

# 雲芝菌絲體發酵液凍乾粉於 Spraque-Dawley 大鼠之 28 天口服重複劑量亞急毒性試驗分析

陳彥博<sup>1</sup>，莉莎<sup>1</sup>，蔡岳廷<sup>2</sup>，陳勁初<sup>1-6\*</sup>

葡萄王生技股份有限公司，桃園市<sup>1</sup>；台美檢驗科技有限公司<sup>2</sup>，新北市；台灣大學食品科技研究所，台北市<sup>3</sup>；實踐大學食品營養與保健生技學系，台北市<sup>4</sup>；彰化師範大學生物技術研究所，彰化縣<sup>5</sup>；新竹教育大學應用科學系，新竹市<sup>6</sup>，台灣

## 摘要

雲芝 (學名: ◆*Trametes versicolor*◆) 是一種療效十分顯著的藥用菇菌，在中國已有悠久的食用歷史。其經液體培養後的菌絲以熱水提取的抽出液多醣多肽 (polysaccharide krestin, PSK) 以抗腫瘤藥物的功效於 1977 年在日本核准上市，然而未純化前之雲芝菌絲體則可以保健食品方式開發。本研究目的即是依據行政院衛福部公告之健康食品安全性評估方法，利用 Spraque-Dawley 大鼠以 28 天亞急毒性試驗評估模式初步探討雲芝菌絲體發酵液凍乾粉的安全性，動物安全性試驗係以雲芝菌絲體 1、2 及 5 g/kg B.W. 3 種劑量分別連續 28 天以口服方式投予試驗物質，每日進行試驗動物的臨床觀察，且每週測量試驗動物之體重及攝食量。試驗結束後，犧牲大鼠並採集血液及臟器進行血液學分析、血清生化分析及病理學檢查。結果顯示，試驗期間所有大鼠均無出現異常之臨床症狀，各劑量組大鼠均能正常增重，而眼睛檢查結果亦顯示各組大鼠均無異常。試驗結束時之血液學檢查、血清生化檢查結果顯示各劑量組與對照組間並無明顯差異。病理解剖、肉眼病變檢查以及組織病理學檢查結果顯示，各劑量組與對照組大鼠均無明顯組織病理變化。綜合上述的發現，雲芝菌絲體發酵液凍乾粉對大鼠 28 天亞急毒性試驗無毒性顯示劑量 (NOAEL) 為大於 5 g/kg B.W.，且能提供膳食纖維。

關鍵字：雲芝、大鼠 28 天亞急性毒性試驗

## 前言

雲芝 (*Trametes versicolor*，又名 *Coriolus versicolor*)，因子實體呈叢生覆瓦狀，外觀宛如層層堆疊的雲朵，遂有雲芝這樣優雅唯美的名稱。最早日本開始測試各菌株對 Sarcoma 180 腫瘤細胞的抗腫瘤活性<sup>[1]</sup>，其中以雲芝培養菌絲體的熱水提取液 (胞內多醣) 最具開發價值，並進一步對此提取進行多項

基礎和臨床研究，終於在 1977 年五月以雲芝素或稱 PSK (polysaccharide krestin) 的名稱，以抗腫瘤藥物的功效在日本取得藥證核准上市，在 1987 年 PSK 銷售額佔日本的抗癌藥物的 25 % 以上<sup>[2]</sup>。而近年來臨床研究亦指出，雲芝多醣對各種消化器官的癌症<sup>[3, 4]</sup>、前列腺癌<sup>[5]</sup>、肺癌<sup>[6, 7]</sup>和乳癌<sup>[8-10]</sup>的病人，能改善其病症並增加存活率。美國國家健康研究院 (NIH) 也於 2010 年通過雲芝與乳癌的臨床 4 期研究，內容提及雲芝可作為乳癌患者的膳食補品。

雲芝有十分良好的提高機體免疫功能之效<sup>[11, 12]</sup>。能經由刺激 TLR-4 路徑活化 MAPK

\*通訊地址：葡萄王生技股份有限公司  
桃園縣中壢市龍岡路三段 60 號 陳勁初  
電話：(03) 4572121 ext. 234  
E-mail address：gkbioeng@grapeking.com.tw

與 NF- $\kappa$ B 達到調節小鼠 B 淋巴球功能<sup>[13-15]</sup>並使 NK 細胞、巨噬細胞吞噬功能提高，荷瘤小鼠服用雲芝多醣後，腫瘤生長跟轉移<sup>[16]</sup>可被抑制。雲芝亦對人類乳突狀病毒有強烈抑制效果<sup>[17]</sup>，臨床試驗中能有效清除口腔內 88% 病毒<sup>[18]</sup>，並能影響 HIV-1 的表面醣蛋白 gp-120 和 CD4 受體間的相互作用，並抑制反轉錄酶活性進而減輕愛滋病毒活性<sup>[19]</sup>。最近研究亦指出雲芝能改善失智症模式老鼠的記憶能力<sup>[20]</sup>，在生物體外能將 L-tyrosine 催化成 L-dopa<sup>[21]</sup>。

由於雲芝多醣之純化製備過程會降低回收率，增加成本，且純化後的多醣多肽容易吸濕受潮而較不易保存，若將含有多醣多肽的菌絲體發酵全液直接濃縮乾燥，則可多保有菌絲體纖維和其他菌體營養成分，提供膳食纖維並可降低吸濕性，而以保健食品上市銷售；藥品級的 PSK 已有安全性的臨床試驗，但過去很少有文獻探討發酵全液的安全性，故依照衛福部食品藥物管理署公告之安全性評估方法進行 28 天亞急性毒性餵食測試<sup>[22-25]</sup>。試驗結果指出本研究室所研發出的雲芝菌絲體發酵液凍乾粉具有動物安全性。

