

## Ochratoxin A가 마우스의 장기에 축적 정도와 ELISA법 확립에 관한 연구

김동술

영국식품연구소

### Study on the Accumulation of Ochratoxin A in Mouse's Organs and the Establishment of ELISA Method for Ochratoxin A

Dong-Sul Kim

Department of Food Molecular Biochemistry, Institute of Food Research, Norwich Laboratory, Norwich Research  
Park, Colney, Norwich NR4 7UA, U.K.

**ABSTRACT**—Ochratoxin A was produced from *Aspergillus ochraceus* ATCC 18412 which was then orally administered into the experimental mice to study the toxic levels of ochratoxin A. A ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) method which is more rapid and safe than conventional analytical method, was developed by using ochratoxin A antibody. This method was successfully used to measure the levels of ochratoxin A in blood, liver and kidney of mice. In order to produce a large amount of ochratoxin A to study toxicity in the mice, *Aspergillus ochraceus* ATCC 18412 was incubated in the rice medium and as a result 0.5 g of ochratoxin A from rice medium (kg) was produced after extraction and purification. Feed consumption and gain in body weight of mice with ochratoxin A at a level of 10 µg/g body weight was significantly ( $p < 0.05$ ) reduced as compared with control during period of 3 weeks. Ochratoxin A-BSA conjugate was made by putting 13 mole of ochratoxin A on 1 mole of BSA. This conjugate was used to develop ELISA method. The minimum detection level of ochratoxin A by established ELISA method was 0.5 ppb. After oral administration of ochratoxin A dose of 10 µg/g every two day for 3 weeks, concentration of ochratoxin A was measured in the blood, liver and kidney by ELISA method. The level of ochratoxin A was 11 µg/dl, 0.9 µg/g and 3.7 µg/g in the blood, liver and kidney, respectively.

**Key words** □ *Aspergillus ochraceus* ATCC 18412, Ochratoxin A, Toxicity, ELISA

Ochratoxin A는 곰팡이에 의해 생성되는 2차 대사산물로서 옥수수, 밀, 보리 및 땅콩등의 농산물에 수확전 또는 저장중에 오염되어 이를 사람이나 가축이 섭취할 경우 급만성질병과 생리적 이상을 유발시키며 특히 신장 및 간에 치명적인 손상을 주어 급성 지방변성을 일으키고<sup>1,2)</sup> 간의 glycogen합성효소 및 면역작용을 저해하여 사람에게 Balkan endemic nephropathy등의 만성질환을 일으키는 독성물질이다.<sup>3,5)</sup> 그 종류는 ochratoxin A, ochratoxin B, ochratoxin C, 4-hydroxyochratoxin A, mellein, 및 4-hydroxymellein 등으로 현재까지 17종의 유도체가 알려졌으며<sup>6)</sup> 그중에서 독성이 가장 강력한 것은 ochratoxin A이며 이를 생성하는 곰팡이는 *Aspergillus ochraceus*, *A. melleus*, *A. sclerotiorum*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. petrakii* 등과 *Pen-*

*icillium viridicatum*, *P. palitans*, *P. commune*, *P. variabile*, *P. purpurescens*, *P. cyclopium* 등으로 밝혀졌다.<sup>7,8)</sup>

Ochratoxin A에 대한 독성보고는 덴마크와 스웨덴에서 사료와 관련된 돼지의 만성 신장질환이 반세기 이상 알려져왔는데,<sup>9,10)</sup> 이 만성 신장질환은 세뇨관의 위축증(tubular atrophy), 간질피질의 섬유화(cortical interstitial fibrosis)와 사구체의 초자양 병성(hyalinized glomeruli)등의 원인이 ochratoxin A로 밝혀졌으며,<sup>11)</sup> 또한 신장질환을 앓고있는 돼지들의 장기등에서 ochratoxin A가 검출되었다. 그리고 발칸반도성 질환이 만연되어 있는 유고슬라비아 지방에서 생산된 736점의 곡류와 32점의 빵을 분석한 결과 곡류에서 8.7%와 빵에서 18.8%의 ochratoxin A가 검출되었다. 이때 오염된 곡류의 33%가 100 µg/kg이상이었다. 따라서 발칸

풍토성 신장독은 ochratoxin A에 오염된 식품을 섭취함으로써 기인되는 것으로 보고되고 있다.<sup>12,13)</sup>

우리나라에서도 김등<sup>14,15)</sup>에 의해 ochratoxin A의 생성균주인 *Aspergillus ochraceus* 및 *Penicillium viridicatum* 등의 곰팡이는 물론 곡류중에도 ochratoxin A가 검색된 바 있다. 최근 세계각국에서는 식품에서의 mycotoxin 오염문제를 중요하게 취급하고 이에 대한 법적 허용규제한도를 설정하여 농산물등에 ochratoxin에 대한 오염여부를 엄격히 검색하고 있으나 우리나라의 경우는 aflatoxin B1에 대한 잠정 허용기준 이외에는 다른 mycotoxin에 대한 기초연구는 미흡한 편이다.

