

各種 食品에서 分離한 眞菌 培養液으로 處理된 마우스 肝細胞의 電子顯微鏡的 觀察

II. 分離菌株에 對한 實驗成績

滕永健·崔春根·高春明*

延世大學校 醫科大學 電子顯微鏡室·微生物學教室*

Electron Microscopic Observations of Mouse Liver Cell Treated with Fungal Culture Filtrates Isolated from Foodstuffs

II. Results of Isolated Strains

Young-Kun Deung, Choon-Keun Choi and Choon-Myung Koh*

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

ABSTRACT

The present study is to determine the toxicity of the fungi isolated from foodstuffs by observing the ultrastructural changes in the mouse liver cells.

The results as follows :

1. The toxin-producing fungi were screened by the methods of toxin-screening test (cytotoxicity test against to HeLa cells and thin layer chromatography).
2. All of the experimental animals treated with isolated fungi were observed the focal necrosis and inflammatory infiltration of liver parenchymal cells.
3. It showed the cytoplasmic changes, such as dilatation of rough endoplasmic reticulum (RER), swelling of mitochondria (mi), increased number of lipid droplet (li) and glycogen (gl), detachment of ribosomes (ri) by observing the electron microscopy.
4. Nuclear and nucleolar alteration were also noted the segregation of nucleolar element and irregularity of nuclear envelopes.
5. As a mass screening, the cytotoxicity test using HeLa cells and thin layer chromatography are feasible methods to detection of the mycotoxin producing fungi from various sources.

I. 緒 論

Mycotoxin 에 對한 細胞毒性 및 發癌性에 關한 研究는 여러 學者들에 依하여 多角的인 面에서 研究되어 왔으며 現在도 進行되고 있다 (Miyake 및 Saito, 1965; Butler, 1966; Svoboda 등, 1966; Newberne, 1967; Ueno 등, 1971; 金, 1971; Uruguchi 등, 1972; Wogan 및 Newberne, 1967; 趙等, 1973; 滕等, 1974).

Mycotoxin 의 研究는 英國의 Turkey-X disease 의 原因이 aflatoxin 에 依함이라 Sargeant等(1961)에 依하여 發表된 以來, 体系的인 研究가 行하여 졌다고 할수가 있겠으나 이보다 앞서 日本等地에서는 穀類에 汚染된 眞菌에 依하여 심한 肝疾患이 야기된다고 報告된 바 있기도 하다.

現在에 와서는 많은 種類의 眞菌들로부터 여러 種類의 mycotoxin 이 分泌된다고 報告되어 있으며 이들은 주로 *Aspergillus spp.*를 비롯하여 *Penicil-*

lium spp., *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.* 등 여러 種類로 알려져 있다(Enomoto 및 Saito, 1972; 高等, 1972).

그러나 Enomoto 및 Saito (1972)는 이들 여러 種類의 mycotoxin 中 癌을 유발하는 독신으로서는 aflatoxin 이외의 sterigmatocystine, leuteoskyrin, cyclochlorotin, patulin, penicillic acid 및 griseofulvin 등 7種에 국한되고 그 이외의 mycotoxin 들에 대하여는 細胞毒性은 일으키나 癌을 유발한다는 증거는 없다고 주장하였다.

한편, 이들의 動物實驗을 통한 結果를 보면, 여러 實驗動物들이 感受性を 가지고 있으며 이중, turkey, duckling, chicken, rat, monkey, sheep, trout 및 mice 등은 mycotoxin 의 種類에 따라 강한 感受性を 나타낸다고 發表하였다(Newberne, 1967; Uruguchi 등, 1972; Enomoto 및 Saito, 1972).

Mycotoxin 을 利用한 實驗動物들의 病變에 對한 研究도 역시 여러 學者들(Butler, 1966; Brown 및 Abrams, 1966; Clifford 및 Rees, 1966; Uruguchi 등, 1972; 金, 1971; 趙等, 1973; 滕等, 1974)에 의하여 行하여 졌으며 주로 肝臟細胞에 對하여 심한 變化를 招來한다고 報告한 바 있다. 電子顯微鏡의 結果를 보면 Wogan 및 Newberne (1967), Bernhard 등(1965), Tulpule 등(1964), 金(1971) 및 滕等(1974)은 mycotoxin 處理 肝臟細胞의 觀察結果, 주로 nuclear envelope 의 變化, nucleolus 의 capping, mitochondria 의 變化, 粗面小胞體(rough endoplasmic reticulum)의 腫창, 액포화등을 볼 수 있었으며 아울러 glycogen 의 증가등을 관찰할 수 있었다고 주장하고 이는 他 發癌物質의 處理에 依한 結果와 一致하는 點들이라고 發表하였다(Reynolds 등, 1964; Harris 등, 1968; Wood, 1965; Emmelot 및 Beneditti, 1966; Magee 및 Bames, 1962).

이에 著者들은 各種 食品에서 分離한 眞菌中 먼저 mice 및 HeLa 細胞株에 對하여 毒性을 나타내며 thin-layer chromatography 上에서의 mycotoxin 의 存在를 의심할 수 있는 菌株들을 使用하여 이들 培養液을 mice 에 處理, 肝細胞의 變化를 電子顯微鏡을 통하여 觀察하였던 바 그 結果를 얻을 수 있었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料:

1). 實驗에 使用한 菌株:

本 實驗에 使用한 菌株로서는 各種 食品에서 分離 同定되어 本教室에서 保管中인 *Aspergillus spp.* 58株, *Penicillium spp.* 32株中 thin-layer chromato-

graphy 및 HeLa 細胞株를 利用한 mycotoxin screening test 에 依하여 毒性이 있다고 思慮되는 *Aspergillus spp.* 6株와 *Penicillium spp.* 12株 總 18株를 使用하였으며 對照群으로서는 *Aspergillus flavus* ATCC 15517 以外 6株를 使用하였다.

2). 實驗에 使用된 마우스:

實驗에 使用된 마우스는 日本國立癩病 研究所에서 분양받아 本教室에서 繼代中인 体重 20gm 内外의 ICR-마우스株를 使用하였다.

