

Mycotoxin 分泌 數種菌株들의 培養濾過液으로 處理된
HeLa 細胞의 電子顯微鏡的 觀察

高 香 明·崔 大 卿·滕 永 健*

(延世大學校 醫科大學 微生物學教室, 電子顯微鏡室*)

Electron Microscopic Observations on the HeLa Cells Treated with
Culture Filtrates of Mycotoxin-Producing Fungi

KOH, Choon Myung, Tae Kyung CHOI, and Young Kun DEUNG*

(Department of Microbiology and Electron Microscopy Laboratory*,
College of Medicine, Yonsei University)

ABSTRACT

The fine structure of HeLa cells treated with several mycotoxin-producing fungi (*Aspergillus flavus* ATCC 15517, *Aspergillus parasiticus* RIB 1037, *Penicillium toxicarium* RIB 4002, *Penicillium citrinum* SWU 238, *Penicillium islandicum* IFO 5235, *Penicillium tardum* IFO 5787 and *Penicillium brunneum* RIB 1172) has been examined and some details have been described.

The normal HeLa cells have numerous microvilli, large ovoid nucleus, pleomorphic mitochondria, electron-dense body, Golgi complex, mid-body and endoplasmic reticulum etc.

Certain specific structural changes induced by culture filtrates of several mycotoxin-producing fungi have been noted. These alterations induced disappearance of Golgi complex, rER vacuolization, nucleolus attachment to the nuclear envelope and appearance of certain vacuoles. There were not any changes by the treatment of culture filtrates of non-toxic fungi and only cell debris of some specimens can be observed by the injury of culture filtrates.

The experimental animals treated with mycotoxin-producing fungi (*Aspergillus flavus* ATCC 15517, *Aspergillus parasiticus* RIB 1037, *Penicillium citrinum* SWU 238, *Penicillium toxicarium* RIB 4002, and *Penicillium islandicum* IFO 5235) were observed on the focal necrosis and on inflammatory infiltration of liver parenchymal cells treated with culture filtrates.

緒 論

組織培養 細胞들에 對한 微細構造에 對하여서는 그 동안 여러 學者들에 依하여 觀察 되었으며 아울러 여러 種類의 藥品을 處理하여 일어나는 變化等에 對하여도 研究된 바 있다.

Robbins 및 Scharff(1966)는 細胞의 分

裂過程中的 細胞에서 Golgi apparatus, lysosome, endoplasmic reticulum 및 mitochondria 등의 變化는 거의 없다고 하였으나 Robbins(1968) 등은 分裂中 centriole과 pericentriole의 가벼운 變化를 관찰 가능하다고 하고, Blondel 및 Tolmach(1965)는 cell cycle 中 telophase를, Erlandson 및 Harven(1971)은 各 stage 別로 나누어 研

究하여 各 stage에 약간의 變化는 있다고 發表한 바 있다.

또한 Froese(1964), Hsu(1960), Kim 및 Perez(1965) 그리고 Scharff 및 Robbins(1965)는 4가지 要因에 依하여 同調培養의 난점을 표시하고 이로 因하여 培養細胞의 構造에 對한 觀察 역시 正確을 기하기 매우 힘들다고 하였다. 따라서 이에 對한 構造의 觀察도 Krishan 및 Buck(1965)는 mid-body formation이 될 경우 이를 一名 stem-body라고 불렀으며, 이 mid-body 形成은 細胞의 完全 分離를 방해한다고 主張하였으며(Abramson 및 Byers, 1966; Fawcett, 1961), 이와 같은 mid-body는 intracellular bridge의 역할을 한다고 主張하였다(Robbins 및 Gonatas, 1964; Jones, 1969; Byers 및 Abramson, 1968; Buck 및 Tisdale, 1962).

또한 HeLa cell의 核은 2가지 type이 있어 한 모양은 fibrillar form이고 다른 하나는 granular form이라고 주장하기도 하였다(Fell 및 Hughes, 1949; Popoff 및 Stewart, 1968; Lewin 및 Moscorello, 1968; Hardin 등, 1969; Monneron 및 Bernhard, 1969). 그외에 Everingham(1968), Kessel(1968) 등은 nuclear envelope으로부터 시작된 lamellae에 關하여 發表하고 Epstein(1961)은 HeLa cell, Kessel(1968)은 oöcyte, Procicehiani(1968) 등은 lymphocyte, Leak(1967) 등은 human fibrosarcoma 등에서 lamellae를 관찰, 이에 對한 研究를 實施한 바 있다.

各種 藥品을 處理한 組織培養 細胞에 對한 研究 역시 많은 學者들에 依하여 實施되었는데 Erlandson 및 Harven(1971)은 colcemide로서, Journey 및 Goldstein(1961)은 actinomycin D로서, Heine(1969)은 toycamycin으로, Robbins 및 Gonatas(1964)는 spindle inhibitor로서, Goldberg 및 Green(1959)은 IgG를 使用하여, Edward 및 Fogh(1959)는 trypsin 處理로, Jones 및 Fawcett(1966), Remmer 및 Merker(1963)

는 phenobarbital로서 處理, 이들 各種 細胞의 變化를 관찰하여, Golgi complex의 fragmentation, sER의 증가, mitosis의 抑制 그리고 membrane phospholipid의 增加 등을 나타낸다고 主張하였으며, 安田(1967)은 mitochondria의 藥劑處理에 依한 變化 pattern을 몇가지로 分類하여 그 變化樣相을 發表한 바도 있다.

