식품 첨가물의 면역독성 및 혈액독성 — Erythrosine이 마우스의 면역기능과 Methemoglobin형성에 미치는 영향 —

黃美瓊·尹惠禎·柳忠珪·*文昌奎
梨花女子大学校 薬学大学
*서울大学校 薬学大学

Effects of Erythrosine on Murine Immune Functions and Methemoglobin Formation

Mi-Kyung Hwang, Hae-Chung Yun, Chung-Kyu Ryu, *Chang-Kiu Moon
College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120, Korea
** College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea*

ABSTRACT-Erythrosine used as a colouring agent in drugs, cosmetics and foods in Korea, was examined for its effects on murine immune system and methemoglobin formation.

As immunotoxicologic assay parameters, we adopted circulating leukocytes and immunoorgan weights for pathotoxicology, IgM plaque forming cells and arthus reaction for humoral immunity, delayed hypersensitivity reaction for cell mediated immunity and carbon clearance for macrophage function.

Erythrosine's effects were observed as follows;

1. **Erythrosine showed no significant effects on circulating leukocyte counts and relative immunoorgan weights.**
2. **Erythrosine diminished IgM plaque forming cells.**
3. **Erythrosine decreased arthus reaction, in the dose dependent manner.**
4. **Erythrosine had no significant effect on delayed hypersensitivity.**
5. **Phagocytic and corrected phagocytic index were not affected.**
6. **Methemoglobin content was similar in the test and control groups.**

Key words □ Erythrosine, Immune Function, Circulating leukocyte count, Immunoorgan weight, Plaque forming cell, Arthus reaction, Delayed hypersensitivity reaction, Carbon clearance, Methemoglobin.

현대 산업사회의 발달로 인한 의약품, 식품 첨가물, 환경물질등 화학물질에의 노출에 대한 지속적인 증가는 비의도적이든 치료목적이든 간에 생체기능에 변화를 가져올 수 있고, 면역반응을 억제하거나 증가시키는 화합물의 검출은 chemical safety assessment program의 중요한 부분을 차지하고 있다. Erythrosine은 현재 국내에서 사용이 허가된 식용 착색료로서 의약품, 화장품뿐 아니라 캔디, 츄잉껌, 쿠키, 아이스크림은 포함하는 음식물에 널리 사용되는 것이다. Erythrosine의 독성은 약한 것으로 알려져 있기는 하나

Received for publication 15 October, 1987
Reprint requests; Dr. C.K. Ryu at the above address

Waliszewski는 hemolytic disorder를 야기한다고 보고하였고[1], Collins 등은 hematocrit value, leukocyte count, reticulocyte count 그리고 hemoglobin level의 저하와 함께 체중감소를 보고하였다[2]. 또한 thymidine incorporation 감소에 의한 DNA의 합성저해도 보고된 바 있다[3].

본 연구에서는 Erythrosine이 마우스의 면역기능과 methemoglobin형성에 미치는 영향에 대해 검토하였기에 그 결과를 보고하고자 한다. 면역반응의 parameter로서는 pathotoxicity, humoral immunity, cell mediated immunity 그리고 macrophage function을 택하여 실험하였다.