2. 實驗方法

1). 眞菌의 培養方法:

眞菌의 培養方法으로서는 特-신生成 培地를 使用하여 이 培地에 各 菌株를 一定量 接種하고 27°C incubator 에서 2週間 靜置 培養하였다.

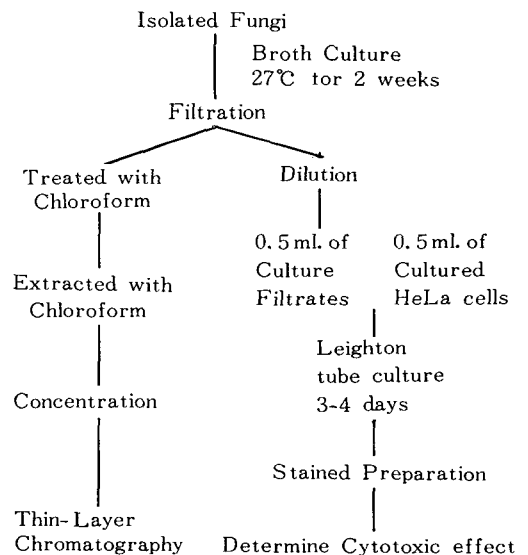
2). 培養濾過液의 製造方法:

眞菌의 培養이 끝난 菌의 培養液은 一次로 濾過紙를 通하여 濾過한 뒤 이를 다시 seitz-filter apparatus 를 通하여 無菌의으로 濾過 이를 動物實驗에 使用하였다.

3). Mycotoxin 分泌菌株의 screening 方法:

Mycotoxin 分泌菌株의 screening 方法으로서는 10% 培養濾過液의 HeLa 細胞株에 對한 細胞毒性 여부를 觀察, Toplin (1959)方法에 依한 細胞毒性 程度가 1+ 以上の 세포독성을 나타내는 菌株와 아울러 thin layer chromatography 方法에 依한 對照群으로 使用한 菌株의 배양추출액의 Rf-值 및 螢光性이 同一한 菌株들을 선택, 實驗에 使用하였다 (그림 1).

Fig. 1. Mycotoxin-producing fungi Screening Method



4). 動物實驗方法 :

實驗動物인 ICR-마우스에 上記 方法에 依하여 準備한 培養濾過液을 1.0ml/20gm 의 比率로서 腹腔內에 주사하고 一週日後 도살하여 肝臟을 적출, 이의 一部分은 病理組織 標本을 作成하고 同時에 他 一部分은 1mm³의 크기로 細切하여 電子顯微鏡 標本 作成에 必要한 試料로 使用하였다.

5). 病理組織 標本 및 電子顯微鏡的 觀察方法 :

病理組織 標本은 肝臟 적출 즉시 10%中性 formalin 溶液으로 固定한 후 이를 ethanol로서 脫水, paraffin으로 包埋한 다음 6μ 두께로 標本을 作成 hematoxylineosin 染色을 實施하였으며 電子顯微鏡 觀察를 위하여서는 1mm³크기로 細切한 組織을 pH 7.4의 0.1mol. phosphate buffer 溶液으로 調整된 1% osmium tetroxide 液으로 2時間 동안 固定하고 (Palade, 1952) 이를 70% ethanol로 洗滌, 다시 70% ethanol로부터 上昇順으로 無水 ethanol 및 prophylyene oxide 로 脫水를 實施, Epon 812 로서 包埋 (Luft, 1961)한 뒤 glass-knife 로서 Sorvall MT-2, Porterblum ultramicrotome을 使用하여 500 Å 의 두께로 切片을 作成한 뒤, 飽和 uranyl acetate 溶液과 lead citrate 溶液으로서 二重染色을 行하여 Hitachi 製 HU-11, E-1 型 電子顯微鏡으로서 75 KV 下에서 觀察하였다.

III. 實驗成績

1. Mycotoxin 分泌菌株의 screening 成績

1). Thin-layer chromatography 에 依한 成績 :

實驗菌株 중 TLC 方法에 依하여 mycotoxin 分泌 可能菌株로서 screening 된 菌株는 *Aspergillus spp.* 가 6 株, *Penicillium spp.* 가 12 株로서 總 18 株이었으며 이들의 大部分은 1 個의 spot 를 나타내었으나 N₁-7, P-49, P-56, P-66, N₁-3 및 N₁-12 株는 2 個의 spot 를 그리고 A-49 및 P-63 株는 3 個의 spot 를 나타내었다 (表 1 및 2).

2) HeLa 細胞에 對한 成績 :

對照群의 경우에는 共히 *P. brunneum* 株를 제외하고는 cytotoxicity grade 1+~3+을 나타내었으며 (表 3), 實驗菌株에서는 *Aspergillus spp.* 가 6 株, *Penicillium spp.* 12 株가 역시 cytotoxicity grade 1+~3+를 나타내어 mycotoxin 分泌 可能 菌株로서 screening 이 可能하였으며 이중 특히 P-63 및 A-49 株는 cytotoxicity grade 3+로서 가장 細胞 毒性이 強함을 나타내었다 (表 4).

2. 病理組織學的 成績

對照群의 菌株에 對한 病理組織學的 成績을 보면, *P. tardum* IFO 5787 株 및 *P. brunneum* 株를 제

외하고는 모두 肝細胞에 對하여 輕度の 病變을 야기하여 肝實質細胞의 炎症 내지 괴사현상을 야기하였으며 glycogen 의 증가현상을 볼 수 있었다.

한편, 實驗菌株에서 보면 *Penicillium spp.* 7 株, *Aspergillus spp.* 6 株에서 變化를 볼 수 있었으며, 이들 變化 역시 肝細胞에 對하여 部分的인 炎症反應, 炎症細胞의 침윤 및 괴저현상을 관찰할 수 있었다.