따라서 본 연구는 ochratoxin A가 마우스의 각 장기에 대한 축적의 정도를 살펴보고 이를 분석하기 위한 ELISA법을 확립함으로써 기존의 방법에 비해 추출과 정제에 많은 시간을 절약함은 물론 처리 과정에서 수반되는 안전성 문제와 효율성등의 장점이 있기 때문에 축산식품등의 잔류검사법으로 활용도가 높을 것으로 기대되기에 그 결과를 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 실험재료

실험에 사용한 Ochratoxin A, BSA(bovine serum albumin), OVA(ovalbumin), Tween20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate), TMBZ(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), RPMI-1640(cell culture media), charcoal(Darco G-60), alumina(80-200mesh)등은 Sigma사, LPS(lipopoly saccharide), ConA(concanavalin A)는 Difco사, glutaric anhydride, DMF(dimethyl formamide), PBS(phosphate buffer saline, 인산완충염수), EDPC[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbo diimide]는 Aldrich사로 부터 구입하여 사용하였으며, 그 외 시약은 특급시약이었다.

### Ochratoxin A-BSA conjugate의 합성

기존의 TLC 및 HPLC법에 의한 ochratoxin A의 분석 방법 개선을 위해 면역분석기법을 응용하려는 시험을 행하였다. 우선 indirect competitive ELISA법을 확립하기에 앞서 microtiter plate에 coating할 ochratoxin A-BSA conjugate의 합성을 Kawamura등<sup>16)</sup>의 방법을 참고하여 Fig. 1과 같은 반응을 거쳐 이행하였다. 즉, 5 mg의 ochratoxin A를 ethanol 0.12ml에 용해시켜서 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 3 ml를 첨가하여 준비하였다.

또한, BSA 50 mg은 0.1 M NaCl 5 ml에 용해시켜서 25 mg의 EDPC를 첨가하여 앞서 준비한 용액을 서서히 혼합하여 실온에서 20시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 반응물은 0.01 M tris buffer(pH 8.5)에서 12시간 동안 투석하였다. 투석

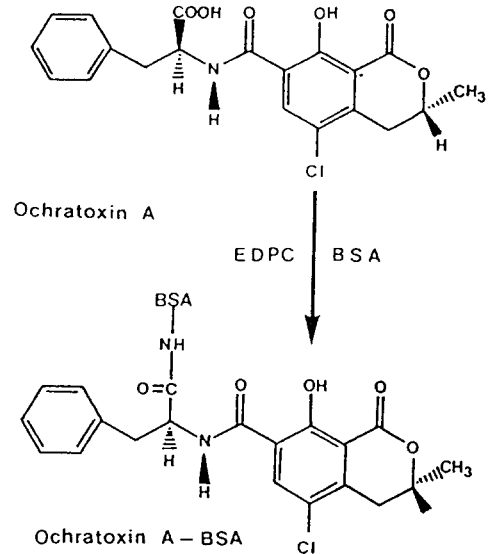


Fig. 1. Schematic diagram for the preparation of ochratoxin A-BSA conjugate.

BSA: bovine serum albumin. EDPC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide.

이 완료된 용액을 Sephadex G-75 column에 통과시켜 spectrophotometer를 이용하여 peak를 확인하고 각 fraction을 수집하였다. 분리된 fraction은 다시 3차 증류수에 3일간 투석시킨 후 동결건조시켜 -70°C에서 보존하면서 실험에 사용하였다.

### Ochratoxin A-BSA conjugate의 확인

합성된 ochratoxin A-BSA 결합체에서 BSA 한 분자당 결합된 ochratoxin A의 반응비율은 다음과 같이 Lowry법<sup>17)</sup>에 준하여 계산하였다. 즉, spectrophotometer를 이용하여 ochratoxin A-BSA의 순수한 단백질양만을 정량한 다음, 단백질 농도를 알고 있는 ochratoxin A-BSA의 일정량을 취하여 동량의 7 N-NH<sub>4</sub>OH 용액을 첨가하여 실온에서 6시간 동안 반응시켜 가수분해하였다. 이 추출물을 질소하에서 증발농축시킨 후 hot methanol을 가하여 천천히 반응시켰다. 상층액을 취하여 다시 질소하에서 증발 농축시켜 chloroform을 천천히 가하여 반응시키는 조작을 반복하여 acetonitrile+water+acetic acid(99+99+1) 용액을 가하여 용해시킨 후 HPLC로 분석하였다.