한편, 各種 培養組織 細胞와 實驗動物을 利用하여 mycotoxin을 assay하려는 試圖는 여러 學者들에 依하여 실시되고 현재 여러 方法이 이용되고 있으나 그중 HeLa 細胞와 mouse를 利用한 方法 등은 알려져 있는 方法들이며(Saito 등, 1971; Enomoto 및 Saito, 1972; 趙等, 1973; 高等, 1974), 이를 통한 實驗 動物의 電子顯微鏡的 觀察도 實施된 바 있다(Svoboda 등, 1966; Enomoto 및 Satio, 1972; Sporn 등, 1966; 藤等, 1973; 藤等, 1974; 金, 1971).

이에 著者들은 mycotoxin을 分泌한다고 알려진 眞菌中 數種의 菌株를 使用하여 HeLa 細胞에 對한 細胞 毒性의 여부 및 變化程度와 ICR-mouse를 利用한 臟器의 變化有無를 觀察함과 同時에 特히 HeLa 細胞의 形態學的 變化樣相을 電子顯微鏡을 通하여 觀察하여 보았던 바 그 結果를 얻을 수 있었기에 여기 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 實驗에 使用된 菌株

實驗에 使用된 菌株로서는 *Aspergillus flavus* ATCC 15517, *Aspergillus parasiticus* RIB 1037, *Penicillium toxicarium* RIB 4002, *Penicillium citrinum* SWU 238, *Penicillium islandicum* IFO 5235, *Penicillium tardum* IFO5787, *Penicillium brunneum* RIB 1172 株로서 總 7株이었다.

2) 實驗에 使用된 細胞 및 mouse

實驗에 使用된 細胞株로서는 國立保健 研究院에서 분양받아 本 教室에서 繼代保管중인 HeLa細胞株와 日本 國立癩病 研究所에

서 분양받은 ICR-mouse株를 使用하였다.

3) 實驗에 使用된 培地 및 試藥

本 實驗에 使用된 培地로서는 美國 Difco 會社 製品의 lactalbumin hydrolysate, yeast extract, bovine albumin 等과 市販 되고 있는 一級 試藥을 使用하였다.

2. 實驗方法

1) 菌 培養 濾過液 製造方法

各種 實驗菌株를 특신生成培地* 200ml에 各 各 接種, 27°C에서 2주간 靜置培養한 후, 이를 먼저 gauze를 通하여 여과하고 이를 다시 Seitz-filter apparatus를 利用 再次 濾過하였으며 이를 使用하여 HeLa細胞의 毒性 여부와 實驗動物의 毒性 檢査를 위한 여과액으로 使用하였다.

2) HeLa細胞株의 培養方法 및 濾過液 處理 方法

HeLa細胞株의 培養方法 및 處理方法으로서는 LEY 培地**에 10% 牛血清을 첨가하여 培養시켜 培養하여 오고 있는 HeLa細胞株를 trypsin溶液으로 37°C에서 20分間 處理하고 여기서 부터 HeLa細胞株를 採取한 뒤 이를 細胞株를 1ml當 2.5×10^5 cell이 되게 다시 培地로 희석 이의 一定量과 同量의 10%로 희석된 培養濾過液을 混合, Leighton tube에서 5% CO₂ 存在下 3~4日間 培養, 이를 hematoxylin-eosin 染色을 實施, 細胞 毒性 여부를 관찰함과 同時에 電子顯微鏡의 觀察을 實施하였다.

3) ICR-mouse株를 使用한 毒性 檢査 方法

ICR-mouse를 使用한 毒性檢査 方法으로서는 體重 20gm 내외의 mouse를 使用하여 每 體重 20gm當 1.0ml를 基準으로 1.0ml~1.5ml의 培養 濾過液을 腹腔內에 注射하고 注射후 1週日후에 도살하여 肝臟을 비롯하여 腎臟 및 睪丸을 적출, 病理 組織標本을 作成, 病變의 有無와 程度를 觀察하였다.

