When splenic B lymphocytes were stimulated *in vitro* with lipopolysaccharides for 7 days, level of IgG1 and IgG2a produced in the culture supernatants was not significantly different among the groups. Furthermore, no significant alteration was observed in IL-4 and IFN $\gamma$  producing ability with splenic T lymphocytes stimulated *in vitro* with phytohemagglutinins for 48 hours between the pollen-administered and the control mice. Overall, this study suggests that the lily pollen intake is inducing no significant modulation of humoral and cell-mediated immunity in mice.

**Keywords:** lily pollen, immunotoxicity, mice, lymphocyte

### I. 서 론

기능성 식품(functional foods 혹은 nutraceuticals)에 대해서는 현재까지 국제적으로 일치된 정의는 없지만, 국제식품정보위원회에 의하면 해당식품을 섭취하는 사람에게 식품에 함유된 전통적인 영양소 외에 건강증진 효과를 가져올 수 있는 성분이 함유된 식품 또는 그 성분 자체를 말한다.<sup>1)</sup> 한편 International Life Sciences

Institute of North America는 기초영양소가 아니면서 건강증진에 기여할 수 있는 생리활성성분을 가지고 있는 식품을 기능성식품으로 정의하였으며,<sup>2)</sup> 일본에서는 기능성식품은 일상 생활에서 정제, 분말, 캡슐 형태가 아닌 식품형태로 섭취하여서 인체의 노화를 지연시키거나 특정 질병을 예방하거나 면역학적 방어기전을 증강시키거나 육체적·정신적 상태를 조절해 주는 식품으로 기술되어 있다.<sup>3)</sup> 종합적으로 기능성식품이란 어떠한 질병의 예방 혹은 치료목적으로 일상 식이의 일부분으로 섭취되는 식품을 의미한다고 볼 수 있다. 우리나라의 경우는 건강기능성식품을 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보

†Corresponding author : Department Occupational Health,  
College of Natural Sciences Catholic University of Daegu  
Tel: 82-53-850-3737, Fax: 82-53-850-3736  
E-mail : yheo@cu.ac.kr

건용도에 유용한 효과를 얻기 위해 인체에 유용한 가능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조, 가공한 식품으로 정의하고 있다.<sup>4)</sup>

국제적으로 기능성 식품의 성분들에 대한 질병치료 또는 예방효과여부를 연구하는 분야는 대체의학의 대두와 더불어 관심이 고조되고 있는데,<sup>5)</sup> 대표적으로 녹차의 위장관계 암 발생 억제 효과,<sup>6)</sup> 마늘의 고혈압 및 혈중 콜레스테롤 증가 억제,<sup>7,8)</sup> 브로콜리(broccoli)의 항암작용을 예로 들 수 있다.<sup>9)</sup> 기능성 식품 개발은 식물이 주요 연구 대상으로 주로 열매나 뿌리, 잎이 이용되고 있으며,<sup>10)</sup> 꽃가루(花粉)의 인체 생리 활성화에 미치는 기능성에 대해서도 일부 연구되고 있다.<sup>11,12)</sup> 한편, 식물의 건강기능식품원으로서 유효성 연구와 더불어 안전성에 대한 보다 철저한 검사가 이루어져야 할 것이라는 주장들이 국제적으로 대두되고 있다.<sup>13,14)</sup> 특히 기능성 식품이 통상적인 식품처럼 전반적으로 안전하다고 여겨지기 위해서는 성분중 약리적으로 비활성화 물질에 대한 독성 발현 검사의 필요성도 언급되고 있다. 이에 본 연구는 관절염, 당뇨병, 암 등에 치료적 또는 예방적 효과가 있다는 보고와<sup>15)</sup> 더불어 최근에는 유전자 발현의 숙주 세포로서도 효용성이 탐색되고 있는<sup>16)</sup> 화분의 기능성 식품원으로서 안전성을 평가하는 일환으로 실험동물 mice에게 4주 반복투여 후 면역안전성에 중점을 둔 안전성을 평가하였다. 특히 본 연구는 화분에 인체 간염 바이러스 항원을 발현시켜 이 화분을 섭취한 mice에 있어서 간염바이러스 항체 생성 정도를 탐색하는 본격적인 연구에 선행하여 화분자체의 면역안전성을 평가하는 목적을 갖고 있다. 이를 위해 미국의 National Toxicology Program이나 FDA에서 일차적 면역안전성 검색방법으로 제시하고 있는 몸무게, 비장, 신장, 간 등 주요 장기의 무게, 체액면역, 세포면역에 있어서 변화를 평가하였다.<sup>17,18)</sup>