### 독성실험

Ochratoxin A의 생산-Ochratoxin A의 독성 연구를 위해서는 많은 양의 ochratoxin A가 필요하므로 ochratoxin A를

생성하는 표준균주를 배양하여 독소를 생성하게 한 다음 정제하여 실험에 사용하였다. 먼저 표준균주의 영향을 위한 포자현탁액의 조제는 공시균을 PDA 평판배지에 무균적으로 접종하여 28°C에서 14일간 배양시켜 0.1% tween 80 ml와 멸균수 5 ml를 가해 교반기에서 강력하게 교반하여 포자를 씻어내는 조작을 3회 반복하여 얻은 포자현탁액을 완전히 살균된 4겹의 cheese cloth에 여과하고 적당한 양의 멸균수로 희석하면서 현미경으로  $10^6$ - $10^7$  conidia/ml로 조절하여 eppendorf tube에 분주한 후 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

또한 ochratoxin A의 생산은 Ueno등<sup>16)</sup>의 방법을 변형하여 실험하였다. 즉, 쌀배지(쌀 1 kg, 수분 40%)에 위에서 만들어 보관중인 *Aspergillus ochraceus* ATCC 18412의 포자현탁액을 접종하여 28°C에서 14일간 배양하였다. 배양이 끝난 배양물은 ethyl acetate로 추출하여 여과한 액을 감압 건조하고 5 ml가 되게 한 후 silica gel(Merck, 70~200 mesh)이 충전된 5 cm×50 cm 컬럼에 흡착시켜 n-hexane 1 l로 탈지시킨 후 n-hexane+acetone(12+7) l, n-hexane+acetone(1 +2) l를 차례로 유출시켜 fraction collector(LKB2211, Sweden)로 10 ml씩 수집하였으며 TLC로 확인하였다. Ochratoxin A가 들어있는 분획을 전부 모아 감압건조한 후 잔사를 benzene에 녹여 4°C에 방치하여 ochratoxin A결정을 얻었다. 결정화된 ochratoxin A는 HPLC로 확인하였다.

#### 실험동물 및 사육환경

동물 체내에서 ochratoxin A가 미치는 영향을 실험하기 위하여 C<sub>3</sub>H/He 계통의 마우스를 실험동물로 이용하였다. 마우스는 생후 5주된 것으로 평균무게 18 g의 암컷을 이용하였다. 사육장은 25°C를 유지토록 하였으며 명암주기는 12시간(08:00-20:00)으로 유지시켰으며 물과 사료는 자유롭게 섭취하게 하였다.

#### 군분리 및 투여용량

실험군을 3군으로 나누어 실험하였는데 대조군인 제1군의 경우 옥수수 기름만 투여하였으며, 제2군의 경우 ochratoxin A를 옥수수 기름에 녹여 5 mg/kg으로 하였고, 제3군의 경우 10 mg/kg의 양으로 주당 3회씩 경구투여 하였다.

#### 사료섭취량 및 체중 측정

실험에 사용된 모든 실험동물에 대하여 시험물질 투여 후 사료 섭취량과 몸무게를 2일 간격으로 측정하였다.

부검-1, 2, 3주째 되는 시기에 마우스를 ether로 가볍게 마취한 후 채혈하고 간 및 신장을 적출하여 ELISA 분석용 시료로 사용하였다.

#### ELISA법에 의한 조직 및 혈청 중 ochratoxin A의 검색 확립된 ELISA법으로 조직 및 혈청중 ochratoxin A 함량

Methanol 150  $\mu$ l were added to serum 150  $\mu$ l  
↓ After vortexing  
Centrifuge for 5 min in 1,500rpm.  
↓  
Preparation of supernatant with PBS-Tween  
↓ Adding 5% Methanol  
Adjust to 10% Methanol  
↓  
Sample for ELISA

Fig. 2. Sample preparation of ochratoxin A in whole blood for ELISA.

Extracting 1g of liver and kidney  
↓  
Homogenizing with 5ml ethyl acetate  
↓ Shaking for 30 min.  
Adding 7.5ml D.W.  
↓  
Separation of ethyl acetate layer  
↓  
Drying 2.5ml of ethyl acetate layer  
↓  
Dissolving with 1ml methanol and 4ml D.W.  
↓  
Passing through Sep Pak(C<sub>18</sub>, Waters) column  
↓  
Washing column with methanol:water(10:90)  
↓  
Eluting ochratoxin A with 3ml methanol  
↓ Drying  
Dissolving with 0.1ml methanol and 0.9ml of phosphate buffer  
↓  
Preparation of ELISA sample

Fig. 3. Preparation of ELISA sample from the tissues.