Table 1. Thin-layer Chromatographic Rf-value of Reference Strains

Generic Name	Rf-value (Chloroform: Acetone 3:1)			
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 15517	0.41	0.49	0.57	0.69
<i>Aspergillus parasiticus</i> RIB 1037	0.27	0.50	0.69	
<i>Aspergillus toxicarium</i> RIB 4002	0.48			
<i>Penicillium citrium</i> SWU 238	0.41	0.48	0.58	
<i>Penicillium islandicum</i> IFO 5235	0.14	0.50	0.96	
<i>Penicillium tardum</i> IFO 5787	0.21			
<i>Penicillium brunneum</i>	0.14	0.38	0.50	

Table 2. Thin-layer Chromatographic Rf-value of Isolated Strains

Generic Name	Rf-value (Chloroform: Acetone 3:1)			
<i>Aspergillus spp.</i>				
A-8	0.50			
A-35	0.49			
A-49	0.41	0.50	0.69	
A-66	0.41			
N ₁ -7	0.21	0.58		
N-25-2	0.69			
<i>Penicillium spp.</i>				
P-32	0.28			
P-49	0.50	0.69		
P-47	0.50			
P-56	0.20	0.50		
P-61	0.68			
P-63	0.41	0.50	0.21	
P-66	0.12	0.41		
P-67	0.30			
N ₁ -3	0.20	0.50		
N ₁ -12	0.18	0.40		
N ₁ -14	0.28			
N-19	0.38			

Table 3. Result of Cytotoxicity Test on HeLa cells to the Reference Strains

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

*F : Culture Filtrates

Table 4. Result of Cytotoxicity Test on HeLa cells to the Isolated Strains

Generic Name	Grade of Cytotoxicity on HeLa cell(10% F*)
<i>Aspergillus spp.</i>	
A-8	2 +
A-35	2 +
A-49	3 +
A-66	2 +
N ₁ -7	1 +
N-25-2	2 +
<i>Penicillium spp.</i>	
P-32	1 +
P-47	2 +
P-49	1 +
P-56	2 +
P-61	1 +
P-63	3 +
P-66	1 +
P-67	1 +
N ₁ -3	1 +
N ₁ -12	1 +
N-19	1 +
N ₁ -14	1 +

*F : Culture Filtrates

3. 電子顯微鏡의 觀察成績

1). 對照菌株에 對한 成績 :

對照菌株의 處理에 依한 ICR-마우스의 肝細胞에 對한 微細構造를 보면, 모든 細胞에서 粗面小胞體(rough endoplasmic reticulum)가 多少 腫脹 내

지는 液胞化 경향을 나타내고 있었으며 mitochondria의 swelling, cristae의 消失 등이 아울러 觀察되었다.

또한, *A. flavus* ATCC 15517 및 *A. parasiticus* RIB 1037 株에 依하여 處理된 경우에는 核의 變化, nuclear envelope의 變化 및 nucleolus의 capping도 觀察되었으며, glycogen이 增加하는 感이 있었다.

2). 實驗菌株에 對한 成績 :

實驗菌株에 對한 成績을 보면 核의 變化는 N₁-14, P-32, N₁-3, 및 P-61等 菌株에서 不規則한 核膜을 觀察할 수 있었고 특히 P-32株에서는 nuclear inclusion body를 볼 수 있었다. 粗面小胞體는 P-32, P-49, P-61, P-66, P-67, N₁-3, N₁-14, A-35 및 A-66株等에서 輕한 확장 내지 液胞化를 볼 수 있었고, mitochondria의 變化는 P-56, P-63, A-49 및 N-25-2株等에서 腫脹, cristae의 소실 또는 不規則한 膜의 構造를 보였다. glycogen은 P-32, P-61, 및 P-67株에서 輕한 내지 重症의 축적현상을 나타내었다. 한편, P-47, A-6, N₁-12, 및 N₁-7株에서는 lysosome 및 ribosome의 變化를 일으키어 lysosome의 증가 혹은 ribosome의 소실현상이 나타났다. 또한, N₁-14, P-67, N₁-3 및 A-66株에서는 多數의 脂肪滴이 觀察되었다.

V. 考 按

1961年 英國의 질먼조 피사사건이 *Aspergillus flavus* 라는 眞菌에 依한다고 報告된 이래, mycotoxin에 對한 研究는 계속되고 있다고 할 수 있다.

한편, mycotoxin에 對한 發癌性 問題도 아울러 研究되어 現在까지 7種의 mycotoxin이 癌을 誘發한다고 報告되어 있다(Enomoto 및 Saito, 1972). 그러나 이들 특-신에 依하여서는 많은 種類의 動物들에 對하여 여러 種類의 毒性을 나타낸다고 報告되어 있으며 아울러 感受性이 높은 實驗動物들로서는 turkey, duckling, rat, rabbit, trout, monkey, 및 sheep等 여러 種類의 動物들이 있다고 하고 mouse는 比較的 저항성이 있다고 하였으나 近來에 와서는 오히려 mycotoxin의 種類에 따라서는 感受性이 높다고 報告되었다(Wogan 및 Newberne, 1967; Newberne, 1967; Uraguchi等, 1972).

또한, 培養組織 細胞를 實驗 model로 使用하여 毒性을 찾아내려는 研究 역시 많은 學者들에 依하여 實施되어 Svoboda等(1966)은 원숭이의, 간장세포, Legator 및 Withrow(1964), Saito等(1971), 趙等(1973), 高等(1974)은 HeLa細胞, Zuckerman

等(1968)은 human embryo liver cell, Dilimpio(1968) 및 Promachainant 等(1972)은 human leukocyte culture system 을 利用하여 細胞의 變化를 基準으로 毒性을 추구하기도 하였다.

近來에 와서는 이들 變化를 電子顯微鏡을 통하여 觀察하고 이들 細胞의 微細構造에 對한 變化를 Svoboda 等(1966), 金(1971) 및 滕等(1974)은 核의 變化와 더불어 核小體의 capping, 粗面小胞體의 腫창 및 소실, mitochondria 의 變化等を 볼수 있다고 하고, 이는 蛋白質 合成의 阻害等과 關係가 있다고 主張하였으며 이는 他 數種 發癌物質의 處理結果와 一致하는 點들이라 發表하였다 (Reynolds 等, 1964; Reich, 1963; Lapis 및 Bernhard, 1965, Harris 等, 1968; Dalton, 1959; Wood, 1965).