4) 電子顯微鏡의 觀察方法

試料인 HeLa細胞株를 採取, 低速遠沈하여 침전물에 0.1 mol phosphate buffer solution으로서 調整한 pH 7.4의 3% glutar-

aldehyde solution에 2時間, 0~4°C에서 先 固定한 뒤 10% sucrose를 含有한 pH 7.4 의 0.1 mol phosphate buffer solution으로 3回 洗滌하고 다시 1% osmium tetroxide solution으로서 2時間後 固定하였다. 固定이 끝난 試料는 70% ethanol로서 洗滌 遠沈한 후 Kellenberger(1967) 등의 方法에 依하여 1% 加温 寒天이 응고되면 1mm³의 크기로 細切하여 70% ethanol로 부터 上昇順으로 無水 alcohol 및 prophylyene oxide로서 脫水를 行하고 epon 812(Luft, 1961)로 包埋, glass knife를 使用 Sorvall MT-2 Porter blum Ultramicrotome으로 500Å의 두께로 超薄切片을 作成, 포화 uranyl acetate solution과 lead citrate solution으로 二重 染色을 實施, Hitachi製品 HU-11E-1型 電子顯微鏡으로 75KV에서 觀察하였다.

*특신生成 培地(Wogan, 1965)

NaN₃ 20 gm, KCl 0.5gm, Sucrose 30.0gm
K₂HPO₄ 1.0gm, FeSO₄ 0.01gm, D.Water 1.00ml
MgSO₄ 0.5gm, ZnSO₄ 0.2gm

**LEY-media

10X Earle's salts	100ml
10X Lactalbumin hydrolyate	100ml
10X Yeast extract	100ml
50X Sod. bicarbonate	100ml
10X Bovine albumin	100ml(Low Sugar)
Sterile D. water	690ml

結 果

1. HeLa細胞株에 對한 細胞毒性 成績

實驗에 使用된 菌株의 細胞毒性에 對한 成績을 보면, 10% 培養濾過液으로 處理된 群에서는 *Aspergillus flavus* ATCC 15517, *A. parasiticus* RIB 1037, *Penicillium* SWU 238, *Penicillium* RIB 4002, 및 *Penicillium* IFO 5235 株는 cytotoxicity grade 2-3이 었으며, 그 이외의 菌株들은 cytotoxicity grade 1이었고 그중 *Penicillium brunneum* RIB 1172는 별다른 變化를 발견할 수 없이 正常群(normal) 및 培地만을 處理한 群

(test control)과 同一하였다(Table 1).

Table 1. Result of cytotoxicity test on HeLa cells to the experimental strains

Generic name	Grade of cytotoxicity on HeLa cell (10%F*)
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 15517	3+
<i>Aspergillus parasiticus</i> RIB 1037	3+
<i>Penicillium toxicarium</i> RIB 4002	2+
<i>Penicillium citrinum</i> SWU 238	3+
<i>Penicillium islandicum</i> IFO 5235	2+
<i>Penicillium tardum</i> IFO 5787	1+
<i>Penicillium brunneum</i> RIB 1172	0
Test Control	0
Control	0

F* : Culture Filtrates

2. ICR-mouse株에 對한 檢査 成績

實驗에 使用된 菌株들의 ICR-mouse株에 對한 毒性을 보면 역시 *Aspergillus flavus* ATCC 15517, *Penicillium parasiticus* RIB 1037, *Penicillium islandicum* IFO 5235, *Penicillium citrinum* SWU 238, 및 *Penicillium toxicarium* RIB 4002은 輕度の 肝實

Table 2. Result of toxicity test on ICR-mice to the experimental strains

Generic name	Grade of toxicity on ICR-mice
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 15517	2
<i>Aspergillus parasiticus</i> RIB 1037	3
<i>Penicillium toxicarium</i> RIB 4002	1
<i>Penicillium citrinum</i> SWU 238	1
<i>Penicillium islandicum</i> IFO 5235	1
<i>Penicillium tardum</i> IFO 5787	0
<i>Penicillium brunneum</i> RIB 1172	0
Test Control	0
Control	0

質細胞에 炎症 내지 部分的 괴사현상을 나타내었으며 그이의 glycogen 및 lipid 등의 축적 현상을 나타내었으나 培地만으로 處理된 群(test control) 및 正常 對照群(normal)에서는 病變을 볼 수 없었다(Table 2).

3. 電子顯微鏡의 成績

1) 正常 HeLa 細胞株의 微細構造

正常 HeLa 細胞株의 微細構造를 보면 nuclear envelope으로 둘러 싸여있는 核(N)과 核內部에는 仁(Nu)이 存在하고 있으며, 形態學的으로는 他 正常 核과 같이 둥근 형태를 하고 있었다. 또한, granular 및 fibrillar型的 nuclear body를 觀察할 수 있었다. Mitochondria(M)는 大部分이 원형 혹은 타원형이었으며, mitochondria 內의 cristae는 잘 發達되어 있었다. 그이의 Golgi apparatus, rER system, mid-body 등이 관찰되었으며 많은 microvilli, vacuole 및 lipid 등도 觀察이 可能하였다(Plate 1의 Fig. 1, 2, Plate 2의 1).

4. Mycotoxin 生成菌株의 培養濾過液으로 處理한 HeLa細胞株의 微細構造 成績

Mycotoxin生成菌株의 培養濾過液으로 處理한 HeLa cell의 微細構造를 보면, 正常 HeLa細胞와 달리 形態學的으로 變化를 가져와 大部分이 細胞自體의 모양이 원형에 가깝게 變化되어 있었으며 微細構造를 보면, 核의 모양이 正常세포와 다르게 불규칙한 형태를 나타내고 nucleolus는 nuclear envelope에 부착되어 있음을 볼 수 있었다(Plate 2의 Fig. 2, Plate 3의 Fig. 1 및 Plate 4의 Fig. 1).