## 材料與方法

### 雲芝菌絲體凍乾粉製備

雲芝菌種來源 (BCRC-36450) 購買自財團法人食品工業發展研究所生資中心 (新竹, 台灣)。先將長好雲芝菌絲之平板，挖取大約 0.5-1.0 cm<sup>2</sup> 大小菌絲塊至 2 L 三角搖瓶中 (內含 1 L 培養基 [1.0% 蔗糖、0.5% 黃豆粉、0.5% 消化蛋白胨、0.5% 酵母萃取物 (yeast extract)]，調整至 pH 5.5)，於 25±1°C，轉速 120 rpm 下，培養 3-4 天後接入 100 L 發酵槽中 (培養基: 黃豆粉 1%、蔗糖 1%、酵母萃取物, 0.3%)，於 25±1°C，pH 4.0，轉速 60 rpm，通氣量 0.5 vvm，槽壓 1.0 kg/cm<sup>2</sup> 下，培養 3-4 天後打入 5 噸發酵槽 (培養條

件同 100 L 培養基)，培養 4 天後即可收槽，最後將發酵完成所得之菌絲體發酵液加熱至 100°C，攪拌 1 小時，以萃出多醣後，再經 55°C 減壓濃縮、冷凍乾燥、磨粉後即成為「雲芝菌絲體發酵液凍乾粉」。

### 雲芝多醣之 GFC 測定

雲芝菌絲體發酵完經離心分離菌成菌絲及上清液部分，以 0.45  $\mu$ M 過濾膜過濾其上清液，再經透析膜 (MWCO:10000) 透析 2 天成胞外多醣；而菌絲體部分先以無菌水洗過後，在覆水成原體積之懸浮液以 100°C 萃取 3 小時後，離心過濾再將此萃取液置於透析膜 (MWCO:10000)，經過兩天透析後成胞內多醣，再以 HPLC 分析。層析管柱使用體積排除管柱 phenomenox, polysep GFC-p4000，300×7.8 mm，搭配折射率偵測器 (RI detector)，動相為 100% water，流速 0.8 mL/min，總層析時間 25 分鐘。商品 Krestin (克速鎮粉劑，杏昌醫藥科技股份有限公司代理) 之製備則以粉末 1 g 加 99 g 水，121 °C 加熱 20 分鐘。並利用分子量 11,700 標準品 (Sigma-Aldrich, USA) 及分子量 5,700 標準品 (Sigma-Aldrich, USA) 之滯留時間進行相對分子量比對。

### 實驗動物和飼養

在 28 天餵食毒性試驗中，所使用之 Spraque-Dawley 品系大鼠，是購買自樂斯科生物科技股份有限公司 (宜蘭, 台灣)，試驗動物為 8 周齡，動物經觀察無異狀後先於飼育室中經過 5 天之隔離檢疫與適應後 (每籠 5 隻)，始進行試驗。動物飼養於台美檢驗科技有限公司 (Super Laboratory Co., Ltd., New Taipei city, Taiwan.) 中，並提供一個通風良好的環境及維持溫度在 22±3°C，室內相對溼度 55±15 %，每天恆定 12 小時的光照制度；每籠飼養 2 隻大鼠，使用飼料為經高壓滅菌後之 MFG (Oriental Yeast Co., Ltd, Tokyo,

Japan)，試驗期間不限食，飲水為經高壓蒸氣滅菌處理的 RO 水。墊料採用美國 Beta Chip 實驗鼠專用之木屑墊料(Northeastern Products Crop, USA)。

### 試驗設計

本試驗共設置 4 組試驗組，分別為對照組、低、中及高劑量組，每組 20 隻動物，公母鼠各半；低、中及高劑量組大鼠試驗物質投予量分別為 1 g/kg B.W. (低劑量組)、2 g/kg B.W. (中劑量組) 及 5 g/kg B.W. (高劑量組) (表 1)。

試驗期間，每天取適量試驗物質，加入逆滲透水配置所需體積，攪拌均勻後配置成適當濃度之懸浮液，以餵食針方式進行管餵。各劑量組和對照組大鼠每日管餵試驗物質或對照物質之總體積為 20 mL/kg B./W.。每隻大鼠每日所需管餵之試驗物質分兩次投予，兩次投劑之間至少間隔 1 小時。

### 血液生化值分析

28 天連續餵食試驗完成後，試驗動物於犧牲前經隔夜禁食，以心臟採血實施血液學檢查。血液置於有 EDTA 的抗凝血管中，於室溫下混和均勻，以全自動血球分析儀 (XE-1800, Sysmex) 來測定。檢測項目包括 WBC (白血球計數)、RBC (紅血球計數)、Hematocrit (血球容積比)、Hemoglobin (血紅素量)、MCV (平均紅血球容積)、MCH (平均紅血球血紅素量)、MCHC (平均紅

血球血紅素濃度)、Platelet (血小板)、neutrophil (嗜中性球)、lymphocyte (淋巴球)、monocyte (單核球)、eosinophil (嗜酸性球) 及 basophil (嗜鹼性球)。另以抗凝血管收集血液並以全自動血液凝固分析儀 (CA-1500, Sysmex) 檢測凝血酶原時間(prothrombin time)。

### 血清生化值分析

28 天連續餵食試驗完成後，試驗動物於犧牲前經隔夜禁食，利用心臟採血所得之血液靜置凝固後，離心分離血清，以血清生化自動分析儀(7070 Autoanalyzer, Hitachi)檢測常規項目，包括天門冬胺酸轉胺酶(AST; aspartate aminotransferase)、丙胺酸轉胺酶(ALT; alanine aminotransferase)、鹼性磷酸酶(ALP; Alkaline Phosphatase)、總膽紅素(total bilirubin)、血總蛋白質(total protein)、白蛋白(Albumin)、球蛋白(Globulin)、血中尿素氮(BUN; blood urea nitrogen)、肌酸酐(creatinine)、膽固醇(cholesterol)、三酸甘油酯(triglyceride)、葡萄糖(glucose)、鈉離子(sodium)、鉀離子(potassium)、鈣離子(calcium)、氯離子(chloride)及磷離子(phosphorus)。

### 組織病理檢查

試驗動物犧牲後，肉眼觀察其器官與組織，並進行組織病理檢驗，以了解毒性變化的嚴重程度。摘取腎上腺、脾臟、心臟、腎臟、肝臟、卵巢/睪丸等器官，以福馬林保存。

表 1. 28 天亞急性毒性試驗動物分組

動物組別	管餵物質	劑量 (g/kg)	投予體積 (mL/kg)	動物數量	
				公鼠	母鼠
對照組	逆滲透水	-	20	10	10
低劑量組	雲芝菌絲體發酵液凍乾粉	1	20	10	10
中劑量組		2	20	10	10
高劑量組		5	20	10	10

