

<원 저>

*Paecilomyces japonica*의 반복투여가 랫드에 미치는 영향

김용범¹ · 홍다해² · 조은상² · 임완중¹ · 김일환³ · 손화영^{2,*}

¹안전성평가연구소, ²충남대학교 수의과대학, ³대웅제약

(접수: 2014년 1월 17일, 수정: 2014년 2월 26일, 게재승인: 2014년 3월 5일)

Effect of repeated *Paecilomyces japonica* treatment on rats

Yong-Bum Kim¹, Da-Hae Hong², Eun-Sang Cho², Wanjung Im¹, Il-Hwan Kim³, Hwa-Young Son^{2,*}

¹Korea Institute of Toxicology, Daejeon 305-343, Korea

²College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

³DAEWOONG Pharmaceutical Co., Yongin 449-814, Korea

(Received: January 17, 2014; Revised: February 26, 2014; Accepted: March 5, 2014)

Abstract : Cordyceps is a fungus used as a traditional medicine in China, Japan, and Korea. *Paecilomyces (P) japonica* is a new cordyceps that was recently cultivated on silkworm pupae in Korea. The present study evaluated the toxicological effects of *P. japonica* in rats. Forty rats were treated with oral doses of *P. japonica* (0, 20, 100, or 500 mg/kg/day) for 4 weeks. Twenty additional rats were treated with 0 or 500 mg/kg/day of *P. japonica* for 4 weeks and then maintained for 2 weeks without treatment. Clinical signs, body weight, food and water consumption, and organ weight as well as hematology, serum biochemistry, and histopathology data were examined. Body weight gain of the group treated with 500 mg/kg/day was significantly reduced. Microscopically, karyomegaly, single cell necrosis, and mitosis were observed in the renal tubular epithelium of all treated groups. In conclusion, *P. japonica* caused a reduction of body weight and renal injury in rats. The no observed adverse effect level (NOAEL) of *P. japonica* was less than 20 mg/kg/day.

Keywords : body weight, karyomegaly, *Paecilomyces japonica*, rat, renal toxicity

서 론

동충하초는 곤충 기생성 균류가 다양한 곤충에 침입하여 이를 기주로 자실체나 포자과를 형성하는 약용버섯의 일종이며, 곤충 이외에 절지동물, 균류, 고등식물의 종자에도 기생한다 [10]. 고대로부터 중국에서 인체의 활력을 보하는 불로장생의 비약으로 인식됐으며, 다양한 생리활성 효능이 알려지면서 건강식품으로 인기가 높아지고 있다. 동충하초의 유효성분으로는 cordycepin과 그 유도체, cordycepic acid, ergosterol, polysaccharides, nucleosides 등이 알려져 있다 [28]. 국내에서는 *Paecilomyces (P) japonica* 자실체의 인공 배양이 성공하여 보급되고 있다. 최근 연구에서 *P. japonica*는 항암, 면역력증강, 항피로, 항스트레스, 항산화 등의 다양한 생리활성 효능이 있는 것으로 보고되고 있다 [12, 22].

동충하초의 안전성에 관하여 *Cordyceps sinensis*를 3 g/kg의 농도로 랫드와 개에 3개월간 반복 경구투여 시 이상소견이 관찰되지 않았으며, 임상시험에서도 안전한 것으로 보고되어 있다 [29]. 그러나 이 밖에 *P. japonica*를 비롯한 동충하초의 독성학적 영향평가는 미비한 실정이다.

본 시험은 국내에서 인공 배양된 *P. japonica*의 반복투여가 생체에 미치는 영향을 확인하기 위해 랫드를 이용하여 4주간 반복투여 후 혈액학, 혈액화학, 병리조직학적 검사 등을 실시하였다.

재료 및 방법

시험물질

(주)동충하초(대한민국)에서 구입한 누에 동충하초(*P.*

*Corresponding author

Tel: +82-42-821-7900, Fax: +82-42-821-6787

E-mail: hyson@cnu.ac.kr

japonica)를 균질하게 분쇄하여 분말화하였다. 그 분말을 방사선으로 멸균(25 kGy; 그린피아, 대한민국)한 후 냉장 보관하여 사용하였다.

실험동물 및 사육환경

(주)바이오제노믹스(대한민국)에서 4주령의 SPF Sprague-Dawley(SD) 수컷 랫드 65마리를 입수하여 1~2주간 순화시킨 후에 건강한 동물 60마리를 시험에 사용하였다. 동물실은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 10\%$, 환기횟수 시간당 13~18회, 조도 150~300 Lux, 조명시간 12시간으로 유지하였다. 철망 사육상자(410 × 220 × 200 mm)를 사용하여 순화검역기간에는 사육상자당 5마리씩, 시험기간에는 2~3마리씩 사육하였다. 사료는 방사선멸균(25 kGy; 그린피아)한 실험동물용 고품사료(제일사료, 대한민국)를 자유롭게 섭취시켰고, 음수는 수돗물을 미세여과장치(1 μm)와 자외선 유수 살균장치로 살균하여 자유롭게 섭취시켰다. 본 연구는 KIT 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하여 시행되었다.

투여농도 및 시험군의 구성

투여농도는 500 mg/kg을 최고용량군으로 정하고 공비 5를 두어 저용량군과 중간용량군을 설정하였으며, 대조군은 시험물질의 용매로 사용된 멸균증류수를 투여하였다. 각 군은 4주 투여군과 4주 투여 후 2주 회복군으로 구분하여 군당 10마리씩을 무작위로 배치하였다. 시험물질은 매일 1회씩 4주간 경구투여하였다.