## II. 연구방법

### 1. 실험동물 및 화분 투여

4주령의 specific pathogen free 스킷 BALB/c mice를 대한바이오링크회사로부터 구입하여 일주일간 순화시킨 뒤 균분리하여 실험하였다. Mice는 온도 23±2°C, 상대습도 50±10%, 환기횟수 12~15회/시간, 조명시간 12시간(오전 8시~오후 8시), 조도 150~300 Lux로 조건이 설정된 대구가톨릭대학교 실험동물사육실에서 사육하였다.<sup>19-21)</sup> 사료는 (주)푸리나로부터 공급받은 방사선 조사 멸균된 실험동물용 고형사료를 자유섭취시켰다.

음용수는 고압증기멸균하여 자유 섭취시켰으며 mice 케이지 역시 고압증기멸균후 사용하였다. Mice는 화분의 투여량에 따라 500, 50, 5, 0.5 mg/kg 체중 투여군과 증류수 투여 대조군으로 나뉘었으며 각 군당 20마리씩의 mice를 사용하고 기본적으로 2회 반복 실험하였다. 면역안전성을 평가하기 위한 시험 화분으로는 백합(*Lilium longiflorum*) 화분을 선택하였고 백합화분을 3차증류수에 용해시켜 mice에게 위장관내 투여(gastric intubation)하였는데, 1회 투여 용량은 200 μ였고 4주간 주 5회씩 투여하였다.

### 2. 면역안전성 평가를 위한 실험방법

일주일 2회씩 3일 간격으로 몸무게를 측정하였으며, 투여 종료 3일 후 mice를 희생부검하고 비장, 폐, 간, 신장 등 주요 장기의 무게를 측정하였고, 특히 비장은 비장세포 배양을 위해 무균적으로 채취하였다. 심장체혈을 통해 혈액을 채취하고 혈액에서 분리된 혈장은 사용전까지 -80°C 냉동고에 보관하였다. 간과 신장은 포르말린에 보관 후 조직표본을 만들었고 hematoxylin-eosin염색을 실시하여 조직병리변화를 평가하였다.

#### 1) 혈장내 IgE 및 IgG 측정

혈장내 존재하는 IgE 수준을 대조군 mice와 비교분석하기 위해 sandwich ELISA 방법에 의해 total IgE를 정량하였다.<sup>22)</sup> 간단하게 방법을 기술하면 다음과 같다.

Rat anti-mouse IgE capture antibody (PharMingen, San Diego, CA)를 Immulon 2 plate (Dynex, Chantilly, VA)에 2 μg/ml (각 well당 100 μl) 첨가한 다음 냉장상태에서 24시간 정치시키고 이후 1% BSA-PBS로 non-specific binding을 차단한 다음 희석된 실험혈장 및 표준 IgE(purified mouse IgE mAb isotype standard, PharMingen)를 첨가하고 냉장상태에서 24시간 정치시켰다. 다음날, biotinylated rat anti-mouse IgE(1 μg/ml 1% BSA-PBS, PharMingen)를 첨가하여 2시간 실온에서 정치시켜 detection antibody가 부착하게 한 다음 avidin-peroxidase를 넣고 다시 1시간 실온에서 정치시켰다. 이후 ABTS(Sigma, St. Louis, MO)로 발색을 유도한 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈장내 존재하는 IgG의 isotype인 IgG1 및 IgG2a의 수준을 측정하기 위해서는 goat-anti mouse IgG1 및 IgG2a(Serotec, Raleigh, NC) capture antibody와 peroxidase conjugated anti-mouse IgG detection antibody를 사용하는 sandwich ELISA 방법을 이용하였다.

