

# *Ochratoxin A* 투여에 따른 혈액성상 및 급성독성에 대한 Phenylalanine의 방어효과

김성훈

(제주대학교 농과대학 수의학과)

## Phenylalanine Protection against *Ochratoxin A*-Induced Changes on the Blood Aspects and Acute Toxicity in Mice

Kim, Sung-Hoon

Dept. of Veterinary Medicine, College of Agriculture,  
Cheju National University

### 적 요

This study was carried out to study the preventive effect of phenylalanine on the toxicities of ochratoxin A to the mortalities, hematological and serum biochemical values.

A single dose of ochratoxin A(69.4 mg/kg B.W, P.O) was given to male ICR mice and its toxicities were evaluated by body weight changes, autopsy findings, organ weight, and hematological and serum biochemical parameters.

The single dose of ochratoxin A caused significant different from vehicle control values in mortality, body weight, time of clinical sign continued, hematological and serum biochemical values. Where as phenylalanine(over 48.58 mg/kg B.W) given immediately after *ochratoxin A* appeared to prevent the mortality, body weight time of clinical sign continued, hematological and serum biochemical findings.

The results suggest that the phenylalanine may protect the subject from *ochratoxin A*- induced acute toxicity.

KEY WORD : *Ochratoxin A*, *Phenylalanine*, Antagonism, Mice

### I. 서 론

곰팡이 독소는 *Aspergillus*, *Penicillium* 및 *Fusarium* 속등의 곰팡이가 생산하는 저분자화합물의 2차 대사산물로

써 식품이나 사료등에 오염시 품질의 저하 뿐만아니라 인간 및 가축에게 최기형성, 발암, 신장 및 간장등 실질장기의 손상등 여러가지 유해한 작용을 나타내는 것으로 잘 알려져 있다.<sup>1)</sup> 1960년 영국에서 수십만 마리의 칠면조가 간장장애를 일으켜 대량폐사한 사고가 발생하여 그 원인을 조사한

결과 사료에 혼합된 브라질산 땅콩박에서 *Aspergillus flavus*가 오염되어 그생성물질이 원인임을 확인하고 곰팡이 이름을 따서 aflatoxin이라 명명한 이래 진균독소에 의해 유발되는 진균독소증에 관한 연구가 활발하게 진행되어 왔다.<sup>2)</sup> 자연적으로 오염된 음식물이나 사료에서 주로 발견되는 진균독소로서는 aflatoxin, ochratoxin, patulin, zearalenone, trichothecenes, citrinin, penicillic acid등으로 보고된 바 있다.<sup>3)</sup>

ochratoxin은 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속 곰팡이가 주로 생성하는 진균독소로서 A, B 및 C의 세가지 유도체가 분류되고 있으며, 이 중 ochratoxin A(OTA)가 가장 강한 독성을 가지고 있는데<sup>4)</sup> ochratoxin을 생성하는 곰팡이로는 곡류와 콩류에서 *Aspergillus ochraceus*가 1965년 최초로 분리되었고<sup>5)</sup> 그후 *penicillium viridicatum*, *aspergillus sulphureus*, *aspergillus sclerotiorum*, *penicillium cyclopium*등도 ochratoxin을 생성하는 것으로 증명되었으며<sup>6)</sup> 특히, *A. ochraceus*는 OTA를 생성하는 것으로 보고된 바 있다.<sup>5)</sup>

*Aspergillus*균은 저장중인 곡류에서 수분 16%이상, 수분 활성도 0.8-0.9일때 발육하고 발육최적온도는 26-27°C이다. OTA의 생성정도와 형태는 곰팡이의 종이나 계통에 의하여 영향을 받을 뿐만 아니라 기질내의 영양함량이나 온도, 습도등의 환경적인 요인도 중요하다고 보고된 바 있다.<sup>7)</sup>

OTA는 L-β-phenylalanine과 7-carboxyl group으로 연결된 7-carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3-R-methylisocoumarin으로 구성되어 있다고 보고되었다.<sup>8)</sup> 또한 소화기관을 통하여 신속히 흡수되어 체내에 분포하고, 혈청알부민에 높은 친화력을 가지며, 랫트에서의 반감기는 56시간이고, 장내세균중에 의해 가수분해되며 ochratoxin α와 phenylalanine으로 분해되어 분변이나 요중으로 배설된다.<sup>9)</sup>

한편, OTA중독에 의한 가축의 피해로 스웨덴, 노르웨이, 핀란드, 독일, 헝가리, 폴란드, 유고슬라비아, 영국등을 포함한 유럽 여러나라에서 OTA에 의한 돼지 신장염의 발생이 보고되었고<sup>10)</sup> 미국에서도 돼지와 소에서 신장염의 발생이 보고된 바 있다.<sup>11)</sup> 가축의 OTA중독증상으로는 신장손상이어 쇠약, 피로, 식욕결핍, 복통, 심한 빈혈등이 일어나며 요독증으로 인하여 폐사하게 되는 것으로 알려져 왔다.<sup>12)</sup>

OTA는 정상인의 체내에도 분포되어 있는 것으로 보고되어 있는데, 독일인 306명의 혈액을 조사해 본 결과 57%에

서 OTA잔류물이 검출되었다고 보고한 바 있고<sup>13)</sup> 신장, 간장등의 내부장기와 근육내에서도 검출된다고 하였다.