對各臟器秤重並記錄其重量，以計算臟器相對重量比率(%) (臟器重量/體重×100%)。組織病理檢查將各組大鼠由 10%福馬林處理之器官，經脫水、澄清、石蠟包埋後，再以石蠟組織切片機切成 5 $\mu$ m 厚度之組織切片。以光學顯微鏡觀察 H&E (Hematoxylin and Eosin stain)染色切片標本並分析各臟器之組織病理變化。

### 統計分析

實驗結果數據以平均值(Mean) $\pm$ 標準差(SD)來表示。試驗數據依以單向變異數分析 one-way ANOVA 及 Duncan's multiple range test<sup>[25]</sup>來決定多組間差異。若  $p < 0.05$  則視為具有統計上的顯著差異。

## 結 果

### 雲芝多醣分子量

雲芝胞內、外多醣及 krestin 分子量以 HPLC 分析，krestin 為經純化過之多醣多肽，分子量約 9.4 萬，滯留時間為 6.7 分鐘。本文製備之胞內多醣與 krestin 在滯留時間 6.7 分鐘有最高之波峰，其後有 4 個較低的波峰，經與標準品比對其分子量約為 10 萬~5700 及 <5700。因其分子量較小，可能在 krestin 製備時未能被硫酸銨析出。胞外多醣在 6.7 分鐘處亦有波峰，但相對較低，其後亦有 4 個波峰（圖表資料未顯示）。

### 臨床症狀觀察

試驗期間，每天觀察試驗動物的臨床症狀 2 次，紀錄試驗動物顯示的毒性症狀，餵食試驗物質後各組動物均存活，毛髮色澤也沒有明顯地變化，活動、飲食皆正常，呼吸、鼻、眼及口腔亦無異常分泌物。

### 體重與攝食量

各餵食試驗組大鼠與母鼠平均體重如圖

1 所示，結果顯示，除試驗第 1 週高劑量組大鼠體重明顯低於對照組外( $p < 0.05$ )，其餘時間各劑量組大鼠與對照組相比，體重增加的幅度並無顯著差異( $p > 0.05$ )。

同時觀察各試驗組間對飼料的消耗量如圖 2 所示，結果顯示，除試驗第 1 週高劑量組大鼠攝食量明顯低於對照組外( $p < 0.05$ )，其餘時間各劑量組大鼠攝食量與對照組相比無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。母鼠方面，除試驗第 4 週中劑量組母鼠攝食量明顯高於對照組外( $p < 0.05$ )，其餘時間各劑量組母鼠攝食量與對照組相比無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。

### 病理與血液生化值分析

連續餵養 28 天後，逐隻秤重，取心臟採血進行血液學、生化學、電解質檢查。犧牲後解剖觀察無明顯病變。取肝、腎、脾、心、等臟器進行秤重。試驗結果如表 2 顯示，各劑量組大鼠或母鼠臟器絕對重量與對照組均無明顯差異( $p > 0.05$ )。進一步分析臟器/體重比率，結果如表 3 所示，除大鼠低劑量組腎上腺相對重量低於對照組外( $p < 0.05$ )，其餘臟器各劑量組與對照組相比無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。

餵食試驗完成後，各組動物以心臟採血實施血液生化值檢查。檢測結果如表 4 所示，大鼠高劑量組 monocyte 含量 3.3% 明顯低於對照組( $p < 0.05$ )，而在大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性臨床歷史數據顯示，monocyte 正常參考值落在 1.1~5.7%<sup>[26]</sup>，故高劑量組大鼠 monocyte 位於正常範圍內。其餘項目各劑量組與對照組相比均無顯著差異( $p > 0.05$ )。在母鼠方面，各劑量組與對照組相比均無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。

另外，血清生化學檢測結果如表 5 所示，低劑量母鼠 glucose (107.2 $\pm$ 17.2 mg/dL)及 globulin (1.9 $\pm$ 0.3 g/dL)、中劑量母鼠 glucose (116.2 $\pm$ 30.0 mg/dL)及 globulin (1.9 $\pm$ 0.3 g/dL)

均明顯低於對照組( $p < 0.05$ )，而在大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性臨床歷史數據顯示，Glucose 正常參考值落在 95~175 mg/dL<sup>[27]</sup>，故中、低劑量組母鼠 glucose 位於正常範圍內；而 globulin 正常參考值落在 2.0~4.5 g/dL<sup>[27]</sup>，其數值與正常參考值相距不大，且在高劑量組又與對照組無差異，亦即未呈現劑量相關性，因此推斷並非試驗物質所引發的毒物反應。其餘項目各劑量組與對照組相比均無顯著差異( $p > 0.05$ )。公鼠則在各劑量組與對照組相比均無顯著差異( $p > 0.05$ )。

### 組織病理分析

28 天餵食試驗結束後肉眼觀察其器官組織，並進行組織病理切片檢驗，其組織切片以 H&E 染色後的結果顯示高劑量組試驗動物與對照組的組織學分析並沒有明顯變化（圖 3），顯示試驗物質並不會造成試驗動物各器官組織產生病變。進一步針對非特異性病理解讀（表 6）。結果顯示部分試驗動物心臟、腎臟及肝臟出現局部單核炎症細胞浸潤、肝臟出現多發性脂肪滴浸潤及局部壞死現象，腎臟腎小管再生等病變。以上病變於對照組與高劑量組病變程度及發生率並無正相關性，