을 알아보기 위하여 다음과 같이 추출하였다. 즉, 혈청의 경우 Fig. 2와 같이 혈청 150  $\mu$ l에 methanol 150  $\mu$ l를 가하고 10분동안 강하게 교반한 후 15,000 rpm에서 5분동안 원심 분리하였다. 원심분리한 상층액을 일정량 취해 PBS-Tween으로 제조한 5% methanol 용액을 가하여 최종 methanol 농도가 10%되게 한 후 ELISA 분석에 이용하였다.

간과 신장조직의 시료준비는 Fig. 3과 같이 행하였다. 조직을 각각 1 g씩 취하여 5 ml ethyl acetate를 넣어 5분 동안 균질화한 후 30분 동안 진탕하였다. 진탕이 끝나면 증류수 7.5 ml를 가하여 ethyl acetate층을 세척해 준 다음 ethyl acetate층을 2.5 ml 취해 건조시키고 methanol 1 ml와 증류수 4 ml를 가하여 용해시킨 후 Sep Pak(C<sub>18</sub>, Water)컬럼에 통과시

켰다. 그런 다음 methanol +water(10+90)의 혼합용매로 컬럼을 세척하고 흡착된 ochratoxin A를 methanol 3 ml로 용리시켜 건조한 후 0.1 ml의 methanol에 녹인 다음 0.9 ml의 PBS-Tween을 가해 ELISA 분석용 시료로 사용하였다.

### 통계처리

본 연구의 모든 실험결과는 통계처리를 하여 평균치와 표준편차 및 표준오차를 계산하였고 실험군간의 평균치 비교는 분산분석(analysis of variance)을 한 후 유의성 검정은  $p < 0.05$  수준에서 Scheff의 다중비교 검정법(multiple comparison test)을 하였다.

## 결과 및 고찰

### Ochratoxin A-BSA conjugate의 합성

Ochratoxin A는 분자량(403)이 낮아 그 자체만으로는 항체생산을 유도할 수 없기때문에 단백질을 면역원으로 하는 conjugate생성이 매우 중요하다. Ochratoxin A는 3,4-dihydro-3-methyl- isocoumarin 화합물의 7-carboxyl기에 L- $\beta$ -phenylalanine의 amide결합에 의한 화합물로서 ochratoxin A는 5번 탄소에 chloro와 22번 탄소에 carboxyl기가 결합되어있으므로 직접 단백질과 conjugate 합성이 가능하였다. 즉, 실험방법에서 언급한 바와 같이 Kawamura등<sup>16)</sup>의 방법을 참고하여 ochratoxin A-BSA conjugate를 조제하였다. 합성된 conjugate는 투석시켜 정제한 후 Lowry법<sup>17)</sup>으로 ochratoxin A-BSA의 단백질 함량을 측정하고 일정량의 ochratoxin A-BSA에 7 N-NH<sub>3</sub>OH 용액을 가하여 가수분해시킨 후 단백질 분자 주위에 결합하고 있는 ochratoxin A의 수를 HPLC법으로 분석하였다. 그 결과 단백질(BSA) 1 M 당 약 13 M의 ochratoxin A가 결합된 것으로 나타났다. 특히 BSA와 결합한 ochratoxin A의 확인을 위해 ochratoxin A-BSA conjugate를 가수분해시킨 후 HPLC법으로 분석하여 BSA에 결합된 ochratoxin A를 확인하였다.

한편, Kawamura등의 실험결과는 한 분자의 단백질에 16.7 M의 ochratoxin A가 결합되었다고 하였으며, 1 M의 KLH, OVA 및 BSA와 결합하는 ochratoxin A는 각각 19.1 M, 0.3 M 및 1.2 M인 것으로 나타났는데 이러한 결합비는 실험 테크닉, 실험의 반응 조건 등에 따라서 조금씩 차이가 있는 것으로 사료된다.