재료 및 방법

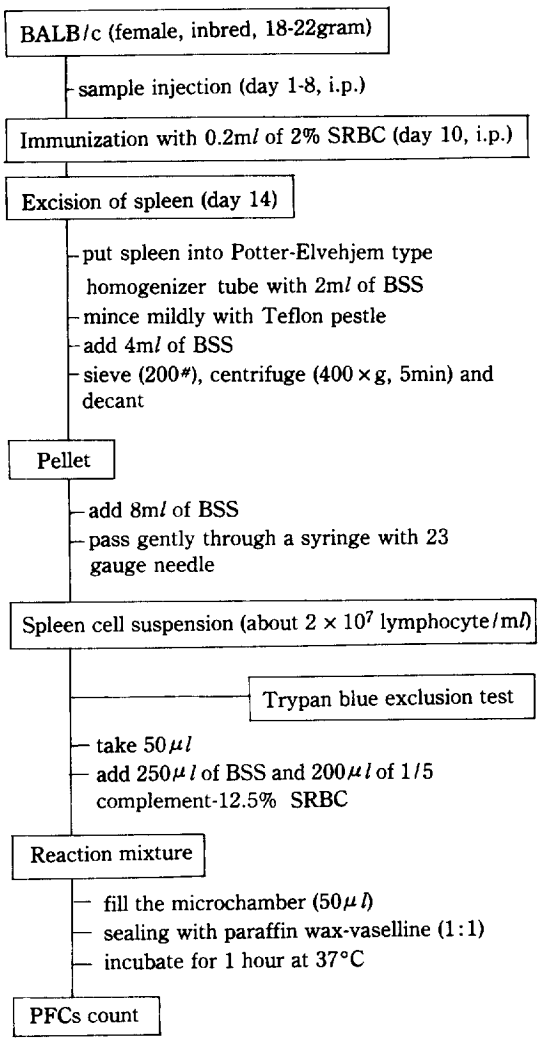
시약 및 기구—Erythrosine은 남영상사 주식회사(일본 후생성 검정품)을 사용하였고, guinea pig complement는 Gibco社에서, bovine serum albumin과 complete Freund's adjuvant는 Sigma社에서 그리고 Pelikan drawing ink(17 Black India)는 Pelikan A.G社에서 각각 구입하였으며, 기타 시약은 1급 이상의 것을 사용하였다.

CO_2 incubator는 Forma Scientific, model 3158을, micrometer는 Mitutoyo MFG社 제품을, UV spectrophotometer는 shimadzu UV-240을 사용하였다.

실험동물 및 처리—체중 20±2g의 BALB/c 순종 마우스와 ICR 마우스를 1주일 이상 동물실 환경에 적응시킨 후 사용하였고, 동물실은 12시간 간격의(오전 7시에서 오후 7시) light-dark cycle을 유지하였다. Erythrosine의 투여는 3mg/kg, 30mg/kg 용량이 되도록 생리 식염수에 녹여 각각 복강주사하였으며 대조군은 생리 식염수를 투여하였다. 실험동물의 circadian rhythm을 고려하여 시료의 투여와 실험은 오전 9시에서 오전 11시 사이에 행하였다[4].

혈중 백혈구수와 면역장기—Female BALB/c 순종 마우스에 Erythrosine(3mg/kg, 30mg/kg)을 10일간 복강주사하고, 마지막 투여 24시간 후에 retro orbital plexus로 부터 채혈하여 hemacytometer를 이용하여 백혈구 수를 계산하였다. 채혈에 앞서 마우스의 무게를 재고 치사시킨 후 간과 비장의 무게를 재어 상대적 면역장기의 비를 구하였다.

용혈반 형성 세포수(Plaque Forming Cells)—Cunningham's liquid monolayer slide method를 사용하였으며, Scheme 1.에 나타내었다[5-10]. 여기서의 BSS는 phosphate buffered balanced salt solution을, SRBC는 sheep red blood cell



Scheme 1. Procedure for Assay of IgM Plaque Forming Cells by Cunningham's Liquid Monolayer Slide Method in Female BALB/c inbred Mice.

을 나타낸 것이다.

항체 매개 과민반응과 지연형 과민반응—웅성 ICR 마우스에 Erythrosine 각 용량을 10일간 복강주사하고 complete Freund's adjuvant(CFA)를 첨가한 bovine serum albumin(BSA) 100 μg을 마우스당 피하주사하여 감작시켰다. 이때 negative control은 sensitizing antigen대신 멸균 생리식염수를 사용하였다. 감작 후 7일 뒤에 2% heat-aggregate BSA를 micrometer로 미리 발바닥 두께를 측정한 마우스의 발바닥에 30 μl씩 피하주사하여 challenge시키고, 3시간과 24시간 후에 그 증가치를 관찰하여 각각 항체 매개 과민반응과 지연형 과민증의 척도로 하였다.

