Kor. J. Food Hygiene 8 (1), 37-53 (1993)

랫드에서 *Fusarium moniliforme* MRC 826 배양물질의 독성 및 발암성에 관한 연구

신동진 · 신광순 · 이영순
서울대학교 수의과대학

Toxicity and Carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* MRC 826 Culture Material in Rats

Dong-Jin Shin, Kwang-Soon Shin and Young-Soon Lee
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

ABSTRACT—***F. moniliforme*** **MRC 826, a common fungal contaminant of corn, has been known to produce a group of mycotoxins, the fumonisins. By thin layer chromatography, fumonisin B_1 was detected in the *F. moniliforme* MRC 826 corn culture material(CM) extracts. This study was performed to compare the toxicity and carcinogenicity of *F. moniliforme* MRC 826 CM with those of aflatoxin B_1(AFB_1) in rats. The toxicity was tested over a period of 7 days in ten female Sprague-Dawley (SD) rats. Treatment group were fed a 1 : 1 mixture(wt/wt) of ground CM and basal diet in powder form, while other negative control group were given basal diet alone. The principal pathological changes in rats treated with 50% CM were hepatocellular hydropic degeneration and renal tubular necrosis. The cancer-promoting activity of CM was evaluated in the rat liver diethylnitrosamine-two thirds partial hepatectomy(DEN-PH) model for carcinogenesis. 70 male SD rats(ca. 170 g) were randomized into 5 groups. Group 1 served as the positive controls and received the basal diet containing 2 ppm AFB_1, group 2 received 5% CM, group 3 received 2.5% CM, group 4 received 5% normal corn and group 5 received 2.5% normal corn. 5% treated group showed cancer promoting activity in rat liver using DEN as initiator and the induction of glutathione S-transferase placental form positive foci as an end point after 6 weeks of promotion.**

Keywords □ ***F. moniliforme*** **MRC 826, Fumonisin B_1, Aflatoxin B_1, Toxicity, Carcinogenicity, Glutathione S-transferase placental form positive foci, Rat.**

진균독소(mycotoxin)는 곰팡이가 여러 동식물에 오염되어 산생하는 2차 대사산물이다.[1,2] *Aspergillus*와 *Penicillium*속균이 산생하는 대표적인 진균독소에는 aflatoxin, sterigmatocystin, ochratoxin, citrinin, patulin 등이 있으며, *Fusarium*속균 산생 진균독소에는 trichothecene계와 zearalenone 등이 있다.[3] 이들 진균독소들은 인축에 급·만성 독성, 변이원성, 최기형성은 물론 발암성 등의 진균독증(mycotoxicosis)을 일으키며 일반적으로 곰팡이에 의한 진균증(mycosis)과는 구분하고 있다.[4] 진균독증 중 맥각중독과 alimentary toxic aleukia 등은 동물은 물론 사람에서도 중독증을 일으키기 때문에 오래 전부터 잘 알려져 왔으며, 1960년대초 aflatoxin중독증이 발생한 이후 진균독증에 대한 본격적인 연구가 수행되었다.[1,5]

Aflatoxin에 관한 연구가 비교적 심도 있게 이루어진데 반해, *Fusarium*속균 산생독소에 관해서는 역학 및 독성학적인 측면에서 아직도 연구가 미미한 편이다. *Fusarium*속균은 광범위한 지역의 토양 또는 부패식물 등 자연계에 흔히 발생하는 부생균으로, 과거에는 단순히 학문적인 관심거리에 불과하였으나

Received for publication 10 February, 1993
Reprint request: Dr K.S. Shin at the above address

차츰 인축에 그 독성이 알려지기 시작하면서 중요한 연구대상이 되고 있다.[3] 특히, 1980년대초 아프카니스탄과 라오스 등의 전장에서 과립이나 이슬상태의 노란색 물질이 비가 내리는 것과 같이 쏟아져 'yellow rain"이란 이름이 붙여졌고, 이 물질이 *Fusarium*속균이 산생하는 T-2독소 등이 다량 함유된 진균독소의 복합체로 의심 받으면서 *Fusarium*속균 산생 진균독소에 관심이 모아졌다.[6,7] *Fusarium*속균 산생 진균독소는 크게 trichothecene계와 비trichothecene계로 나눈다.[8] Trichothecene계에는 alimentary toxic aleukia, 스타키보트리스 중독증(stachybotryotoxicosis), 식도암 및 "yellow rain" 등의 원인물질로 추정된 바 있는 T-2 독소, nivalenol, diacetoxyscirpenol, deoxynivalenol 등이 있으며,[9] 비trichothecene계에는 zearalenone과 간독성을 나타내는 moniliformin 등이 있다.[8]

*Fusarium(F.)*속균 중 *Liseola*아속에 속하는 *F. moniliforme*은[10] 비trichothecene계 진균독소들을 산생하며, 대표적인 것에 fusarin C,[11] fusariocin C,[12] moniliformin,[13] fumonisin,[14] zearalenone[15] 등이 있다. 이 중 fumonisin은 *F. moniliforme, F. proliferatum, F. anthophilum, F. napiforme, F. nygamai* 등의 *Fusarium*속균이 산생하는 일군의 진균독소로[16,17] 배양물질 중에서 검출됨은 물론 옥수수에서 자연적으로 발생하기도 한다.[18-20] 특히, 옥수수에 감염되어 사람 및 동물에 위해를 줄 수 있는 가장 흔한 곰팡이 중 하나로 알려진 *F. moniliforme* Sheldon[21,22]과 그 아종인 *F. moniliforme* MRC 826이 fumonisin을 다량 생산하는 것으로 알려졌다. *F. moniliforme* MRC 826은 남아프리카의 Transkei 서남부지방에서 재배된 옥수수에서 분리한 곰팡이로, 배양물질을 여러 실험동물에 투여시 독성이 매우 높은 것으로 보고된 바 있다.[23-26] 특히 말에서는 뇌백질연화증(equine leukoencephalomalacia : ELEM)을 일으키며,[25] BD IX 랫드를 이용한 발암성시험에서 간암 유발능[24]과 간암 촉진능[14,27,28]이 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 배양물질의 독성 및 발암성에 관한 연구 도중 Gelderblom 등[14]은 fumonisin이라는 새로운 독소를 찾아내게 되었다.

Fumonisin은 자연상태 하에서 미국, 캐나다, 브라질, 페루, 호주, 뉴질랜드, 네팔, 스위스, 남아프리카지역, 이집트, 나이지리아 등 전세계적으로 발생하며, 옥수수, 기장, 조, 수수, 사탕수수 등 사료는 물론이고 토양 및 목초에도 존재하며, 심지어는 사람들이 흔히 섭취하는 식품 중에도 존재하는 것으로 보고되었다.[19,29-33] 특히, *Fusarium*속균과 사람의 식도암발생율 사이의 역학적 관계를 중국[34,35] 및 남아프리카 지역[20,22]에서 조사한 결과, 식도암발생율이 높은 지역에서 fumonisin이 다량 검출되는 등, fumonisin과 식도암발생율 간에 역학적 관련성이 있는 것으로 보고되었다.[18] 더구나 자연상태 하에서도 fumonisin의 발생량이 많아 사람 및 동물에 위해를 줄 수 있기 때문에,[36] 세균을 이용한 예방법과 같은 효과적인 예방책의 강구가 필요하다고 한다.[37]

현재까지 분리동정된 fumonisin은 총 6종으로 fumonisin B_1, fumonisin B_2, fumonisin B_3 등은 다량 검출되는 반면, fumonisin B_4, fumonisin A_1, fumonisin A_2 등은 비교적 미량 검출된다.[14,38,39] Fumonisin은 *F. moniliforme* MRC 826 배양물질과 유사하게 랫드의 신장과 간장에 독성 및 간발암성을 나타내고,[40] 말에는 뇌백질연화증을 일으키며,[41] 돼지에는 폐부종(pulmonary edema) 또는 수흉증(hydrothorax)을 일으킨다.[42-44]

Fumonisin은 자연상태에서도 다량 검출되고, 육안적으로 곰팡이 감염이 식별되지 않은 옥수수에서도 검출되므로, fumonisin의 독성·발암성 및 면역억제효과[45]에 관한 연구가 최근 활발히 진행되고 있다. Fumonisin은 내열성이 있어 보통의 조리온도에서 파괴되지 않기 때문에 사람이 먹는 식품에 혼입될 가능성이 높고,[46] 알콜발효에도 안전하며,[47] aflatoxin의 해독방법으로 알려진 암모니아처리법[48]에 의해서도 거의 해독되지 않기 때문에[49] 더욱 주의가 필요하다.