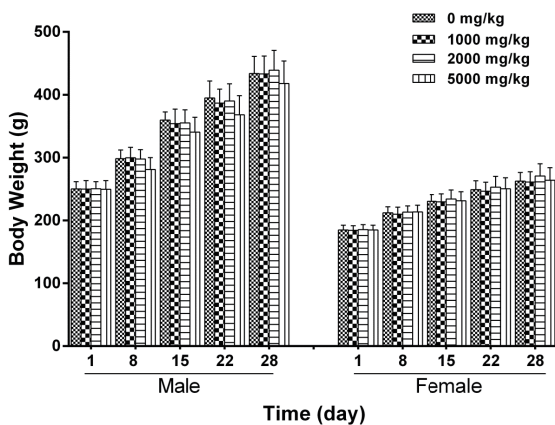


圖 1. 28 天亞急性毒性試驗中受試大鼠的體重變化（增加）量。數據皆以平均值±標準差 (mean ± SD) 呈現，n = 10。

為非特異性病變，與試驗物質無關。

### 討論

本次試驗結果顯示，試驗期間各劑量組或對照組大鼠均無顯現任何臨床異常症狀。而高劑量公鼠的體重，從第 8 天起呈現較輕的情況，且一直持續到第 28 天（圖 1），雖然未達統計上的差異，但有增重較為遲緩的傾向。此可能與攝食量有關，高劑量的雲芝菌絲體因含有大量的菌絲體纖維，不易消化，故有降低動物攝食量的情形，此現象在圖 2 中獲得支持，在母鼠方面，在第 1 周三劑量組皆有攝食偏低趨勢，但未達統計上之顯著差異，但在往後 3 周攝食量逐漸增加，甚至在第 4 周更為明顯，而反映在圖 1 之體重部份，則未見其差異。

試驗結束後，各大鼠經犧牲後解剖觀察，各劑量組與對照組大鼠之心臟、肝臟、脾臟、腎臟、腦及生殖系統等器官，均未發現與試驗物質有關之病變。但在母鼠的脾臟重量發現有增加趨勢，且有劑量效應（表 2）；而在公鼠亦發現其脾臟重量隨試驗物質劑量增

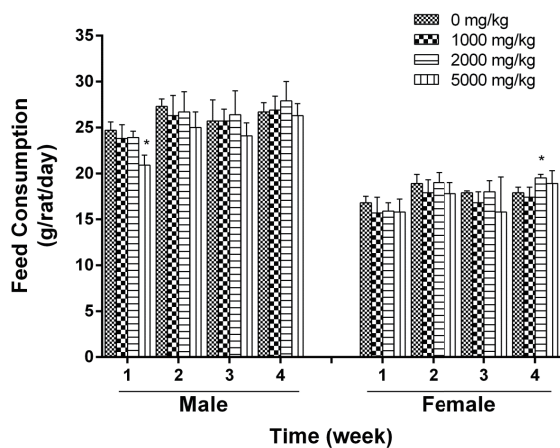


圖 2. 大鼠 28 天亞急性毒性試驗中受試各籠動物攝食變化量。數據皆以平均值±標準差 (mean ± SD) 呈現，n = 5（五籠動物，每籠飼養兩隻大鼠，共 10 隻大鼠）。\*與對照組比較具有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

表 2. 大鼠 28 天亞急毒性試驗中動物的主要臟器重量

Weight (g)	Control (Distilled water)	<i>Trametes versicolor</i> (g/kg)					
		1 g/kg		2 g/kg		5 g/kg	
<b>Male</b>							
Adrenal Glands	0.062 ± 0.007	0.056 ± 0.008	0.057 ± 0.006	0.064 ± 0.009			
Brain	2.11 ± 0.07	2.17 ± 0.07	2.08 ± 0.07	2.06 ± 0.08			
Heart	1.58 ± 0.13	1.60 ± 0.18	1.64 ± 0.20	1.50 ± 0.15			
Kidney	3.36 ± 0.25	3.34 ± 0.34	3.44 ± 0.27	3.29 ± 0.30			
Liver	13.0 ± 1.2	13.4 ± 1.9	13.2 ± 1.7	12.6 ± 1.6			
Spleen	0.814 ± 0.107	0.801 ± 0.139	0.769 ± 0.153	0.761 ± 0.097			
Testes	3.35 ± 0.27	3.23 ± 0.22	3.22 ± 0.36	3.27 ± 0.27			
<b>Female</b>							
Adrenal Glands	0.086 ± 0.019	0.083 ± 0.01	0.09 ± 0.008	0.082 ± 0.012			
Brain	1.89 ± 0.09	1.90 ± 0.04	1.90 ± 0.06	1.87 ± 0.08			
Heart	0.982 ± 0.053	0.975 ± 0.094	0.986 ± 0.087	0.957 ± 0.099			
Kidney	2.11 ± 0.09	1.98 ± 0.16	2.20 ± 0.22	2.08 ± 0.23			
Liver	8.63 ± 0.74	8.08 ± 0.45	8.71 ± 0.88	8.38 ± 0.98			
Spleen	0.508 ± 0.09	0.518 ± 0.091	0.549 ± 0.099	0.549 ± 0.12			
Ovary	0.086 ± 0.019	0.083 ± 0.01	0.09 ± 0.008	0.082 ± 0.012			

數據皆以平均值±標準差(mean ± SD)呈現，n =10。

表 3. 大鼠 28 天亞急毒性試驗中動物主要臟器相對體重比值

Relative weight (%)	Control (Distilled water)	<i>Trametes versicolor</i> (g/kg)					
		1 g/kg		2 g/kg		5 g/kg	
<b>Male</b>							
Adrenal Glands	0.016 ± 0.002	0.014 ± 0.002*	0.014 ± 0.001	0.017 ± 0.002			
Brain	0.535 ± 0.026	0.557 ± 0.029	0.529 ± 0.033	0.552 ± 0.042			
Heart	0.40 ± 0.025	0.41 ± 0.033	0.415 ± 0.030	0.40 ± 0.021			
Kidney	0.853 ± 0.055	0.855 ± 0.064	0.874 ± 0.059	0.880 ± 0.056			
Liver	3.30 ± 0.22	3.43 ± 0.39	3.35 ± 0.23	3.35 ± 0.18			
Spleen	0.206 ± 0.02	0.204 ± 0.207	0.194 ± 0.029	0.203 ± 0.016			
Testes	0.850 ± 0.071	0.830 ± 0.07	0.818 ± 0.096	0.878 ± 0.091			
<b>Female</b>							
Adrenal Glands	0.029 ± 0.004	0.030 ± 0.005	0.031 ± 0.007	0.030 ± 0.006			
Brain	0.801 ± 0.050	0.807 ± 0.047	0.782 ± 0.055	0.793 ± 0.066			
Heart	0.415 ± 0.025	0.412 ± 0.026	0.405 ± 0.026	0.404 ± 0.023			
Kidney	0.894 ± 0.041	0.838 ± 0.056	0.904 ± 0.080	0.882 ± 0.068			
Liver	3.56 ± 0.3	3.42 ± 0.15	3.57 ± 0.1	3.54 ± 0.2			
Spleen	0.215 ± 0.041	0.219 ± 0.036	0.227 ± 0.046	0.232 ± 0.049			
Ovary	0.036 ± 0.007	0.035 ± 0.004	0.037 ± 0.004	0.035 ± 0.006			