North Carolina에서 가금류에 대량 발생한 질병이 ochratoxicosis와 연관성이 지적되었고<sup>14)</sup> 어린 육계와 칠면조, 오리등 에서도 OTA중독증의 발생이 보고된 바 있다.<sup>15)</sup> 또한 실험동물로 사용되는 Beagle dog에서도 심한 신장독소로 작용하는 것을 고려할때 OTA에 대한 종 감수성은 매우 넓은 것을 알수 있다.<sup>16)</sup> OTA는 랫트 암컷에 경구적으로 투여하였을때 LD<sub>50</sub>치는 22mg/kg이고 닭, 돼지 및 송어는 2.1-4.67mg/kg으로서 높은 급성독성이 보고되었으며<sup>4)</sup> 또한 carcinogen, neprotoxin, hepatotoxin, teratogen, mutagen, immuno-suppressor로 작용할수 있음이 보고된 바 있다.<sup>17,18,19,20,21,22)</sup>

OTA는 화학구조중 phenylalanine을 함유하고 있어서 단백질합성과정중 phenylalanine을 전달하는 효소인 phenylalanyl-tRNA synthetase와 작용하여 단백질합성을 억제하며 phenylalanine과는 경쟁적으로 작용한다고 보고된 바 있다.<sup>23)</sup> Ueno<sup>4)</sup>, Mayura등<sup>24)</sup> 및 Haubeck등<sup>25)</sup>의 보고에서는 OTA에 대한 면역 및 대식구이행 억제효과를 보고한 바 있다.

본 연구에서 수행한 OTA의 마우스에 대한 LD<sub>50</sub>값의 측정에 관한 data의 보고는 조사된 바 없으며 또한 OTA의 LD<sub>80</sub>용량을 급성으로 투여하였을때 이에대한 phenylalanine의 방어작용에 관한 보고는 전혀 없는 것으로 조사되었으며 임상증상, 혈액학 및 혈청생화학적 변화의 방어작용에 관한 연구 보고가 없어 본 연구를 수행하게 되었다.

## II. 재료 및 방법

백색 미색결정체인 ochratoxin A(sigma Co.)는 0.1N sodium bicarbonate(sigma Co.)에 농도별로 용해하였고 백색미세분말인 phenylalanine(Sigma Co.)은 생리식염수에 용해하였으며 두시료 모두 mouse 체중 kg당 10ml씩 투여되게끔 조제하였다.

실험동물은 (주)대한실험동물센터에서 분양받은 5주령의 Specific Pathogen Free(SPF) ICR mouse를 이용하였다. 이들 동물은 1주간의 적응순화 기간을 거쳐 건강한 동물 및 체중에 따라 분류하여 실험에 사용하였다. 실험동물은 10마

리식 polycarbonate 사육상자(260W × 420L × 180Hmm)에 수용하였으며 음수는 상수도수를, 사료는 실험동물용 고품사료(선진 사료, 주)를 자유섭취시켰다. 사육실 환경조건은 온도 20~26°C, 습도 40~60% 및 조도 150~300Lux하에서 12시간 명암주기로 사육하였다.

5주령의 mouse를 체중측정하여 투여량을 산출하고 오전 중에 시료를 각 농도별로 투여하였다. OTA는 경구용 Zonde를 이용하여 위내로 강제경구 투여하였으며 phenylalanine은 ochratoxin A 투여직후 26 gauge로 주사기를 이용하여 경배부 피하투여를 실시하였다.

여러번의 예비실험 결과 사망동물이 관찰되지 않은 최저용량군인 30mg/kg군과 모두 사망한 최고 용량군인 115.2mg/kg 사이에 공비 1.4로 하여 5개군을 두었다. 본 연구에서 LD<sub>50</sub> 값을 측정할려는 이유는 이 용량에서 OTA에 의한 임상증상이 대부분 나타날 뿐만 아니라 길항작용을 갖을 것으로 추측되는 phenylalanine에 의한 사망율의 감소 및 임상증상의 경감을 확인할수 있을 것으로 생각되었다.

각 용량별로 OTA를 투여한 후 0, 6시간, 1일, 3일, 7일, 14일의 체중을 측정하였다. 이는 OTA에 의한 종합적 독성 정도를 확인할수 있는 data로 생각된다.

체중의 변화는 독성영향의 가장 기본적인 data로서 OTA 및 phenylalanine을 각각 또는 동시투여하여 투여후 0 및 12시간, 1일, 3일, 7일, 14일에 체중을 측정하여 phenylalanine에 의한 증체량의 회복정도를 확인하고자 하였다.

OTA의 LD<sub>50</sub>용량을 투여하여 이론적으로는 10마리중 8마리가 여러가지 임상증상을 거쳐 사망하는 용량이므로 OTA에 의한 임상증상의 종류와 각 임상증상들의 지속시간을, 투여후 36시간 동안 매3시간 별로 측정하고 OTA의 독성감소제라고 생각되는 phenylalanine을 동시에 투여하여 임상증상들의 지속시간이 감소되고 사망율 역시 낮아지는 효과를 확인하기 위하여 Table 3과 같이 군을 분류하였다.

OTA에 의해 유도될수 있는 혈액학적 이상소견에 대해 phenylalanine의 방어효과를 확인할 목적으로 부검직전에 채취된 모든 군의 혈액은 항응고제가 처리된 CBC 용기에 넣고 응고를 방지하기 위하여 가볍게 흔들여 준 후 혈액학 자동분석장치(Coulter S 880, USA)를 이용하여 백혈구 수, 적혈구 수, hemoglobin, packed cell volume(PCV), mean corpuscular volume(MCV), mean corpuscular hemoglobin(MCH) 및 mean corpuscular hemoglobin concentration(MCHC)등을 측정하였다.