사람에서의 발암은 화학물질에 의한 경우가 많다고 한다. 화학물질에 의한 발암은 유발/촉진(initiation/promotion)의 2단계론(two stage concept)[50-53]과 진행론(progression theory)[54]을 절충한 다단계론(multistage theory)[55,56]이 정립된 바 있으며, 이러한 이론에 근거한 여러가지 발암성 검색법이 개발되었다.[57-60] 이러한 검색법 중에서 Ito 등이 개발한 나고야대학법[57]은 시험기간이 8주로서 짧고 장기시험의 결과와 일치하며,[61] 위양성이 없다는 점[62]에서 화학물질의 발암성 유무를 검색하는데 매우 유용한 방법으로 인정되고 있다.[63]

따라서 본 실험은 fumonisin을 다량 산생하는 것으로 알려진 *F. moniliforme* MRC 826을 옥수수에 배양하여, 그 배양물에 존재하는 FB_1을 박층크로마토그래피로 정성분석한 후, Sprague-Dawley 랫드에서 배양물질이 독성을 나타내는 표적장기를 찾아내고 조직학적으로 병변을 관찰하여 aflatoxin B_1과의 독성을 비교하여 보고, Ito 등[57]의 glutathione S-transferase placental form 양성병소를 지표로 한 중기 발암성 검색법을 이용하여 간발암성을 조사하고자 수행하였다.

재료 및 방법

시험물질 및 재료

본 실험에서 진균독소는 fumonisin B_1 표준품(FB_1, $C_{34}H_{59}NO_{15}$, SIGMA)과 aflatoxin B_1 표준품(AFB_1, $C_{17}H_{12}O_6$, SIGMA)을 사용하였고, 균주와 배지는 *F. moniliforme* MRC 826(ATCC 52539, Koram Bioteck)과 potato dextrose agar를 사용하였다. 발암성시험과 박층크로마토그래피에 사용된 재료 및 시약은 diethylnitrosamine(DEN, $C_4H_{10}N_2O$, SIGMA), Sep-Pak C_{18} cartridge(Waters), Silica gel 60 thin layer chromatography(TLC) plates(Merk), *p*-anisaldehyde, methanol, chloroform 등이며, 면역조직화학적 염색과 H&G 염색용 시약은 rabbit anti-glutathione S-transferase placental form 항체(1차 항체, 나고야시립대 제공), biotin-labeled goat anti-rabbit Ig G(2차 항체), avidin biotin peroxidase complex (Vectastain Elite ABC Kit, PK-6101, Vector Laboratories), 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene(3'-Me-DAB), phosphate buffered saline(PBS), hydrogen peroxide, bovine serum albumin(BSA), hematoxylin, eosin 등을 사용하여 실험하였다.

실험동물

서울대학교 실험동물 사육장에서 분양받은 5주령의 SD 수컷 랫드 70마리를 발암성시험에 사용하였고, 3주령의 SD 암컷 랫드 10마리를 독성시험에 사용하였다. 발암성시험의 경우 1주일 동안 시험실 환경에 적응시킨 후 6주령에 실험을 시작하였다.

예비사육 및 실험기간 중 사육실 환경조건은 온도 23± 2℃, 상대습도 50± 10%에서 랫드용 케이지(polycarbonate, 26×42×18 cm, 명진기계 제작)에 3~4마리씩 넣어서 사육하였으며, 실험동물용 분말사료(제일 사료)와 음수는 충분히 급여하였다.

곰팡이 배양

F. moniliforme MRC 826(Koram Bioteck)을 Jaskiewicz 등[24]의 배양법을 보완한 방법으로 2단계로 배양하였다.

즉, 제 1단계는 선택배지 배양법으로 동결건조된 *F. moniliforme* MRC 826의 분생포자(conidia)를 potato dextrose agar(PDA)에 무균적으로 접종하여 25℃에서 5일간 배양하였다. 제 2단계 배양은 옥수수 배지 배양법으로, 옥수수는 강원도 화천에서 1991년에 수확된 육안적으로 보아 곰팡이의 감염이 없고 농약을 살포한 적이 없는 건전한 황색종 옥수수를 사용하였다. 옥수수 200 g과 멸균한 증류수 140 ml를 1리터들이 Erlenmeyer flask에 넣고 실온에서 3시간 정치시킨 후 흔들어 주었다. 솜으로 마개를 하여 121℃에서 1시간 가압멸균을 하고, 24시간 경과 후에 제 2차 가압멸균하였다. 충분히 냉각시킨 후 제 1단계에서 PDA에 배양한 곰팡이를 접종하여 25℃에서 2주간, 15℃에서 2주간 배양하되, 배양 초기단계에서는 적당히 교반함으로써 곰팡이를 옥수수배지에 균일하게 접종시켜 주었다. 4주간 배양 후, 배양물을 꺼내 완전히 건조시킨 다음 Wiley mill에 갈아 냉동고에 기밀보관하면서 사용하였다.

Fumonisin B_1의 정성분석

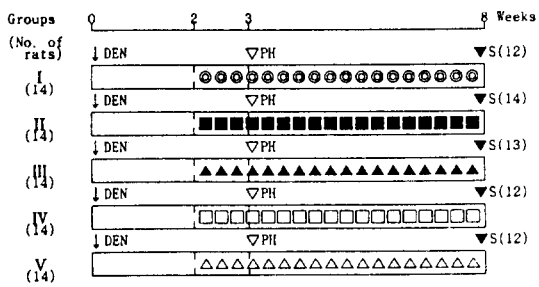
박층크로마토그래피를 이용하여 옥수수와 배양물질에 존재하는 fumonisin B_1을 정성분석하였다.[19] 시료를 25 g 취하여 삼각플라스크에 넣고 메탄올과 물의 3 : 1 혼합액을 50 ml 넣은 다음, 10분간 잘 흔들어 섞은 후에 여과지로 여과하여 여액을 받았다. 여과액 25 ml를 50℃에서 증발건조시키고 여기에 메탄올과 물의 1 : 3 혼합액 25 ml를 넣어 녹였다. 분액깔대기 내에서 클로로포름으로 분획처리한 후, aqueous phase를 취하여 증발 건조시키고 건조물에 메탄올과 물의 1 : 3 혼합액 50 ml를 넣어 녹였다. Sep-Pak C_{18} cartridge로 순수화한 후 Silica gel 60 TLC plate에 점적하여 클로로포름, 메탄올과 초산의 6 : 3 : 1 혼합액을 전개액으로 전개시켰다. 전개·건조시킨 후에 *p*-anisaldehyde를 메탄올, 초산 및 황

산의 85 : 10 : 5 혼합액에 0.5% 비율로 녹여 살포하고 110℃에서 5분간 발색시킨 후 색변화를 관찰하였다.

실험설계

독성시험－SD 암컷 랫드 10마리를 2개군으로 나누어 시험군은 배양물질을 분말사료와 1 : 1로 혼합하여 1주일간 급여하였고, 대조군은 분말사료만을 1주간 급여하면서 체중변화, 사료섭취량, 임상증상 등을 비교·관찰하고, 실험종료 시 부검하여 주요장기는 조직병리학적으로 관찰하였다.

발암성 시험－SD 수컷 랫드 70마리를 각 군당 14마리씩 총 5개군을 두었으며 각 군 모두 시험개시일에 간암 유발물질인 diethylnitrosamine을 생리식염수에 용해시켜 체중 kg당 200 mg씩 복강내로 1회 투여하였으며, 2주 후에 촉진물질로 각 시험물질을 투여하였고, 3주 후에 간세포의 증식을 증폭시킬 목적으로 간의 좌우 중심엽 및 좌측 외엽(약 2/3)을 잘라내는 간 부분절제(partial hepatectomy : PH)를 하였다.[64] 실험종료 시 ether로 마취한 후 부검하여 육안적 소견 및 조직병리학적 소견을 관찰하고 면역조직화학적 염색을 하여 양성병소를 측정하였다. 촉진물질로 제 1군은 aflatoxin B_1이 2 ppm 농도로 첨가된 분말사료를, 제 2군은 배양물질이 5% 농도로 첨가된 분말사료를, 제 3군은 배양물질이 2.5 % 농도로 첨가된 분말사료를, 제 4군은 제 2군에 대한 음성대조군으로 정상 옥수수가 5% 농도로 첨가된 분말사료를, 제 5군은 제 3군의 음성대조군으로 정상 옥수수가 2.5% 농도로 첨가된 분말사료를 각각 급여하였다(Text-Fig. 1).



Text-Fig. 1. Schematic representation of the experimental protocol for rat hepatocarcinogenesis.

↓ DEN : A single dose of diethylnitrosamine (200 mg/kg B.W.) by *i.p.*
▽ PH : 2/3 partial hepatectomy.
▼ S( ) : Sacrifice; numbers in parentheses, total number of rats/group sacrificed at 8 weeks.
: Basal diet.
: Basal diet containing 2 ppm aflatoxin B_1.
: Basal diet containing 5% *F. moniliforme* culture material.
: Basal diet containing 2.5% *F. moniliforme* culture material.
: Basal diet containing 5% normal corn.
: Basal diet containing 2.5% normal corn.