또한 細胞質의 構造를 보면, Golgi apparatus는 거의 消失되어 버렸으며 rER의 vacuolization, certain vacuole의 出現 및 增加等 正常 細胞에서 볼 수 없는 현상들이 觀察되었으나 mitochondria에는 별다른 變化가 없었다(Plate 2의 Figs 2, Plate 3의 Fig. 2).

또한, 上記 實驗菌株에서 보면 程度의 差異는 있으나 大部分 共通된 變化를 招來하

였으며 *Aspergillus parasiticus* RIB 1037에서는 그 細胞毒性이 強하여 거의 細胞의 完全한 形態는 관찰하기 힘들고 cell debris를 만의 관찰이 가능하였으나(Plate 5의 Figs. 1, 2), 反面 *Penicillium tardum* IFO 5787 및 *Penicillium brunneum* RIB 1172에서는 正常細胞와 별다른 變化의 觀察이 힘들었다.

考 察

電子顯微鏡의 發達以後 많은 學者들에 依하여 各種 組織細胞나 組織培養細胞 等에 對한 微細構造에 對하여 많은 研究가 進행되 었으며, 現在도 進行되고 있는 형편이다.

Robbins 및 Scharff(1966)은 細胞의 分 裂過程中的 細胞에서 細胞質의 觀察結果 Golgi apparatus, lysosome, endoplasmic reticulum 및 mitochondria 等의 變化는 볼 수 없으나 centriole과 pericentriole에 는 가벼운 變化等을 볼 수 있고 Blondel 및 Tolmach(1965), Eriandson 및 Haven(1971)은 各 分裂期의 差異에 따라 약간의 變 化가 있다고 發表하였다. 따라서 組織培養 細胞의 微細構造를 正確히 觀察하기는 극히 힘든 일이며 이는 各分裂期를 同調培養 狀 態로 만들기가 힘들기 때문이라고 하였다 (Hsu, 1960; Froese, 1964; Kim 및 Perez, 1965; Scharff 및 Robbins, 1965).

따라서 各 하나의 分裂期의 微細構造를 觀察하는 일이 많이 있으며 Krishan 및 Buck(1965)는 metaphase의 細胞를 관찰하 고 특히 mid-body formation의 관찰이 可 能하다고 하였는데 本 實驗結果에서도 同一 한 結果를 볼 수 있었다(Plate 4의 Fig. 1).

또한 HeLa cell의 경우, Hardin(1969) 等, Monneron 및 Bernhard(1969), 그리고 Popoff 및 Stewart(1968)等은 核은 2가지 型으로, 한 모양은 granular form이고 또 다른 하나는 fibrillar form이라 하였으며 그 이외의 微細構造는 他 細胞의 微細構造 와 별다른 差異點을 發見할 수 없었다고 發

表하였다.

各種 藥劑 處理를 行한 組織培養細胞에 對 한 研究 역시 여러 學者들에 依하여 行하여 졌는데 Robbins 및 Gonatus(1964)는 0.1~ 1.0 μ g/ml의 colchicine 혹은 vinblastine sulfate를 處理하였을 경우 Golgi apparatus 의 fragmentation, microtubule의 소실, rER 및 annulate lamellae의 증가, sER 의 whorl 출현 등이 나타난다고 하고 Krishan(1968) 等은 Earl's L cell에서 0.01 μ g/ml의 vinblastine을 處理하였을 경우 rER 및 annulate lamellae의 증가는 前者의 研 究 結果와 同一하다고 하고, Wirkus 및 Meenakshi(1968)는 *Allium cepa*의 root meristematic cell에 colchicine을 處理한 경 우 multilayered sER이, George(1965)는 HeLa cell에 0.1~1.0 μ g/ml의 vincristine 을 處理하여 multilamellae sER이 발견된 다고 하고 0.1 μ g/ml의 colchicine을 處理 하면, fine filament의 bundle formation, 1.0 μ g/ml를 處理하면 sER의 proliferation 현상이 나타나고 이는 phenobarbital을 處 理한 경우와 同一하다고 主張하였다(Jones 및 Fawcett, 1966; Remmer 및 Merker, 1963). 또한, actinomycin D로 處理하였을 경우, nucleolus의 變化, 즉, nucleolus의 fragmentation, cytoplasm의 blebbing 等 을 볼 수 있다고 하였는데 이는 本 實驗 結果에서도 mitochondria에서는 별다른 變 化가 없으나 rER의 vacuolization, Golgi apparatus의 소실, nucleolus의 變化 및 nuclear envelope에의 부착현상 그리고, sER의 變化等은 他 研究結果와 一致하는 變化들이었다(Plate 2, 3, 4의 Figs. 4, 5, 6, 7 및 8).