OTA에 의해 유도될수 있는 혈청생화학적 이상소견에 대해 phenylalanine의 방어효과를 확인할 목적으로 부검직전에 채취된 모든 군의 혈액은 혈청을 분리한 후 자동분석장치(JCA VX-1000, Jeol Co.)를 이용하여 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT), alkaline phosphatase(ALP), serum urea nitrogen(SUN), creatinine(CRN), glucose(GLU), Total cholesterol(TCHO), total protein(TP), albumin(ALB), total bilirubin(TBIL), creatine phosphokinase (CPK), calcium(CA)등을 분석하였다.

모든군의 생존동물들은 실험 종료시 ether에 마취시켜 부검하여 실질장기들의 육안적 병리부검소견을 확인한 후 간, 비장, 신장 등의 장기에 대하여 습식 중량을 측정하고 10% formalin에 고정한 후 조직표본(H-E 염색)을 제작하여 현미경적 검사(x100)를 하였다.

모든 결과는 평균과 표준 편차로 나타내었으며 각 농도에서 평균의 유의성 검정은 student-t test를 이용하여 음성대조군 및 양성대조군과 비교하였으며 5%이내의 유의성만 인정하였다.

### III. 결과 및 고찰

OTA에 대한 LD<sub>50</sub> 및 LD<sub>80</sub>값의 측정은 Table 1에서 보는 바와 같이 여러 번의 예비 실험에서 획득한 data를 참조하여 최저용량군인 30mg/kg에서는 치사동물이 발견되지 않았으나 최고 용량군인 115.2mg/kg군에서 100%의 치사율을 나타내었다. 그리고 중간용량군인 42, 58.8 및 82.3mg/kg군에서 각각 20%, 60% 및 90%의 치사율을 나타내었다.

LD<sub>50</sub>값(probit 법)은 54.8mg/kg(95% 신뢰한계 : 46.6~64.3mg/kg)이었으며 LD<sub>80</sub>값은 69.4mg/kg (95%신뢰한계 : 95.9~92.0mg/kg)이었다. Ueno<sup>4)</sup>의 보고에 의하면 랫트암컷에서 경구적으로 투여되었을 때 LD<sub>50</sub>값은 22mg/kg이고 닭, 돼지, 및 송어에서는 2.1~4.67mg/kg으로서 높은 급성독성을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 마우스 수컷의 LD<sub>50</sub> 값이 54.8mg/kg으로써 랫트암컷에 비해 높은 수치를 나타내어 종 및 성에 따른 차이가 있는 것으로 생각된다.

OTA의 투여에 따른 체중의 변화는 Table 2에서 보는 바

와 같이, 사망동물이 관찰되지 않은 30mg/kg군을 기준으로 할 때 58.8mg/kg용량 이상에서 투여 후 6시간 쯤 이후부터 유의한 체중감소 현상이 확인되었다. 42mg/kg군에서는 사망동물은 2마리 관찰되었으나 생존동물의 체중변화에는 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이는 Khera의 보고<sup>26)</sup>에 의하면 체중의 감소는 약제에 대한 독성변화의 가장 기본적인 현상이라고 하였던 것으로 보아 본 연구에서의 체중의 감소 현상은 OTA에 대한 독성증상의 현상이라 생각된다.

OTA 및 phenylalanine의 용량설정은 Table 3. 에서 보는 바와 같으며 OTA의 용량은 Table 1.에서 측정된 LD<sub>50</sub> 값(69.4mg/kg)을 설정하였다. 이는 이 용량에서 모든 종류의 임상증상이 나타날 뿐만 아니라 방어작용을 갖는 phenylalanine에 의한 사망률의 감소 및 임상증상의 경감을 확인 할 수 있을 것이라 생각되었다.

한편, OTA는 화학구조식 중 phenylalanine을 함유하고 있어서 phenylalanine과는 경쟁적으로 작용한다는 보고를 기준으로 하여 OTA 및 phenylalanine의 분자량을 계산하여 phenylalanine의 함량이 1.3배정도 높게 체내에 들어갈 때, 적절한 방어효과가 나타날 것으로 생각되는 용량을 IV군(90.22mg/kg)으로 하고, 0.7배 인 48.58mg/kg을 III군으로, 2.5배의 과량 즉, 충분한 phenylalanine의 방어효과가 용량이라 생각되는 173.50mg/kg을 V군으로, VI군은 phenylalanine자체의 독성현상을 확인할 목적으로 최고용량인 173.50mg/kg용량으로 설정하였다.

OTA 및 phenylalanine의 투여에 따른 치사량 측정에서는 I군, V군 및 VI군에서는 사망동물이 관찰되지 않았으나 II군 및 III군 및 IV군에서는 10마리 중 사망동물이 8마리, 6마리, 및 1마리씩으로 관찰되어 치사율이 80%, 60% 및 10%로 나타났다. OTA (69.4mg/kg) 단독 투여된 경우 80%의 치사율에 비해 phenylalanine의 용량이 48.58mg/kg(III군), 90.22mg/kg(IV군) 및 173.50mg/kg(V군)을 추가투여 하였을 때는 phenylalanine함량이 증가할수록 치사량도 감소되는 것으로 보아 급성으로 감염된 OTA에 대해 phenylalanine은 치사율에서 방어작용이 있는 것으로 생각된다.

이는 OTA에 있는 phenylalanine이 phenylalanine-tRNA synthetase와 작용하므로 혈중 phenylalanine과 경쟁적으로 작용하므로 phenylalanine의 높은 용량군 일수록 치사율이 감소되는 것으로 생각된다.