혈액학 및 혈액생화학적 검사

부검 하루전에 절식시킨 동물을 ether로 마취시켜 복대정맥에서 채혈하였다. 혈액학적 검사는 항응고제(EDTA-3K)가 들어 있는 진공채혈튜브(녹십자)에 채혈하여 자동혈구계수장치(Coulter counter model S-plus II)를 이용하여 백혈구수(white blood cell count ; WBC), 적혈구수(red blood cell count ; RBC), 혈색소량(hemoglobin ; HGB), 적혈구 용적율(hematocrit ; HCT), 평균 적혈구 용적(mean corpuscular volume ; MCV), 평균 적혈구 혈색소량(mean corpuscular hemoglobin ; MCH), 평균 적혈구 혈색소 농도(mean corpuscular hemoglobin concentration ; MCHC), 적혈구 용적분포의 변이계수(red cell distribution width ; RDW), 평균 혈소판 용적(mean platelet volume ; MPV), 혈소판 분포의 변이계수(platelet distribution width ; PDW) 등을 측정하였다.

혈액생화학치는 10 ml의 그린튜브(녹십자)에 채혈한 혈액을 실온에 30분간 방치하여 응고시킨 후 원심분리(1600 rpm에서 15분)하여 얻은 혈청을 대상으로 검사하였다. 즉, RA-XT를 이용하여 alanine transaminase(ALT), aspartate transaminase(AST), cholesterol(CHOL), total bilirubin(TBILL), total protein(TPROT), triglyceride(TRIG), glucose (GLU), alkaline phosphatase(ALP), creatinine (CREAT), blood urea nitrogen(BUN), albumin (ALB) 등을 측정하였고, Corning 480 flame photometer를 이용하여 나트륨(sodium ; SOD)과 칼륨(potassium ; POT)의 농도를 측정하였다.

장기의 처리 및 조직병리학적 검사

부검 하루전에 절식시켰으며, 체중측정 후 부검하여 간, 폐, 신장, 비장, 대뇌, 소뇌, 뇌하수체, 심장, 흉선, 정낭선, 부신, 심장 및 고환 등의 주요장기를 적출하여 각 장기의 중량을 측정한 후 체중에 대한 각 장기의 상대 중량비를 계산하였다.

주요장기들은 10% phosphate buffered formalin 액에 고정하여 보통의 조직처리법대로 파라핀 절편을 만들어 H&E 염색을 실시한 후 조직병리 검사를 하였다.

간의 미상엽(caudate lobe), 우측외엽(right lateral lobe), 부엽(accessory lobe) 등 면역조직화학적 염색을 위한 시료는 냉아세톤에 고정하였다.

면역조직화학적 염색

간 조직내의 GST-P 양성병소의 분포를 확인하기 위해 avidin biotin peroxidase complex(ABC)법을 이용하여 면역조직화학적 염색을 하였다.[61]

즉, 냉아세톤에 1주일간 고정한 시료를 xylene으로 투명화(clearing)하고 paraffin으로 포매하여 5 um 두께로 절편하였다. 보통의 조직처리법대로 xylene에서 paraffin을 녹여내고 농도하강순의 단계적 알콜탈수과정을 거쳐 조직을 탈수시킨 다음, 비특이 반응을 줄이기 위해 moisture chamber내에서 정상 산양 혈청(1 : 5 희석 ; 0.01 M PBS, pH 7.4)으로 처리하였다. 과잉의 수분을 제거한 후 1차항체인 rabbit-anti-GST-P antibody(1 : 6000 희석 ; 0.1% BSA in PBS), 2차 항체인 biotinylated goat anti-rabbit Ig G, avidin biotin peroxidase complex(ABC) 순으로 moisture chamber에서 반응시켰다. 0.02% 3'-Me-DAB(0.2 M Tris buffer, pH 7.6)에 정색반응을 일으키고 hematoxylin으로 대조염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. GST-P 양성병소의 수와 면적은 Quantimet 520 칼라 화상분석기(Cambridge Instruments)를 이용하여 측정하였다.

자료의 통계처리

Glutathione S-transferase placental form 양성병소의 수와 면적은 two-tailed t-test를 이용하여 대조값과 비교·분석하였다. 기타 자료는 General Linear Model(SAS Institude, Version 6.02, 1988)을 이용하여 분산분석에서 유의성 있는 항목에 대해 유의수준 $p<0.05$에서 Duncan's multiple range test를 하였다.

결 과

Fumonisin B_1의 정성분석

Fumonisin B_1(FB_1)의 정성분석을 위하여 정상 옥수수와 배양물질로부터 FB_1을 추출하여 TLC판에 전개시켰다. Sep-Pak C_{18} cartridge를 통과시키지 않은 시료는 방해물질의 간섭으로 약간의 흔적만 관찰될 뿐(Fig. 1) 정성분석이 곤란하여, 추가로 Sep-Pak을 이용하여 순수화시켰다. 그 결과 배양물질에서는 표준품과 유사하게 Rf 약 0.25에서 자주빛의 fumonisin B_1띠가 관찰되었으나 정상 옥수수에서는 아무런 흔적도 관찰되지 않았다(Fig. 2).

독성시험

F. moniliforme MRC 826 배양물질의 랫드에 대한 독성을 평가하기 위한 본 실험에서, 배양물질을 정상사료와 1 : 1로 혼합하여 급여한 시험군은 침울한 상태로 등을 구부리고 구석에 웅크리고 앉아 있었다. 랫드 1마리당 1주간 평균 사료섭취량은, 분말사료만을 급여한 대조군이 105 g인데 반하여 시험군은 24 g으로 떨어졌다. 평균 체중의 변화는 시험군과 대조군 공히 실험초에는 59 g으로 같았으나, 실험종료시 체중은 대조군이 78 g으로 19 g 증가한 반면, 시험군은 41 g으로 18 g 감소하였다. 시험군은 부검시 신장의 피막박리가 곤란하였고, 조직병리학적 검사 결과 간장의 공포변성(Fig. 3)과 신장세뇨관 상피세로의 괴사(Fig. 4) 등이 관찰되었다.

발암성 시험

체중 및 사료 섭취량의 변화－증체율의 변화는 간 부분절제술을 시술하고 시험물질을 급여하면서 일시적인 체중의 감소 또는 증체율의 둔화가 관찰되다가 회복되었다(Text-Fig. 2). 시험 종료시인 8주경과 후 평균 체중은 aflatoxin B_1 투여군이 279 g으로 제일 낮았고, 5% 배양물질 투여군은 282 g, 2.5% 배양물질 투여군은 294 g, 5% 옥수수 투여군은 326 g, 2.5% 옥수수 투여군은 349 g으로 나타났다. 실험종료시 체중에 대한 실험군간의 유의성 분석에서 aflatoxin B_1 투여군, 5% 배양물질 투여군 및 2.5% 배양물질 투여군이 5% 옥수수 투여군 및 2.5%

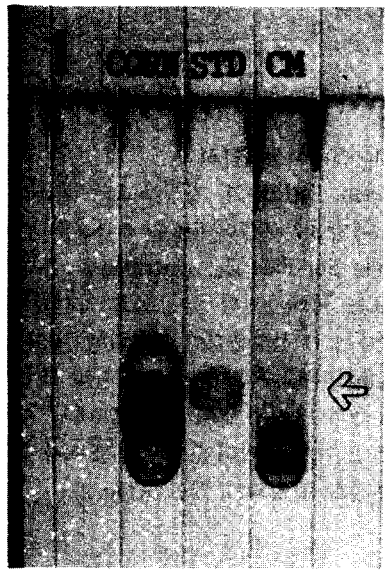


Fig. 1. Identification(arrow) of fumonisin B_1 present in *F. moniliforme* MRC 826 culture material by thin layer chromatography(before Sep-Pak C_{18} cartridge). CORN, normal corn; STD, fumonisin B_1 standard; CM, *F. moniliforme* MRC 826 culture material.

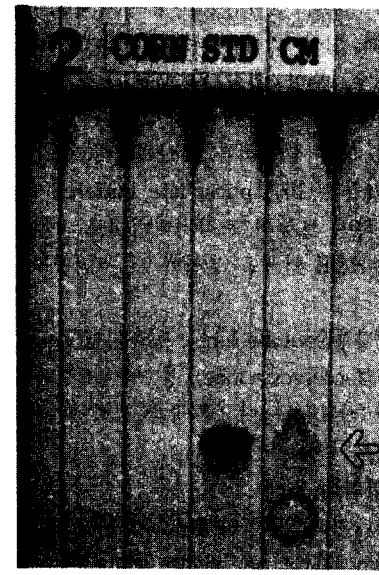


Fig. 2. Identification(arrow) of fumonisin B_1 present in *F. moniliforme* MRC 826 culture material by thin layer chromatography(after Sep-Pak C_{18} cartridge). CORN, normal corn; STD, fumonisin B_1 standard; CM, *F. moniliforme* MRC 826 culture material.

Fig. 3. Part of a liver lobule from the rat fed a 1 : 1 mixture of ground corn culture material and basal diet in powder form for 1 week. Hepatocellular hydropic degeneration was observed. H&E staining. ×200.