本 實驗結果에서도 他 研究者들의 研究結果와 같이 HeLa 細胞株에 對하여 毒性을 나타내며, thin-layer chromatography 上에서의 의심스러운 spot 를 나타내는 菌株들이 毒性을 나타낼 수 있는 可能性을 內包하고 있으며 아울러 實驗菌株中에서 *Penicillium spp.* 7 株와 *Aspergillus spp.* 6 株는 實驗動物인 ICR-mice 에서도 심한 肝細胞에 病變을 招來하였다.

한편, 電子顯微鏡을 통한 微細構造의 變化 역시, N₁-14, P-32, N₁-3, 및 P-61等 4 株에서는 不規則한 核膜의 出現等이 觀察되었으며 P-32, P-49, P-61, P-66, P-67, N₁-3, N₁-14, A-35 및 A-66株等 9 株에서는 粗面小胞體의 腫창 및 液胞化 現象이 야기되었으며 P-56, P-63, A-49 및 N 25-2 株等은 mitochondria 의 變化를 나타내었고 P-32, P-61, P-67株는 glycogen 의 축적, P-47, A-66, N₁-12 및 N₁-7 株에서는 lysosome 의 증가 혹은 ribosome 의 소실등의 現象이 관찰되어 他 研究者들(金, 1971; 滕等, 1974; Svoboda 等, 1966; Wood, 1965; Smuckler 等, 1962; Sporn 等, 1966)의 研究結果와 一致하는 結果를 나타내었다.

이상의 結果를 綜合하여 불배 mice 를 利用한 경우 toxin 分泌 可能菌株의 檢索의 可能性이 있다고 하겠으며 食品에서 分離한 菌株들 중에도 mycotoxin 分泌 可能菌株의 存在를 시사하고 있다고 생각되나 이는 species 및 strain 에 따른 外部의 諸條件 등 여러가지 問題點이 內包되어 있을 것으로 생각되며 이는 좀더 研究되어야 할 問題點들이라 思料된다.

V. 結 論

各種 食品에서 分離하여 保管중인 *Aspergillus spp.* 58 株 및 *Penicillium spp.* 32 株中 mycotoxin

screening test 에 依하여 毒性의 分泌 可能性을 內包한 *Aspergillus spp.* 6 株와 *Penicillium spp.* 12 株, 總 18 株의 培養 濾過液을 使用 ICR-mice 에 處理하여 處理된 마우스의 肝臟細胞의 微細構造에 對한 變化를 電子顯微鏡을 통하여 觀察하였던 바 다음과 같은 結論을 얻을수 있었다.

1. 光學顯微鏡의 所見을 보면 菌株別 差異는 있으나 大部分이 部分的 壞死 혹은 炎症細胞의 침윤 現象을 觀察할 수 있었다.

2. 電子顯微鏡의 結果를 보면 細胞質의 變化로서는 粗面小胞體의 腫창 내지 液胞化 現象을 볼수 있었으며 mitochondria 의 swelling, lysosome 의 增加, ribosome 의 消失과 아울러 glycogen 및 lipid droplet 의 축적現象을 관찰할수 있었다. 核의 變化로서는 不規則한 核膜의 出現과 아울러 nuclear inclusion body 의 出現이 觀察되었다.

3. 電子顯微鏡의 成績으로 미루어 보아 食品中에는 mycotoxin 分泌 可能菌株의 存在를 의심할 수 있다고 하겠으나 이는 外界의 여러 條件等의 差異로 여러가지 差異點을 나타낼 수 있을 것으로 思料된다.

(본 연구는 1973년도 유한연구비로서 進행된 논문임)

REFERENCES

- Bernherd, W., Frayssinet, C, Lafarge, C. and LeBreton, E. (1965) : Lesions nucleolaires precoces provoquees I aflatoxine dans les cellules hepaticques durat, Comp. Rend Acad. Sci., 261 : 1785.
- Brown, J.M. M. and Abrams, L. (1966) : Biochemical studies on aflatoxicosis, J. Vet. Res., 32 : 119.
- Butler, W. H. (1966) : Early hepatic parenchymal changes induced in the rat by aflatoxin B₁. Am. J. Path., 46 : 691.
- Clifford, J. I. and Rees, K. R. (1966) : Aflatoxin ; a site of action in the rat liver cell. Nature 209 : 312.
- 趙世勳 · 高春明 · 崔泰周 · 柳駿 (1973) : 한국식품중의 유독성 진균에 관한 연구(제 6보). 대한미생물학회지, 8 : 43.
- Dalton, A. J. (1959) : Organized in benign and malignant cell, Lab. Invest., 8 : 510.
- 滕永健 · 高春明 · 金聖光 · 孫瑛鍾 · 崔大卿 (1974) : 각종 식품에서 분리한 진균배양액으로서 처리된 마우스 간세포의 전자현미경적 관찰(제 1보). 최신의학, 17 : 101.