2) 비장세포 배양액내 cytokine 및 IgG 측정

IgE 및 IgG1의 isotype switching을 유도하는 interleukin-4 (IL-4)를 중심으로 한 type-2 cytokine과 이 cytokine들의 역할에 길항작용을 미치는 interferon-gamma (IFN $\gamma$ ) 등 type-1 cytokine들의 생성능력을 비교 분석하는 것은 기본적인 세포면역능을 평가하는 방법으로 고려되고 있다.<sup>23,24</sup> 이를 위해 각 mouse에서 spleen을 채취한 뒤 이 splenocytes들을 24 well-culture plate에 분주한 뒤 CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양하였다. 이 때 *in vitro* 활성화를 위해 polyclonal stimulator로 phytohemagglutinin(PHA, 5  $\mu$ g/ $1 \times 10^6$  cells, Sigma)을 첨가하였고, 세포배양액내 cytokine 수준 정량은 sandwich ELISA 방법에 의하였다.<sup>25</sup> 각 cytokine 별 lower detection limit는 다음과 같다: IL-4 (4 pg/ml), IFN $\gamma$ (100 pg/ml).

B림과구의 *in vitro* 활성화를 위하여 B 림과구 특이 polyclonal stimulator인 lipopolysaccharide (LPS, 1  $\mu$ g/ $1 \times 10^6$  cells, Sigma)를 첨가한 후 일주일간 배양하였고, 배양액내 IgG1, IgG2a의 수준 정량은 혈장내 IgG와 동일한 sandwich ELISA방법에 의하였다.<sup>26</sup>

3. 통계처리

각 군간 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 검증하였다. 필요에 따라 Student's *t*-test 또는 Mann-Whitney test로 추가 유의성 검정을 시행하였고 *p* value가 0.05 이하일 때를 유의한 차이로 판정하였다. 결과에서 \*는 *p*<0.05 수준에서 통계적으로 유의한 차이가 있음을 나타낸다.

III. 결과 및 고찰

1. 백합화분 투여군과 대조군간 일반 면역병리 비교

4주간 백합화분을 위장관내 투여한 mice와 백합화분을 용해시킨 용매인 3차증류수를 투여한 대조군 mice 간 체중의 변화를 관찰한 결과(Fig. 1), 체중 kg 당 500, 50, 5, 0.5 mg의 화분을 투여한 실험군 및 대조군 사이에서는 유의한 체중 변화를 관찰할 수 없었다. 4주간 투여후 희생부검시 채취한 mice의 주요 장기인 비장, 간, 폐의 무게를 백합화분 투여 실험군 및 대조군간 비교한 결과 역시 백합화분 투여에 따른 유의한 무게변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 2). 아울러 외부에서 체내로 들어오는 각종 유해인자의 주요 대사기관인 간

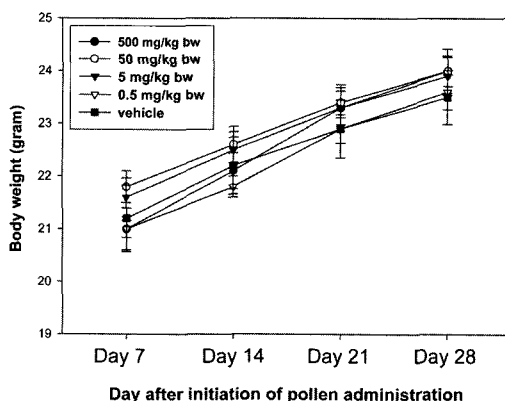


Fig. 1. No significant difference in body weight gain among the groups administered with various doses of lily pollen or the vehicle.