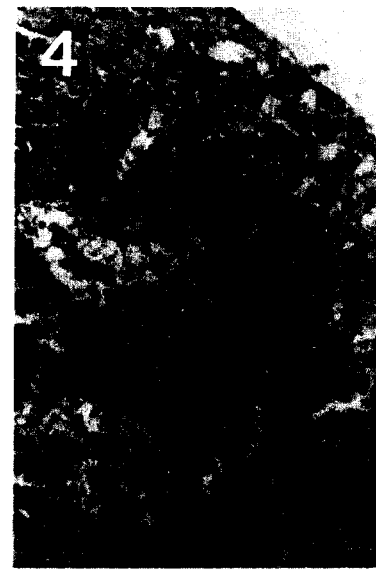
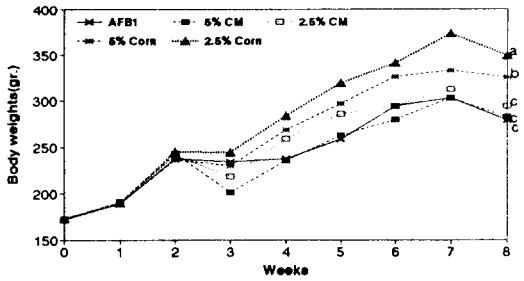


Fig. 4. Part of a renal cortex from the rat fed a 1 : 1 mixture of ground corn culture material and basal diet in powder form for 1 week. Note renal tubular necrosis (arrows; pyknosis, loss of cytoplasm). H&E staining. ×200.



Text-Fig. 2. Effects of *F. moniliforme* MRC 826 culture material on sequential changes of mean body weights in Sprague-Dawley rats.

AFB_1, group of rats were fed diet containing 2 ppm aflatoxin B_1; 5% CM, group of rats were fed diet containing 5% *F. moniliforme* MRC 826 culture material; 2.5% CM, group of rats were fed diet containing 2.5% *F. moniliforme* MRC 826 culture material; 5% Corn, group of rats were fed diet containing 5% normal corn; 2.5% Corn, group of rats were fed diet containing 2.5% normal corn. Values with different letters are significantly different from each other ($p<0.05$).

옥수수 투여군에 비하여 유의성 있는 체중감소가 관찰되었고, 옥수수 투여군 내에서도 5% 옥수수 투여군이 2.5% 옥수수 투여군에 비하여 체중의 유의성 있는 감소가 관찰되었다($p<0.05$) (Text-Fig. 2).

랫드 1마리당 1일 평균 섭취량을 기준으로 한 사료섭취량은 aflatoxin B_1 투여군이 19.89 g으로 제일 낮았고, 5% 배양물질 투여군은 19.99 g, 2.5% 배양물질 투여군은 20.39 g, 2.5% 옥수수 투여군은 22.66 g, 5% 옥수수 투여군은 23.16 g 순으로 많아졌다. 평균 음수량은 랫드 1마리당 1일 평균 음수량을 기준으로 2.5% 배양물질 투여군이 39.27 ml로 제일 적었으며, aflatoxin B_1 투여군은 40.91 ml, 5% 배양물질 투여군은 41.36 ml, 5% 옥수수 투여군은 45.50 ml, 2.5% 옥수수 투여군은 45.78 ml 순으로 증가하는 경향을 보였다.

각 장기의 체중에 대한 상대중량비—부검 시 각 장기의 중량을 측정하여 체중에 대한 각 장기의 상대중량비를 계산한 바, 5% 배양물질 투여군이 양성대조군인 aflatoxin B_1 투여군에 비해 신장, 폐, 부신, 정낭선 등의 상대중량은 유의성 있는 감소를 보였고, 뇌하수체의 상대중량은 유의성 있는 증가를 보였다($p<0.005$). 음성대조군인 5% 옥수수 투여군과 비교하였을 때 신장의 상대중량은 감소하는 경향을 보였으나, 간장, 고환 및 정낭선 등의 상대중량은

Table 1. Effects of *F. moniliforme* MRC 826 culture material on relative organ weights of Sprague-Dawley rats

Mean± S.D.

Organs (gram %)	AFB_1	5% CM	5% Corn
Liver	2.826± 0.208	2.767± 0.202[a]	2.541± 0.178
Spleen	0.223± 0.041	0.211± 0.027	0.222± 0.027
Kidney(L)	0.393± 0.029	0.353± 0.025[a, b]	0.380± 0.035
Kidney(R)	0.382± 0.016	0.339± 0.024[a, b]	0.367± 0.035
Heart	0.381± 0.093	0.370± 0.043	0.351± 0.039
Lung	0.955± 0.353	0.743± 0.071[b]	0.767± 0.153
Thymus	0.141± 0.047	0.121± 0.014	0.130± 0.015
Adrenal gland(L)	0.009± 0.002	0.008± 0.002	0.008± 0.002
Adrenal gland(R)	0.009± 0.003	0.007± 0.001[b]	0.008+0.001
Brain	0.757± 0.196	0.681± 0.068	0.597± 0.004
Pituitary gland	0.002± 0.001	0.003± 0.000[a, b]	0.003± 0.001
Testis(L)	0.546± 0.047	0.528± 0.084[a]	0.474± 0.029
Testis(R)	0.548± 0.042	0.528± 0.068[a]	0.479± 0.040
Seminal vesicle	0.387± 0.076	0.288± 0.137[a, b]	0.205± 0.037

AFB_1, group of rats were fed diet containing 2 ppm aflatoxin B_1; 5% CM, group of rats were fed diet containing 5% *F. moniliforme* MRC 826 culture material; 5% Corn, group of rats were fed diet containing 5% normal corn; [a], significantly different from 5% Corn group($p<0.05$); [b], significantly different from AFB_1 group($p<0.05$).

유의성 있는 증가를 보였다($p<0.05$) (Table 1).

혈액학적 검사－혈액학적 검사는 항응고제(EDTA-3K)가 들어 있는 진공채혈튜브(녹십자)에 채혈하여 자동 혈구계수장치를 이용하여 측정한 결과, 5% 배양물질 투여군이 양성대조군인 aflatoxin B_1 투여군에 비하여 백혈구수가 유의성 있게 감소하였으며, 음성대조군인 5% 옥수수 투여군과 비교해서 MCH의 유의성 있는 감소를 보였다($p<0.05$) (Table 2).

혈액생화학적 검사－혈액생화학적 검사는 10 ml의 그린튜브(녹십자)에 채혈한 혈액을 실온에 30분간 방치하여 응고시킨 후 원심분리하여 분리한 혈청을 RX-XT를 이용하여 분석한 결과, 5% 배양물질 투여군에서 양성대조군인 aflatoxin B_1 투여군보다 ALT 및 AST가 유의성 있게 감소하였으며, GLU 및 ALP는 유의성 있게 증가하였다($p<0.05$). 음성대조군인 5% 옥수수 투여군과 비교하였을 때 BUN이 유의성 있게 증가하였다($p<0.05$) (Table 3).

조직병리학적 소견－시험종료 후 대뇌, 소뇌, 뇌하수체, 폐, 심장, 비장, 흉선, 신장, 부신, 고환 및 정낭선 등의 주요장기를 적출하여, 조직병리학적으로 검사하여 보았으나 특별한 병변은 관찰되지 않았다. afltoxin B_1 투여군에서 glutathione S-transferase placental form(GST-P) 면역조직화학적 염색결과 양성을 나타낸 병소에 대한 면역 염색상과 H&E 염색상은, 간실질세포의 세포질내에 과립상의 물질이 차 있었고, 정상적인 hepatic cord가 소실되어 있었으며, 미약하나마 주변의 정상조직을 압박하는 감을 주었다(Fig. 5와 Fig. 6). 5% 배양물질 투여군의 경우도 aflatoxin B_1의 경우와 비교하여, 정도는 미약하지만 유사한 소견을 보였다(Fig. 7 및 Fig. 8).

Glutathione S-transferase placental form **양성병소**－Avidin biotin peroxidase complex(ABC) 키트를 이용한 GST-P 면역조직화학적 염색결과, aflatoxin B_1 투여군은 5% 옥수수 투여군 및 2.5% 옥수수 투여군에 비하여 GST-P 양성병소의 수와 면적에서 공히 유의성 있는 증가를 보였으며($p<0.001$), 5% 배양물질 투여군도 대조군인 5% 옥수수 투여군에 비하여 GST-P 양성병소의 수와 면적에서 공히 유의성 있는 증가를 보였다($p<0.01$). 그러나 2.5% 배양물질 투여군은 대조군인 2.5% 옥수수 투여군에 비하여 GST-P 양성병소의 수와 면적에 증가하는 경향은 있었으나 유의성은 인정되지 않았다(Table 4).

고 찰

Fumonisin을 다량 산생하는 것으로 보고되고 있

Table 2. Effects of *F. moniliforme* MRC 826 culture material on hematological values of Sprague-Dawley rats

Mean± S.D.