- Dilimpio, D. A. (1968) : Effect of aflatoxin of human leukocytes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 127 :559.
- Emmelot, P. and Beneditti, E. L. (1960) :Changes in the fine structure of rat liver cells brought by Dimethylnitrosamine. J. Cell Biol., 7:393.
- Enomoto, M. and Saito, M. (1972): Carcinogens produced by fungi. Ann. Rev. Microb., 26 :279.
- Harris, C., Grady, H. and Svoboda, (1968) : Segregation of nucleolus produced anthromycin. Cancer Res., 28 :81.
- 金貞淑 (1971) : Aflatoxin B₁ 및 G₁ 의 백서간에 미치는 영향에 관한 형태학적 자기방사법적 연구. 연세의대논문집, 4 : 80.
- 高春明 · 金聖光 · 趙世勳 · 金世鍾 · 崔泰周 · 柳駿 (1974) : 韓國食品中の 有毒性 眞菌에 관한 研究 (第 7 報), 韓國産業微生物學會誌, 2 : 19.
- Lapis, K. and Bernhard, W. (1965) : The effect of mitomycin C on the nucleolar fine structure of BK in cell culture. Cancer Res., 25 :628. KB
- Legator, M. S. and Withrow, A. (1964) : Aflatoxin : Effect on mitotic division in cultured embryonic lung cells. J. AOA., 47 :1007.
- Luft, J. H. (1961) : Improvements in epoxy resin embedding method. J. Biophys. Biochem. Cytol., 11 :736.
- Magee, P. M. and Barnes, J. M. (1962) : Induction of kidney tumors in the rat with DMN. J. Path. Bact., 84 :19.
- Miyake, M. and Saito, M. (1965) Liver injury and liver tumors induced by toxins of *Penicillium islandicum* growing on yellowed rice. In "Mycotoxins in Foodstuffs" (G. N. Wogan ed.), M. I. T. Press, Cambridge, Mass.
- Newberne, P. M. (1967) : Biological activity of the aflatoxins in domestic and laboratory animals. Res. Rept., 70 : 130.
- Palade, G. E. (1969) : A study of fixation for electron microscopy. J. Exp. Med., 95 :285.
- Promchainant, C., Baimai, V. and Nondasuta, A. (1972) : The cytogenetic effects of aflatoxin and gamma rays on human leukocytes in vitro. Mutation Res., 16 : 373.
- Reich, E. (1963) : Biochemistry of actinomycin D. Cancer Res., 23 :1428.
- Reynolds, R. C., Montgomery, P. O. B. and Hughes, B. (1964) : Nuclear "caps" produced by actinomycin D. Cancer Res., 24 :1269.
- Saito, M., Ohtsubo, K., Umeda, M., Enomoto, M., Kurata, H., Udagawa, S., Sakabe, F. and Ichioe, M. (1971) : Screening tests using HeLa cells and mice for detection of mycotoxin producing fungi isolated from foodstuffs. Jap. Exp. Med., 41 :1.
- Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J. and Carnaghan, R. B. A. (1961) : Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature, 192 :1096.
- Smuckler, E. A. and Beneditti, E. P. (1965) : The early effects of actinomycin D on rat liver changes in ribosomes and polysomes. Lab. Invest., 14 :1699.
- Sporn, M. B., Dingman, C. W., Phelps, H. L. and Wogan, G. N. (1966) : Aflatoxin B₁ binding to DNA in vitro and alteration of RNA metabolism in vivo. Science, 151 :1539.
- Svoboda, D., Grady, H. J. and Higginson, J. (1966) : Aflatoxin B₁ injury in rat and monkey liver. Am. J. Pathol., 49 :1023.
- Tulpule, P. G., Madhave, T. V. and Gopalan, C. (1964) : Effect of feeding aflatoxin to young monkey. Lancet, 1 :962.
- Ueno, Y., Ueno, I., Iitoi, Y., Tatsuno Y., Enomoto M. and Ohokubo, K. (1971) : Toxicological approaches to the metabolites of Fusaria. Jap. J. Exp. Med., 41 :521.
- Uraguchi, K., Saito, M., Noguchi, Y., Takanashi, K., Enomoto, M. and Tatsuno, T. (1972) : Chronic toxicity and carcinogenicity in mice of the purified mycotoxins, luteoskyrin and cyclochlorotene, Fd. Cosmet. Toxicol., 10 :193.
- Wogan, G. N. and Newberne, F. M. (1967) : Dose response characteristics of aflatoxin B carcinogenesis in the rat. Cancer Res., 27 :2370.
- Wood, R. L. (1965) : The fine structure of hepatic cell in chronic ethionin poisoning and during recovery, Am. J. Pathol., 46 :307.
- Zuckerman, A. L., Rees, K. R., Inman, D. R. and Robb, I. A. (1968) : The effects of aflatoxins in human embryo liver cells in culture. Brit. J. Exp. Path., 49 :33.

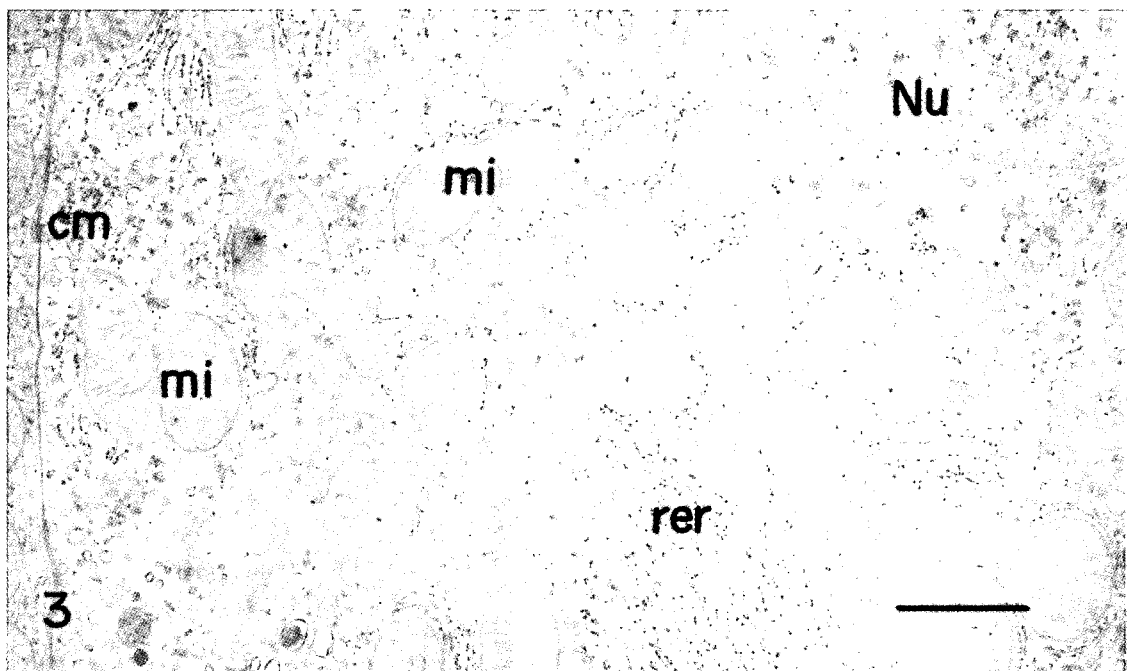
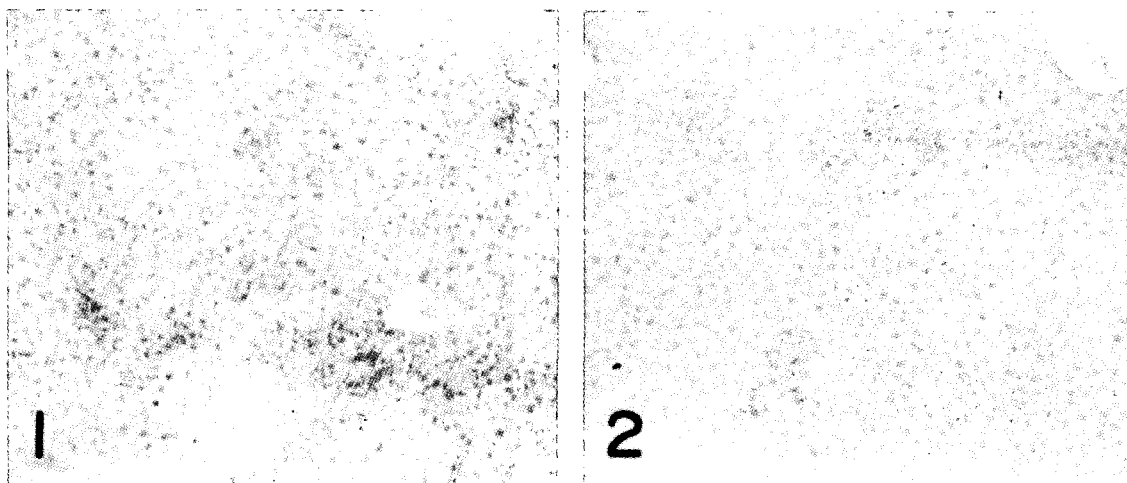