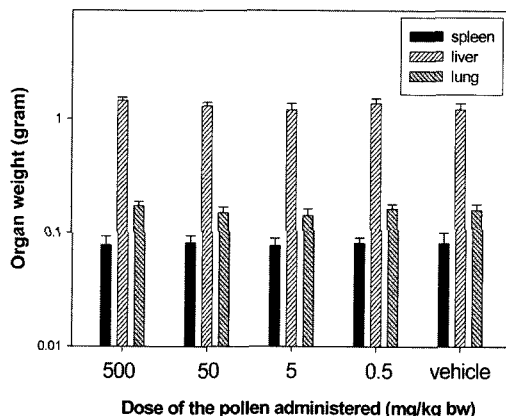


Fig. 2. No significant difference in spleen, liver, and lung weight among the groups administered with various doses of lily pollen or the vehicle.

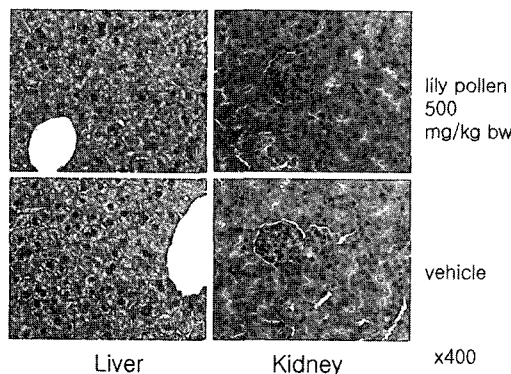


Fig. 3. Histopathological comparison of liver and kidney between the 500 mg/kg bw lily pollen-administered and the vehicle-treated control mice, Hematoxylin & Eosin staining, x400.

과 배출기관인 신장의 조직변화를 관찰하였다. 대표적으로 체중 kg 당 500 mg의 백합화분을 투여한 실험군과 대조군의 조직병리사진을 Fig. 3에 제시하였는데, 화분을 투여한 전체 실험군과 대조군 사이에서 유의한 조직병리학적 변화를 관찰할 수 없었다. 이상의 결과들은 체중 kg 당 최대 500 mg까지 백합화분을 4주간 아급성으로 투여하는 경우 용매 투여 대조군과 비교할 때 일반적인 면역병리학적 소견에 있어서 유의한 유해성을 초래하지 않음을 보여주는 것이다.

## 2. 백합화분 투여의 체액면역에 미치는 영향

IgE 및 IgG1은 Helper T cell의 한 종류인 type-2 helper T cell에서 분비되는 IL-4에 의하여 isotype switching이 유도되는 항체로서 호흡기 과민반응 등 알레르기성 과민반응 발생시 증가되는 항체이며, IgG2a는 type-1 helper T cell에서 분비되는 IFN $\gamma$ 에 의해서 isotype switching이 유도되는 항체로 IL-4의 생성 수준이 항진되면 감소되는 것으로 알려져 있다.<sup>27-29)</sup> 이러한 IgE 또는 IgG1과 IgG2a의 상대적 수준의 변화는 체내 체액면역능의 변화를 예측해볼 수 있는 주요 지표로서 여겨지고 있다.

혈장내 IgG1 및 IgE의 농도는 화분 투여군들과 대조군 사이에서는 유의한 차이가 없었다(Table 1). 또한 혈장내 IgG2a 농도에 있어서도 5 mg/kg 체중 투여군과 0.5 mg/kg 체중 투여군간을 제외하고는 유의한 차이가 없었다. 5 mg/kg 체중 투여군의 경우 0.5 mg/kg 체중 투여군에 비해 유의하게 높은 IgG2a의 농도를 보였는데, 이러한 유의성은 체중 kg 당 500, 50 mg 투여군과 0.5 mg 투여군간 유의한 차이가 없음을 보면 백합화분의 투여농도 차이에는 기인하지 않은 것으로 판

단된다. 비장세포에서 B 임파구를 LPS로 활성화시켜 항체 생성을 유도한 결과 역시 IgG1이나 IgG2a 농도에서 군간 유의한 차이를 발견할 수 없었다.