數據皆以平均值±標準差(mean ± SD)呈現，n =10。

\*與對照組比較具有顯著差異(p<0.05)。

表 4. 大鼠 28 天亞急毒性試驗中動物血液生化值分析

Parameters	Control (Distilled water)		<i>Trametes versicolor</i> (g/kg)					
			1 g/kg		2 g/kg		5 g/kg	
<b>Male</b>								
White blood cell ( $10^3/\mu\text{L}$ )	13.6	± 4.2	15.3	± 1.3	14.0	± 2.5	14.9	± 4.4
Red blood cell ( $10^6/\mu\text{L}$ )	9.0	± 0.5	9.1	± 0.3	9.1	± 0.6	8.2	± 0.6
Hemoglobin (g/dL)	16.9	± 0.5	16.7	± 0.4	16.7	± 0.6	16.4	± 0.8
Hematocrit (%)	50.8	± 1.8	50.2	± 1.4	50.1	± 1.5	46.9	± 2.2
MCV (fL)	56.4	± 3.3	55.4	± 1.8	55.4	± 2.5	56.3	± 2.2
MCH (pg)	18.8	± 0.8	18.4	± 0.6	18.5	± 0.7	18.7	± 0.6
MCHC (g/dL)	33.3	± 0.7	33.2	± 0.3	33.4	± 0.6	33.2	± 0.7
Platelet ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1045.4	± 230.6	1173.4	± 174.3	1083.6	± 150.8	974.2	± 344.3
Neutrophil (%)	14.4	± 3.1	18.4	± 6.2	18.7	± 2.3	18.1	± 5.8
Lymphocyte (%)	79.6	± 4.0	75.8	± 6.9	75.7	± 2.2	77.6	± 6.1
Monocyte (%)	4.7	± 1.3	4.5	± 0.9	4.2	± 0.8	3.3	± 0.7*
Eosinophil (%)	1.1	± 0.3	1.2	± 0.4	1.3	± 0.4	0.9	± 0.2
Basophil (%)	0.2	± 0.1	0.2	± 0.1	0.2	± 0.1	0.1	± 0.1
Reticulocyte (%)	3.1	± 0.8	2.7	± 0.7	3.6	± 1.0	3.6	± 0.8
Prothrombin time (sec)	14.7	± 2.0	16.0	± 4.5	14.5	± 2.1	13.8	± 2.0
<b>Female</b>								
White blood cell ( $10^3/\mu\text{L}$ )	11.8	± 2.7	9.4	± 3.8	9.7	± 2.2	10.2	± 2.8
Red blood cell ( $10^6/\mu\text{L}$ )	8.50	± 0.4	8.93	± 0.5	8.60	± 0.3	8.90	± 0.4
Hemoglobin (g/dL)	15.9	± 0.7	16.2	± 0.6	15.7	± 0.3	16.2	± 0.7
Hematocrit (%)	46.9	± 1.9	47.9	± 1.9	46.9	± 1.14	7.7	± 2.1
MCV (fL)	55.0	± 1.6	53.8	± 1.9	54.7	± 1.7	53.5	± 2.0
MCH (pg)	18.6	± 0.5	18.1	± 0.5	18.3	± 0.5	18.2	± 0.7
MCHC (g/dL)	33.9	± 0.4	33.7	± 0.7	33.5	± 0.3	34.0	± 0.4
Platelet ( $10^3/\mu\text{L}$ )	1081.5	± 171.9	1072.9	± 133.5	1052.6	± 110.9	1131.8	± 112.6
Neutrophil (%)	14.9	± 5.1	14.7	± 3.7	16.5	± 4.8	16.2	± 4.3
Lymphocyte (%)	80.0	± 5.3	79.6	± 4.9	77.7	± 5.9	77.3	± 5.2
Monocyte (%)	3.9	± 0.6	4.4	± 1.6	4.3	± 1.3	4.7	± 1.5
Eosinophil (%)	1.1	± 0.3	1.2	± 0.5	1.3	± 0.6	1.6	± 0.4
Basophil (%)	0.2	± 0.1	0.2	± 0.1	0.2	± 0.1	0.2	± 0.1
Reticulocyte (%)	2.3	± 0.5	2.5	± 0.8	3.0	± 1.1	3.2	± 1.2
Prothrombin time (sec)	10.0	± 0.3	10.0	± 0.2	10.0	± 0.3	10.1	± 0.2

MCV: Mean corpuscular volume ; MCH: Mean corpuscular hemoglobin ; MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration 。