OTA투여에 따른 임상증상의 종류와 지속시간은 Fig. 1

에서 보는 바와 같이 LD<sub>50</sub>값으로 측정된 69.4mg/kg을 투여한 후 여러 가지 임상증상과 지속시간을 측정한 결과, 투여 6시간째부터 모든 동물에서 활동력감소(Decreased activity)가 나타나기 시작하여 16시간 쯤 부터는 이상보행(Abnormal gait)현상이 관찰되기 시작하였다. 그 후 22시간 쯤 부터는 70~90%의 동물에서 운동실조(Ataxia)가 관찰되면서 투여 30시간부터는 혼수상태(Coma)가 시작되었다. 그 후 2마리는 점차 회복되었으나 8마리는 27시간째부터 33시간째에 걸쳐 사망하였다.

OTA의 독성증상에 대한 phenylalanine의 방어효과 : Table. 5에서 보는 바와 같이 Phenylalanine의 농도에 따라 독성증상의 종류 및 지속시간이 현저히 감소되었다. III군에서는 혼수상태 및 사망이 관찰되지 않았으며 운동실조도 II군 보다 늦게 발현되고 지속시간도 단축되었다. IV군에서는 III군에서 보다 더욱 늦게 발현되고 지속시간 역시 짧았다. 그리고, V군에서는 운동실조도 관찰되지 않았으며 이상보행도 늦게 발현하면서 지속시간도 다른 군에 비해 훨씬 짧았다.

이와같은 현상은 Table. 4의 사망율에서 보는 바와 같이 phenylalanine투여에 따른 치사율 감소와 같은 맥락에서 임상증상의 종류 및 지속시간에서도 phenylalanine의 방어효과가 있는 것으로 생각되었다.

OTA의 투여에 의한 혈액학적 성상의 변화에 대한 phenylalanine의 방어효과는 Table. 6에서 보는 바와 같이 백혈구 수에 있어서는 I군과 비교해 모든 군에서 유의성이 인정되지 않아 OTA 및 phenylalanine에 의한 백혈구 수의 변화는 관찰되지 않았다. 적혈구 수에 있어서는 I군에 비해 II군에서 유의한 증가를 나타내었다. 이와같은 현상은 적혈구수가 OTA에 의해 감소된 것이 phenylalanine의 투여로 인한 회복현상이라 생각된다.

Kumar등<sup>27)</sup>은 사람의 적혈구를 배양하여 captafol에 직접 노출시킨 결과 captatol이 적혈구 막의 구조를 유지하는 thiol group과 반응함으로 세포막의 인지질을 유리시켜 적혈구막에 구조적 이상을 초래하여 세포내에 존재하는 potassium ion이 유출되고 삼투취약성이 증가한다는 기전을 밝힌 바 있다. 그러나 본 연구에서 나타난 OTA에 의한 적혈구 수의 감소에 대한 그 기전은 앞으로 연구될 과제라 생각된다.

OTA 및 phenylalanine의 투여에 의한 부검소견은 OTA 투여에 따른 혈청생화학적 성상의 변화에 대한 pheny-

**Table 1. Mortalities, LD<sub>50</sub> and LD<sub>80</sub> values of male mice after a single administration of ochratoxin A**

Dose(mg/kg)	30	42	58.8	82.3	115.2
No. of animal treated	10	10	10	10	10
No. of animal survived	10	8	4	1	0
No. of animal died	0	2	6	9	0
Mortality rate (%)	0	20	60	90	100
LD <sub>50</sub> : 54.8 mg/kg					
Confidence range of 95%: 46.6- 64.3 mg/kg					
LD <sub>80</sub> : 69.4 mg/kg					
Confidence range of 95%: 59.9 - 92.0 mg/kg					

alanine의 방어효과는 Table 7에서 보는 바와 같이 GPT, ALP, SUN, GLU, TP, ALB, CPK, CA등 에서는 OTA 및 phenylalanine의 투여에 따른 유의차가 인정되지 않았으나

GOT에서는 I군에 비해 OTA 단독투여군인 II군에서 유의한( $p<0.05$ ) 증가를 나타내었으나 phenylalanine 투여군에서는 유의성이 인정되지 않았다. 이는 OTA에 의한 간독성이 나타난 것으로 추측되나 간독성의 다른 지표인 GPT에서는 유의차가 인정되지 않는 것으로 보아 심한 간독성을 나타내지는 않았는 것으로 생각된다.

CRN에서는 I군에 비해 II군에서 유의한 증가를 나타내었으며 III, IV 및 V군에서는 II군에 비해 유의한 감소를 나타내었다. 이는 OTA에 의한 신장독성은 인정되었으며 phenylalanine에 의해서는 OTA에 의한 독작용이 경감 또는 억제된 것으로 생각된다. 한편, TCHO의 III군 및 TBIL의 II군에서 I군에 비해 유의한 감소를 나타내었으나 이는 용량상관성이 인정되지 않는 것으로 보아 약제에 의한 영향이라기 보다 개체차이에 의한 일시적인 현상이라 생각된다.

OTA 및 phenylalanine의 투여에 의한 부검소견은 Table 8에서 보는 바와 같이 생존한 모든 군의 동물에서 이상소견은 관찰되지 않았다. 혈액학 소견을 비롯한 여러 항목에서 차이를 보였으나 이상소견이 관찰되지 않은 것은 시험기간이 짧은 급성으로 투여되어 부검하였기에 장기조직에 변화를 나타내기 전 상태라 생각된다.