따라서 本 實驗을 綜合하여 볼 때, mycotoxin 中 共通된 toxin을 分泌한다고 알 려진 菌株(*Aspergillus flavus* ATCC 15517, *Aspergillus parasiticus* RIB 1037, *Penicillium citrinum* SWU 238)들은 大部 分 同一한 樣相을 나타내었으며 그 以外의 他 菌株들도 前者와 별다른 差異를 나타내지

않았으며, 光學 顯微鏡下에서 가벼운 變化는 電子顯微鏡下에서도 심한 變化가 招來되지 않았다.

한편, mycotoxin에 對한 實驗結果를 보면 Legator(1966)은 培養濾過液에 노출된 후 non-dividing cell의 증가, 巨大細胞의 出現, mitosis의 抑制, Zuckerman(1968) 등은 RNA 및 DNA合成의 저해, Dilimpio(1968) 그리고 Promchaiant(1972) 등은 染色體의 breakage 및 translocation, Harley(1969) 등은 ribosome과 hetero-disperas RNA의 합성을 저해한다고 發表한 바 있으며 Natori(1970) 등은 *Aspergillus ochraceus*의 배양여과액이, Saito(1971) 등은 食品에서 分離한 菌株들의 배양액들이 HeLa cell에 對하여 細胞毒性을 야기하여 이를 screening 方法으로 使用可能性을 主張하였다.

動物의 實驗結果에서는 여러 學者들에 의하여 특—신 및 培養濾過液을 注入하였을 경우 주로 肝細胞의 periportal necrosis, parenchymal cell necrosis, degenerative change of hepatic cell 등의 現象을 볼 수 있다고 主張하였는데 本 實驗 結果에서도 實驗菌株들의 대부분이 HeLa cell에 對하여 cytotoxicity 및 hepatic cell의 necrosis 및 inflammatory change를 일으키어 同—한 結果를 나타냈다고 하겠다.

끝으로, 이들 培養液은 細胞內的 enzyme activity에 關여하는 것으로 思慮되며 rER 및 Golgi complex 등의 變化는 細胞 protein synthesis 作用에 關여하는 것으로 생각되나 이는 좀더 자세한 生化學的인 分析이 필요할 것으로 思慮된다.

摘 要

Mycotoxin을 分泌한다고 알려진 數種의 眞菌 培養濾過液으로 處理한 HeLa cell에 對한 微細構造의 變化를 電子顯微鏡을 통하여 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 正常 HeLa cell의 構造는 他 組織 培養細胞의 구조와 비슷하였으며 nuclear envelope에 쌓여진 核, mitochondria, ER system, Golgi apparatus, mid-body vacuole, fat 등 一般構造를 볼 수 있었다.
2. Mycotoxin 分泌菌株의 培養濾過液으로 處理된 HeLa cell의 경우, 形態學的인 變化를 비롯해서 核의 變化, Golgi apparatus의 소실 rER의 vacuolization, certain vacuole의 出現等 심한 變化를 招來하였다.
3. 細胞毒性이 심한 菌株로 處理된 HeLa cell은 正常的인 細胞構造 및 形態를 관찰하기 힘들었다.
4. 實驗菌株가 다르다고하나 變化는 菌株間의 별다른 差異點을 볼 수 없었다.
5. HeLa 細胞株 및 ICR-mouse株에 對한 毒性 檢査 結果를 보면 實驗菌株의 大部分이 HeLa 細胞에 對하여 cytotoxic effect를 나타내었으며 아울러 ICR-mouse에 對하여도 肝細胞에 對하여 證 내지 괴저 현상을 야기하였다.

引 用 文 獻

1. Abramson, D.H., and Byers, B., 1966. Morphological changes in HeLa cells during late cytokinesis. *J. Cell Biol.*, **31**, 3A.
2. Blondel, B., and Tolmach, L.J., 1965. Studies on nuclear fine structure: Three phases of the HeLa cell cycle. *Exp. Cell Res.*, **37**, 497.
3. Buck, R.C., and Tisdale, J.M., 1962. An electron microscopic study of the development of the cleavage furrow in mammalian cells. *J. Cell Biol.*, **13**, 117.
4. Byers, B., and Abramson, D.H., 1968. Cytokinesis in HeLa: Post-telophase delay and microtubular-associated motility. *Proto-*