일반증상 관찰 및 체중측정

시험기간 중 모든 동물을 매일 1회 일정 시간에 일반증상, 폐사 및 빈사유무를 관찰하였다. 체중은 투여개시 전에 측정하였고 이후 1주일에 1회 측정하였다.

사료 및 음수섭취량 측정

사육상자 별로 당일 급여 및 급수총량과 다음날 잔량의 차를 시험개시 후 매주 1회 측정하여 일일 사료섭취량 및 음수섭취량을 산정하였다.

혈액학적 및 혈액화학적 검사

투여 종료 후 및 회복기간 종료 후 모든 동물은 12시간 이상 절식하였고, 에테르 마취 하에 후대정맥으로부터 채혈하여 EDTA 항응고제가 처리된 채혈병(녹십자, 대한민국)에 수집하였다. 백혈구(WBC), 적혈구(RBC), 혈색소(Hb), 헤마토크리트치(Hct), 평균혈구용적(MCV), 평균혈구혈색소량(MCH), 평균혈구혈색소농도(MCHC), 혈소판 등은 혈구자동측정기(Coulter Counter T540; Coulter Electronics, USA)를 이용하여 측정하였다. 백혈구의 감별은 혈액을 슬라이드에 도말 후 Wright 염색하여 광학현미경으로 400배의 배율에서 그 백분율을 구하였다.

혈청을 분리하고, 혈액화학자동분석기(Shimadzu CL-7200; Shimadzu, Japan)를 이용하여 AST(aspartate aminotransferase),

ALT(alanine aminotransferase), ALP(alkaline phosphatase), BUN(blood urea nitrogen), CRE(creatinine), GLU(glucose), TC(total cholesterol), TB(total bilirubin), TP(total protein), ALB(albumin), A/G(albumin/globulin ratio), CPK(creatine phosphokinase), TG(triglyceride), Ca(calcium), IP(inorganic phosphorus), PL-E(phospholipid)를 측정하였고, 전해질 자동분석장치(Na, K, Cl, analyzer Mod. 644; Ciba-Corning, Germany)를 이용하여 Na(sodium), K(potassium), Cl(chloride)를 측정하였다.

장기중량측정

동물은 채혈 후 방혈하고 안락사한 다음 부검을 하여 체강과 각 실질장기를 육안으로 검사하였다. 부검직전 모든 동물의 체중을 측정하고 뇌, 뇌하수체, 간, 비장, 심장, 전립선, 폐, 흉선, 타액선, 부신, 신장, 고환, 갑상선을 적출하여 중량을 측정 후 체중에 대한 상대중량을 산출하였다.

병리조직학적 검사

중량 측정이 끝난 장기와 부고환, 정낭샘, 방광, 췌장, 위장관, 장관막립프절, 하악립프절, 기관, 대동맥, 골격근, 좌골신경, 흉골, 흉수, 안구, 하더씨선, 피부를 10% 중성완충 포르말린 액으로 고정하였다. 고환과 부고환은 Bouin's 액에, 안구는 Davidson's 액에 고정하였다. 장기는 1주일 이상 고정 후 통상적인 방법을 거쳐 조직 절편을 제작하였다. 제작된 조직 절편은 hematoxylin-eosin(H&E) 염색을 한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

신장에서 관찰된 병변의 정도를 karyomegaly는 대조군의 핵 크기와 비교하여 1.5배 이상의 핵을 가진 세포로 400배 한 시야당 0~1개는 -(no change), 2~10개는 +(minimal change), 11~20개는 ++(mild change), 21개 이상은 +++(moderate change)로 표시하였다. 유사분열상(mitosis)은 400배 한 시야당 0~1개는 -(no change), 2~5개는 +(minimal change), 6~10개는 ++(mild change), 10개 이상은 +++(moderate change)로 표시하였다. 단세포괴사(single cell necrosis)는 400배 한 시야당 0~1개는 -(no change), 2~5개는 +(minimal change), 6~10개는 ++(mild change), 10개 이상은 +++(moderate change)로 표시하였다.

통계분석

본 시험에서 얻어진 자료에 대한 통계 분석은 다중비교 검정법으로 실시하였다. 검사항목 중에 체중, 사료섭취량, 음수섭취량, 혈액학적 검사, 혈액화학적 검사 및 장기중량에 대하여는 일원배치분산분석을 유의수준 $p = 0.05$ 와 0.01 로 검정하였다. 검정 결과 유의한 결과가 나타날 경우에는 Dunnett's t test를 실시하여 유의수준을 $p = 0.05$ 와 0.01 로 검정하였다.

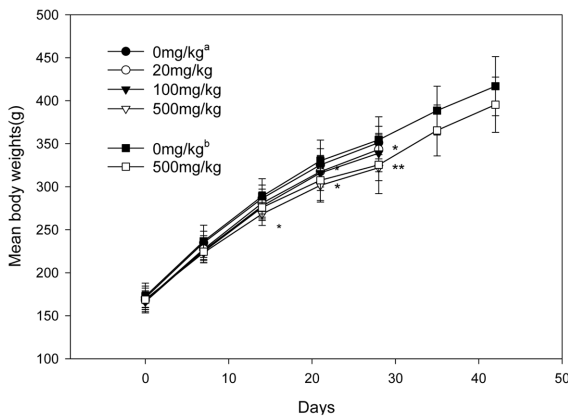


Fig. 1. Mean body weights of rats treated with *Paecilomyces japonica* for 4weeks or 4 weeks and 2 weeks of recovery. ^a4-Week treatment groups. ^b4-Week treatment and 2-week recovery groups. *Significantly different from the control ($p < 0.05$). **Significantly different from the control ($p < 0.01$).