각군의 간장, 비장 및 신장의 중량을 측정된 결과 Table

**Table 2. Mean body weight(g) changes in mice treated with ochratoxin A**

Dose(mg/kg)	30	42	58.8	82.3	115.2
0 hr	31.9±1.15 (10)	30.9±2.06 (10)	31.8±2.01 (10)	31.5±1.25 (10)	30.9±2.24 (10)
6hrs	30.8±0.58 (10)	29.5±1.93 (10)	29.3±2.16* (10)	28.2±1.47** (10)	27.1±2.69** (8)
1 day	29.7±0.73 (10)	28.1±2.46 (9)	27.7±1.98* (6)	25.7±2.04** (5)	-
3 days	28.7±0.43 (10)	27.0±1.56** (8)	25.1±2.34** (4)	23.7** (1)	-
7 days	30.2±4.22 (10)	29.0±3.24 (8)	26.6±2.18 (4)	25.2 (1)	-
14 days	36.9±2.74 (10)	35.7±2.54 (8)	31.7±1.94** (4)	27.6* (1)	-

(): No. of survival animal

\*: Significantly different from 30 mg/kg group value at  $P<0.05$

(\*\*):  $P<0.01$

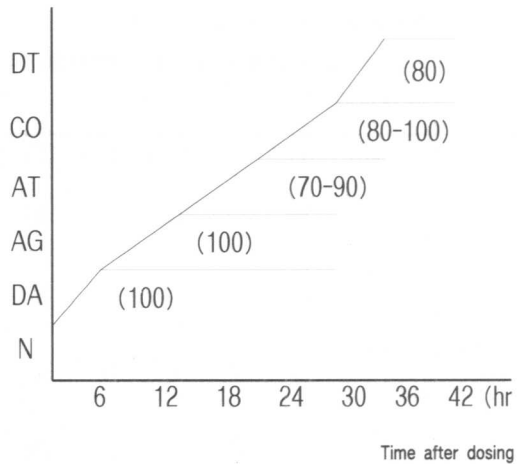
9에서 보는 바와 같다. I군에 비해 모든군의 장기에서 유의차는 인정되지 않았으나 II군의 간장 및 비장에서 다소 감소경향은 나타났다. 체중에 있어서 유의한 감소를 나타낸것과 비유해 볼때 실질장기의 중량에서보다 오히려 혈액학적 정상등 기타부위에 미치는 영향이 더 큰것으로 생각된다.

OTA의 투여에 따른 체중변화에 대한 phenylalanine의 방어효과는 Table 10에서 보는 바와 같이 I군에 비해 II군 및 III군에서는 투여 1일째 부터, IV군에서는 투여3일째 부터, V군에서는 투여7일째 부터 유의한 체중감소가 부검시까지 지속되었다. 한편, phenylalanine의 방어효과를 확인할 목적으로 측정된 결과 II군에 비해 V군에서는 투여1일째 부터 체중회복현상이 인정되었으며 III군 및 IV군에서는 투여 3일째 및 투여7일째에 일시적인 체중회복이 인정되었으나 그 외의 기간에는 유의한 차이는 인정되지 않았다.

상기의 결과를 종합 고찰하여 볼때 ochratoxin A의 LD<sub>80</sub> 용량을 투여하여 치사율, 임상증상의 종류 및 지속시간, 혈액학 및 혈청생화학적 소견, 부검소견, 장기중량 및 체중변화를 측정하여 매체대조군과 비교하고, ochratoxin A 및 phenylalanine의 여러용량을 동시투여하여 ochratoxin A의 독성작용에 대한 phenylalanine의 방어효과를 조사한 결과 치사율감소, 임상증상 지속시간의 단축, 혈액학 및 혈청생화학적 이상소견의 회복, 체중감소의 회복등이 관찰되어 ochratoxin A를 산생하는 곰팡이에 오염된 사료 및 음식물을 통한 동물 및 인간에서 phenylalanine의 공급은 독성증상을 경감시킬수 있을 것이라 생각된다.

Table 3. Experimental groups and doses of ochratoxin A and/or phenylalanine

Group	Animal size	Ochratoxin A	Phenylalanine
I(negative control)	10	-	-
II(positive control)	10	69.4 mg/kg	-
III	10	69.4 mg/kg	48.58 mg/kg
IV	10	69.4 mg/kg	90.22 mg/kg
V	10	69.4 mg/kg	173.50 mg/kg
VI	10	-	173.50 mg/kg



DT: Death CO: Coma  
 AT: Ataxia AG: Abnormal gait  
 DA: Decreased activity N : Normal  
 ( ) : Percentage of animal occurred the clinical signs of ordinate  
 --- : Time of clinical sign continued

Fig. 1. Observation of the toxic signs and time course of effects after oral administration of ochratoxin A(64.9 mg/kg) in mice

Table 4. Mortalities of male mice treated with ochratoxin A and/or phenylalanine

Dose	I	II	III	IV	V	VI
No. of animal treated	10	10	10	10	10	10
No. of animal survived	10	2	4	9	10	10
No. of animal died	0	8	6	1	0	0
Mortality rate (%)	0	80	60	10	0	0

I: Control II: ochratoxin A 69.4 mg/kg  
 III: ochratoxin A 69.4 mg/kg + phenylalanine 48.58 mg/kg  
 IV: ochratoxin A 69.4 mg/kg + phenylalanine 90.22 mg/kg  
 V: ochratoxin A 69.4 mg/kg + phenylalanine 173.50 mg/kg  
 VI: phenylalanine 173.50 mg/kg