### ELISA법의 확립

합성한 ochratoxin A-BSA conjugate와 ochratoxin A에 대한 단클론성 항체이용하여 Fig. 4와 같이 indirect competitive ELISA법을 확립하였다. 즉, ochratoxin A-BSA를 코

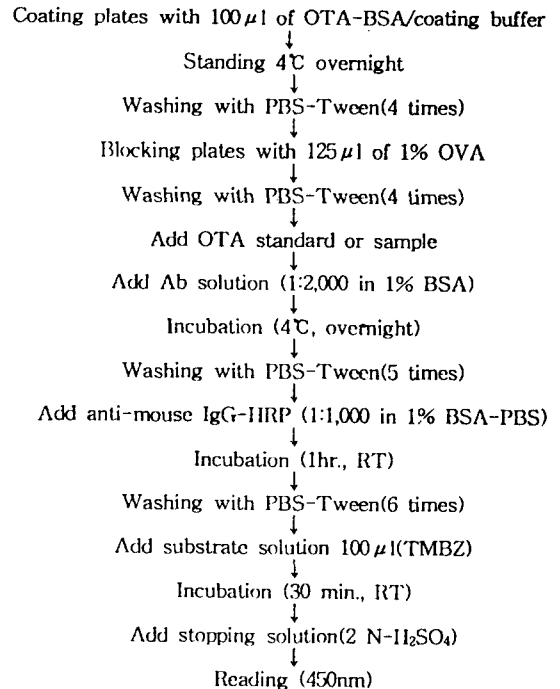


Fig. 4. Procedure of indirect competitive ELISA for ochratoxin A.

OVA: ovalbumin. HRP: horseradish peroxidase, TMBZ: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine.

팅용 완충용액(carbonate buffer)에 녹여 microtiter plate에 100  $\mu$ l(100 ng ochratoxinA/well)씩 분주한 다음 4°C에서 overnight하여 코팅시킨 후 세척용 완충액(PBS-tween)으로 4회 세척하였다. 세척 후 항체의 비특이적인 반응을 방지하기 위해 인산완충용액에 녹인 0.1% ovalbumin을 가하여 overnight 시킨 후 세척용 완충액(PBS-tween)으로 4회 세척하였다. 세척한 plate에 표준 ochratoxin A 또는 분석용 시료 추출액과 ochratoxin A 항체를 희석하여(1:2,000) 각각 50  $\mu$ l씩 well에 주입하고 다시 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 반응이 끝난 plate를 세척용 완충액으로 5회 세척하고, 희석한 2차 항체(anti-mouse IgG-HRP, 1:1,000)를 100  $\mu$ l씩 넣어 실온에서 1시간 반응시킨 후 세척용 완충용액으로 6회 세척하였다. 여기에 기질(TMBZ; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)을 100  $\mu$ l씩 첨가하여 실온에서 30분간 반응, 발색시킨 후 2 N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 50  $\mu$ l씩 가해 반응을 정지시켰다. 이것을 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하고, 미리 작성해 둔 표준곡선에서 ochratoxin A 함량을 계산하였다.

이와 같이 확립된 indirect competitive ELISA 측정조건에

의해 기질의 발색정도는 ochratoxin A 농도차이에 따라 예민하게 큰 차이를 보였으며 5 ppb부터는 육안적으로도 식별이 가능할 정도로 현저한 O.D.값의 변화를 나타냈다. 이러한 O.D.값의 차이를 ELISA reader로 읽어 표준곡선을 작성한 결과 10ppb이하의 낮은 농도에서도 강한 O.D. 차이를 보여 2 ppb 정도 부터 확실한 분석결과를 얻을 수 있었으며, 이를 토대로 실제 마우스의 장기 및 혈청중에 ochratoxin A의 오염정도를 측정하는데 활용하였다.

대체로 mycotoxin의 면역학적 분석을 위해 RIA (radioimmunoassay)가 Aalund와 Dorminique등<sup>19,20</sup>에 의해 분석에 응용되었다. 이는 특이한 항체를 solid phase에 고정시킨 후, 방사성 동위원소로 표지된 mycotoxin과 표준 mycotoxin 및 미지 시료를 함께 경쟁적으로 반응시킨 다음 유안침전 등으로 용액속의 복합체를 제거시키고, 상층액속의 표지된 방사성 동위원소량을 측정하여 역으로 mycotoxin의 함량을 계산해내는 방법으로 종래의 방법에 비해 신속, 정확한 장점이 있는 반면 방사성 물질의 안정성, 폐기물의 문제점이 제기되었다. 그 후 ELISA법이 고안되어 유리 또는 플라스틱의 solid phase에 coating 되어 있는 mycotoxin과 단백질 결합체에 유리 mycotoxin과 1, 2차 항체를 경쟁적으로 작용시키는 indirect competitive ELISA법의 경우 그 과정이 다소 복잡하고 반응시간이 길지만 간편하고 정확한 분석이 가능하게 되었다. 특이성을

갖는 solid phase의 항체결합 부위에 직접 경쟁으로 작용하는 것을 이용하여 간편한 direct competitive ELISA법이 소개되었다.