數據皆以平均值±標準差(mean ± SD)呈現，n=10。

\*與對照組比較具有顯著差異(p<0.05)。

表 5. 大鼠 28 天亞急性毒性試驗中動物血清生化值分析

Parameters	Control (Distilled water)	<i>Trametes versicolor</i> (g/kg)		
		1 g/kg	2 g/kg	5 g/kg
<b>Male</b>				
Glucose (mg/dL)	189.8 ± 39.9	198.4 ± 23.4	200 ± 29.9	195.7 ± 40.6
Blood urea nitrogen (mg/dL)	13.3 ± 1.8	12.7 ± 1.7	12.7 ± 1	12.4 ± 1.7
Creatinine (mg/dL)	0.64 ± 0.05	0.65 ± 0.05	0.65 ± 0.05	0.65 ± 0.05
Aspartate aminotransferase (U/L)	110.4 ± 15.7	125.9 ± 26.9	129.1 ± 54.5	113.7 ± 28.4
Alanine aminotransferase (U/L)	37.5 ± 4.9	47.5 ± 15.3	47.5 ± 23.1	41.6 ± 11.3
Total protein (g/dL)	6.3 ± 0.4	6.4 ± 0.2	6.0 ± 1.4	6.4 ± 0.4
Albumin (g/dL)	4.4 ± 0.3	4.4 ± 0.3	4.4 ± 0.2	4.5 ± 0.2
Alkaline phosphatase (U/L)	161.9 ± 24.8	173.7 ± 22.1	187.7 ± 29.5	171.2 ± 25.4
Cholesterol (mg/dL)	67.8 ± 7.3	77.6 ± 16.7	71.2 ± 12.2	68.3 ± 11.5
Triglyceride (mg/dL)	63.2 ± 32.2	42.6 ± 13.6	49.2 ± 35.8	37.6 ± 25.5
Calcium (mg/dL)	11.5 ± 0.6	11.7 ± 0.3	11.7 ± 0.2	11.6 ± 0.4
Phosphorus (mg/dL)	11.2 ± 1.0	11.4 ± 0.9	11.4 ± 1.1	10.6 ± 0.7
Sodium (mmol/L)	146 ± 5.3	143.3 ± 2.8	143.8 ± 3.3	143.7 ± 5.3
Potassium (mmol/L)	6.2 ± 0.7	7.0 ± 1.2	6.5 ± 1.3	6.4 ± 0.8
Chloride (mmol/L)	96.7 ± 3.6	96.5 ± 1.9	96.2 ± 2.1	96.1 ± 4.3
Globulin (g/dL)	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.3	2.0 ± 0.2	1.9 ± 0.3
Total bilirubin (µg/dL)	0.003 ± 0.002	0.003 ± 0.003	0.003 ± 0.001	0.004 ± 0.002
<b>Female</b>				
Glucose (mg/dL)	144.5 ± 33.1	107.2 ± 17.2*	116.2 ± 30.0*	123.5 ± 28.6
Blood urea nitrogen (mg/dL)	13.7 ± 2.9	11.9 ± 2.1	12.8 ± 2.6	13.6 ± 2.3
Creatinine (mg/dL)	0.66 ± 0.07	0.61 ± 0.07	0.63 ± 0.07	0.65 ± 0.07
Aspartate aminotransferase (U/L)	105.0 ± 22.0	82.2 ± 14.7	100.7 ± 37.8	109.8 ± 39.3
Alanine aminotransferase (U/L)	29.8 ± 5.9	24.5 ± 3.8	29.0 ± 11.2	28.3 ± 7.1
Total protein (g/dL)	6.9 ± 0.6	6.4 ± 0.7	6.4 ± 0.9	6.9 ± 0.7
Albumin (g/dL)	4.8 ± 0.5	4.6 ± 0.5	4.5 ± 0.5	4.7 ± 0.6
Alkaline phosphatase (U/L)	70.7 ± 12.6	66.5 ± 29.1	59.4 ± 13.7	83.4 ± 15.5
Cholesterol (mg/dL)	79.4 ± 17.1	78.4 ± 17.9	76.6 ± 16.5	89.1 ± 16.8
Triglyceride (mg/dL)	30.9 ± 12.5	31.5 ± 6.2	28.6 ± 10.5	21.3 ± 4.3
Calcium (mg/dL)	11.2 ± 0.9	10.6 ± 1.2	10.8 ± 1.1	11.6 ± 1.1
Phosphorus (mg/dL)	10.3 ± 1.1	9.6 ± 1.4	9.9 ± 1.9	10.5 ± 1.0
Sodium (mmol/L)	146.4 ± 2.0	145.7 ± 2.5	144.7 ± 4.5	145.2 ± 2.5
Potassium (mmol/L)	7.6 ± 1.1	7.5 ± 0.8	7.5 ± 1.1	7.2 ± 1.0
Chloride (mmol/L)	99.3 ± 1.3	99.1 ± 1.9	98.7 ± 2.3	97.9 ± 1.9
Globulin (g/dL)	2.1 ± 0.2	1.9 ± 0.3*	1.9 ± 0.3*	2.2 ± 0.2
Total bilirubin (µg/dL)	0.010 ± 0.005	0.009 ± 0.003	0.007 ± 0.003	0.007 ± 0.003