Table 5. Clinical signs in mice treated with ochratoxin A and/or phenylalanine

group	clinical signs	Time after treatment (hrs)												
		1	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36
II	DA	0	2	10	10	10	10	10	10	10	10	8	6	2
	AG			1	2	6	8	10	10	10	10	10	6	3
	AT							1	3	7	9	7	2	
	CO										5	8	8	
	DT										1	2	5	
III	DA	0	2	2	5	6	7	7	7	7	3	1		
	AG			1	2	4	5	8	8	9	6	5	3	1
	AT								1	3	4	3		
	CO													
	DT													
IV	DA	0	2	3	3	5	5	4	1	1				
	AG				1	3	3	7	7	7	7	3	2	
	AT										1	3	2	
	CO													
	DT													
V	DA		1	1	3	3	3	2						
	AG					1	1	1	3	3	1			
	AT													
	CO													
	DT													

DA: Decreased Activity      AG: Abnormal Gait      AT: Ataxia      CO: Coma      DT: Death  
 II: Ochratoxin A 69.4 mg/kg      III: Ochratoxin A 69.4 mg/kg + Phenylalanine 48.58 mg/kg  
 IV: Ochratoxin A 69.4 mg/kg+Phenylalanine 90.22 mg/kg      V: Ochratoxin A 69.4 mg/kg+Phenylalanine 173.50 mg/kg

Table 6. Hematological findings in mice treated with ochratoxin A and/or phenylalanine

Group	I	II	III	IV	V	VI
Total No. of tested	10	2	10	10	10	10
WBC( $\times 10^3$ )	13.63 $\pm$ 0.9	14.39 $\pm$ 0.73	14.03 $\pm$ 0.68	13.92 $\pm$ 0.55	13.88 $\pm$ 0.97	14.08 $\pm$ 0.86
RBC( $\times 10^6$ )	8.29 $\pm$ 0.58	6.74 $\pm$ 0.84*	7.82 $\pm$ 0.73	8.08 $\pm$ 0.71	8.29 $\pm$ 0.69	8.36 $\pm$ 0.71#
Hgb(g/dl)	11.32 $\pm$ 0.4	9.29 $\pm$ 0.49*	10.33 $\pm$ 0.37**#	10.49 $\pm$ 1.32	10.58 $\pm$ 0.57*	10.97 $\pm$ 0.40#
Hct(%)	45.92 $\pm$ 3.4	37.58 $\pm$ 6.83	42.18 $\pm$ 4.94	43.27 $\pm$ 4.68	45.06 $\pm$ 3.59	46.47 $\pm$ 4.03
MCV(fl)	50.36 $\pm$ 1.8	57.85 $\pm$ 3.56	53.71 $\pm$ 2.88*	52.53 $\pm$ 1.94*	51.07 $\pm$ 2.00	51.35 $\pm$ 1.69#
MCH(pg)	11.93 $\pm$ 0.4	10.68 $\pm$ 0.71	10.94 $\pm$ 0.57*	11.11 $\pm$ 0.47	12.05 $\pm$ 0.51	12.16 $\pm$ 0.53#
MCHC(g/dl)	29.70 $\pm$ 1.6	25.82 $\pm$ 1.87	27.88 $\pm$ 1.73	28.84 $\pm$ 2.24	29.98 $\pm$ 2.01	30.25 $\pm$ 1.79#

\* : Significantly different from negative control value at  $p < 0.05$  (\*\*:  $p < 0.01$ )# : Significantly different from positive control value at  $p < 0.05$  (##:  $p < 0.01$ )

I : Control

II : ochratoxin A 69.4 mg/kg

III : ochratoxin A 69.4 mg/kg + phenylalanine 48.58 mg/kg

IV : ochratoxin A 69.4 mg/kg + phenylalanine 90.22 mg/kg

V : ochratoxin A 69.4 mg/kg + phenylalanine 173.50 mg/kg

VI : phenylalanine 173.50 mg/kg

Table 7. Serum biochemical findings in mice treated with ochratoxin A and/or phenylalanine