한편, IgG2a와 IgG1 농도비(IgG2a/IgG1 ratio)는 바 이러스나 암세포에 대한 저항력을 나타내는 type-1 response와 천식, 아나필락시스와 같은 알레르기 반응으로 대표되는 type-2 response가 개체별로 어느 한쪽으로 편향되어 있는지를 추측하는 지표치로 이용되기도 한다.<sup>30,31)</sup> 즉, IgG2a는 위에서 언급한 것처럼 바이러스나 암세포에 대한 면역반응을 매개하는 IFN $\gamma$ 에 의해서 isotype switching이 유도되고 IFN $\gamma$ 의 기능이나 생성을 억제하는 IL-4에 의해서는 IgG1이나 IgE의 isotype switching이 유도되기 때문이다. *In vitro*에서 B 임파구를 활성화시켜 IgG1과 IgG2a 생성을 유도하고 각 항체의 상대적인 수준을 농도비로 계산한 결과(Table 1), 화분 투여군들과 대조군 사이에서 유의한 차이를 발견할 수 없었다. 아울러 혈장내 각 항체의 수준을 비로 계산한 결과에서도 5 mg/kg 체중 투여군과 0.5 mg/kg 체중 투여군간을 제외하고는 유의한 차이가 없었다. 5, 0.5 mg/kg 체중 투여군 사이의 차이는 IgG2a 수준에 있어서 두군간 차이가 있었음에 기인하는 것으로 판단된다. 본 결과는 체중 kg 당 최대 500 mg까지 백합화분을 4주간 아급성으로 투여한 경우 IgG1, IgG2a, IgE 항체 수준에 유의한 변화를 초래하지는 않는 것으로, 궁극적으로 화분 섭취는 type-1 response와 type-2 response 사이에 있어서 불균형을 가져오는 면역독성은 없음을 의미한다고 볼 수 있다.

## 3. 백합화분 투여의 세포면역에 미치는 영향

IL-4와 IFN $\gamma$ 는 각각 type-2 helper T cell과 type-1

Table 1. Distribution of IgG isotype and IgE in the plasma or culture supernatants

		Dose of the pollen administered (mg/kg bw)				
		500	50	5	0.5	vehicle
Plasma	IgG1 (mg/ml)	2.01 ± 0.67	2.46 ± 1.12	2.51 ± 0.76	2.96 ± 2.15	2.43 ± 0.87
	IgG2a (mg/ml)	0.96 ± 0.87	1.09 ± 0.43	1.81 ± 1.03	0.94 ± 0.55*	1.04 ± 0.29
	Ratio (IgG2a/IgG1)	0.45 ± 0.33	0.50 ± 0.25	0.74 ± 0.42	0.34 ± 0.10*	0.48 ± 0.21
	IgE (ng/ml)	198 ± 92	334 ± 123	299 ± 119	235 ± 106	284 ± 66
Culture supernatants	IgG1 ( $\mu$ g/ml)	3.42 ± 2.76	2.98 ± 2.73	2.45 ± 1.56	2.94 ± 2.04	4.82 ± 3.93
	IgG2a ( $\mu$ g/ml)	1.21 ± 0.77	1.10 ± 0.48	1.03 ± 0.34	1.24 ± 0.40	1.43 ± 0.88
	Ratio (IgG2a/IgG1)	0.42 ± 0.17	0.86 ± 0.86	0.53 ± 0.19	0.55 ± 0.25	0.54 ± 0.42

Splenic lymphocytes were stimulated with LPS for one week and the culture supernatants were collected for IgG isotype measurement. Values represent mean  $\pm$  SD of two representative experiments. The ratios (IgG2a/IgG1) were obtained through dividing amount of IgG2a by amount of IgG1. \* indicates the statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) between the 5 mg/kg bw administered mice and the 0.5 mg/kg bw administered mice.