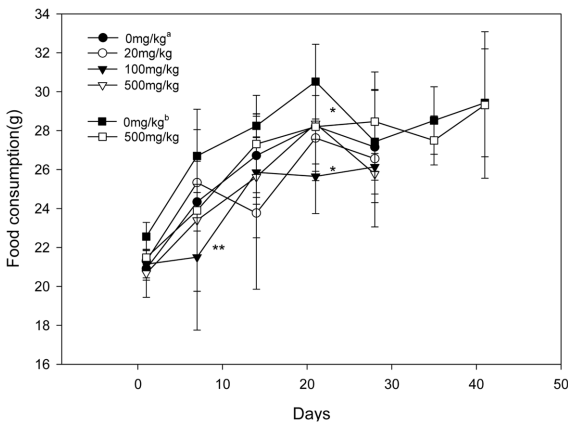


Fig. 2. Food consumption of rats treated with *P. japonica* for 4 weeks or 4 weeks and 2 weeks of recovery. ^a4-Week treatment groups. ^b4-Week treatment and 2-week recovery groups. *Significantly different from the control ($p < 0.05$). **Significantly different from the control ($p < 0.01$).

결 과

일반증상 및 체중변화

모든 시험군에서 시험기간 동안 특별한 증상이 관찰되지 않았다.

체중은 500 mg/kg 4주 투여군에서 투여 14일부터 체중증가 억제에 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성 있게 관찰되었다. 회복군에서는 투여종료 후 7일까지 증가 억제가 유의성 있게 관찰되었으나 이후 대조군과 유사하였다(Fig. 1).

사료 및 음수섭취량

4주 투여군에서는 사료섭취량과 음수섭취량이 측정 시기별로 구간 편차가 있었으나 시험기간 동안 구간 유의할만한 통계학적 차이는 없었다. 그러나 일시적으로 사료 섭취량이 대조군보다 100 mg/kg 투여군에서 7일과 21일째 유의성 있게

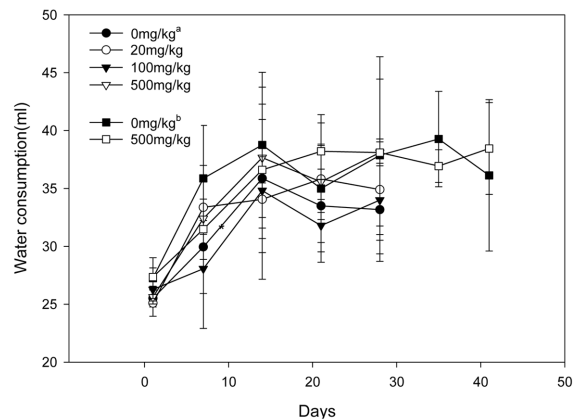


Fig. 3. Water consumption of rats treated with *P. japonica* for 4 weeks or 4 weeks and 2 weeks of recovery. ^a4-Week treatment groups. ^b4-Week treatment and 2-week recovery groups. *Significantly different from the control ($p < 0.05$).

감소하였다. 회복군에서는 투여 21일째 유의성 있게 감소하였다(Fig. 2). 음수섭취량은 투여 7일째에 유의성 있게 감소하였으나 구간 편차가 높게 나타났다(Fig. 3).

혈액학적 및 혈액화학적 검사

혈액학적 검사는 모든 투여군에서 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다(Table 1). 혈액화학적 검사결과, 4주 투여군의 100과 500 mg/kg 투여군, 4주 투여 후 2주 회복군의 500 mg/kg 투여군에서 CRE의 농도가 유의성 있게 증가하였다(Table 2).

장기중량 측정

절대장기중량은 4주 투여군에서 100과 500 mg/kg 투여군의 심장이 유의성 있게 감소하였으나 다른 장기에서는 유의성 있는 차이가 없었다(Table 3).

상대장기중량은 4주 투여군에서 500 mg/kg 투여군의 뇌가 유의성 있게 감소하였으며, 회복군에서는 타액선과 고환이 유의성 있게 증가하였다(Table 4).

병리조직학적 검사

대조군 및 투여군에서 신장을 제외한 모든 검사 장기에서 특별한 병변이 관찰되지 않았다. 신장에서는 바깥 수질(outer medulla)의 바깥 줄무늬층(outer stripe)에 위치하는 근위곡세뇨관 상피에서 호산성 세포질과 농축된 핵을 가진 단세포괴사, 주로 중기(metaphase)의 유사분열상 및 핵의 크기가 정상보다 2~3배 증가한 karyomegaly가 관찰되었다. 각 시험군에서 병변의 정도는 100 mg/kg 투여군(Fig. 4B)이 200 mg/kg 투여군(Fig. 4C)보다 심하였다(Table 5). 500 mg/kg 투여군(Fig. 4D)은 세 가지 변화가 모든 동물에서 관찰되었고 일부 세포에서는 세포질 내 다수의 공포가 관찰되기도 하였으며, 100 mg/kg 투여군 보다 병변의 정도가 훨씬 심하였다. 또한 세뇨관의 상피세포 수와 슬모양가장자리는 감소하였으며, 간질 내에 단핵세포와 림프구가 침윤되었고, 세뇨관 내

Table 1. Hematological values of male rats treated orally with *P. japonica* for 4 weeks or 4 weeks and 2 weeks of recovery