Group	I	II	III	IV	V	VI
Total No. of tested	10	2	10	10	10	10
GOT(IU/l) <sup>1)</sup>	69.7 $\pm$ 19.3	107.2 $\pm$ 24.	83.2 $\pm$ 20.4	82.7 $\pm$ 29.2	79.3 $\pm$ 21.2	70.3 $\pm$ 20.1#
GPT(IU/l) <sup>2)</sup>	29.3 $\pm$ 9.41	40.1 $\pm$ 10.2	35.7 $\pm$ 10.3	34.5 $\pm$ 9.04	33.7 $\pm$ 10.2	34.6 $\pm$ 10.29
ALP(IU/l) <sup>3)</sup>	150.3 $\pm$ 32.	134.7 $\pm$ 38.	151.2 $\pm$ 43.	150.4 $\pm$ 50.	157.1 $\pm$ 41.	149.8 $\pm$ 47.8
SUN(mg/dl) <sup>4)</sup>	26.7 $\pm$ 6.12	25.4 $\pm$ 7.33	25.9 $\pm$ 6.72	26.6 $\pm$ 5.92	27.3 $\pm$ 7.38	26.6 $\pm$ 7.29
CRN(mg/dl) <sup>5)</sup>	2.84 $\pm$ 0.18	3.39 $\pm$ 0.39	2.63 $\pm$ 0.21	2.85 $\pm$ 0.27	2.87 $\pm$ 0.21	2.79 $\pm$ 0.25
GLU(mg/dl) <sup>6)</sup>	153.1 $\pm$ 51.	170.3 $\pm$ 71.	170.1 $\pm$ 65.	140.3 $\pm$ 52.	120.3 $\pm$ 41.	136.8 $\pm$ 50.0
TCHO(mg/dl) <sup>7)</sup>	93.3 $\pm$ 22.2	67.2 $\pm$ 30.4	63.7 $\pm$ 22.7	70.2 $\pm$ 30.4	81.4 $\pm$ 27.7	87.3 $\pm$ 30.5
TP(g/dl) <sup>8)</sup>	6.25 $\pm$ 0.74	6.54 $\pm$ 1.04	6.33 $\pm$ 1.00	6.30 $\pm$ 1.04	6.19 $\pm$ 0.84	6.45 $\pm$ 0.96
ALB(g/dl) <sup>9)</sup>	3.14 $\pm$ 0.35	3.19 $\pm$ 0.37	3.12 $\pm$ 0.53	3.21 $\pm$ 0.39	3.24 $\pm$ 0.34	3.20 $\pm$ 0.36
TBIL(g/dl) <sup>10)</sup>	1.75 $\pm$ 0.21	1.33 $\pm$ 0.30	1.55 $\pm$ 0.29	1.55 $\pm$ 0.30	1.56 $\pm$ 0.33	1.75 $\pm$ 0.41
CPK(IU/l) <sup>11)</sup>	298 $\pm$ 15.4	277 $\pm$ 30.2	287 $\pm$ 22.2	290 $\pm$ 32.2	278 $\pm$ 17.4*	291 $\pm$ 20.7
CA(mg/dl) <sup>12)</sup>	12.3 $\pm$ 0.76	12.5 $\pm$ 0.84	12.5 $\pm$ 0.73	13.0 $\pm$ 1.08	13.3 $\pm$ 0.84	12.8 $\pm$ 0.97

\* : Significantly different from negative control value at  $p < 0.05$  (\*\*:  $p < 0.01$ )# : Significantly different from positive control value at  $p < 0.05$  (##:  $p < 0.01$ )<sup>1,2,13)</sup>UVrate <sup>3)</sup>P-Npp <sup>4)</sup>urease-UV <sup>5)</sup>jaffe <sup>6,7,11)</sup>enzyme <sup>8)</sup>jendrassik-cleghom <sup>12)</sup>GPO enzyme <sup>14)</sup>OCPC

I : Control

II : ochratoxin A 69.4 mg/kg

III : ochratoxin A 69.4 mg/kg + phenylalanine 48.58 mg/kg

IV : ochratoxin A 69.4 mg/kg + phenylalanine 90.22 mg/kg

V : ochratoxin A 69.4 mg/kg + phenylalanine 173.50 mg/kg

VI : phenylalanine 173.50 mg/kg



**Table 8. Necropsy findings in mice treated with ochratoxin A and/or phenylalanine**

Group	No. of animals examined	Findings
I	10	NAD
II	2	NAD
III	10	NAD
IV	10	NAD
V	10	NAD
VI	10	NAD

NAD: No abnormal detected

I: Control

II: ochratoxin A 69.4 mg/kg

III: ochratoxin A 69.4 mg/kg + phenylalanine 48.58 mg/kg

IV: ochratoxin A 69.4 mg/kg + phenylalanine 90.22 mg/kg

V: ochratoxin A 69.4 mg/kg + phenylalanine 173.50 mg/kg

VI: phenylalanine 173.50 mg/kg

**Table 9. Organ weights(g) in mice treated with ochratoxin A and/or phenylalanine**

Group	Liver	spleen	Kidney	
			left	right
I	1.36±0.127	0.107±0.013	0.154±0.021	0.155±0.020
II	1.17±0.130	0.088±0.015	0.150±0.023	0.151±0.020
III	1.30±0.124	0.101±0.014	0.153±0.021	0.154±0.023
IV	1.33±0.131	0.103±0.015	0.153±0.022	0.153±0.023
V	1.34±0.128	0.106±0.015	0.155±0.021	0.154±0.024
VI	1.36±0.130	0.106±0.014	0.154±0.020	0.154±0.022

\*: significantly different from negative control value at  $p < 0.05$  (\*\*:  $p < 0.01$ )

#: significantly different from positive control value at  $p < 0.05$  (##:  $p < 0.01$ )

I: Control

II: ochratoxin A 69.4 mg/kg

III: ochratoxin A 69.4 mg/kg + phenylalanine 48.58 mg/kg

IV: ochratoxin A 69.4 mg/kg + phenylalanine 90.22 mg/kg

V: ochratoxin A 69.4 mg/kg + phenylalanine 173.50 mg/kg

VI: phenylalanine 173.50 mg/kg

Table 10. Body weight changes in mice treated with ochratoxin A and/or phenylalanine

Group	I	II	III	IV	V	VI
0	26.3±2.13	27.7±2.02	26.4±1.77	27.1±2.24	27.3±1.97	26.6±1.89
hr	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
12	26.5±1.87*	24.3±2.33	25.1±1.84	26.3±2.08	24.9±2.31	26.5±2.31#
hrs	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
1	26.9±2.11	23.2±2.46**	24.7±2.03*	25.2±1.88	25.4±1.94#	26.7±1.88##
day	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
3	28.0±2.04	21.2±2.75**	2.33±2.21**#	25.1±2.44**	26.8±2.78#	27.3±1.96##
days	(10)	(2)	(10)	(10)	(10)	(10)
7	29.7±1.94	22.3±2.56**	25.7±2.77**	26.6±2.33**#	27.3±2.31*#	28.3±2.04##
days	(10)	(2)	(10)	(10)	(10)	(10)
14	31.8±1.87	25.7±2.38**	28.7±2.26**	29.3±2.51*	29.6±2.24*#	31.6±3.02#
days	(10)	(2)	(10)	(10)	(10)	(10)