Colloidal carbon clearance—B. N. Halpern *et al*[11]과 G. Biozzi *et al*[12]의 방법에 따랐으며, 각 용량의 Erythrosine을 female BALB/ c mice에 10일간 복강주사하고 시료 투여 최종일로 부터 24시간 후에 행하였다. carbon suspension은 Pelikan ink를 1% gelatin을 함유하는 멸균 생리식염수로 5배 희석하여 조제하였으며 주사 전 40℃를 유지하였다. 실험에 앞서 마우스의 무게를 미리 재어 16 mg/ 100g을 마우스의 꼬리 정맥에 주사하고, 5분, 10분, 15분, 20분 간격으로 채혈하여 0.1% sod. carbonate 용액 3 ml중에 가하고, 600 nm에서 UV흡광도를 측정하였다. 실험 후 마우스는 치사시켜 간과 비장의 무게를 재고, 이로 부터 phagocytic index(PI)와 corrected phagocytic index(CPI)를 계산하였다.

Methemoglobin—F. L. Rodkey *et al*[13]의 방법에 준하였다. ICR 웅성 마우스에 Erythrosine 각 용량을 5일간 복강주사하고 최종 시료 투여 후, 10분, 20분, 30분, 60분, 90분, 120분, 150분, 180분 간격으로 채혈하여 KCN함유 0.01 M Tris용액으로 약 1500배 희석하고 CO gas로 포화시켜 420 nm에서 흡광도(A_1)를 측정하였다. 약 10 mg의 $Na_2S_2O_4$를 가하여 15분 방치 후 420 nm에서 흡광도를 재 측정하여(A_2) 이로 부터 methemoglobin의 함량(%)을 계산하였다.

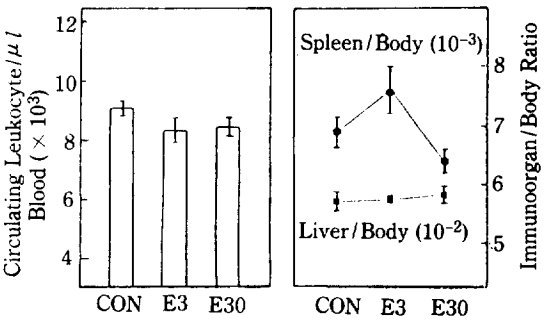
$$\% = \frac{(A2 \quad A1)\varepsilon_{420}^{CO\ b}}{A2(\varepsilon_{420}^{COHb} \quad \varepsilon_{420}^{CNMetHb})} \times 100$$

In mice, molar absorptivity (ε) per Mol of Hemoglobin Iron for COHb and CNMetHb at 420 nm are 1.952 and 1.130, respectively.

통계 분석—모든 실험 Data는 mean±standard error로 나타내었으며, 유의성 검정은 student's t-test에 의하였다.

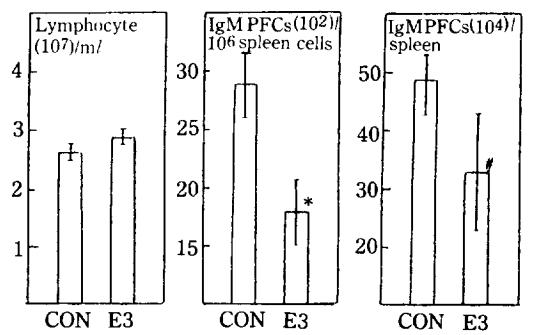
결과 및 고찰

Erythrosine의 투여는 혈중 백혈구수와 면역 장기에는 유의성 없이 나타났으며, 그 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 그러나 Erythrosine 투여군은 체액성 면역반응의 척도인 용혈반 형성 세포수[5-10]와 항체 매개 과민반응(arthus reaction)[14-19]에 있어 유의적인 감소를 나타냈는데(Fig. 2, 3), 이는