Table 2. Level of IL-4 and IFN $\gamma$  production *in vitro* from the lily pollen- or vehicle-administered mice splenocytes

	Dose of the pollen administered (mg/kg bw)				
	500	50	5	0.5	vehicle
IL-4 (pg/ml)	8.25 $\pm$ 6.85	4.11 $\pm$ 4.02	5.76 $\pm$ 5.77	12.79 $\pm$ 11.95	5.92 $\pm$ 4.96
IFN $\gamma$ (ng/ml)	9.33 $\pm$ 6.89	8.20 $\pm$ 5.76	12.30 $\pm$ 4.13	11.49 $\pm$ 11.69	10.06 $\pm$ 4.82

Splenic lymphocytes were stimulated with PHA for 48 hours, and the culture supernatants were collected for cytokine ELISA. Values represent mean  $\pm$  SD of two representative experiments.

helper T cell에서 분비되는 대표적인 cytokine으로서 어느 한쪽의 cytokine 분비가 우세할 때는 다른 cytokine의 합성, 분비가 저해되는 상호 길항작용을 가지고 있어 체내 type-2 response와 type-1 response간 세포면역의 항상성(homeostasis) 유지여부를 판단하는 주요한 척도로 이용되고 있다.<sup>28)</sup> 최근에는 type-2 cytotoxic T cell과 type-1 cytotoxic T cell에서도 각각 IL-4와 IFN $\gamma$  분비되는 것으로 보고된 바 있다.<sup>32)</sup> 이들 cytokine 생성에 있어서 항상성 조절이 이상이 있을 때는 여러 가지 면역병리학적 이상 상태를 가져오는데, 특히 type-2 response가 상대적으로 우세할 때는 세균, 바이러스 등 미생물 감염에 대한 방어력 저하, 알레르기 발생, 일부 자가면역질환 발생 등을 촉진하는 것으로 알려져 있다.<sup>33,34)</sup>

비장세포 중에서 T 임파구만을 활성화시키는 PHA를 사용하여 화분 투여 실험군 및 대조군의 비장 T 임파구를 *in vitro*에서 활성화시킨 결과, 화분 투여군들과 대조군 사이에서 유의한 IL-4와 IFN $\gamma$  생성의 차이를 발견할 수 없었다(Table 2). 이러한 결과는 화분투여가 type-1 response와 type-2 response 중 어느 한쪽을 선택적으로 향진 또는 억제하는 비정상적인 세포면역조절작용을 나타내지 않음을 의미하는 것으로 T 임파구 중심 세포면역력에 독성을 미치지 않는 것으로 판단되는 근거가 될 것이다.

#### IV. 결 론

본 연구는 전통의학에서 예방, 치료 목적으로 또한 최근에는 유전자 발현등 생명공학 연구 대상으로서도 활용성이 검토되고 있는 화분 중에서 대표적으로 백합 화분을 택하여 mice에게 위장관내로 4주 반복투여 후 면역안전성을 평가하였다. 실험을 통하여 얻어진 주요 결과는 다음과 같다.

1. 체중 kg 당 500, 50, 5, 0.5 mg의 화분을 투여한 mice의 체중, 비장을 포함한 주요 장기의 무게 및 조직병리학적 소견에서 용매만을 투여한 대조군에 비하여 유의한 변화를 관찰할 수 없었다.

2. 체액면역의 주요 지표치인 혈장내 IgG1, IgG2a, IgE 수준 및 비장 B 임파구 활성화에 따른 IgG1과 IgG2a 생성능력에 있어서 화분 투여군들과 대조군간 유의한 차이가 없었는데, 이는 화분 섭취가 체액면역능에 유의한 변화를 초래하지는 않는 것으로 판단할 수 있는 근거가 되었다.