	AFB_1	5% CM	5% Corn
WBC(10^3/ul)	14.85± 4.13	11.45± 2.44[b]	12.30± 3.02
RBC(10^6/ul)	8.06± 0.37	8.05± 0.35	8.05± 0.41
HGB(g/dl)	16.01± 0.87	15.73± 0.73	16.23± 0.51
HCT(%)	42.34± 2.05	42.36± 2.06	43.15± 1.72
WCV(fl)	51.85± 1.29	52.27± 1.35	53.56± 1.96
MCH(pg)	19.66± 0.79	19.55± 0.60[a]	20.18± 0.59
MCHC(g/dl)	37.85± 1.19	37.14± 0.95	37.65± 0.70
RDW	13.81± 0.44	13.84± 1.25	13.56± 0.93
MPV(um)	6.22± 0.45	5.87± 0.34	5.85± 0.41
PDW	15.55± 0.28	15.35± 0.27	15.44± 0.41

AFB_1 group of rats were fed diet containing 2 ppm aflatoxin B_1; 5% CM, group of rats were fed diet containing 5% *F. moniliforme* MRC 826 culture material; 5% Corn, group of rats were fed diet containing 5% normal corn; WBC, white blood cell count; RBC, red blood cell count; HGB, hemogllobin; HCT, hematocrit; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; RDW red cell distribution width; MPV, mean platelet volume; PDW, platelet fdistribution width; [a], significantly different from 5% Corn group ($p<0.05$); [b], significantly different from AFB_1 group ($p<0.05$).

는 *F. moniliforme* MRC 826을 옥수수 배지에서 배양하였다. 배양물질의 독성 및 발암성을 aflatoxin B_1과 비교·연구하기 위하여, SD 랫드에 대한 독성을 평가하였고, 중기발암성 검색법인 DEN-PH모델을 이용하여 배양물질과 AFB_1의 간발암성을 비교하였다.

Fumonisin을 검출하는 방식으로 현재까지 알려진 것은 thin layer chromatography(TLC)법,[14,19,44,65] gas chromatography(GC)법,[19,66] high performance liquid chromatography(HPLC)법,[14,44,46,67-69] liquid secondary ion mass spectrometry(LSIMS)법,[38,65] gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)법,[65,66] enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)법[70,71] 등이 있다.

GC, HPLC, LSIMS, GC-MS법 등은 정량분석 및 fumonisin의 구조를 확인할 목적으로 사용하는 분석법 들이다. 이들은 저농도의 fumonisin도 검출할 수 있다는 장점이 있으나, 시료의 전처리과정이 복잡하고 분석시간과 경비가 많이 든다는 단점 때문에, 단클론항체를 이용한 ELISA법이 개발 중에 있다.[71]

본 실험에서는 배양물질 중에 존재하는 fumonisin을 TLC를 이용하여 분석하였는데, TLC법은 감도(sensitivity)가 떨어지기는 하나 조작이 편하고 시간을 절약할 수 있어, 역학조사 및 정성검사용으로 흔히 사용되고 있다.[19] Sydenham 등[19]의 TLC법으로 FB_1의 분석을 시도하였으나 방해물질의 간섭으로 약간의 흔적만이 발견되었다. 따라서 시료를 좀더 순수화 할 목적으로 Sep-Park C_{18} cartridge를 이용하여 메탄올과 물의 1 : 3 혼합액 10 ml로 씻어내고, 메탄올과 물의 3 : 1 혼합액 10 ml로 용출시킨 후, TLC로 정성분석 하였더니, 표준물질과 거의 유사하게 Rf 약 0.25에서 갈색 내지 보라색의 점을 확인할 수 있었다.

Gelderblom 등[14]은 약 100 g 정도의 BD IX 랫드에 FB_1을 1일 23.75 mg의 비율로 투여한 독성시험 결과, 3일안에 4마리중 3마리가 폐사하였다고 보고하였다. 폐사한 랫드에 나타난 조직병리소견은 간장에 산발적인 단세포 괴사(scattered single-cell necrosis), 미약한 지방변성, 초자적 변성, 수종성 변성, Kupffer cell의 증가 및 종대 등이 관찰되었다고 하였다. 신장에서는 지방변성 및 근위곡세뇨관의 괴사 등이 관찰되었고, 심장과 폐장에 심한

Table 3. Effects of *F. moniliforme* MRC 826 culture material on serum biochemical values in Sprague-Dawley rats

Mean± S.D.

	AFB_1	5% CM	5% Corn
ALT(U/L)	89.33± 20.07	49.08± 9.56[a]	50.36± 10.58
AST(U/L)	243.50± 48.37	184.42± 27.27[a]	130.00± 13.17
CHOL(MG/DL)	75.33± 10.97	77.17± 6.56	78.91± 11.84
TBILL(MG/DL)	0.58± 0.11	0.50± 0.10	0.42± 0.15
TPROT(G/DL)	7.91± 0.57	7.46± 0.28	7.47± 0.41
TRIG(MG/DL)	61.67± 12.63	62.33± 16.83	66.45± 11.79
GLU(MG/DL)	71.67± 26.82	105.00± 38.17[a]	93.73± 23.28
ALP(U/L)	158.17± 24.55	191.83± 41.86[a]	169.36± 36.25
CREAT(MG/DL)	0.94± 0.13	0.99± 0.05	0.90± 0.09
BUN(MG/DL)	18.00± 2.41	24.50± 4.74[b]	15.64± 3.35
ALB(G/DL)	3.06± 0.74	3.46± 0.44	3.34± 0.23
SOD(MMOL/L)	145.29± 1.80	147.58± 1.65	147.00± 1.20
POT(MMOL/L)	6.06± 1.26	5.30± 0.55	5.03± 0.77

AFB_1 group of rats were fed diet containing 2 ppm aflatoxin B_1; 5% CM, group of rats were fed diet containing 5% *F. moniliforme* MRC 826 culture material; 5% Corn, group of rats were fed diet containing 5% normal corn; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; CHOL, cholesterol; TBILL, total bilirubin; TPROT, total protein; TRIG, triglyceride; GLU, glucose; ALP, alkaline phosphatase; CREAT, creatinine; BUN, blood urea nitrogen; ALB, albumin; SOD, sodium; POT, potassium; [a], significantly different from AFB_1 group ($p<0.05$); [b], significantly different from 5% corn group ($p<0.05$).

Fig. 5. A preneoplastic focus(arrow) of the rat liver induced by aflatoxin B_1. H&E staining. ×100.

Fig. 6. Serial section of Fig. 5. GST-P immunohistochemical staining. ×100.

Fig. 7. A preneoplastic focus(arrow) of the rat liver induced by *F. moniliforme* MRC 826 culture material. H&E staining. ×100.

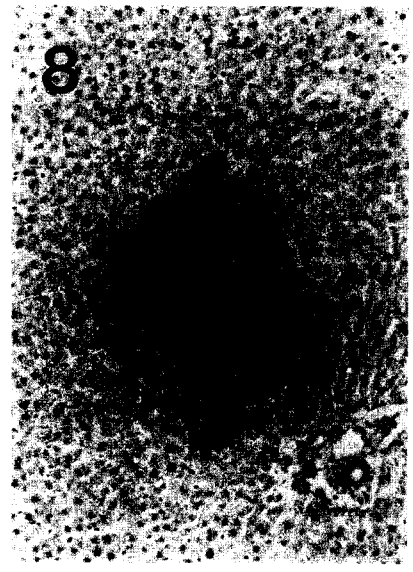


Fig. 8. Serial section of Fig. 7. GST-P immunohistochemical staining. ×100.

급성심근괴사(severe, disseminated acute myocardial necrosis)와 폐수종 등이 관찰되었다고 보고하였다.[14]

본 실험에서 배양물질과 분말사료를 1 : 1로 혼합하여 1주일간 급여한 결과, 사료섭취량의 급격한 감소와 체중의 저하는 곰팡이의 냄새로 인한 식이거부 및 fumonisin 등의 독성에 기인한 것으로 생각되며, 신장의 피막박리가 관란하였던 것은 영양

Table 4. Numbers and areas of glutathione S-transferase placental form positive foci in livers of Sprague-Dawley rats fed *F. moniliforme* MRC 826 cultkure material Mean± S.D.

Group	No. of rats	GST-P positive foci	
		No./cm^2	Area(mm^2/cm^2)
AFB_1	12	62.25+31.46[a]	10.83± 7.97[a]
5% CM	14	14.34+11.32[b]	0.85± 0.61[b]
2.5% CM	13	4.20± 4.93	0.24± 0.22
5% Corn	12	2.06± 2.29	0.13± 0.16
2.5% Corn	12	3.57± 2.71	0.16± 0.09

GST-P, glutathione S-transferase placental form; AFB $_1$, group of rats were fed diet containing 2 ppm aflatoxin B_1; 5% CM, group of rats were fed diet containing 5% *F. moniliforme* MRC 826 culture material; 2.5% CM, group of rats were fed diet containing 2.5% *F. moniliforme* MRC 826 culture material; 5% Corn, group of rats were fed diet containing 5% normal corn; 2.5% Corn, group of rats were fed diet containing 2.5% normal corn; [a]significantly different from 5% Corn group and 2.5% Corn group ($p<0.001$); [b]significantly different from 5% group ($p<0.01$).

상태의 불량과 관련된 것으로 생각된다. 실험기간중 폐사한 개체는 없었으며, 조직병리 검사 결과 간장의 수종성변성(hydropic degeneration)과 신세뇨관 상피세포의 괴사 등이 관찰되었다. Gelderblom 등[14]의 독성시험 결과와 본 실험의 결과를 비교하여 볼 때, 신장 및 간장에 나타난 독성은 비교적 일치된 경향을 보였으나, 본 실험의 경우 심장과 폐장에서의 병변은 전혀 관찰할 수 없었다. Jones와 Hunt[72]에 의하면 간장에서의 수종성변성은 주로 이온펌프의 기능부전으로 인한 세포손상에 의한 경우가 많다고 하였다.