Item	4-week treatment (n = 10)				4-week treatment & 2-week recovery (n = 10)	
	0 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg	0 mg/kg	500 mg/kg
WBC (10 ³ /uL)	13.8 ± 3.6	12.8 ± 2.5	12.3 ± 2.8	13.2 ± 3.9	14.8 ± 4.8	12.4 ± 4.1
Neutrophil	1.02 ± 0.30	1.32 ± 0.49	1.18 ± 0.36	1.23 ± 0.46	1.91 ± 1.21	1.43 ± 0.71
Eosinophil	0.07 ± 0.08	0.08 ± 0.13	0.12 ± 0.15	0.04 ± 0.08	0.11 ± 0.14	0.06 ± 0.09
Basophil	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Lymphocyte	12.7 ± 3.4	11.4 ± 2.6	11.0 ± 2.5	11.9 ± 3.7	12.8 ± 3.9	10.8 ± 3.9
Monocyte	0.0 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.04	0.02 ± 0.05	0.02 ± 0.06	0.04 ± 0.07
RBC (10 ⁶ /uL)	7.49 ± 0.11	7.67 ± 0.29	7.68 ± 0.33	7.81 ± 0.37	7.36 ± 0.26	7.27 ± 0.40
Hb (g/dl)	15.6 ± 0.4	15.6 ± 0.5	15.6 ± 0.4	15.8 ± 0.6	14.9 ± 0.5	14.5 ± 0.6
Hct (%)	46.5 ± 1.0	46.7 ± 1.9	46.8 ± 1.2	47.3 ± 2.3	43.2 ± 1.6	42.4 ± 2.0
MCV (fL)	62.1 ± 1.4	60.8 ± 1.2	61.0 ± 1.7	60.5 ± 1.4	58.7 ± 0.8	58.3 ± 1.1
MCH (pg)	20.8 ± 0.7	20.3 ± 0.5	20.3 ± 0.6	20.2 ± 0.4	20.2 ± 0.4	20.0 ± 0.5
MCHC (g/dL)	33.4 ± 0.7	33.4 ± 0.5	33.3 ± 0.4	33.4 ± 0.5	34.4 ± 0.5	34.3 ± 0.5
PLT (10 ³ /uL)	1,001 ± 76	1,042 ± 80	1,035 ± 66	1,030 ± 78	953 ± 74	916 ± 105

WBC: white blood cell, RBC: red blood cell, Hb: hemoglobin, Hct: hematocrit, MCV: mean cell volume, MCH: mean cell hemoglobin, MCHC: mean cell hemoglobin concentration, PLT: platelet. Values are expressed as mean ± SD.

Table 2. Serum biochemical values of male rats treated orally with *P. japonica* for 4 weeks or 4 weeks and 2 weeks of recovery

Item	4-week treatment (n = 10)				4-week treatment & 2-week recovery (n = 10)	
	0 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg	0 mg/kg	500 mg/kg
AST (IU/L)	106.1 ± 24.1	115.3 ± 29.4	117.5 ± 38.2	114.7 ± 49.6	92.4 ± 23.9	102.5 ± 30.3
ALT (IU/L)	48.5 ± 9.7	59.8 ± 16.7	55.0 ± 15.3	59.5 ± 21.6	68.6 ± 9.3	70.2 ± 8.2
ALP (21IU/L)	421.7 ± 68.6	549.1 ± 160.6	418.9 ± 136.6	446.3 ± 123.1	455.8 ± 108.0	428.2 ± 143.7
BUN (mg/dL)	19.5 ± 2.7	24.3 ± 18.6	17.9 ± 5.6	18.8 ± 3.6	21.3 ± 2.7	21.8 ± 1.2
CRE (mg/dL)	0.51 ± 0.08	0.51 ± 0.19	0.78 ± 0.24**	0.71 ± 0.12*	0.50 ± 0.08	0.71 ± 0.15**
GLU (mg/dL)	142.1 ± 15.6	163.0 ± 48.7	149.1 ± 52.2	147.5 ± 28.3	161.1 ± 28.1	152.3 ± 14.7
TC (mg/dL)	103.3 ± 16.5	110.5 ± 34.6	103.6 ± 35.5	96.8 ± 25.9	103.6 ± 23.1	103.8 ± 8.3
TB (mg/dL)	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
TP (g/dL)	6.09 ± 0.20	6.79 ± 2.09	6.40 ± 1.75	6.41 ± 1.17	6.35 ± 0.56	6.50 ± 0.35
ALB (g/dL)	4.28 ± 0.09	4.53 ± 0.92	4.38 ± 0.84	4.43 ± 0.58	4.27 ± 0.27	4.30 ± 0.14
CPK (IU/L)	338.4 ± 143.2	355.9 ± 123.7	372.0 ± 134.7	352.3 ± 202.3	227.7 ± 106.5	262.8 ± 150.7
TG (mg/dL)	89.0 ± 26.4	92.9 ± 29.0	94.1 ± 25.6	72.6 ± 18.2	186.5 ± 27.7	204.3 ± 30.6
Ca (mg/dL)	10.49 ± 0.58	11.42 ± 3.31	10.72 ± 3.04	10.66 ± 2.09	10.14 ± 0.82	10.25 ± 0.57
IP (mg/dL)	8.98 ± 0.73	9.78 ± 2.80	9.11 ± 2.51	9.48 ± 2.35	7.69 ± 1.02	7.95 ± 0.52
PL-E (mg/dL)	161.8 ± 21.5	172.3 ± 49.2	162.9 ± 46.6	150.6 ± 31.6	193.3 ± 34.0	201.7 ± 12.6
A/G	2.38 ± 0.14	2.35 ± 0.80	2.47 ± 0.81	2.32 ± 0.31	2.08 ± 0.25	1.98 ± 0.19
Na (mmol/L)	144.0 ± 1.2	143.5 ± 11.5	142.0 ± 8.6	142.2 ± 7.6	145.0 ± 4.2	143.4 ± 1.6
K (mmol/L)	5.20 ± 0.33	4.94 ± 0.49	4.93 ± 0.33	5.07 ± 1.05	5.38 ± 1.10	5.02 ± 0.19
Cl (mmol/L)	102.6 ± 2.7	102.1 ± 8.2	102.3 ± 5.9	103.3 ± 4.9	103.0 ± 3.9	104.1 ± 1.8

AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, ALP: alkaline phosphatase, BUN: blood urea nitrogen, CREA: creatinine, GLU: glucose, TC: total cholesterol, TB: total bilirubin, TP: total protein, ALB: albumin, CPK: creatine phosphokinase, TG: triglyceride, Ca: calcium, IP: inorganic phosphorus, PL-E: phospholipid, A/G: albumin/globulin ratio, Na: sodium, K: potassium, Cl: chloride. Values are expressed as mean ± SD. *Significantly different from the control ($p < 0.05$). **Significantly different from the control ($p < 0.01$).

에는 피사된 세포가 현저히 증가하였다.

회복군(Fig. 5)은 500 mg/kg 4주 투여군보다 karyomegaly,

유사분열상, 단세포피사 등의 정도가 미약하게 관찰되어 2주

간의 투여 정지로 어느 정도 회복되는 것으로 나타났다.

Table 3. Absolute organ weights of male rats treated orally with *P. japonica* for 4 weeks or 4 weeks and 2 weeks of recovery

Item	4-week treatment (n = 10)				4-week treatment & 2-week recovery (n = 10)	
	0 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg	0 mg/kg	500 mg/kg
Body weight	343.5 ± 18.9	333.3 ± 18.7	328.9 ± 21.2	313.0 ± 14.1**	399.4 ± 33.9	368.6 ± 34.5
Brain	1.96 ± 0.06	1.95 ± 0.09	1.94 ± 0.09	1.96 ± 0.07	2.04 ± 0.09	1.98 ± 0.08
Hypophysis	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.002	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.001	0.010 ± 0.002	0.010 ± 0.001
Liver	10.83 ± 1.07	10.80 ± 0.98	10.28 ± 1.14	9.66 ± 1.00	16.02 ± 1.84	15.12 ± 1.56
Spleen	0.62 ± 0.07	0.62 ± 0.07	0.59 ± 0.05	0.57 ± 0.07	0.68 ± 0.10	0.65 ± 0.06
Heart	1.27 ± 0.07	1.18 ± 0.15	1.14 ± 0.12*	1.08 ± 0.11†	1.31 ± 0.13	1.27 ± 0.13
Prostate	0.48 ± 0.06	0.44 ± 0.08	0.55 ± 0.28	0.43 ± 0.09	0.5 ± 0.14	0.56 ± 0.12
Lung	1.41 ± 0.12	1.46 ± 0.18	1.32 ± 0.36	1.37 ± 0.11	1.57 ± 0.22	1.61 ± 0.10
Thymus	0.53 ± 0.10	0.62 ± 0.16	0.58 ± 0.10	0.54 ± 0.11	0.61 ± 0.14	0.50 ± 0.19
Salivary gland	0.68 ± 0.03	0.62 ± 0.07	0.66 ± 0.06	0.63 ± 0.05	0.71 ± 0.04	0.74 ± 0.06
Adrenal glands	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Kidneys	2.44 ± 0.19	2.37 ± 0.21	2.33 ± 0.24	2.25 ± 0.20	2.82 ± 0.36	2.65 ± 0.36
Testes	3.05 ± 0.24	3.07 ± 0.28	3.07 ± 0.21	2.89 ± 0.23	3.15 ± 0.23	3.24 ± 0.16
Thyroid glands	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01

Values are expressed as mean ± SD (g). *Significantly different from the control ($p < 0.05$). **Significantly different from the control ($p < 0.01$).

Table 4. Relative organ weights of male rats treated orally with *P. japonica* for 4 weeks or 4 weeks and 2 weeks of recovery

Item	4-week treatment (n = 10)				4-week treatment & 2-week recovery (n = 10)	
	0 mg/kg	20 mg/kg	100 mg/kg	500 mg/kg	0 mg/kg	500 mg/kg
Brain	0.57 ± 0.03	0.59 ± 0.04	0.59 ± 0.05	0.63 ± 0.02**	0.51 ± 0.05	0.54 ± 0.04
Hypophysis	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.0003	0.003 ± 0.001	0.003 ± 0.001
Liver	3.15 ± 0.22	3.24 ± 0.20	3.15 ± 0.46	3.09 ± 0.30	4.01 ± 0.31	4.11 ± 0.26
Spleen	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.01
Heart	0.37 ± 0.03	0.35 ± 0.04	0.35 ± 0.05	0.35 ± 0.04	0.33 ± 0.05	0.34 ± 0.03
Prostate	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.17 ± 0.10	0.14 ± 0.03	0.13 ± 0.03	0.16 ± 0.04
Lung	0.41 ± 0.04	0.44 ± 0.07	0.40 ± 0.10	0.44 ± 0.04	0.40 ± 0.07	0.44 ± 0.05
Thymus	0.15 ± 0.02	0.19 ± 0.05	0.18 ± 0.03	0.17 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.13 ± 0.05
Salivary gland	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.02*
Adrenal glands	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Kidneys	0.71 ± 0.04	0.71 ± 0.06	0.71 ± 0.07	0.72 ± 0.06	0.71 ± 0.06	0.72 ± 0.05
Testes	0.89 ± 0.07	0.92 ± 0.08	0.93 ± 0.06	0.93 ± 0.08	0.80 ± 0.09	0.89 ± 0.09*
Thyroid glands	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00

Values are expressed as means ± SD (% body weight). *Significantly different from the control ($p < 0.05$). **Significantly different from the control ($p < 0.01$).