3. 비장 T임파구를 *in vitro*에서 활성화시킨 결과, 화분 투여군들과 대조군간 IL-4 및 IFN $\gamma$  생성에 있어서 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 본 결과는 화분 섭취가 IL-4와 IFN $\gamma$  생성으로 대표되는 type-2 및 type-1 세포면역능에 유의한 영향을 미치지 않는음을 제시하는 것으로 생각된다.

#### 감사의 글

본 연구결과에서 제시된 병리조직표본 처리 및 판독을 하여주신 서울대학교 수의과대학 수의병리학교실 김대용 교수에게 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. International Food Information Council Foundation : Backgrounder: Functional Foods in *Food Insight Media Guide*. Washington, DC, 1998.
2. Clydesdale, F. M. : ILSI North America Food Component Reports. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **39**, 203-316, 1999.
3. Henry, C. J. K. and Heppell, N. J. : Nutritional aspects of food processing and ingredients. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, USA, 1998.
4. 식품의약품안전청 : 건강기능식품에 관한 법률 [법률 제6727호], 2002.
5. Zubillaga, M., Weill, R., Postaire, E., Goldman, C., Caro, R. and Boccio, J. : Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nut. Res.*, **21**, 569-579, 2001.
6. Weisburger, J. H. : Tea and health: the underlying mechanisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **220**, 271-275, 1999.
7. Silagy, C. A. and Neil, H. A. : A meta-analysis of the effect of garlic on blood pressure. *Hypertension*, **12**,