일반적으로 면역학적 분석법에 의한 mycotoxin 정량은 분석방법과 사용하는 항체의 종류의 특성에 따라 그 감도에 차이가 있지만 대체로 시료 g당 0.2~200 mg 정도이며 일회용 polystyrene 시험관을 쓰는 micro ELISA나 일회용 플라스틱 microtiter plate(96well plate)를 쓰는 micro plate ELISA는 오염문제가 많은 식품가공 분야의 분석에도 매우 바람직한 방법으로 생각된다.

### Ochratoxin A의 생산

먼저 ochratoxin A의 독성실험을 위해 표준 균주 *Aspergillus ochraceus* ATCC 18412를 고체배지에 대량 배양하여 다량의 독소를 생산하였다. 쌀배지(쌀 500 g, 수분 40%)에 위에서 만들어 보관중인 *Aspergillus ochraceus* ATCC 18412의 포자현탁액을 접종하여 28 °C에서 14일간 배양하였다. 그 결과 1~131번 까지 색소성분이 용출되었고 132~148번 까지의 분획에서 ochratoxin A가 나타났다. Ochratoxin A가 검출된 분획을 모아 건조시킨 결과 쌀배지 (kg)당 0.84 g의 crude toxin이 얻어졌으며 이것을 benzene+n-hexane에서 재결정하여 0.5 g의 결정을 얻을 수 있었다.

**Table 1. Sequential changes of body, organ weights and food consumption of mouse treated with ochratoxin A**

Item	Experimental group*	Weeks after treatment		
		1	2	3
Body weight (g)	1	<sup>a)</sup> 19.95±2.02	21.38±2.51	24.90±1.38
	2	19.24±2.18	22.88±1.08	27.16±1.59
	3	23.44±4.91	21.96±2.44	19.20±1.56 <sup>b)</sup>
Liver weight (g)	1	0.1 ±0.05	0.1±0.16	1.03±0.36
	2	1.08±0.25	1.18±0.07	1.48±0.09
	3	1.14±0.23	0.99±0.06	0.89±0.1 <sup>b)</sup>
Kidney weight (g)	1	0.25±0.03	0.25±0.05	0.33±0.02
	2	0.23±0.01	0.24±0.01	0.27±0.06
	3	0.22±0.04	0.21±0.04	0.22±0.02
Food consumption <sup>b)</sup> (g)	1	2.96±0.68	3.59±0.6	4.47±1.07
	2	3.15±0.11	3.03±0.53	2.99±0.55
	3	2.84±0.55	2.48±0.46	2.34±0.19 <sup>b)</sup>

a) Mean S.E.

b) Significant at a=0.05 by Scheff test

\*1: Ochratoxin A untreated (control)

2: 5 mg/kg ochratoxin A treated group

3: 10 mg/kg ochratoxin A treated group

**Table 2. Recovery of ochratoxin A in serum, kidney and liver samples after spiking authentic toxin (triplicate runs)**

Ochratoxin	A added	Recovery (%)	C.V.*
Serum	5( $\mu\text{g}/\text{dl}$ serum)	104	0.10
	1	98	0.16
	0.1	90	0.29
Kidney	50 (ng/g kidney)	86.5	0.11
	10	90	0.18
	1	90	0.11
Liver	50 (ng/g liver)	98	0.10
	10	106	0.16
	1	107	0.38

\* C.V.: Coefficient Variance.

### 마우스의 독성실험

**체중 및 장기 무게에 미치는 영향**—Ochratoxin A를 투여한 마우스의 체중, 간 및 신장의 무게 변화는 Table 1과 같다. Ochratoxin A를 5 mg/kg 투여한 제2군의 체중변화는 대조군보다 오히려 높게 나타났으나 10 mg/kg 투여한 제3군의 체중은 2주째까지는 차이가 없으나 제3주째는 현저히 낮은 경향을 보였으며 간과 신장의 무게도 같은 경향을 나타내었다.

사료 섭취량의 변화-농도가 다른 ochratoxin A를 마우스에 경구투여한 결과 3군 마우스들의 사료 소비량은 Table 1과 같다. 즉, ochratoxin A를 투여하지 않은 대조군에서는 실험일이 경과할수록 증가하였으나, ochratoxin A를 투여한 제3군은 대조군에 비해 사료 섭취량이 줄어들었고, 특히 ochratoxin A 용량의 증가와 시간이 경과할수록 사료 소비량은 유의적( $p<0.05$ )으로 감소하였다.