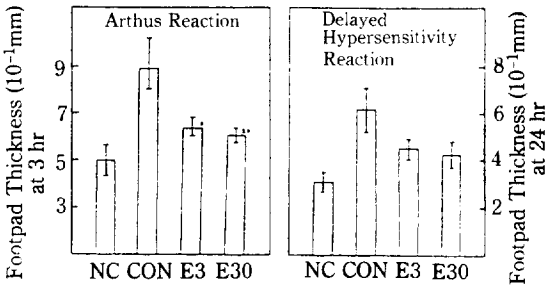
CON; Control
E3; Erythrosine (3mg/kg)
E30; Erythrosine (30mg/kg)

Fig. 1. Effect of Erythrosine on the Circulating Leukocytes and Immunoorgan Weights (Spleen and Liver) in Normal Female BALB/c inbred Mice.



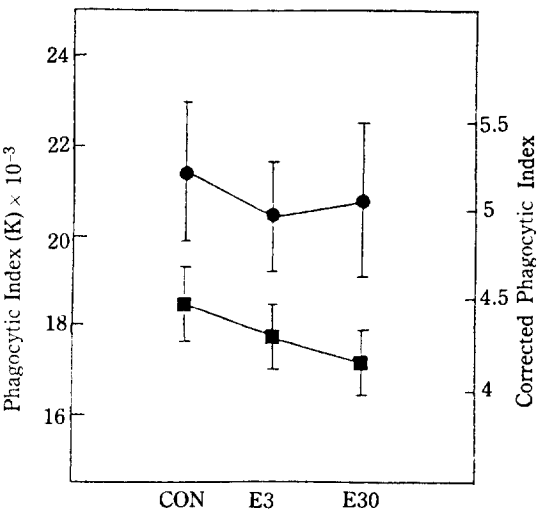
CON; Control #p 0.1 * p 0.05
E3; Erythrosine (3mg/kg)

Fig. 2. Effect of Erythrosine on IgM PFCs in Normal Female BALB/c inbred Mice.



NC; Negative Control CON; Control
E3; Erythrosine (3mg/kg) E30; Erythrosine (30mg/kg)

Fig. 3. Effect of Erythrosine on Arthus and Delayed Hypersensitivity Reaction in Normal Male ICR outbred Mice.



CON; Control
E3; Erythrosine (3mg/kg)
E30; Erythrosine (30mg/kg)

Fig. 4. Effect of Erythrosine on Colloidal Carbon Clearance as Macrophage Function in Normal Female BALB/c inbred Mice.
Phagocytic Index (K) is the slope of the logarithm of blood concentration against time.
Corrected Phagocytic Index is a constant obtained from multiplying the cube root of K by the ratio of the bodyweight to the weight of liver and spleen.

면역항체가 Erythrosine에 대해 민감한 표적 장기가 될 수 있음을 시사하는 것이다.

용혈반 형성 세포 수는 흉선 의존성 항원인 SRBC에 대한 항체의 증식에 협동하는 B세포, T세포 그리고 마크로파지의 능력을 보는 것으로, Erythrosine에의 노출로 인하여 plaque forming cells/ 10^6 spleen cell로 환산시 38.0%가, plaque forming cells/ spleen로 환산시에는 32.0%가 각각 감소되었다. 또한 생체내 주사된 항원이 소정 맥내에서 항체와 침강하여 나타나는 급성 염증 반응인 arthus 반응에서는 AMH Index(antibody mediated hypersensitivity index)가 각각 63.3%, 72.1% 저하하였다. 이상의 결과는 Erythrosine이 IgM이나 IgG 항체의 생성 억제 또는 보체에 대한 기능장애나 호중구에 대한 화학 주성의 억제 혹은 염증 매개체들을 억제할 가능성이 있음을 나타내는 것이다.