數據皆以平均值±標準差(mean ± SD)呈現，n=10。

\*與對照組比較具有顯著差異(p<0.05)。



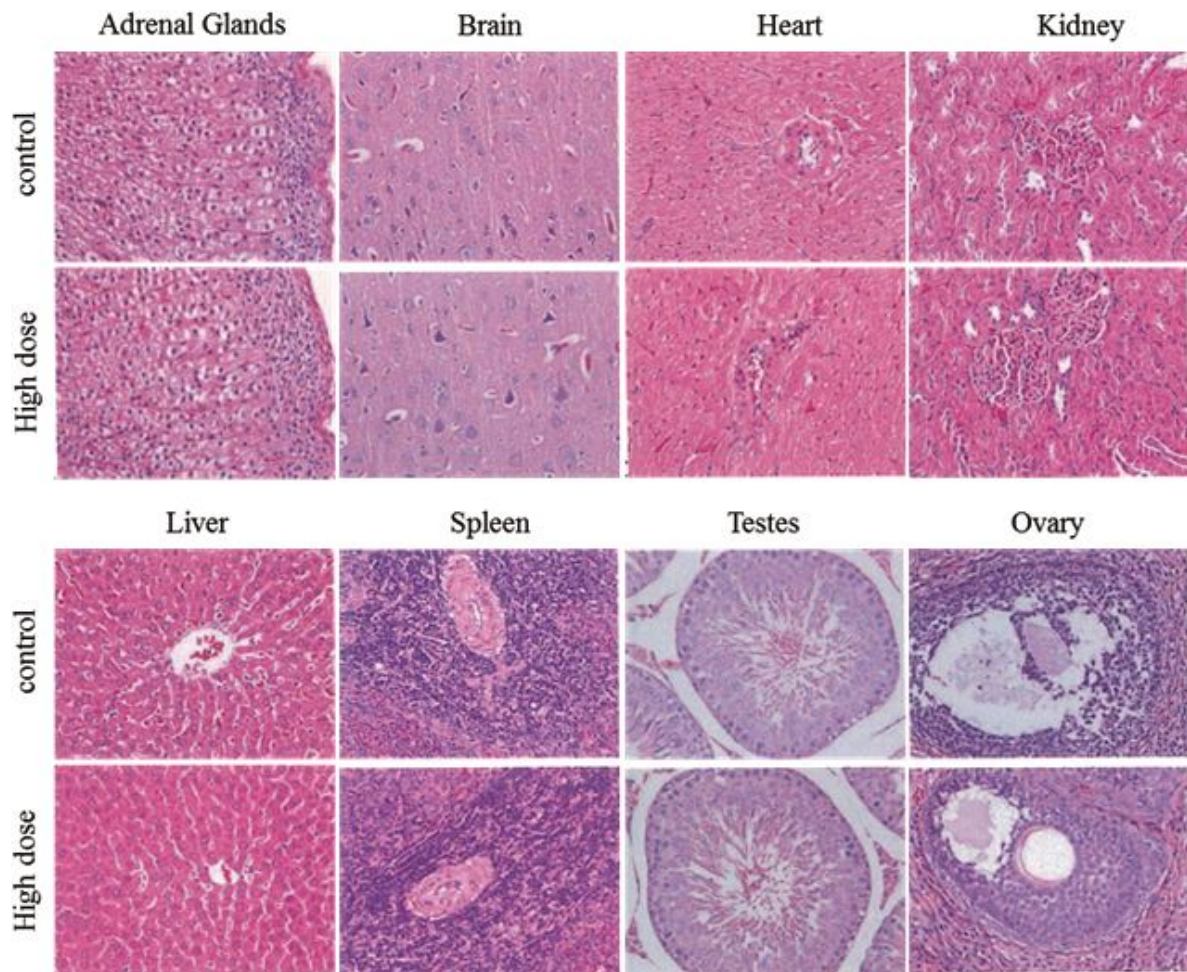


圖 3. 亞急毒性試驗中受試動物組織病理切片。圖為對照組或高劑量組大鼠，組織切片以 H&E 染色進行觀察(400x)。

加而有減少的趨勢，顯示脾臟重量改變並非試驗物質所造成。血清生化檢驗結果顯示，不論公或母鼠，其三酸甘油酯數值，皆隨劑量呈現下降的趨勢，可見雲芝菌絲體的發酵全液可保有菌絲體纖維並提供膳食纖維，能使動物增加膳食纖維攝取進而減少三酸甘油酯的吸收。

綜合以上結果，試驗物質雲芝菌絲體發酵液凍乾粉對大鼠 28 天重複劑量亞急毒性試驗無毒性顯示劑量(NOAEL)為大於 5 g/kg B.W.，且能提供膳食纖維，而具有作為保健食品的潛力。

表 6. 大鼠 28 天亞急性毒性試驗中動物組織病理學的評估

器 官	損傷 <sup>a</sup>	雄		雌	
		對照組	高劑量組	對照組	高劑量組
Adrenal Glands		-	-	-	-
Brain		-	-	-	-
Heart	局部單核炎症細胞浸潤，極微至輕微	2/10 <sup>b</sup>	-	-	1/10
Kidney	局部單核炎症細胞浸潤，極微	-	1/10	-	-
	局部、腎小管再生，極微	-	1/10	-	-
Liver	多發性脂肪滴浸潤，輕微	-	-	1/10	1/10
	局部壞死，輕微	-	-	-	1/10
Spleen		-	-	-	-
Ovary		N	N	-	-
Testes		-	-	N	N

- 無影響

<sup>a</sup> 損傷端視嚴重程度分為 1-5 級：極微 (<1%); 輕微 (1-25%); 中度 (26-50%); 中度至嚴重 (51-75%); 嚴重至極為嚴重 (76-100%)。

<sup>b</sup> 發生率：受影響動物隻數/每組受試動物隻數 (n=10)。

### 參考文獻

1. Fujita H, Ogawa K, Ikuzawa M *et al.* Effect of psk, a protein-bound polysaccharide from *Coriolus versicolor*, on drug-metabolizing enzymes in sarcoma-180 bearing and normal mice. *Internat J Immunopharmacol* 1988; 10: 445-50.
2. Kobayashi Y, Kariya K, Saigenji K, Nakamura K. Enhancement of anti-cancer activity of cisdiamined-ichloroplatinum by the protein-bound polysaccharide of coriolus versicolor quel (ps-k) *in vitro*. *Cancer biother* 1994; 9: 351-8.
3. Dong Y, Kwan CY, Chen ZN, Yang MM. Antitumor effects of a refined polysaccharide peptide fraction isolated from *Coriolus versicolor*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1996; 92: 140-8.
4. Eliza WL, Fai CK, Chung LP. Efficacy of yun zhi (*Coriolus versicolor*) on survival in cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Recent Patent Inflamm Allergy Drug Disco* 2012; 6:78-87.
5. Hsieh TC, Wu JM. Cell growth and gene modulatory activities of yunzhi (*Windsor wunxi*) from mushroom *Trametes versicolor* in androgen-dependent and androgen-insensitive human prostate cancer cells. *Internat J Oncol* 2001; 18:81-8.
6. Fritz H, Kennedy DA, Ishii M *et al.* Polysaccharide k and *Coriolus versicolor* extracts for lung cancer: A systematic review. *Integrat Cancer Ther* 2015; 14: 201-11.
7. Tsang KW, Lam CL, Yan C *et al.* *Coriolus versicolor* polysaccharide peptide slows progression of advanced non-small cell lung cancer. *Resp Med* 2003; 97: 618-24.
8. Torkelson CJ, Sweet E, Martzen MR *et al.* Phase 1 clinical trial of *Trametes versicolor* in women with breast cancer. *ISRN Oncol* 2012:251632.
9. Standish LJ, Wenner CA, Sweet ES *et al.* *Trametes versicolor* mushroom immune therapy in breast cancer. *J Soc Integ Oncol* 2008; 6:122-28.
10. Ho CY, Kim CF, Leung KN *et al.* Differential anti-tumor activity of *Coriolus versicolor* (yunzhi) extract through p53- and/or bcl-2-dependent apoptotic pathway in human breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2005; 4:638-44.
11. Chu KK, Ho SS, Chow AH. *Coriolus versicolor*: A medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values. *J Clin Pharm* 2002; 42:976-84.
12. Li F, Wen H, Zhang Y, Aa M, Liu X. Purification and characterization of a novel immunomodulatory protein from the medicinal mushroom *Trametes versicolor*. *Sci China Life Sci* 2011; 54:379-85.
13. Yang SF, Zhuang TF, Si YM, Qi KY, Zhao J. *Coriolus*