Table 5. Summary of histopathological findings in the kidney of male rats treated orally with *P. japonica* for 4 weeks or 4 weeks and 2 weeks recovery

	4-week treatment												4-week treatment & 2-week recovery															
	0 mg/kg (n = 10)				20 mg/kg (n = 10)				100 mg/kg (n = 10)				500 mg/kg (n = 10)				0 mg/kg (n = 10)				500 mg/kg (n = 10)							
	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
Karyomegaly	10	-	-	-	6	4	-	-	-	2	7	1	-	-	2	8	10	-	-	-	-	-	4	6	-	-	-	-
Mitosis	10	-	-	-	-	-	6	4	-	-	2	8	-	-	2	8	10	-	-	-	9	1	-	-	-	-	-	-
Single cell necrosis	10	-	-	-	2	8	-	-	-	8	2	-	-	3	6	1	10	-	-	-	8	2	-	-	-	-	-	-

-: no change, +: minimal change, ++: mild change, +++: moderate change. Values are expressed as numbers of animals with each findings.

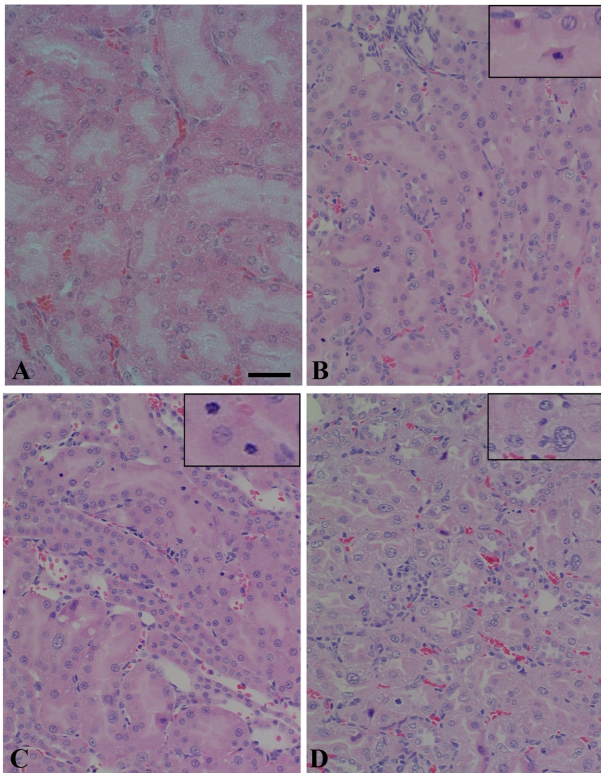


Fig. 4. Kidney of rat treated with *P. japonica* for 4 weeks. (A) Control. (B) 20 mg/kg group. Renal tubules show single cell necrosis (inset) and mitosis of tubular cells. (C) 100 mg/kg group. Renal tubules show single cell necrosis, mitosis (inset), and karyomegaly of tubular cells. (D) 500 mg/kg group. Renal tubules show single cell necrosis, mitosis, and karyomegaly (inset) of tubular cells. H&E stain, Scale Bar = 100 μ m.

고 찰

본 연구는 *P. japonica*가 생체에 미치는 영향을 알아보기 위해 수컷 랫드에 0, 20, 100 및 500 mg/kg 용량으로 시험 물질을 4주간 반복 투여하여 독성 발현 여부를 관찰하고 0 과 500 mg/kg 용량에 대해 별도로 4주간 반복 투여 후 2주 간의 회복기간을 두어 독성의 회복 여부를 확인하였다.

사료 및 음수섭취량은 100 또는 500 mg/kg 투여군에서 일시적으로 유의성 있는 감소세를 보였으며, 측정 시점별로 군간 편차가 있었다. 그러나 시험기간 동안 시험군 사이에 일관성 있는 유의할만한 통계학적 차이가 인정되지 않아 시험물질에 의한 직접적인 영향은 아닌 것으로 판단된다.

체중변화는 4주 투여군과 4주 투여 후 2주 회복군에서 각각 투여 기간에 500 mg/kg 투여군의 평균체중이 유의성 있게 감소하였다. 체중증가 억제는 사료 및 음수섭취량이 대조군과 투여군 간에 유의성이 없는 것으로 볼 때 이는 시험물질에 의한 영향으로 판단된다. 이러한 체중증가 억제는 2주 간의 회복기간 후에 대조군과 비교하여 통계학적으로 유의성을 보이지 않아 투여 중지에 따라 회복이 이루어지는 것으로 생각된다.

혈액화학적 검사결과, 4주 투여군의 100, 500 mg/kg 투여

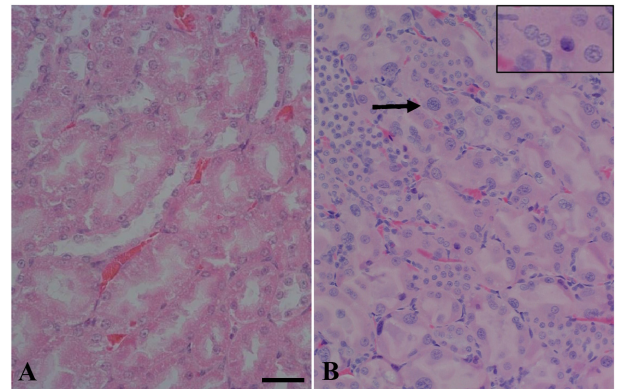


Fig. 5. Kidney of rat treated with *P. japonica* for 4 weeks and 2 weeks of recovery group. (A) Control. (B) Renal tubular cells show karyomegaly (arrow) and single cell necrosis with pyknotic nuclei (inset). H&E stain, Scale Bar = 100 μ m.