- plasma*, **66**,413.
5. Cho, S.H., Koh, C.M., Choi, T.J., and Lew, J., 1973. Studies on the population of toxigenic fungi in foodstuffs. *J. Kor. Soc. Microbiol.*, **8**,43.
 6. Deung, Y.K., Choi, C.K., and Koh, C.M., 1973. Electron microscopic observations of mouse liver cell treated with fungal culture filtrates isolated from foodstuffs(II). *Kor. J. Elect. Microscopy*, **3**,45.
 7. Deung, Y.K., Koh, C.M., Kim, S.K., Sohn, W.J., and Lew, J., 1974. Electron microscopic observations of mouse liver cell treated with fungal culture filtrates isolated from foodstuffs. *New Med. J.*, **17**,101.
 8. Dilimpio, D.A., 1968. Effect of aflatoxin on human leukocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **127**,559.
 9. Edwards, G.E., and Fogh, J., 1959. Morphologic changes in human amnion cells during trypsinization. *Cancer Res.*, **19**, 608.
 10. Epstein, M.A., 1961. Some unusual features of fine structure observed in HeLa cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **10**,153.
 11. Erlandson, R.A., and Harven, E., 1971. The ultrastructure of synchronized HeLa cells. *J. Cell Sci.*, **8**,353.
 12. Everingham, J.W., 1968. Attachment of intranuclear annulate lamellae to the nuclear envelope. *J. Cell Sci.*, **37**,540.
 13. Enomoto, M., and Saito, M., 1972. Carcinogens produced by fungi. *Ann. Rev. Microbiol.*, **26**,279.
 14. Fawcett, D.W., 1961. Intercellular bridges. *Exp. Cell Res.*, Suppl., **8**,174.
 15. Fell, H.B., and Hughes, A.F., 1949. Mitosis in mouse: A Study of living and fixed cells in tissue cultures. *Quart. J. Microscop. Sci.*, **99**,355.
 16. Froese, G., 1964. The distribution and interdependence of generation times of HeLa cells. *Exp. Cell Res.*, **35**,415.
 17. George, P., Journey, L.J., and Goldstein, M.N., 1935. Effect of vincristine on fine structure of HeLa cells during mitosis. *J. Nat. Cancer Inst.*, **35**,355.
 18. Goldberg, G., and Green, H.J., 1959. Cytotoxic action of immune gamma globulin and complement on Krebs ascites tumor cells, II. Ultrastructural studies. *J. Exp. Med.*, **109**,505.
 19. Hardin, J.W., Spicer, S.S., and Greene, W.B., 1969. The paranuclear structure, accessory body of Cajal, sex chromatin and related structures in nuclei of rat trigeminal neurons: A cytochemical and ultrastructural study. *Anat. Rec.*, **164**,430.
 20. Harley, E.H., Rees, K.R., and Cohen, A., 1969. A comparative study of the effect of aflatoxin B and actinomycin D on HeLa cells. *Biochem. J.*, **114**,289.
 21. Heine, U., 1969. Electron microscopic studies on HeLa cells exposed to the antibiotic toyocamycin. *Cancer Res.*, **29**,1875.
 22. Hsu, T., 1960. Generation time of HeLa cells determined from cine records. *Tex. Rep. Biol. Med.*, **18**,31.
 23. Jones, A.L., and Fawcett, D.W., 1966. Hypertrophy of the agranular endoplasmic reticulum in hamster liver induced by phenobarbital. *J. Histochem. Cytochem.*, **14**,215.
 24. Jones, O.P., 1969. Elimination of midbodies from mitotic erythroblasts and their contribution to fetal blood plasma. *J. Nat. Cancer Inst.*, **42**,753.
 25. Journey, L.J., and Goldstein, M.N., 1961. Electron microscope studies on the HeLa cell lines sensitive and resistant to actinomycin D. *Cancer Res.*, **21**,929.
 26. Kellenbeger, E., Ryter, A., and Sechaud, J., 1967. Techniques for electron microscopy. F.A. Davis Co.
 27. Kessel, R.G., 1968. Annulate lamellae. *J. Ultrastruct. Res.*, Suppl., **10**,5.
 28. Kim, J.H., and Perez, A.G., 1965. Ribonucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells. *Nature*, **207**, 974.
 29. Koh, C.M., Kim, S.K., Cho, S.H., Kim,