Fig.1. Focal necrosis of liver cells.

(Reference Strain:A. flavus ATCC 15517)

Fig.2. Focal inflammatory changes of liver cell. (Exp. Strain No. P-32)

Fig.3. Ultrastructure of normal mouse liver cell. Nu: nucleus, mi: mitochondria, rer: rough endoplasmic reticulum, cm: cell membrane.

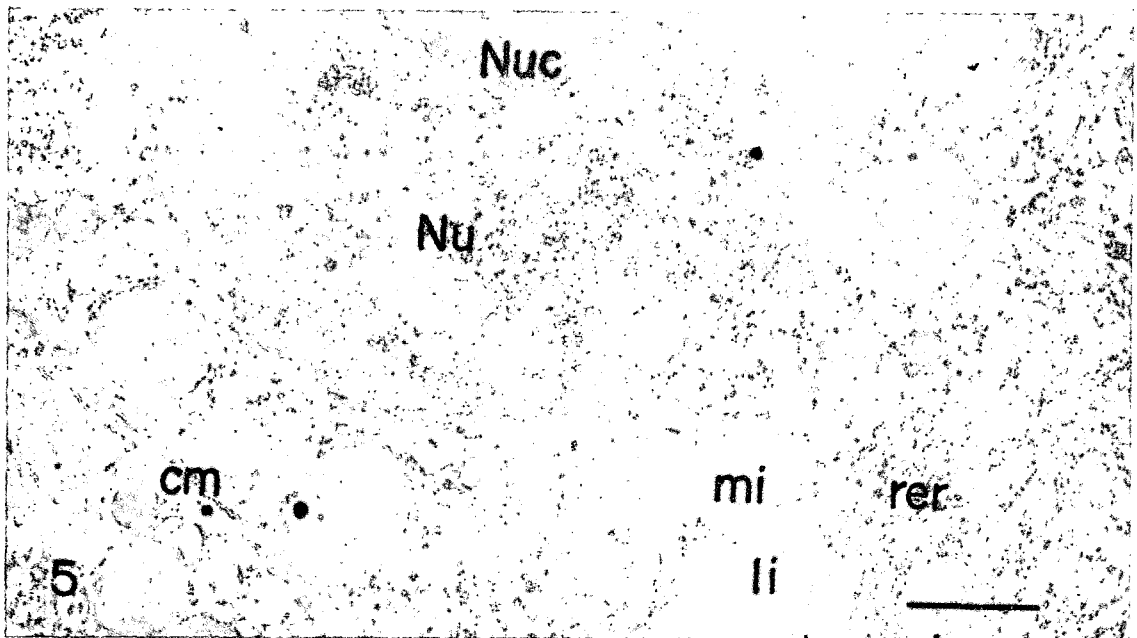
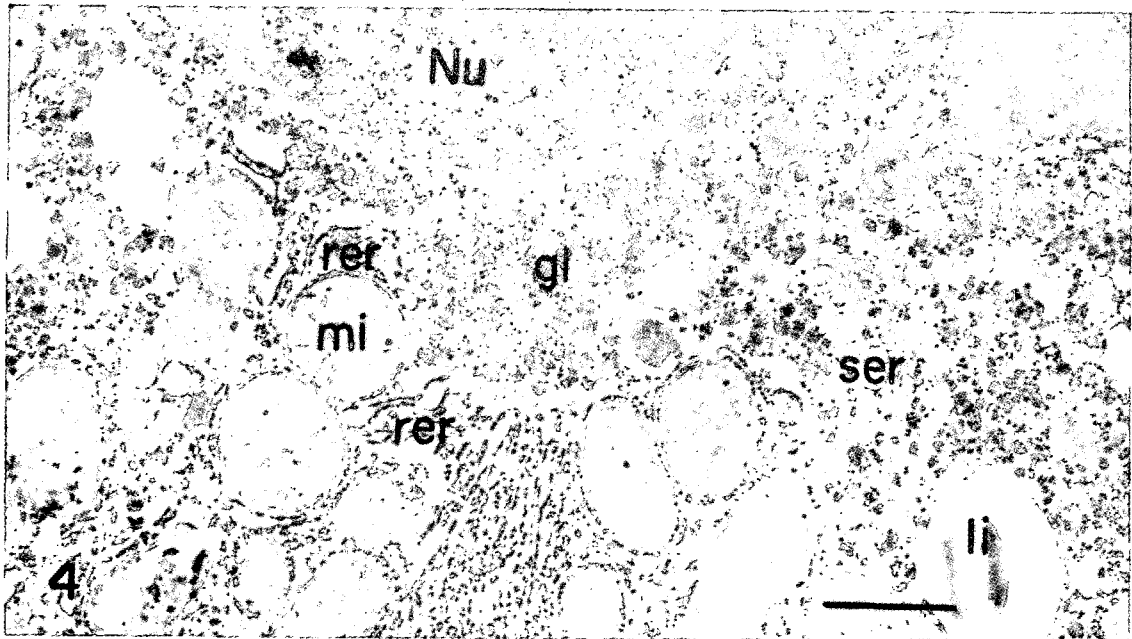