군, 그리고 4주 투여 후 2주 회복군의 500 mg/kg 투여군에서 CRE의 농도가 유의성 있게 증가하였다. CRE는 근육 내 creatine이 creatine phosphate에 의해 대사되어 생성되며 사구체 여과에 의해 혈장에서 분리되어 요로 배출되고, 신장기능에 장애를 유발하는 약물투여 시 증가한다고 알려져 있다 [25]. 본 시험에서 CRE의 증가는 병리조직학적 검사결과 신장에서 세뇨관 상피세포의 단세포괴사와 karyomegaly가 관찰되어 이와 관련된 것으로 생각한다.

장기 중량 측정결과, 4주 투여군에서 심장과 뇌의 중량이 유의성 있게 변화했지만 이들 장기의 중량변화는 일반적인 정상범위에 포함되는 것으로 [6] 투여농도 증가에 따른 용량의존성을 보이지 않아 독성학적 의의는 없는 것으로 판단된다. 4주 투여 후 2주 회복군에서도 타액선과 고환의 중량이 유의성 있게 변화하였으나 이들 장기의 변화 또한 일반적인 정상범위 [6]에 포함되는 것으로 독성학적 의의는 없는 것으로 판단된다. 병리조직학적 검사결과, 신장에서 단세포괴사, 유사분열상 및 karyomegaly가 근위곡세뇨관 상피세포에서 관찰되었다. 이들 병변의 발생빈도와 정도는 투여농도에 따라 증가하였으며, *P. japonica*에 의한 영향으로 생각된다. 4주 투여 후 2주 회복군에서는 단세포괴사와 유사분열상은 현저한 감소세를 보였고 karyomegaly 또한 크기와 발생빈도에 있어 감소경향을 보였다. 따라서 근위곡세뇨관 상피세포에 나타난 병변은 시험물질의 투여중단으로 회복되는 것으로 판단된다.

신장의 병변은 20 mg/kg 투여군에서는 단세포괴사와 유사분열상이 관찰됐지만 100 또는 500 mg/kg 투여군에서는 단세포괴사, 유사분열상 및 karyomegaly가 관찰되었고, 특히 karyomegaly는 500 mg/kg 투여군에서 현저하게 관찰되었다. 이는 유사분열 후에 karyomegaly가 진행되는 것으로 판단되며, 유사분열 억제와 밀접한 관련이 있는 것으로 생각한다 [9, 11]. 본 시험에서 karyomegaly는 대조군을 제외한 모든 투여군에서 관찰되었다. Karyomegaly는 lead, bismuth, cytomegalovirus, 방사선치료, 항유사분열제, ochratoxin, homogenate of *penicillium aurantiogriseum*과 *penicillium*

verrucosum var *cyclopium*, aflatoxin 및 α -protein 등에 의해 근위곡세뇨관에서 발생한다고 보고되어 있으며 [1-3, 13, 14, 16-18, 23, 26, 27], 조직학적으로 불규칙한 핵경계, 다수의 핵소체, 다수의 소포, 농축된 염색질 및 유사봉입체를 가진다 [19]. 본 시험에서도 유사한 형태학적 변화를 보인 karyomegaly가 관찰되었다. Karyomegaly의 형태학적 특징과 관련하여 일부 연구자들은 전암병변과 관련이 있는 것으로 보고하였다 [4, 5]. 그러나 아직 종양과의 관련성은 논란이 있다. 본 시험에서 karyomegaly는 시험물질과 밀접한 관련이 있는 것으로 생각되나 이들의 정확한 독성학적 의의와 전암병변 여부에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 시험에서 *P. japonica*에 의한 단세포괴사, 유사분열상 및 karyomegaly는 outer medulla의 outer stripe에 존재하는 근위곡세뇨관 S₃부위에 한정되어 관찰되었다. S₃부위는 조직학적으로 근위곡세뇨관의 다른 부위에 비해 다수의 솔모양 가장자리, 과산화소체 및 소수의 미토콘드리아를 가지고 있으며, glucose, amino acids, ketone bodies, pyruvate, lactate 및 short-chain fatty acids가 나트륨 결합을 통해 이차적으로 재흡수 되는 곳이다 [20]. Mercuric chloride, cadmium chloride, cis-platinum, cyclosporin 및 cysteine 등과 같은 신장독성물질들은 S₃ 부위에 직접적인 세포독성을 유발하거나 허혈을 통한 이차적인 세포손상을 유발하는 것으로 알려졌다 [7, 8, 15, 21, 24]. 본 시험에서 사용된 *P. japonica* 또는 그 대사산물도 이들 화합물과 유사한 기전 또는 알려지지 않은 기전으로 S₃부위의 상피세포에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 랫드에 *P. japonica*를 4주 반복투여 시 체중증가를 억제하고 신장에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 또한 최저농도인 20 mg/kg에서도 신장의 병변이 관찰되어 본 시험조건에서 무해용량(NOAEL)은 20 mg/kg 미만으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(2010-0011450)입니다.