영양적 측면에서 옥수수는 불완전한 사료라 한다. van Rensburg 등[73]의 보고에 의하면, 곰팡이의 감염이 없는 건실한 옥수수라도 필수영양소가 절대적으로 부족하기 때문에, 영양소를 고루 갖춘 배합사료보다 랫드에서 식도암의 발생율을 상대적으로 높이고, 이 옥수수사료에 비타민, 미네랄 등의 영양소를 보충해주면 이러한 영향이 없어진다고 하였다. 따라서 옥수수는 진균독소와 같은 발암물질의 매개체로 작용하기도 하고, 영양결핍 때문에 발암의 초기단계를 촉진하여 주기도 한다고 하였다.[24]

본 실험에서 발암성시험 종료시인 8주 경과 후에, aflatoxin B_1 투여군과 배양물질 투여군이 옥수수 투여군에 비하여 증체율이 유의성있게 떨어진 것은 aflatoxin B_1과 fumonisin 등의 진균독소의 독작용과 식이거부에 기인하였다고 판단된다.

Hayes[74]는 각 장기들의 체중에 대한 상대중량비가 독성 및 발암성을 평가하는 유용한 기준이라고 하였다. 본 실험에서 5% 배양물질 투여군이 5% 옥수수 투여군에 비하여 체중에 대한 간장의 상대적인 중량비가 유의성 있게 증가한 것은 배양물질의 독성 또는 발암성과 관련된 것으로 사료된다. 체중에 대한 신장의 중량비는 유의성 있는 감소를 보인 반면, 고환과 정낭선 등 생식기관의 중량비는 유의성 있는 증가를 보였다. 체중에 대한 각 장기들의 상대 중량비가 독성과 관련하여 나타났는가를 보기 위하여 해당 장기들을 조직검사하여 보았으나, 조직병리학적인 변화는 관찰되지 않았다.

한 등[75]은 MCH와 MCHC가 빈혈을 진단하는데 유용한 지수들이라 하였다. 본 실험의 혈액학적 검사 결과 5% 배양물질 투여군이 음성대조군에 비하여 MCH는 유의성 있게 감소하였으나, MCHC는 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 평균 적혈구 혈색소 농도인 MCHC의 감소를 동반하지 않은 평균 적혈구 혈색소량인 MCH의 감소는 큰 의미가 없다고 하였다.[75] 혈액생화학적 검사 결과, 5% 배양물질 투여군에서는 BUN이 5% 옥수수 투여군에 비하여 유의성 있게 증가하였는데 이는 배양물질의 신장독성과 관련이 있는 것 같다.[75]

간은 체내에 들어온 많은 물질들을 배설이 용이한 상태로 대사하는 작용을 하는 중요기관으로 여러 효소들을 갖고 있다. Sato[76]에 의하면 이 효소들은 간의 전암병소와 관련하여 증감하는 것으로 알려졌고, 특히 γ-glutamyl transpeptidase(GGT)와 glutathione S-transferase placental form(GST-P) 등은 전암병소에서 증가하는 효소들로서 잘 알려져 있다. 그리고 GGT와 GST-P 양성병소를 비교한 실험에서, GST-P는 GGT로 검색할 수 없는 작은 병소도 찾아내고 GGT보다 조기에 검출할 수 있으며 특이성이 높아 더 유용한 방법으로 평가되었다.[76]

본 실험에서 GST-P를 지표효소로 한 DEN-PH 모델로 aflatoxin B_1과 배양물질의 발암성을 비교해 본 결과, aflatoxin B_1 투여군과 5% 배양물질 투여군은 대조군에 비하여 GST-P 양성병소의 발현율이

유의성 있게 높게 나타났다. 순수하게 정제된 aflatoxin B_1과 배양물질의 발암성 지도를 비교하기가 쉽지는 않았으나, 배양물질 투여군의 GST-P 양성병소에서 관찰되는 H&E 염색상 및 면역조직화학적 염색결과가 aflatoxin B_1의 그것과 매우 흡사하였다.

Columbano 등[77]에 의하면, 발암 유발단계는 유전자에 직접 작용하는 발암물질의 투여로 유전자에 구조변화가 생기는 비가역적 과정으로 비교적 짧은 시간 노출되어도 가능하며, 세포증식이 활발하게 일어나는 간에서 그 유발율이 높은 것으로 보고하였다. 한편 촉진과정은 유전자에 직접작용은 하지 않고, 유발단계 때 생긴 변이세포의 유전자 발현을 도우면서 변이세포군들이 가역적으로 증식하도록 하는 과정이며, 진행단계는 유발·촉진된 세포군이 악성종양으로 자율적으로 발달해가는 비가역적인 과정이라고 한다.[78] 본 실험에서 FB_1을 함유한 것으로 확인된 5% 배양물질이 랫드 간장에서 발암 촉진능이 있는 것으로 증명되었고, Gelderblom 등[14]은 GGT를 지표효소로 한 단기간의 발암성 검색법에서 배양물질이 발암 유발능이 있다고 보고하였다.

Fumonisin의 독성 발현기전에 관한 연구는 간장세포나 신장세포를 이용한 *in vitro*실험,[79-81] 조랑말을 이용한 *in vivo*실험,[82] 방사성 동위원소를 이용한 대사실험[83] 등을 통하여 진행된 바 있다. 현재까지 밝혀진 바에 의하면 fumonisin의 구조가 sphingosine과 유사하여, sphingolipid의 생합성을 sphingosine(sphinganine) *N*-acyltrasferase 단계에서 차단하기 때문이라고 한다.[82] 즉, 말의 뇌백질연화증은 fumonisin이 sphingolipid 생합성을 저해하게 되면, 뇌는 sphingolipid가 많은 조직이기 때문에 괴사소가 나타나 뇌백질연화증을 일으키게 되고, 랫드에서 발암 촉진효과는 항암력을 갖고 있는 sphingosine의 생합성을 fumonisin이 저해하기 때문에 나타난 결과라고 한다.[79]

이상의 결과들을 종합하여 볼 때, FB_1을 함유한 것으로 확인된 *F. moniliforme* MRC 826 배양물질은 랫드의 간장과 신장에 독성을 나타내었고, DEN-PH모델을 이용한 발암성 검색법에서 발암 촉진능이 있는 것으로 증명되었다. FB_1이 발암 유발능도 있다는 많은 보고들을 볼 때 FB_1은 자연상태에서도 많이 검출될 뿐만 아니라 내열성이 있어 인축에 위해를 초래할 가능성이 높기 때문에 간편한 검색법의 개발, 효과적인 해독방법 및 예방책 등이 강구되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

본 실험에서 fumonisin B_1을 함유한 것으로 확인된 *F. moniliforme* MRC 286 옥수수 배양물질의 독성 및 발암성을 aflatoxin B_1과 비교하기 위하여, 독성을 평가하고 중기발암성 검색법인 diethylnitrosamine-partial hepatectomy(DEN-PH)모델을 이용하여 발암성을 평가하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 옥수수 배양물질을 동량의 분말사료와 혼합하여 급여한 독성시험 결과 사료섭취량 및 증체율이 떨어졌고, 조직병리학적으로는 간장의 공포변성과 신장세뇨관 상피세포의 괴사 등이 관찰되었다.

2. Aflatoxin B_1 투여군과 마찬가지로, 5% 배양물질 투여군 및 2.5% 배양물질 투여군에서 증체율이 정상 옥수수 투여군에 비하여 유의성 있게 떨어졌다 ($p<0.05$).

3. 5% 배양물질 투여군에서 간장, 신장, 고환, 정낭선 등의 체중에 대한 상대중량비와 평균 적혈구 혈색소량 및 혈액요소질소량 등이 음성대조군인 옥수수 투여군에 비하여 유의성 있는 변화를 보였다 ($p<0.05$).

4. 5% 옥수수 투여군에 비하여 5% 배양물질 투여군은 glutathione S-transferase placental form (GST-P) 양성병소의 발현율이 2 ppm 농도의 aflatoxin B_1 투여군과 마찬가지로 유의성 있게 높게 나타났다($p<0.01$).

이상의 결과들을 종합하여 볼 때, *F. moniliforme* MRC 826 배양물질은 랫드의 간장과 신장에 독성과 간암 촉진효과가 있음이 증명되었다.

국문요약

옥수수에 자연발생하는 *F. moniliforme* MRC 826을 옥수수에 배양하여 배양물에 존재하는 fumonisin B_1을 정성검사한 후, 배양물질의 독성 및 발암성을 aflatoxin B_1과 비교하여 보았다.

독성시험은 3주령의 Sprague-Dawley(SD) 암컷 랫드 10마리를 각 군당 5마리씩 2개 군으로 나누어 제 1군은 시험군으로 배양물질을 분말사료와 1 : 1로 혼합하여 1주간 급여하였고, 제 2군은 대조군으로 분말사료만을 급여하면서 실험하였다. 시험군은 급여 3~4일경부터 침울해 보였으며, 랫드 1마리당 1주간 평균 사료섭취량은 24 g이었고, 평균 체중은 18 g 감소하였다. 부검 시 신장의 피막박리가 곤란하였고 조직 검사 결과 간장의 공포변성과 신장 세뇨관 상피세포의 괴사 등이 관찰되었다.