### ELISA법에 의한 마우스의 장기 및 혈청 중 ochratoxin A의 잔류농도 검색

합성한 ochratoxin A를 마우스에 경구투여한 후 간, 신장 및 혈액에서 ochratoxin A의 잔류농도를 조사하였다.

혈청중에 잔류하는 ochratoxin A가 어느 정도까지 회수되는지를 실험한 결과 Table 2와 같이 혈청 1 ml에 ochratoxin A를 1, 10 및 50 ppb를 첨가하여 ELISA법을 수행한 결과 90~104%까지 회수되는 것으로 나타났으며, 마우스의 신장과 간을 적출하여 조직내 잔류 ochratoxin A의 함량을 측정하기에 앞서 각 조직에 ochratoxin A를 spiking한 후 시료조제와 indirect competitive ELISA법으로 spiking시킨 표준 ochratoxin A의 회수율을 구하였다. 그 결과 신장에서는 86~90%, 간조직에서는 98~107%로 이는 기존의

**Table 3. Detection of ochratoxin A in serum, kidney and liver samples of mouse by indirect competitive ELISA**

Experimental group*	Ochratoxin A		
	1	2	3 (Weeks)
Serum ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )	1	ND	ND
	2	$^a)7.5\pm 0.72$	$8.0\pm 0.5$
	3	$7.8\pm 0.93$	$8.8\pm 0.67^{b)}$
Kidney (ng/g)	1	ND	ND
	2	$^a)34\pm 7.21$	$122\pm 11.13$
	3	$42\pm 2.31$	$168\pm 10.53$
Liver (ng/g)	1	ND	ND
	2	$216.7\pm 6$	$253\pm 64.29$
	3	$280\pm 105$	$1153\pm 50.33$
		$3733\pm 461.88$	

ND: Not detected

a) Mean S.E.

b) Significant at  $\alpha=0.05$  by Scheff test

\*1: Ochratoxin A untreated (control)

2: 5 mg/kg ochratoxin A treated group

3: 10 mg/kg ochratoxin A treated group

방법에 비하여 아주 양호한 회수율을 보였다.

혈청중에 잔류하는 ochratoxin A의 량을 시험한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 대조군의 경우 ochratoxin A가 검출되지 않았으며 제3군에서는 제2군에 비하여 높게 나타났으며 특히 kidney는 2주째 168 ng/g에 비하여 3주째는 993 ng/g로 매우 높게 검출되었고, 간에서는 3주째 3733 ng/g으로 가장 많은 ochratoxin A가 검출되었으나 혈청에서는 11 ppb가 검출되었다. Ochratoxin A의 투여농도가 높고 투여기간이 길수록 잔류농도가 높게 나타났으며, 혈액, 신장 및 간 중에서는 간에서 가장높게 ochratoxin A가 검출되었다. Ochratoxin A를 마우스의 복강내 투여하면 그 일부가 대사되어 대사산물인 isocumarin acid와 4-hydroxy-ochratoxin A 그리고 대사되지 않는 일부 ochratoxin A가 대.소변으로 배설되며<sup>21)</sup> ochratoxin A를 경구로 투여했을때, 설치류, 육식동물, 영장류, 어류 및 조류 등 여러 종류의 실험동물에서 간과 신장에 치명적인 손상을 주어 급성 지방변성을 일으키며 특히, 간과 신장에 투여 농도가 높고 투여 기간이 길수록 비례하여 축적량도 매우 높게 나타났다.

### 감사의 말씀

본 연구는 1994년 후반기 한국과학재단 및 보건복지부의 후원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## 국문요약

*Aspergillus ochraceus* ATCC 18412를 고체배지에 배양하여 다량의 ochratoxin A 생산하여 마우스에 경구 투여한 후 각 장 기 및 혈청에서 ochratoxin A의 잔류농도를 기존의 방법보다 신속, 정확하고 안전한 ELISA 방법을 확립하여, 이 방법으로 마우스의 장기 및 형질중에 ochratoxin A의 잔류정도를 검색하였다. 독성연구를 위해 필요한 많은 양의 ochratoxin A를 생산하기 위하여 *Aspergillus ochraceus* ATCC 18412를 쌀배지에 대량으로 배양하여 추출, 정제한 결과 0.5 g/kg이었으며, ochratoxin A의 섭취와 마우스의 체중 및 사료섭취량의 변화는 대조군에 비하여 ochratoxin A를 10 µg/g 투여한 실험군에서 감소하는 경향을 나타냈으며 사료의 섭취량 역시 체중과 비례하여 나타났다. Ochratoxin A에 대한 항원성을 부여하기 위하여 ochratoxin A-BSA를 합성한 결과 BSA 1몰당 ochratoxin A 13몰이 결합된 것으로 확인되었으며, ochratoxin A 분석을 위해 면역분석법을 응용하고자 ELISA법을 확립한 결과 최저 검출 한계는 0.5 ppb이었다. Ochratoxin A를 적일로 3주간 10 µg/g을 경구투여한 결과 혈액, 간, 및 신장에서 ochratoxin A의 농도는 11 µg/dl, 0.99 µg/g 및 3.7 µg/g으로 각각 나타났다.