Fig. 4. Dilatation of rough endoplasmic reticulum, increased number of glycogen and lipid droplet were observed (Reference Strain: *A. flavus* ATCC 15517). Nu: nucleus, rer: rough endoplasmic reticulum, gl: glycogen, mi: mitochondria, ser: smooth endoplasmic reticulum, li: lipid droplet.

Fig. 5. Irregularity of nuclear envelope and dilatation of rough endoplasmic reticulum and disappearance of mitochondrial cristae were also noted (Reference Strain: *P. islandicum* IFO 5235). Nuc: nucleolus, cm: cell membrane.

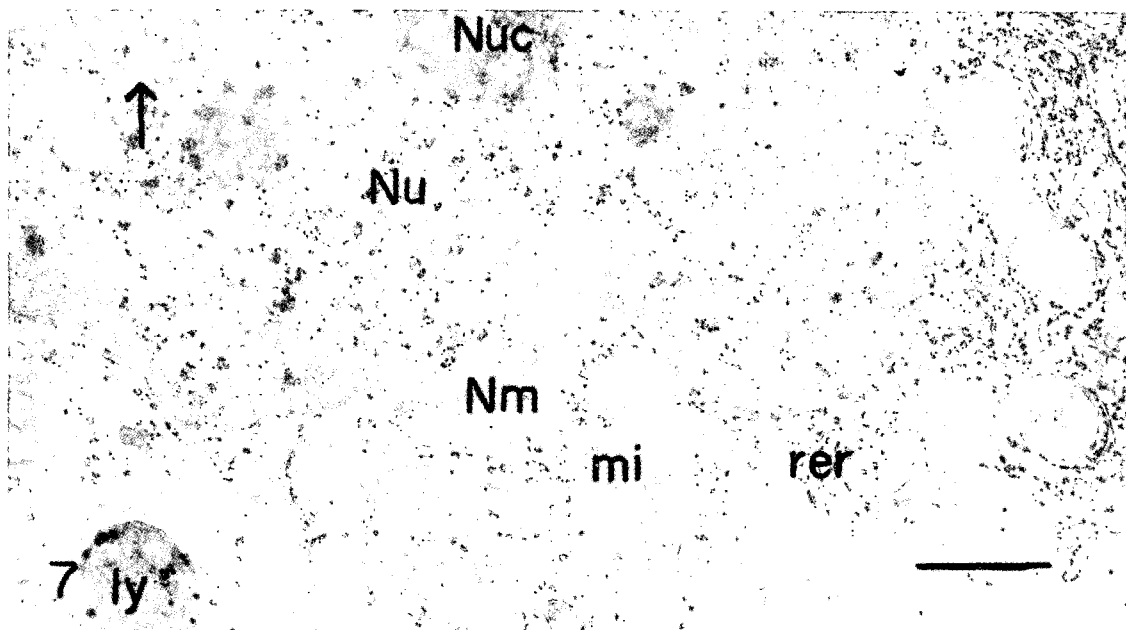
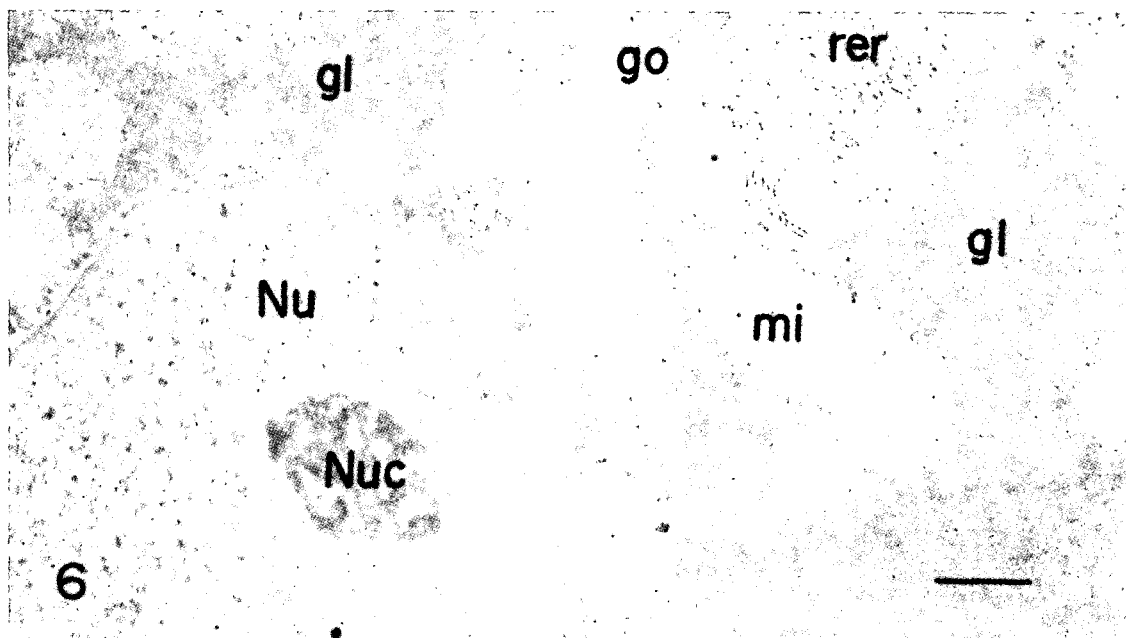


Fig. 6. Heavily deposit of glycogen and slightly rough endoplasmic reticulum dilatation were seen treated with culture filtrate of Exp. strain No. P-61. Nu:nucleus, Nuc: nucleolus, go: golgi complex, gl: glycogen, mi:mitochondria, rer:rough endoplasmic reticulum.