발암성 검사는 6주령의 SD 수컷 랫드 70마리를 사용하여 중기 발암성 검색법인 diethylnitrosamine-partial hepatectomy (DEN-PH) 모델로 시험하였다. 시험군은 각 군당 14마리씩 총 5개군을 두었으며 실험 0일에 DEN을 복강내로 투여하였고, 2주 후에 제 1군(양성대조군)은 aflatoxin B_1을 2 ppm 농도로 첨가한 사료를, 제 2군은 배양물질을 5% 농도로 첨가한 사료를, 제 3군은 배양물질을 2.5% 농도로 첨가한 사료를, 제 4군은 옥수수를 5% 농도로 첨가한 사료를, 제 5군은 옥수수를 2.5% 농도로 첨가한 사료를 각각 6주간 급여하였다. 실험 3주에 간 부분절제술을 시술하였고, 8주간 체중변화, 사료섭취량, 음수량을 측정한 후 부검하여 간장은 glutathione S-transferase placental form(GST-P) 면역조직화학적 염색을 실시하였고, 뇌, 뇌하수체, 흉선, 폐, 부신, 신장, 심장, 비장, 정낭선, 고환 및 간장 등은 H&E 염색을 하여 병변을 관찰하였다. GST-P 염색 결과 5% 배양물질 투여군은 aflatoxin B_1 투여군과 유사하게 GST-P 양성병소의 발현율이 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 보였다. 5% 배양물질 투여군 및 2.5% 배양물질 투여군은 옥수수 투여군에 비하여 증체율의 저하가 관찰되었고, 5% 배양물질 투여군에서 간, 신장, 고환 및 정낭선 등의 체중에 대한 상대중량비, 혈액요소질소와 평균 적혈구 혈색소량 등은 옥수수 투여군에 비하여 유의성 있는 변화가 관찰되었다.

이상의 결과들을 종합하여 볼 때 *F. moniliforme* MRC 826 배양물질은 랫드의 간과 신장에 독성을 나타내었고, aflatoxin B_1과 마찬가지로 간암 촉진효과가 있는 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. Busby, W.F., Jr. and Wogan, G.N.: Food-borne mycotoxins and alimentary mycotoxicoses. In "*Food-borne infections and intoxications*", New York, Academic Press, 1979.
2. Pier, A.C.: An overview of the mycotoxicoses of domestic animals. *J.A.O.A.C.*, **163**, 1259 (1973).
3. Wyllie, T.D. and Morehouse, L.G.: Mycotoxic fungi mycotoxins mycotoxicoses. New York and Basel, Marcel Dekker, Inc., 1977, 1978.
4. Institute of Food Technologists' Expert Panel on Food Safety & Nutrition: Mycotoxins and food safety. *Food Technol.*, **40**, 59 (1986).
5. Christensen, C.M.: Fungi and seed quality. In "*Handbook of applied mycology*", Vol. 3, New York, York, Marcel Dekker, Inc., 1991.
6. Marshall, E.: Bugs in the yellow rain theory, *Science*, **220**, 1356 (1983).
7. Committee on Protection Against Mycotoxins, Board on Toxicology and Environmental Health Hazards and Commission on Life Sciences National Research Council: Introduction. In "*Protection against trichothecene mycotoxins*", Washington D. C., National Academy Press, 1983.
8. Krogh, P.: Mycotoxins in food, London, Academic Press, 1987.
9. Ueno, Y.: Toxicology of trichothecene mycotoxins. *ISI Atl. Sci.: Pharmacol.*, 121 (1988).
10. Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F. O.: Fusarium species: An illustrated manual for identification. University Park and London, The Pennsylvania State University Press, 1983.
11. Wiebe, L.A. and Bjeldanes, L.F.: Fusarin C, a mutagen from *Fusarium moniliforme* growth on corn, *J. Food Sci.*, **46**, 1424 (1981)
12. Ito, T.: Fusariocin C, a new cytotoxic substance produced by *Fusarium moniliforme*, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1237 (1979).
13. Cole, R.J., Kirksey, J.W., Cutler, H.G., Doupnik, B.L. and Peckham, J.C.: Toxin from *Fusarium moniliforme*: Effects on plants and animals. *Science*, **179**, 1324 (1973).
14. Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F.

O., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vleggaar, R. and Kriek, N.P.J.: Fumonisins-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1806 (1988).
15. Nelson, G.H., Christensen, C.M. and Mirocha, C. J.: *Fusarium* and estrogenism in swine, *J.A.V.M. A.*, **163**, 1276 (1973).
16. Nelson, P.E., Plattner, R.D., Shackelford, D.D. and Desjardins, A.E.: Fumonisin B_1 production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 984 (1992).
17. Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Gelderblom, W.C.A. and Nieuwenhuis, J.J.: Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1089 (1991).
18. Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shephard, G.S. and vas Schalkwyk, D.J.: *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*, **82**, 353 (1992).
19. Sydenham, E.W., Gelderblom, W.C.A., Thiel, P. G. and Marasas, W.F.O.: Evidence for the natural occurrence of fumonisin B_1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*, in corn. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 285 (1990).
20. Sydenham, E.W., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Shephard, G.S., van Schalkwyk, D.J. and Koch, K.R.: Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, southern Africa. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1900 (1990).
21. Marasas, W.F.O., van Rensburg, S.J. and Mirocha, C.J.: Incidence of *Fusarium* species and the mycotoxins, deoxynivalenol and zearalenone, in corn produced in esophageal cancer areas in Transkei. *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 1108 (1979).
22. Marasas, W.F.O., Wehner, F.C., van Rensburg, S.J. and van Schalkwyk, D.J.: Mycoflora of corn produced in human esophagel cancer areas in Transkei, southern Africa. *Phytopathology*, **71**, 792 (19 81).
23. Jaskiewicz, K., Marasas, W.F.O. and Taljaard, J.J. F.: Hepatitis in vervet monkeys caused by *Fusarium moniliforme*. *J. Comp. Path.*, **97**, 281 (1987).
24. Jaskiewicz, K., van Rensburg, S.J., Marasas, W.F. O. and Gelderblom, W.C.A.: Carcinogenicity of *Fusarium moniliforme* culture material in rats. *JNCI*, **78**, 321 (1987)
25. Kriek, N.P.J., Kellerman, T.S. and Marasas, W.F. O.: A comparative study of the toxicity of *Fusarium verticillioides (=F. moniliforme)* to horses, primates, pigs, sheep and rats. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **48**, 129 (1981).
26. Kriek, N.P.J., Marasas, W.F.O. and Thiel, P.G.: Hepato- and cardiotoxicity of *Fusarium verticillioides (F. moniliforme)* isolates from southern African maize. *Fd Cosmet. Toxicol.*, **19**, 447 (1981).
27. Gelderblom, W.C.A., Thiel, P. G., Jaskiewicz, K. and Marasas, W.F.O.: Investigations on the carcinogenicity of fusarin C-a mutagenic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Carcinogenesis*, **7**, 1899 (1986).
28. Gelderblom, W.C.A., Marasas, W.F.O., Jaskiewicz, K., Combrinck, S. and van Schalkwyk, D.J.: Cancer promoting potential of different strains of *Fusarium moniliforme* in a short-term cancer initiation/promotion assay. *Carcinogenesis*, **9**, 1405 (1988).
29. Mirocha, C.J., Mackintosh, C.G., Mirza, U.A., Xie, W., Xu, Y. and Chen, J.: Occurrence of fumonisin in forage grass in New Zealand. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3196 (1992).
30. Nelson, P.E., Plattner, R.D., Shackelford, D.D. and Desjardins, A.E.: Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2410 (1991).
31. Pittet, A., Parisod, V. and Schellenberg, M.: Occurrence of fumonisins B_1 and B_2 in corn-based products from the Swiss market. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1352 (1992).
32. Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O. and Stockenström, S.: Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 2014 (1991).
33. Sydenham, E.W., Marasas, W.F.O., Shephard, G.S., Thiel, P.G. and Hirooka, E.Y.: Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 994 (1992).
34. Cheng, S.J., Jiang, Y.Z., Li, M.H., and Lo, H.Z.: A mutagenic metabolite produced by *Fusarium moniliforme* isolated from Linxian country, China. *Carcinogenesis*, **6**. 903 (1985).