\*: significantly different from negative control value at p&lt;0.05(\*\*:p&lt;0.01)

#: significantly different from positive control value at p&lt;0.05(##:p&lt;0.01)

():No. of survival animals

### 참고문헌

- Purchase IFH(1974) : Mycotoxins. pp.?? Elsevier Sci. Pub. Comp.;Oxford. New York.
- Goldblatt LA(1969): Aflatoxin-Scientific background. pp.1~11. control and implications. Academic Press. Inc. New York and London.
- Jelinek CF, Pohland AE, & Wood GE(1989) : Worldwide occurrence of mycotoxins in feeds-An update. J, Assoc,Off, Anal, Chem, 72(2),223-230.
- Ueno Y(1985) : The toxicology of mycotoxins. CRC Crit, Rev,Toxicol. 14(2),99-132.
- Scott DB(1965) : Toxicogenic fungi isolated from cereal and legume products. Mycopathol, Mycol, Appl. 25,213-222.
- van Walbeek W, Scott PM, & Thatcher FS(1968) : Mycotoxins from food-borne fungi. Can, J, Microbiol. 14,131-137.
- Chu FS(1974) : Studies in ochratoxin. CRC Crit, Rev, Toxicol. 2,499-524.
- van der Merwe KJ, Steynm PS & Fourie L(1965) : Mycotoxins. Part II.The constitution of ochratoxin A, B, C, etabolites of Aspergillus ochraceus. J, Chem,Soc. 7083-7088.
- Marquardt RR, Frohlich A & Abramson D(1990) : Ochratoxin A : an important western Canadian storage mycotoxin. Can, J, Physiol, Pharmacol. 68(7),991-999.
- Krogh P(1980): Ochratoxins : occurrence, biological effects and causal role in disease. pp.673~680. In Natural Toxins. edited by D. Eaker & T Wadstrom. Pergamon Press,Oxford.
- Lloyd WE, Daniels GN & Stahr HM(1985) : Cases of nephrotoxic mycotoxicosis in cattle and swine in the United States. pp.545~548. In : Trichothecenes and other Mycotoxins. edited by J Lacey.
- Shank RC(1981): Environmental toxicosis in humans. In : Mycotoxins and N-Nitroso Compounds :

- Environmental Risks. pp.107~140. Vol. 1, edited by R C Shank, CRC Press.
13. Bauer J & Gareis M(1987): Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette. J, Vet, Med, Ser, B, 34,613-627.
  14. Hamilton PB, Huff WE, Harris JR & Wyatt RD(1982) : Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. Poult, Sci. 61,1832-1841.
  15. Huff WE, Wyatt RD & Hamilton PB(1975) : Nephrotoxicity of dietary ochratoxin A in broiler chickens. Appl, Microbiol. 30,48.
  16. Szczech GM, Carlton WW & Tuite J(1973) : Ochratoxicosis in beagle dogs. Vet,Pathol. 10,135.
  17. Krogh P, Axelsen NH, Elling F, Gyrd-Hansen N, Hald B,Hyldaard-Jensen J, Larsen A E, Madsen A, Mortensen HP, Moller J, Petersen OK, Ravnskov U, Rostgaard M & Aalund O(1974) : Experimental porcine nephropathy. Acta Pathol, Microbiol, Scand, Scet, A Suppl. 246,1-21.
  18. Creppy EE, Lugnier AAJ, Fasiolo F, Heller K, Roschenthaler, R & Dirheimer G(1979) : In vitro inhibition of yeast pyenylalanyl-tRNA synthetase by ochratoxin A. Chem, Biol, Interact. 24,257-261.
  19. Moore JH & Truelove B(1970) : Ochratoxin A : Inhibition of mitochondrial respiration. Science, 168,1102-1103.
  20. Suzuki S, Satoh T & Yamazaki M(1975) : Effect of ochratoxin A on carbohydrate metabolism in rat liver. Toxicol, Appl, Pharmacol. 32,116-122.
  21. Bendele SA, Carton WW, Lillehof EB & Krogh P(1983) : Ochratoxin A carcinogenicity in the mouse. Mycol, Cong, in 3rd Int, Toky, 3(21).
  22. Dwivedi P & Burns RR : The natural occurrence of ochratoxin A and its effects in poultry. A review. Part II.Pathology and immunology. World Poult, Sci, 42,48~55.
  23. Roschenthaler R, Creppy EE, Dreismann H & irheimer G(1983) : Effect of ochratoxin A on protein synthesis and immunoresponse. Proc. Jpn, Assoc,Mycotoxicol, 18,24.
  24. Mayura K, Reddy RV, Hayes AW & Berndt WO(1982) :Embryocidal, fetotoxic and teratogenic effects of ochratoxin A. Toxicology, 25,175~185.
  25. Haubeck H, Lorkowski G, Kolsch E, and Roschenthaler R(1981) :Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. Appl,Environ,Microbiol, 41,1040~1042.
  26. Khera KS(1985): A possible etiological factor in embrio-fetal death and fetal malformations of rodent-rabbit species. Teratology, 31:129~153.
  27. Kumar SS, Sikka HC, Saxena J & Zweig G(1975): Membrane in human erythrocytes caused by captan and captafol. Pesticide Biocemistry and Physiology, 5:338~347.