- 463-468, 1994.
8. Steiner, M., Khan, A. H., Holbert, D. and San Lin, R. I. : A double-blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compared the effect of aged garlic and placebo administration on blood lipids. *Am. J. Clin. Nutr.*, **64**, 866-870, 1996.
  9. van Poppel, G., Verhoeven, D. T., Verhagen, H. and Goldbohm, R. A. : Brassica vegetables and cancer prevention. Epidemiology and mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **472**, 159-168, 1999.
  10. Kobayashi, N., Unten, S., Kakuta, H., Komatsu, N., Fujimaki, M., Satoh, K., Aratsu, C., Nakashima, H., Kikuchi, H., Ochiai, K. and Sakagami, H. : Diverse biological activities of healthy foods. *In vivo*. **15**, 17-24, 2001.
  11. Yasumoto, R., Kawanishi, H., Tsujino, T., Tsujita, M., Nishisaka, N., Horii, A. and Kishimoto, T. : Clinical evaluation of long-term treatment using ceritin pollen extract in patients with benign prostatic hyperplasia. *Clin. Ther.*, **17**, 82-87, 1995.
  12. MacDonald, R., Ishani, A., Rutks, I. and Wilt, T. J. : A systematic review of Cernilton for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *BJU Int.*, **85**, 836-841, 2000.
  13. Hasler, C., Moag-Stahlberg, A., Webb, D. and Hundall, M. : How to evaluate the safety, efficacy, and quality of functional foods and their ingredients. *J. Am. Diet Assoc.*, **101**, 733-736, 2001.
  14. Kruger, C. L. and Mann, S. W. : Safety evaluation of functional ingredients. *Food Chem. Toxicol.*, **41**, 793-805, 2003.
  15. Hanssen, M. : The healing power of pollen. Thorsons Publishers Limited, Northamptonshire, UK, 1979.
  16. Park, H-S., Kim, E-H., Lee, S-S., Huh, Y-J., Kim, J-R., Kim, S-R., Min, A-G. and Heo, Y. :  $\beta$ -glucuronidase gene expression of pollen tube of lily (*Lilium longiflorum*) by transformation using Agrobacterium via vacuum infiltration. *Plant Biology* 2004, **167**, 2004.
  17. Luster, M. I., Munson, A. E., Thomas, P. T., Holsapple, M. P., Fenters, J. D., White, K. I., Lauer, L. D., Germolec, D. R., Rosenthal, G. J. and Dean, J. H. : Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, **10**, 2-19, 1988.
  18. Federal register : Toxic substances control act test guidelines. Environmental Protection Agency of the United States. August 1997.
  19. 최옥희, 안형수, 안명미 : ICR mouse에 있어서 UVB 조사로 유도된 접촉 과민반응에 대한 EGb 761 억제 효과. *한국환경보건학회지*, **31**(1), 7-14, 2005.
  20. 김관기, 양윤희 : 수유기에 투여된 Butyl Benzyl Phthalate 가 랫드 차산자에 미치는 영향. *한국 환경보건학회지*, **29**(2), 16-22, 2003.
  21. 최경호, 황성희, 권은아, 김관기 : Bisphenol A와 butyl benzyl phthalate 동시투여가 임신랫드와 차산자에 미치는 영향. *한국환경보건학회지*, **30**(2), 71-78, 2004.
  22. 허 용, 김광호 : 백신접종후 발생할 수 있는 전신적과 민중 예측을 위한 아급성 실험동물 모형 개발과 관련 면역독성학적 지표치 평가. *한국독성학회지*, **18**(2), 205-213, 2002.
  23. Heo, Y., Parsons, P. J. and Lawrence, D. A. : Lead differentially modifies cytokine production in vitro and in vivo. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **138**, 149-157, 1996.
  24. Snapper, C. M. and Paul, W. E. : Interferon- $\gamma$  and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science*, **236**, 944-947, 1987.
  25. Heo, Y., Lee, W. T. and Lawrence, D. A. : Differential effects of lead and cAMP on development and activities of Th1- and Th2-lymphocytes. *Toxicological Sciences*, **43**, 172-185, 1998.
  26. Tian, J., Zekzer, D., Hanssen, L., Lu, Y., Olcott, A. and Kaufman, D. L. : Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.*, **167**, 1081-1089, 2001.
  27. Oshiba, A., Hamelmann, E., Takeda, K., Bradley, K. L., Loader, J. E., Larsen, G. L. and Gelfand, E. W. : Passive transfer of immediate hypersensitivity and airway hyperresponsiveness by allergic-specific immunoglobulin (Ig) E and IgG1 in mice. *Journal of Clinical Investigation*, **97**, 1398-1408, 1996.
  28. Krishnan L., Guilbert, L. J., Wegmann, T. G., Belosevic, M. and Mosmann, T. R. : Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to Leishmania major infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines. *Journal of Immunology*, **156**, 644-652, 1996.
  29. Heo, Y., Saxon, A. and Hankinson, O. : Effect of diesel exhaust particles and their components on the allergen-specific IgE and IgG1 response in mice. *Toxicology*, **159**, 143-158, 2001.
  30. Margalit, M., Shibolet, O., Klein, A., Elinav, E., Alper, R., Thalenfeld, B., Engelhardt, D., Rabbani, E. and Ilan, Y. : Suppression of hepatocellular carcinoma by transplantation of ex-vivo immune-modulated NKT lymphocytes. *International Journal of Cancer*, **115**, 443-449, 2005.
  31. Gans, H., De Hovitz, R., Forghani, B., Beeler, J., Maldonado, Y. and Arvin, A. M. : Measles and mumps vaccination as a model to investigate the developing immune system: passive and active immunity during the first year of life. *Vaccine*, **21**, 3398-3405, 2003.
  32. Vukmanovic-Stejic, M., Vyas, B., Gorak-Stolinska, P., Noble, A. and Kemeny, D. M. : Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood*, **95**, 231-240, 2000.
  33. Prigent, P., Saoudi, A., Pannetier, C., Graber, P., Bonnefoy, J. Y., Duet, P. and Hirsch, F. : Mercuric chloride, a chemical responsible for T helper cell

(Th2)-mediated autoimmunity in Brown Norway rats, directly triggers T cells to produce interleukin-4. *J. Clin. Invest.*, **96**, 1484-1489, 1995.

34. 김형아, 이경숙, 김경란, 김광호, 허 용 : 면역독성학적 분석에 의한 축산업 종사자들의 건강 유해성 평가. *한국독성학회지*, **21**(2), 121-128, 2005.