35. Luo, Y., Yoshizawa, T. and Katayama, T.: Comparative study on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3723 (1990).
36. Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W., Shephard, G.S. and Gelderblom, W.C.A.: The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia*, **117**, 3 (1992).
37. Bacon, C.W. and Williamson, J.W.: Interactions of *Fusarium moniliforme*, its metabolites and bacteria with corn. *Mycopathologia*, **117**, 65 (1992).
38. Bezuidenhout, S.C., Gelderblom, W.C.A., Gorst-Allman, C.P., Horak, R. M., Marasas, W.F.O., Spiteller, G. and Vleggaar, R.: Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 743 (1988).
39. Cawood, M. E., Gelderblom, W.C.A., Vleggaar, R., Behrend, Y., Thiel, P.G. and Marasas, W.F.O.: Isolation of the fumonisin mycotoxins: A quantitative approach. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1958 (1991).
40. Gelderblom, W.C.A., Kriek, N.P.J., Marasas, W.F. O. and Thiel, P.G.: Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B_1, in rats. *Carcinogenesis*, **12**, 1247 (1991).
41. Wilson, T.M., Ross, P.F., Owens, D.L., Rice, L.G., Green, S.A., Jenkins, S.J. and Nelson, H.A.: Experimental reproduction of ELEM: A study to determine the minimum toxic dose in ponies. *Mycopathologia*, **117**, 115 (1992).
42. Colvin, B.M. and Harrison, L.R.: Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathologia*, **117**, 79 (1992).
43. Haschek, W.M., Motelin G., Ness, D.K., Harlin, K.S., Hall, W.F., Vesonder, R.F., Peterson, R.E. and Beasley, V.R.: Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. *Mycopathologia*, **117**, 83 (1992).
44. Ross, P.F., Nelson, P.E., Richard, J.L., Osweiler, G.D., Rice, L.G., Plattner, R.D. and Wilson, T.M.: Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3225 (1990).
45. Qureshi, M.A. and Hagler, W.M., Jr.: Effect of fumonisin-B_1 exposure on chicken macrophage functions *in vitro*. *Poultry Sci.*, **71**, 104 (1992).
46. Alberts, J.F., Gelderblom, W.C.A., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., van Schalkwyk, D.J. and Behrend, Y.: Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B_1 by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1729 (1990).
47. Bothast, R.J., Bennett, G.A., Vancauwenberge, J.E. and Richard, J.L.: Fate of fumonisin B_1 in naturally contaminated corn during ethanol fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 233 (1992).
48. Park, D.L., Lee, L.S., Price, R.L. and Pohland, A. E.: Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: Current status and regulation. *J.A.O.A.C.*, **71**, 685 (1988).
49. Norred, W.P., Voss, K.A., Bacon, C.W. and Riley, R.T.: Effectiveness of ammonia treatment in detoxification of fumonisin-contaminated corn. *Fd Chem. Toxic.*, **29**, 815 (1991).
50. Ito, N., Tatematsu, M., Imaida, K., Hasegawa, R. and Murasaki, G.: Effects of various promoters on the induction of hyperplastic nodules in rat liver. *Gann*, **71**, 415 (1980).
51. Marx, J.L.: Tumor promoters: Carcinogenesis gets more complicated. *Science*, **201**, 515 (1978).
52. Pitot, H.C.: Biological and enzymatic events in chemical carcinogenesis. *Ann. Rev. Med.*, **30**, 25 (1979).
53. Pitot, H.C. and Sirica, A.E.: The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, **605**, 191 (1980).
54. Foulds, L.: The experimental study of tumor progression: A review. Cancer Res., **14**, 327 (1954).
55. Farber, E.: The multistep nature of cancer development. *Cancer Res.*, **44**, 4217 (1984).
56. Nowell, P.C.: Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.*, **46**, 2203 (1986).
57. Ito, N., Tatematsu, M., Nakanishi, K., Hasegawa, R., Takano, T., Imaida, K. and Ogiso, T.: The effects of various chemicals on the development of hyperplastic liver nodules in hepatectomized rats treated with N-nitrosodiethylamine or N-2-acetylaminofluorenylacetamide. *Gann*, **71**, 832 (1980).
58. Pitot, H.C., Barsness, L., Goldsworthy, T. and Kitagawa, T.: Biochemical characterisation of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine. *Nature*, **271**, 456 (1978).

59. Solt, D. and Farber, E.: New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature,* **263**, 701 (1976).
60. Tatematsu, M., Nakanishi, K., Murasaki, G., Miyata, Y., Hirose, M. and Ito, N.: Enhancing effect of inducers of liver microsomal enzymes on induction of hyperplastic liver nodules by N-2-fluorenylacetamide in rats. *JNCI,* **63**, 1411 (1979).
61. Ogiso, T., Tatematsu, M., Tamano, S., Tsuda, H. and Ito, N.: Comparative effects of carcinogens on the induction of placental glutathione S-transferase-positive liver nodules in a short-term assay and of hepatocellular carcinomas in a long-term assay. *Toxicol. Pathol.,* **13**, 257 (1985).
62. Ito, N., Inoue, T. Tagawa, T., Aoki, T. and Kagawa, M.: Development of new rapid bioassays for carcinogens to predict the results of long-term carcinogenicity tests. *Toxicol. Forum,* **9**, 601 (1986).
63. Kang, K.S., Kim, H.C. and Lee, Y.S.: The comparison of efficacy of glutathione S-transferase placental form positive and iron-resistant lesions in the detection of hepatocarcinogens. *Kor. J. Food Hygiene,* **6**, 1 (1991).
64. Hasegawa, R., Tsuda, H., Shirai, T., Kurata, Y., Masuda, A. and Ito, N.: Effect of timing of partial hepatectomy on the induction of preneoplastic liver foci in rats given hepatocarcinogens. *Cancer Letters,* **32**, 15 (1986).
65. Plattner, R.D., Norred, W.P., Bacon, C.W., Voss, K.A., Peterson, R., Shackelford, D.D. and Weisleder, D.: A method of detection of fumonisins in corn samples associated with field cases of euine leukoencephalomalacia. *Mycologia,* **82**, 698 (1990).
66. Jackson, M.A. and Bennett, G.A.: Production of fumonisin B_1 by *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 in submerged culture. *Appl. Eviron. Microbiol.,* **56**, 2296 (1990).
67. Scott, P.M. and Lawrence, G.A.: Liquid chromatographic determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. *J. AOAC Int.,* **75**, 829 (1992).
68. Stack, M.E. and Eppley, R.M.: Liquid chromatographic determination of fumonisins B_1 and B_2 in corn and corn products. *J. AOAC Int.,* **75**, 834 (1992).
69. Sydenham, E.W., Shephard, G.S. and Thiel, P.G.: Liquid chromatographic determination of fumonisins B_1, B_2, and B_3 in foods and feeds. *J. AOAC Int.,* **75**, 313 (1992).
70. Azcona-Olivera, J.I., Abouzied, M.M., Plattner, R. D., Norred, W.P. and Pestka, J.J.: Generation of antibodies reactive with fumonisins B_1, B_2, and B_3 by using cholera toxin as the carrier-adjuvant. *Appl. Environ. Microbiol.,* **58**, 169 (1992).
71. Azcona-Olivera, J.I., Abouzied, M.M., Plattner, R. D. and Pestka, J.J.: Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins fumonisins B_1, B_2, and B_3. *J. Agric. Food Chem.,* **40**, 531 (1992).
72. Jones, T.C. and Hunt, R.D.: Introduction, the cell, death of cells and tissues. In "*Veterinary pathology*", Philadelphia, Lea & Febiger, 1983.
73. van Rensburg, S.J., Hall, J.M. and du Bruyn, D.B.: Effects of various dietary staples on esophageal carcinogenesis induced in rats by subcutaneously administered N-nitrosomethylbenzylamine. *JNCI,* **75**, 561 (1985).
74. Hayes, A.W.: Principles and methods of toxicology, 2nd Ed. New York, Raven Press, 1989.
75. 韓弘栗, 李政吉, 李昌雨: 改正 獸醫臨床病理. 제 3판, 서울, 機電研究社, 1987.
76. Sato, K.: Tumor markers, with special reference to marker enzymes for chemical hepatocarcinogenesis. *Toxicol. Forum,* **10**, 57 (1987).
77. Columbano, A., Rajalakshmi, S. and Sarma, D.S.R.: Requirement of cell proliferation for the initiation of liver carcinogenesis as assayed by three different procedures. *Cancer Res.,* **41**, 2079 (1981).
78. Pitot, H.C.: Progression: the terminal stage in carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.,* **80**, 599 (1989).
79. Norred, W.P., Wang, E., Yoo, H., Riley, R.T. and Merrill, A.H., Jr.: *In vitro* toxicology of fumonisins and the mechanistic implications. *Mycopathologia,* **117**, 73 (1992).
80. Wang, E., Norred, W.P., Bacon, C.W., Riley, R.T. and Merrill, A.H., Jr.: Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J. Biol. Chem.,* **266**, 14486 (1991).
81. Yoo, H.S., Norred, W.P., Wang, E., Merrill, A.H., Jr. and Riley, R.T.: Fumonisin inhibition of *de novo* sphingolipid biosynthesis and cytotoxicity are correlated in LLC-PK_1 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* **114**, 9 (1992).
82. Wang, E., Ross, P.F., Wilson, T.M., Riley, R.T. and Merrill, A.H., Jr.: Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium monilifo-*

rme. J. Nutr., **122**, 1706 (1992).
83. Shephard, G.S., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Alberts, J.F. and Gelderblom, W.C.A.: Fate of a single dose of the ^{14}C-labelled mycotoxin, fumonisin B_1, in rats. *Toxicol.*, **30**, 768 (1992).