Sensitization에 사용되는 CFA는 주사 부위에서 오랜 기간에 걸쳐 항원을 서서히 방출케 하는 것으로, 이러한 점진적인 방출은 항체 산생계 세포와의 접촉 기회를 증가하고, 항원 주사부위나 그 영역, 임파절등에 일종의 염증반응을 불러일으켜 항체 산생계 세포를 자극한다[19]. 한편 가용성 항원으로서의 challenge는 footpad에 있어 국소적 반응을 상쇄시키는 전신적 anaphylactic response를 야기할 수 있으므로 challenge antigen의 heat aggregation은 지연형 과민증 분석에 있어 필수적이다[16]. Erythrosine 투여군은 지연형 과민증을 다소 감소시키는 경향을 나타내었으나 통계학적 유의성은 없었다. 이는 Erythrosine이 세포성 면역에는 유의적인 영향을 미치지 않음을 나타내는 것이다(Fig. 3).

본 실험에 사용한 colloidal carbon suspension은 90% 이상이 간과 신장에 존재하는 macrophage에 의해 제거되며, alveolar macrophage는 관계하지 않는다[11-12]. 세망 내피조직의 phagocytic activity를 반영하는 PI는 동물에 있어 개체간 변동이 심하며, 이를 보정한 CPI는 PI 그 자체보다 개체간 변동을 훨씬 줄일 수 있다. Erythrosine으로의 처리는 PI나 CPI에 있어 유의성 있는 영향을 발견하지 못했다(Fig. 4).

Methemoglobin은 정상적 혈색소인 hemoglobin의 산화형으로, 산화제에 의한 직접적 산화와, 대기중 산소의 존재하 수소 공여체의 작용 그리고 자동산화 등에 의한다. 정상적 개체의 적혈구에도 2% 이하의 순환하는 methemoglobin이 발견되며, intracellular reductive mechanism이

Table 2. Effect of Erythrosine on MetHb formation in male ICR mice.

Time	Methemoglobin (%)		
	Control	Erythrosine(3mg/kg)	Erythrosine(30mg/kg)
10 min[a]	0.60 ± 0.18	1.25 ± 0.49	0.93 ± 0.48
20 min	0.59 ± 0.14	0.90 ± 0.24	0.65 ± 0.21
30 min	0.63 ± 0.19	0.99 ± 0.28	1.10 ± 0.33
60 min	0.60 ± 0.15	0.91 ± 0.30	0.98 ± 0.29
90 min	0.96 ± 0.25	0.85 ± 0.22	1.39 ± 0.29
120 min	0.57 ± 0.18	0.73 ± 0.15	0.94 ± 0.23
150 min	0.68 ± 0.16	0.94 ± 0.27	1.15 ± 0.40
180 min	0.59 ± 0.22	0.95 ± 0.22	1.09 ± 0.25

The data signify the arithmetic mean ± standard error from 9 mice.
[a] Time after last injection.
Treated groups are not significantly different from control group.

methemoglobin의 그 이상의 축적을 방지하고 있다[20]. Erythrosine의 투여는 다소 높은 methemoglobin 함량을 나타내기는 하였으나 유의성 있는 차이는 아니었다(Table 2).

감사의 말

이 연구에 소요된 경비의 일부는 문교부 학술 연구 조성비에 의해 충당되었으며 이에 감사하는 바이다.

국문 요약

식품 첨가제인 Erythrosine이 마우스의 면역기능과 Methemoglobin 형성에 미치는 영향에 관한 실험결과,

1. BALB/ c 순종 마우스의 혈중 백혈구수는 Erythrosine의 영향을 받지 않았으며, 면역 장기에도 유의성 없이 나타났다.
2. BALB/ c 순종 마우스의 Splenic IgM plaque forming cell 수는 Erythrosine에 의해 유의성 있게 감소되었다.
3. 항체 유도 염증반응인 arthus 반응은 ICR 웅성 마우스에서 억제되었다.
4. ICR 웅성 마우스의 지연형 과민반응은 Erythrosine의 영향을 볼 수 없었다.
5. BALB/ c 순종 마우스의 phagocytic index와 corrected phagocytic index는 유의성 있는 차이가 없었다.
6. Erythrosine은 ICR 웅성 마우스에서 methemoglobin 형성에 영향을 미치지 않았다.

