

## 蝙蝠蛾擬青霉(*Paecilomyces hepiali*)菌絲體發酵液 之基因毒性及急性毒性探討

吳思穎<sup>1</sup>，葉淑幸<sup>1</sup>，蔡岳廷<sup>2</sup>，洪鳴遠<sup>3</sup>，高均瑋<sup>3</sup>，郭家芬<sup>4</sup>，陳勁初<sup>1,4,5\*</sup>

葡萄王生技股份有限公司，桃園縣<sup>1</sup>；台美檢驗科技有限公司，新北市<sup>2</sup>；  
財團法人食品工業發展研究所，新竹市<sup>3</sup>；實踐大學食品營養與保健生技學系，台北市<sup>4</sup>；  
新竹教育大學應用科學系，新竹市<sup>5</sup>，台灣

### 摘要

蝙蝠蛾擬青霉 (*Paecilomyces hepiali*) 為中藥材冬蟲夏草 [*Ophiocordyceps sinensis* (Berk.)] 中分離出之伴生菌，根據研究顯示其具有諸多生理活性，因此可作為優良的保健食品素材。本研究使用蝙蝠蛾擬青霉菌絲體發酵液凍乾粉作為試驗物質，進行三項基因毒性及小鼠口服急性毒性試驗，以評估其安全性。結果顯示，於沙門氏菌回復突變試驗、體外哺乳類細胞染色體結構異常試驗及嚙齒類週邊血液微核試驗基因毒性試驗中，分別在劑量 5.0 mg/plate、5.0 mg/mL 及 5.0 g/kg·bw 以下，皆未發現與試驗物質相關之異常；而單一劑量口服急性毒性試驗也未觀察到血清生化值異常以及任何臨床病變，顯示其 LD<sub>50</sub> 大於 12 g/kg·bw。綜合上述，我們判斷蝙蝠蛾擬青霉菌絲體發酵液凍乾粉並無基因毒性及口服急性毒性之疑慮，此結果可作為人類食用安全性之參考。

關鍵字：蝙蝠蛾擬青霉、冬蟲夏草、基因毒性試驗、急性毒性試驗

### 前言

冬蟲夏草 (*Ophiocordyceps sinensis* (Berk.))<sup>[1]</sup> 為線蟲草科 (Ophiocordycipitaceae) 冬蟲夏草菌寄生在鱗翅目蝙蝠蛾幼蟲上形成之子座及蟲屍複合體。在諸多中醫藥典中，冬蟲夏草皆被列為首選用藥；《本草從新》記載“冬蟲夏草可保肺益腎、止血化痰，具回生之用”。因中藥材冬蟲夏草的稀少及珍貴，自 1982 年起，學者們紛紛自天然冬蟲夏草中分離真菌菌株，希望藉此開發出人工培育冬

蟲夏草的方法，以避免濫採造成物種的絕跡。目前分離出的菌種已被發表有 22 個學名，涉及 13 個屬，但其中伴隨著同物異名，造成研究上的混淆與困難，故近年來通過導入分子生物學方法，配合傳統形態學及特性分析，學者們確立了冬蟲夏草之無性型為中華被毛孢 (*Hirsutella sinensis*)<sup>[2,3]</sup>，而其餘常態分離出的菌株則定義為蝙蝠蛾幼蟲之伴生菌。在功效方面，根據研究顯示，冬蟲夏草具有鎮靜、降血壓、改善心肌缺血、抗血小板凝集、抗衰老、調節人體免疫和抗腫瘤等生理活性<sup>[4]</sup>，有學者提出冬蟲夏草有效成分並非單獨來自中華被毛孢，應包含蟲體及其他伴生菌，因部分伴生菌經研究證實具有一定生理活性<sup>[5]</sup>；而中華被毛孢菌絲體生長條件較為嚴苛且生長緩慢，不利工業發酵生產，故

\*聯絡地址：葡萄王生技股份有限公司  
桃園市中壢區龍岡路三段 60 號 陳勁初  
電話：(03)4572121 ext. 234  
E-mail address：gkbioeng@gropeking.com.tw

目前有些公司以伴生菌菌絲體作為冬蟲夏草的替代品在市面上販售。

蝙蝠蛾擬青霉 (*Paecilomyces hepiali*) 屬於叢梗孢科 (Moniliaceae) 擬青霉菌屬 (*Paecilomyces*)，為早期被分離出的伴生菌之一<sup>[3]</sup>，自 1986 年起陸續有研究結果證實其具有功效性，包含抗疲勞<sup>[6]</sup>、護腎<sup>[7, 8]</sup>、抑菌<sup>[9]</sup>、調節免疫<sup>[10, 11]</sup>、抗腫瘤<sup>[12]</sup>等，而化學成分分析方面，目前已知其菌絲體含有多醣、腺苷、*D*-甘露醇和麥角甾類等成分<sup>[13]</sup>。蝙蝠蛾擬青霉的食用安全性也已有學者探討，例如 2009 年周雯等人以蝙蝠蛾擬青霉菌絲體進行口服急性毒性試驗，其 LD<sub>50</sub> 大於 10 g/kg·bw，Ames 試驗、微核試驗和精子畸形試驗結果均為陰性，大鼠 30 天飼養試驗各項指標也未見異常，顯示其不具有遺傳毒性及亞急性毒性作用<sup>[14]</sup>。