- S.J., Choi, T.J., and Lew, J., 1974. Studies on the population of toxigenic fungi in foodstuffs. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **2**, 19.
30. Krishan, A., and Buck, R.C., 1965. Structure of the mitotic spindle in L strains fibroblasts. *J. Cell Biol.*, **24**, 433.
31. Krishan, A., Hsu, D., and Huchins, P., 1968. Hypertrophy of granular endoplasmic reticulum and annulate lamellae in Earle's L cells exposed to vinblastine sulfate. *J. Cell Biol.*, **39**, 211.
32. Leak, L.V., Caulfield, J.B., Bruke, J.F., and McKhann, C.F., 1967. Electron microscopic studies on human fibromyxosarcoma. *Cancer Res.*, **27**, 261.
33. Legator, M., and Withrow, A., 1964. Aflatoxin: Effect on mitotic division in cultured embryonic lung cells. *J. AOAC.*, **47**, 1007.
34. Legator, M., 1966. Biological effects of aflatoxin in cell culture. *Bact. Rev.*, **30**, 471.
35. Lewin, P.K., and Moscorello, M.A., 1968. Nucleolar change in HeLa cells grown in the presence of aminonucleoside. *Lab. Invest.*, **19**, 265.
36. Monneron, A., and Bernheard, W., 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.*, **27**, 266.
37. Natori, S., Sasaki, S., Kurata, S., Udagawa, S., Ichinoe, M., Saito, M., and Umeda, M., 1970. Chemical and cytotoxicity survey on the production of ochratoxins and penicillic acid by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm. *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 2259.
38. Popoff, N., and Stewart, S., 1968. The fine structure of nuclear inclusions in the brains of experimental golden hamster. *J. Ultrastruct. Res.*, **23**, 347.
39. Sporn, M.B., Dingman, C.W., Phelps, H. L., and Wogan, G.N., 1966. Aflatoxin B₁ binding to DNA *in vitro* and alteration of RNA metabolism *in vivo*. *Science*, **151**, 1539.
40. Procicchiani, G., Miggiano, V., and Arancia, G., 1968. A peculiar structure of membranes in PHA-stimulated lymphocytes. *J. Ultrastruct. Res.*, **22**, 195.
41. Promchainant, C., Baimai, V., and Non-dasuta, A., 1972. The cytogenetic effects of aflatoxin and gamma-rays on human leukocytes *in vitro*. *Mutation Res.*, **16**, 373.
42. Remmer, H., and Merker, H.J., 1963. Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischen Reticulum in der Leberzelle während der Behandlung mit Phenobarbital. *Klin. Wschr.*, **41**, 276.
43. Robbins, E., and Gonatas, N.K., 1964. Histochemical and ultrastructural studies on HeLa cell cultures exposed to spindle inhibitors with special reference to the interphase cell. *J. Histochem. Cytochem.*, **12**, 704.
44. Robbins, E., and Gonatas, N.K., 1964. The ultrastructure of mammalian cell during the mitotic cycle. *J. Cell Biol.*, **36**, 329.
45. Robbins, E., and Scharff, M.D., 1966. Some macromolecular characteristics of synchronized HeLa cells, in I.L. Cameron and G.M. Padilla, eds., "Cell Synchrony", p. 353, Academic Press.
46. Robbins, E., Jetzsch, G., and Micali, A., 1968. The centriole cycle in synchronized HeLa cells. *J. Cell Biol.*, **36**, 329.
47. Saito, M., Ohtsubo, K., Umeda, M., Enomoto, M., Kurata, H., Udagawa, S., Sakabe, F., and Ichinoe, M., 1971. Screening test using HeLa cells and mice for detection of mycotoxin-producing fungi isolated from foodstuffs. *Jap. J. Exp. Med.*, **41**, 1.
48. Scharff, M.D., and Robbins, E., 1965. Synthesis of ribosomal RNA in synchronized HeLa cells. *Nature*, **208**, 464.
49. Striker, G.E., Smucker, E.A., Kohnen, P. W., and Nagle, R.B., 1968. Structural and functional changes in rat kidney during CCl₄ intoxication. *Am. J. Pathol.*, **53**, 769.

50. Svoboda, D., Grady, H.J., and Higginson, J., 1966. Aflatoxin B₁ injury in rat and monkey liver. *Am. J. Pathol.*, **49**, 1023.
51. Wrikus, E.R., and Meenakshi, G., 1968. Ultrastructural study of the cytological effects of cytological on the meristematic cells of the root tip of *Allium cepa*, *J. Cell Biol.*, **39**, 182 A.
52. Zuckerman, A.J., Rees, K.R., Inan, m D. R., and Robb, I.A., 1968. The effects of aflatoxins in human embryo liver cells in culture. *Brit. J. Exp. Pathol.*, **49**, 33.
53. 日本病理學會編, 1967. 電子顯微鏡による細胞病理學圖譜. 岩波書店