Fig. 7. Appearance of lysosome, irregularity of nuclear envelope and nuclear inclusion body were observed (Exp. Strain No. P-32). ly:lysosome, Nm:nuclear envelope, ←: nuclear inclusion body.

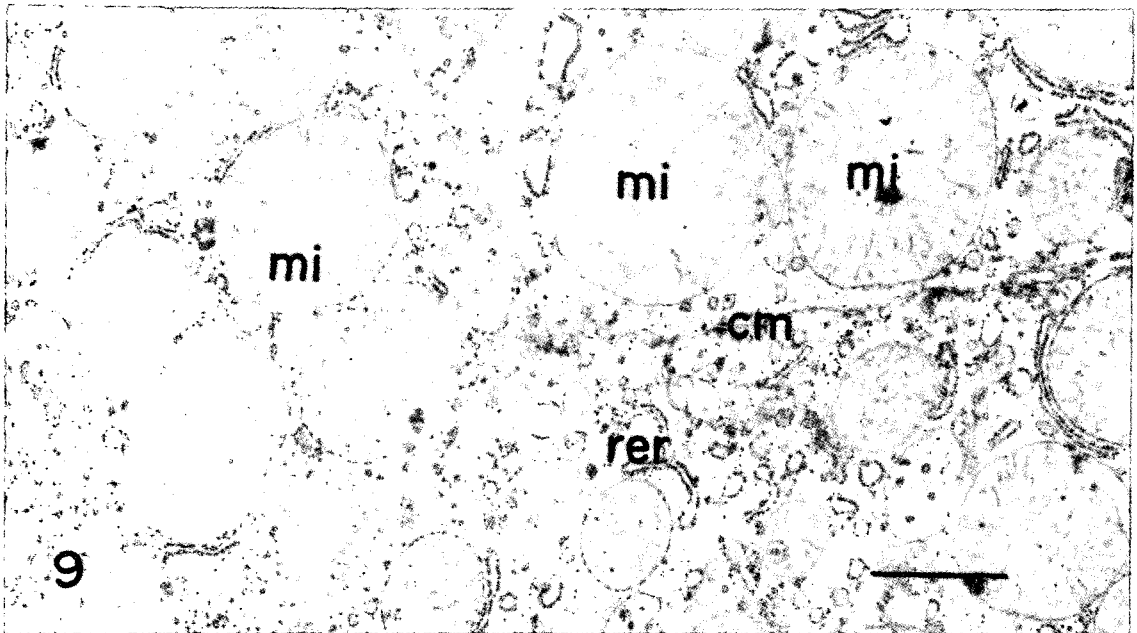
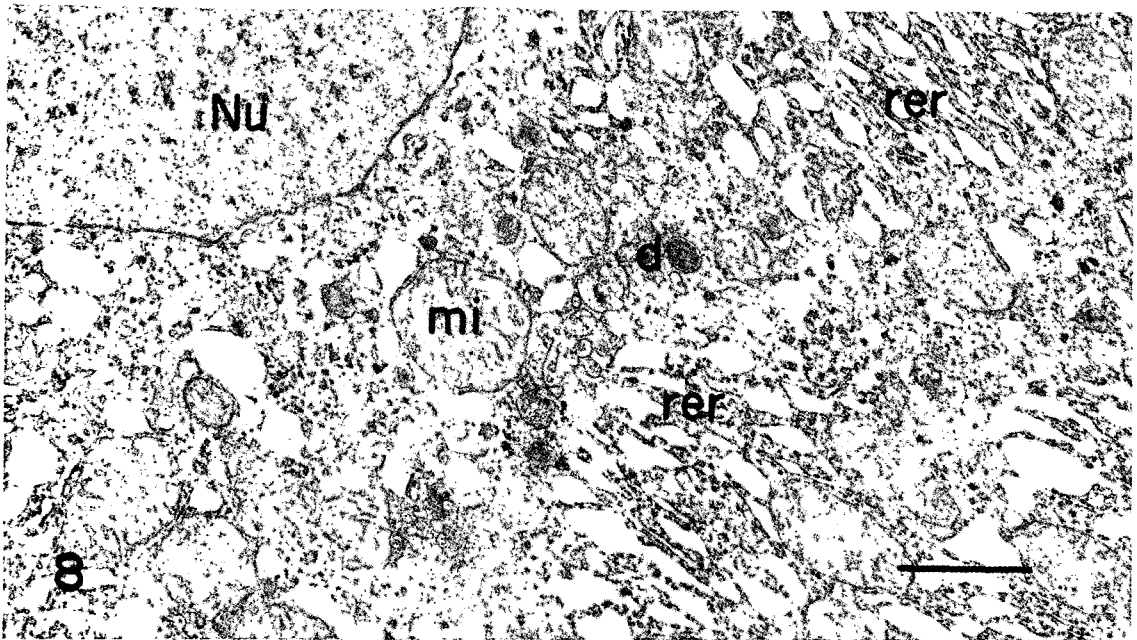


Fig. 8. Intensive changes of rough endoplasmic reticulum, disappearance of mitochondrial cristae and wrinkled mitochondrial membrane were observed (Exp. Strain No. A-49). Nu: nucleus, mi: mitochondria, rer: rough endoplasmic reticulum, d: dense body

Fig. 9. Disappearance of mitochondrial cristae and swelling of mitochondria were also noted treated with culture filtrate of Exp. Strain No. A-49. cm: cell membrane.