- versicolor* mushroom polysaccharides exert immunoregulatory effects on mouse b cells via membrane ig and tlr-4 to activate the mapk and nf-kappab signaling pathways. *Mol Immunol* 2015; 64:144-51.
14. Wang HX, Ng TB, Liu WK, Ooi VE, Chang ST. Polysaccharide-peptide complexes from the cultured mycelia of the mushroom *Coriolus versicolor* and their culture medium activate mouse lymphocytes and macrophages. *Internat J Biochem Cell Biol* 1996; 28:601-7.
  15. Kuan YC, Wu YJ, Hung CL, Sheu F. *Trametes versicolor* protein yzp activates regulatory b lymphocytes - gene identification through *de novo* assembly and function analysis in a murine acute colitis model. *PloS one* 2013; 8:e72422.
  16. Luo KW, Yue GG, Ko CH *et al.* *In vivo* and *in vitro* anti-tumor and anti-metastasis effects of *Coriolus versicolor* aqueous extract on mouse mammary 4t1 carcinoma. *Phytomedicine: Internat J Phytother Phytopharm* 2014; 21:1078-87.
  17. Bogdanova J. *Coriolus versicolor* innovation in prevention of oncogynecological diseases, especially hpv. *Akusherstvo I Ginekol* 2008; 47 Suppl 3:51-3.
  18. Donatini B. Control of oral human papillomavirus (hpv) by medicinal mushrooms, *Trametes versicolor* and *Ganoderma lucidum*: a preliminary clinical trial. *Intern J Med Mushroom* 2014; 16:497-8.
  19. Collins RA, Ng TB. Polysaccharopeptide from *Coriolus versicolor* has potential for use against human immunodeficiency virus type 1 infection. *Life Sci* 1997; 60: PL383-87.
  20. Fang X, Jiang Y, Ji H ◆et al◆. The synergistic beneficial effects of ginkgo flavonoid and ◆*Coriolus versicolor*◆ polysaccharide for memory improvements in a mouse model of dementia. *Evidence-based Complement Altern Med: eCAM*; 2015: 128394.
  21. Ali S, Rizvi N. Microbiological transformation of l-tyrosine to l-dopa from methanol pretreated biomass of a novel ◆*Coriolus versicolor*◆ under submerged culture. *Appl Biochem Biotech* 2014; 172:2041-54.
  22. Japan Pharmaceuticals and Cosmetics Division. Japanese guidelines for nonclinical studies of drugs manual. Yakuji Nippo 1995.
  23. OECD. Test No. 401: Guideline for the testing of chemicals. 1987. OECD
  24. 中華民國行政院衛生福利部. 健康食品安全評估方法. 1999.
  25. OECD. Test No. 407: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. 2001. OECD
  26. Petterino C, Argentino-Storino A. Clinical chemistry and haematology historical data in control sprague-dawley rats from pre-clinical toxicity studies. *Experimental and toxicologic pathology: Off J Gesellschaft fur Toxikol Pathol* 2006; 57:213-9.
  27. Levine BS. Animal clinical pathology. *Handbook of Toxicology* Edited by Michael J Derelanko and Manfred A Hollinger. 2001; 18:747-74. CRC Press LLC, Florida, USA.

## Evaluation of the toxicological safety of *Trametes versicolor* mycelium in a 28-day oral feeding study in SD rats

Yen-Po Chen<sup>1</sup>, Lee-Sar Sheng<sup>1</sup>, Yueh-Ting Tsai<sup>2</sup>, Chin-Chu Chen<sup>1,3,4,5,6\*</sup>

*Bioengineering Center of Grape King Bio Ltd., Taoyuan city<sup>1</sup>; Super Laboratory Co., Ltd., New Taipei city<sup>2</sup>;*

*Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei city<sup>3</sup>;*

*Department of Food Science, Nutrition, and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei city<sup>4</sup>;*

*Institute of Biotechnology, National Changhua University of Education, Changhua city<sup>5</sup>;*

*Department of Applied Science, National Hsin-Chu University of Education, Hsin-Chu city<sup>6</sup>; Taiwan*

### Abstract

*Trametes versicolor*, an ideal culinary-medicinal mushroom, has a long history of medicinal usage in China. In particular, hot water extracted polysaccharopeptide Krestin (PSK) from these mushrooms was approved for use in Japan in 1977 and ranked as the world's most commercially successful anti-cancer drug. In addition to clinically tested PSK, there is potential in developing extract preparations of *T. versicolor* as an ingredient in functional foods. This study was conducted to assess the 28-day repeated oral administration of *T. versicolor* mycelium according to the safety assessment guideline of Health Food promulgated by Department of Health, Executive Yuan of Taiwan. Three doses of 1,000 (low), 2,000 (intermediate) and 5,000 (high) mg/kg body weight/day were administered to the rats for 28 consecutive days by oral gavage. The clinical observation and the body weight as well as feed intake of the rats were carried out daily and recorded weekly, respectively. At the end of the stipulated

experimental period, all animals were autopsied and observed in parameters such as hematology, clinical biochemistry and histopathological examination. Results indicated that all rats in the treatment and control group did not show any abnormal clinical signs during the study period. All rats gained weight normally and no abnormality was founded during the ophthalmological examination. There were no significant differences of the urinalysis, hematology and clinical biochemistry parameters between the treatment and control group. Necropsy and histopathological examination indicated that no treatment-related change was found. Based on the above findings, we may conclude that the NOAEL of the toxicological safety of *Trametes versicolor* mycelium in a 28-day oral feeding study in SD rats is > 5 g/kg B.W.

**Keywords:** *Trametes versicolor*, 28-day oral feeding study in SD rats