## 참고문헌

- Boorman, G.: Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A in rats. NIH, Washington D.C., NIH publication No. 88-2813 (1988).
- Kanisawa, M. and Suzuki S.: Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A. A mycotoxin, *Gann*. **69**, 599-600 (1978).
- Hald, B.: Human exposure to ochratoxin A, in mycotoxins and phycotoxins '88 (Natori, S., Hashimoto, K. and Ueno, Y., Eds) Elsevier Science Publications, Amsterdam. 57-65 (1989).
- Krogh, P.: Causal associations of mycotoxic nephropathy. *Acta path. microbiol. scand. Sect. A. Suppl.* **269**, 28-70 (1978).
- Krogh, P.: Mycotoxic nephropathy, *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. Vol. 20. Academic Press, New York pp 147-170 (1976).
- Brodnik, T., Klemenc, N., Vospernik, P. and Zust, J.: Maize contamination by moulds and mycotoxins in SR Slovenia-Yugoslavia. *Krmiva* **19**, 29-33 (1970).
- Ciegler, A., Fennell, D.L., Mintzloff, H.J. and Leistner, L.: Ochratoxin synthesis by *Penicillium* species. *Naturwissenschaften* **59**, 365-366 (1972).
- Lee, S. S. and Chu, F.S.: Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in wheat. *J. AOAC*. **67**, 45-49 (1984).
- Szemerédi, G. and Aguero, A.: Nephropathy in swine associated with feeding ochratoxin-containing faecal meal prepared from bovine faeces. *Magyar Allatorvosok Zapja*. **38**, 45-49 (1983).
- Szozzech, G.N., Carton, W.W. and Tuite, J.: Ochratoxin A toxicosis in swine. *Vet. Pathol.* **10**, 347-364 (1973).
- Still, P.E., Mackalin, A.W., Ribelin, W.E. and Smalley, E.B.: Relationship of ochratoxin A to foetal death laboratory and domestic animals. *Nature (London)* **234**, 563-564 (1971).
- Brodnik, T., Klemenc, N., Vospernik, P. and Zust, J.: Maize contamination by moulds and mycotoxins in SR Slovenia-Yugoslavia. *Krmiva* **19**, 29-33 (1970).
- Cuturic, S., Pepeljnjak, S. and Cvetnic, Z.: The prevalence of micromycetes on cereals and other crops in the vegetation growing in a region of endemic nephropathy in middle posavina. *Lij. Jesnik* **101**, 525-530 (1979).
- 김동술, 정덕화, 이용옥: 곡류중 ochratoxin A의 검색을 위한 면역분석법에 관한 연구. *한국환경위생학회지* **20**, 3 (1994).
- 김동술, 정덕화, 조태용, 여명재, 강진순: 영남지방 곡류로부터 ochratoxin A 생성균의 분리에 관한 연구. *한국환경위생학회지* **20**, 3 (1994).
- Kawamura, O., Sato S., Kajii, H., Nagayama, S., Ohtani, K., Chiba, J. and Ueno, Y.: A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A based on monoclonal antibodies. *Toxicon*. **27**, 887-897 (1989).
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
- Ueno, Y., Sawano M. and Ishii K.: Production of trichothecene mycotoxins by *Fusarium* species in shake culture. *Appl. Microbiol.* **30**, 4-9 (1975).
- Aalund, O., Brunfeldt, K., Holand, B., Krogh P. and Pouksen, K.: A radioimmunoassay for ochratoxin A: a preliminary investigation. *Acta Pathologica Scandinavia*,

- preliminary investigation. *Acta Pathologica Scandinavica, Section C*. **83**, 390-392 (1975).
20. Dorminique M.R., Slegers, G.A. and Peteghem, V.: Radio immunoassay of ochratoxin A in barley. *J. Appl. Env. Microbiol.* **50**, 529-531 (1985).
21. Krogh, P.: Ochratoxins, on mycotoxins in human and animal health. Ed. by Pat htox Publishers. Inc. 488-498 (1977).