References

1. Boorman GA, McDonald MR, Imoto S, Persing R. Renal lesions induced by ochratoxin A exposure in the F344 Rat. *Toxicol Pathol* 1992, **20**, 236-245.
2. Butler WH, Lijinsky W. Acute toxicity of aflatoxin G1 to the rat. *J Pathol* 1970, **102**, 209-212.
3. Dablgren S, Holm G, Svanborg N, Warz R. Clinical and morphological side-effects of busulfan (myleran) treatment. *Acta Med Scand* 1972, **192**, 129-135.
4. Dees JH, Heatfield BM, Reuber MD, Trump BF. Adenocarcinoma of the kidney. III. Histogenesis of renal adenocarcinomas induced in rats by *N*-(4'-fluoro-4-biphenyl)acetamide. *J Natl Cancer Inst* 1980, **64**, 1537-1545.
5. Hard GC, Butler WH. Morphogenesis of epithelial neoplasms induced in the rat kidney by dimethylnitrosamine. *Cancer Res* 1971, **31**, 1496-1505.
6. Iwaki S, Nanri H, Morikawa M, Ishida M, Kato T, Takata M, Shibata K, Katsuki S. Background data of Crj:CD (SD) IGS rats dosed with distilled water orally for 4, 13 and 26 weeks. In: Matsuzawa T, Inoue H (eds.). *Biological reference data on CD (SD) IGS rats -1998*. pp. 64-70, BEST PRINTING, Tokyo, 1998.
7. Jackson NM, Hsu CH, Visscher GE, Venkatachalam MA, Humes HD. Alterations in renal structure and function in a rat model of cyclosporin nephrotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 1987, **242**, 749-756.
8. Jaffe DR, Gandolfi AJ, Nagle RB. Chronic toxicity of S-(trans-1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine in mice. *J Appl Toxicol* 1984, **4**, 315-319.
9. Kim HY, Stermitz FR, Molyneux RJ, Wilson DW, Taylor D, Coulombe RA. Structural influences on pyrrolizidine alkaloid-induced cytopathology. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993, **122**, 61-69.
10. Kobayashi Y, Shimizu D. *Iconography of vegetable wasps and plant worms*. pp. 280, Hoikusha Publishing, Osaka, 1983.
11. Krishan A. Fine structure of cytochalasin-induced multinucleated cells. *J Ultrastruct Res* 1971, **36**, 191-204.
12. Kwon SH, Woo HJ, Han DS, Kim MK. Effect of dried powders and water extracts of *Paecilomyces tenuipes* and *Cordyceps militaris* on lipid metabolism, antioxidative capacity and immune status in rats. *Korean J Nutr* 2001, **34**, 271-284.
13. Mantle PG, McHugh KM, Adatia R, Heaton JM, Gray T, Turner DR. *Penicillium aurantiogriseum*-induced persistent renal histopathological changes in rats: an experimental model for Balkan endemic nephropathy competitive with ochratoxin A. *IARC Sci Publ* 1991, **115**, 119-127.
14. Mihatsch MJ, Gudat F, Zollinger HU, Heierli C, Thölen H, Reutter FW. Systemic karyomegaly associated with chronic interstitial nephritis. A new disease entity? *Clin Nephrol* 1979, **12**, 54-62.
15. Nonclercq D, Toubeau G, Laurent G, Tulkens PM, Heuson-Stiennon JA. Tissue injury and repair in the rat kidney after exposure to cisplatin or carboplatin. *Exp Mol Pathol* 1989, **51**, 123-140.
16. Payne BJ, Saunders LZ. Heavy metal nephropathy of rodents. *Vet pathol Suppl* 1978, **15**, 51-87.
17. Peristianis GC, Austwick PK, Carter RL. An ultrastructural investigation of nephrotoxicity in rats induced by feeding cultures of *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1978, **28**, 321-337.
18. Reynier JP, Woodard JC, Alvarez MR. Nuclear cytochemical alterations in alpha-protein-induced nephrocytomegalia. *Lab Invest* 1974, **30**, 582-588.
19. Richardson JA, Woodard JC. Renal tubular karyocytomegaly, rat. In: Jones TC, Mohr U, Hunt RD (eds.). *Monographs on pathology of laboratory animals. Urinary system*. pp. 189-192, Springer-Verlag, New York, 1986.
20. Sands JM, Verlander JW. Functional anatomy of the kidney. In: Sipes IG, McQueen CA, Gandolfi AJ (eds.). *Comprehensive Toxicology*. 1st ed. pp. 31-35, Elsevier Science, Oxford, 1997.
21. Sendelbach LE, Bracken WM, Klaassen CD. Comparisons

- of the toxicity of CdCl₂ and Cd-metallothionein in isolated rat hepatocytes. *Toxicology* 1989, **55**, 83-91.
22. **Shim JY, Lee YS, Lim SS, Shin KH, Hyun JE, Kim SY, Lee EB.** Pharmacological activities of *Paecilomyces japonica*, a new type Cordyceps sp. *Korean J Pharmacogn* 2000, **31**, 163-167.
 23. **Slavin RE, Millan JC, Mullins GM.** Pathology of high dose intermittent cyclophosphamide therapy. *Hum Pathol* 1975, **6**, 693-709.
 24. **Tanaka T, Naganuma N, Imura N.** Role of γ -glutamyltranspeptidase in renal uptake and toxicity of inorganic mercury in mice. *Toxicology* 1990, **60**, 187-198.
 25. **Weiss RB, Poster DS.** The renal toxicity of cancer chemotherapeutic agents. *Cancer Treat Rev* 1982, **9**, 37-56.
 26. **Woodard JC.** On the pathogenesis of alpha protein-induced nephrocytomegalia. *Lab Invest* 1969, **20**, 9-16.
 27. **Woodard JC, Alvarez MR.** Renal lesions in rats fed diets containing alpha protein. *Arch Pathol* 1967, **84**, 153-162.
 28. **Yue K, Ye M, Zhou Z, Sun W, Lin X.** The genus *Cordyceps*: a chemical and pharmacological review. *J Pharm Pharmacol* 2013, **65**, 474-493.
 29. **Zhu JS, Halpern GM, Jones K.** The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*, Part I. *J Altern Complement Med* 1998, **4**, 289-303.