Plate 1

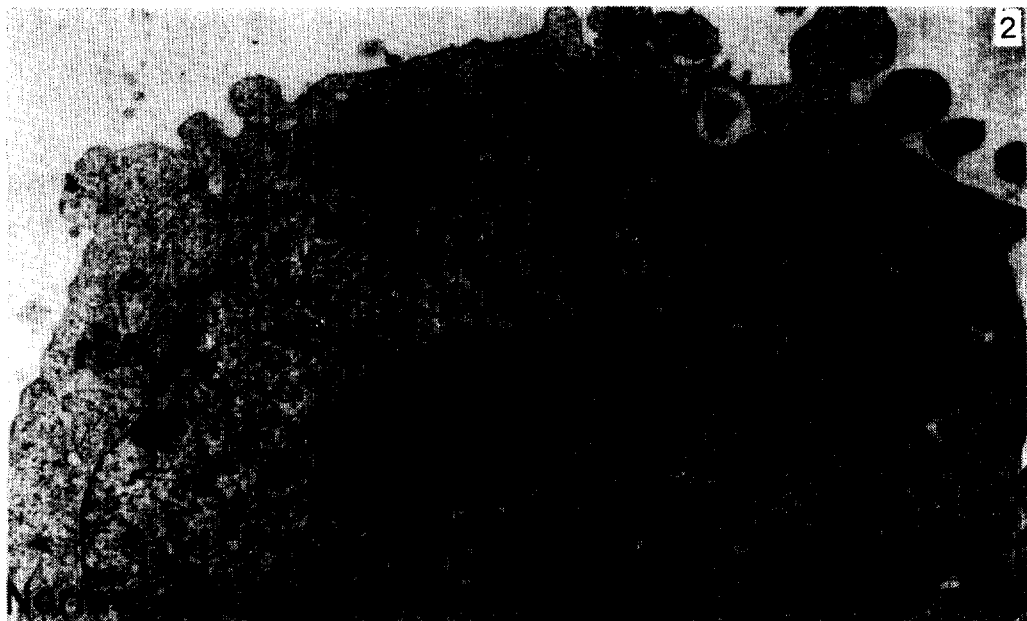
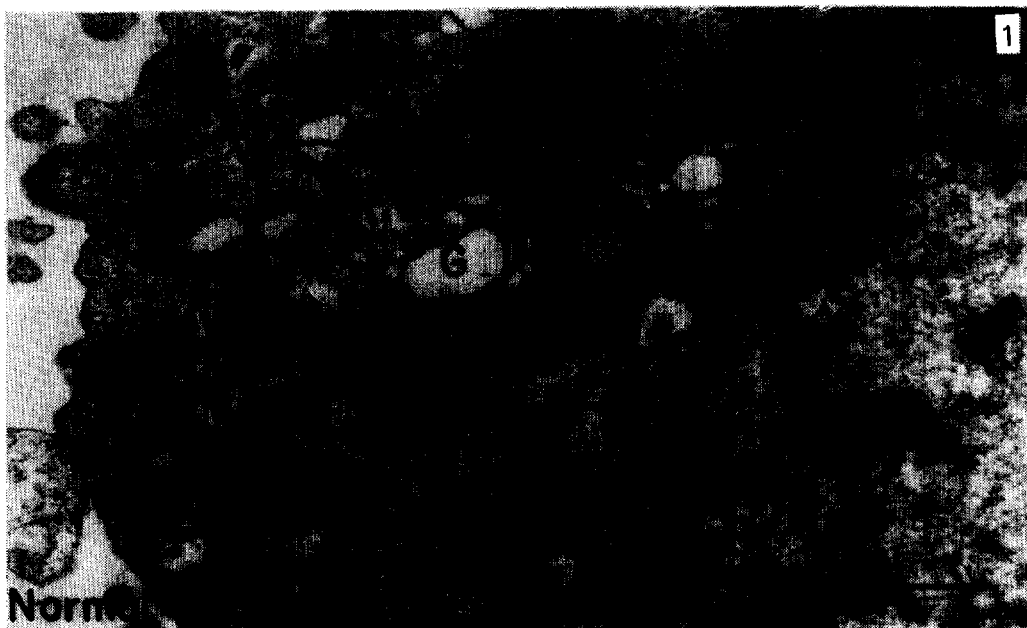


Plate 2

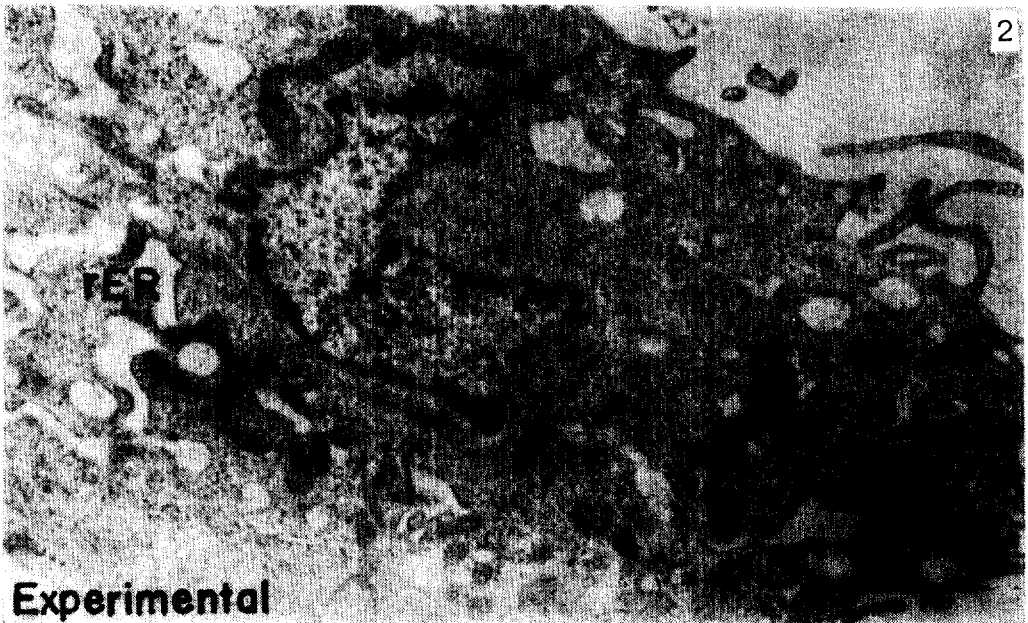


Plate 3



Plate 4



Plate 5