참고문헌

1. Waliszewski, T.: Chromatographic and biologic study of food colorings with special reference to erythrosine. *Acta Pol. Pharm.*, **9**, 127 (1952).
2. Collins, T.F.X. and Long, E.L.: Effects of chronic oral administration of erythrosine in the Mongolian gerbil. *Food Cosmet. Toxicol.*, **14**(4), 233 (1976).
3. Tanaka, Noriho and Kitahara, Keida: Cytogenetic effect of food dyes on cultured human cells. *Nippon Eiseigaku Zasshi*, **30**(5), 574 (1975).
4. Fernandes, G., Halberg, F., Yunis, E.J. and Good, R.A.: Circadian rhythmic plaque-forming cell response of spleens from mice immunized with SRBC. *J. Immunol.*, **117**(3), 962 (1976).
5. Cunningham, A.J. and Szenberg, A.: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology*, **14**, 599 (1968).
6. Cunningham, A.J.: Antibody formation

studied at the single-cell level. *Progr. Allergy,* **17,** 5 (1973).
7. Kissinger, R. and Myl, A.D.: Improvements to the plaque assay for antibody secreting cells. *J. Immunol. Methods,* **66,** 377 (1984).
8. Dininno, V.L., Chenier, V.K. and Fenrick, W.J.: Production of monolayer plaque assay slides. *J. Immunol. Methods,* **43,** 115 (1980).
9. Setcavage, T.M., Scheffel, J.W., Kim, Y.B.: Immune response to immobilized sheep erythrocyte monolayer. *J. Immunol. Methods,* **46,** 299 (1981).
10. Richter, M., Berry, M. and Kazaniwsky, N.: Cells involved in the immune response. XXX. *J. Immunol. Methods,* **45,** 65 (1981).
11. Halpern, B.N., Benacerraf, B., Biozzi, G.: Quantitative study of the granulopectic activity of the reticulo-endothelial system. I. *Brit. J. Exp. Pathol.,* **34,** 426 (1954).
12. Biozzi, G., Benacerraf, B. and Halperm, B.N.: Quantitative study of the granulopectic activity of the reticulo-endothelial system. II. *Brit. J. Exp. Pathol.,* **34,** 441 (1954).
13. Rodkey, F.L., Hill, T.A., Pitts, L.L. and Robertson, R.F.: Spectrometric measurement of carboxyhemoglobin and methemoglobin in Hood. *Clin. Chem.,* **25**(8), 1388 (1979).
14. Titus, R.G. and Chiller, J.M.: A simple and effective method to assess murine delayed type hypersensitivity to proteins. *J. Immunol. Methods,* **45,** 65 (1981).
15. Henningsen, G.H., Koller, L.V., Exon, J.H., Talcott, P.A. and Osborne, C.A.: A sensitive delayed-type hypersensitivity model in rat. *J. Immunol. Methods,* **70,** 153 (1984).
16. Katsura, Y., Nakano, K., Kabara, Y. and Uesaka, I.: Cell-mediated and humoral immune response in mice. *Int. Archs Allergy appl. Immun.,* **53,** 152 (1977).
17. Exon, J.H., Koller, L.D., Henningsen, G.H. and Osborne, C.A.: Multiple immunoassay in a single animal. *Fundam. Appl. Toxicol.,* **4,** 278 (1984).
18. Hartley, L.W., Zimmermann, J.L. and Schmidtke, J.R.: A novel way to assess murine delayed type hypersensitivity. *J. Immunol. Methods,* **58,** 255 (1983).
19. French, V.I., Stark, J.M. and White, R.G.: The influence of adjuvants on the immunological response of the chicken. *Immunology,* **18,** 645 (1970).
20. Bodansky, O.: Methemoglobinemia and methemoglobin-producing compounds. *Pharmacol. Revs.,* **3,** 144 (1951).