蝙蝠蛾擬青霉及中華被毛孢為中國國家食品藥品監督管理局公佈唯二可用於保健食品 (等同於我國之健康食品認證) 原輔料之蟲草類菌絲體，而我國法規則規定若產品使用中華被毛孢可直接標示內含「冬蟲夏草菌絲體」，但其他分離自冬蟲夏草之真菌則需提出來源證明及安全性報告等資料備查。在中國，蝙蝠蛾擬青霉已上市販售二十餘年，其安全性應無重大疑慮，但由於真菌發酵培養條件不同時，可能誘導產生不同成分，故為謹慎起見，本公司以自行發酵生產之蝙蝠蛾擬青霉菌絲體發酵液凍乾粉進行成分分析、口服急性毒性試驗及第二類安全性試驗，以作為其功效性及安全性之參考備查；而本文先就三項基因毒性及急性毒性試驗評估其人體食用安全性。

## 材料與方法

### 試驗物質

以葡萄王生技股份有限公司液態發酵生產之蝙蝠蛾擬青霉 (*Paecilomyces hepiali*) 菌

絲體發酵液凍乾粉作為試驗物質進行基因毒性試驗及蟲草指標成分分析；本菌株經財團法人食品工業發展研究所生資中心 (Food Industry Research and Development Institute, FIRDI, Bioresource Collection and Research Center, BCRC, 台灣) 依據其菌落型態特徵、顯微構造及 rRNA ITS1-5.8S-ITS2 片段定序結果，鑑定確認為蝙蝠蛾擬青霉。

### 指標成分分析方法

秤取蝙蝠蛾擬青霉菌絲體發酵液凍乾粉萃取後分析其腺苷 (adenosine)、蟲草素 (cordycepin)、HEA (N<sup>6</sup>-(2'-hydroxyethyl)-adenosine) 及麥角固醇 ergosterol 之含量。本試驗使用具 DAD 之 HPLC 儀器進行分析 (L-2000 Series, 包含 pump、degasser L-2130, autosampler L-2200, column oven L2350 及 Diode array detector L-2455; Data processor: EZChrom Elite chromatography data system, Hitachi, 日本)，分析管柱為逆相 C<sub>18</sub> 管柱 (Phenomenex Luna 5 $\mu$  C<sub>18</sub> (2), 250 x 4.6 mm, 美國)，管柱溫度設定為 40 °C，進樣量 10  $\mu$ L，流速 1.0 mL/min。

檢測腺苷、蟲草素及 HEA 成分時，將各標準品 (Sigma, 美國) 及樣品萃取物回溶於二次水中進行分析，移動相為 94% 含有 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Katayama Chemical Co., Ltd., 日本) 的二次水以及 6% 的乙腈 (HPLC grade, Aencore Chemical Co., Ltd., 澳洲)，檢測波長設定在 254 nm。檢測麥角固醇成分時則將標準品 (Sigma, 美國) 與樣品萃取物回溶於甲醇，以 95% 甲醇/ 5% 乙腈作為移動相，檢測波長為 UV 270 nm。

### 沙門氏菌回復突變試驗

本試驗所使用之菌株為 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537。將菌株自菌種保存管中取出，置

入 Oxoid 公司製造的 NB No. 2 培養液中，以  $35\pm 1^\circ\text{C}$  條件搖瓶培養 14-16 小時，菌體活化後進行組胺酸需求性測試 (histidine requirement)、*rfa* 突變型測定 (*rfa* mutation)、*uvrB* 突變型測定 (*uvrB* mutation) 及 R 質體測定等菌株基因型 (genotype) 鑑定實驗，確定菌株無誤後進行回復突變測試。

秤取 1 g 的試驗物質，加入 4 mL DMSO 充分混合後補無菌水至 20 mL，配製成 50 mg/mL 之試驗物質溶液，並以無菌水做兩倍系列稀釋配製成 25、12.5、6.25 及 3.125 mg/mL，共五個濃度的試驗物質溶液。

進行斑點測試 (spot test) 以觀察試驗物質是否會造成試驗菌株受傷或突變，結果顯示在試驗物質濃度 5.0 mg/plate 之下，未觀察到毒性及致突變性 (資料未呈現)，故依據政府公佈之「健康食品安全性評估方法」<sup>[15]</sup> 內文，以 5 mg/plate 作為最高試驗劑量。

將試驗菌株進行添加或不添加 S9 酵素 (大鼠肝臟微粒體懸浮混合液，Rat liver S9，

Moltox，美國) 試驗，各自包含陰性對照組、陽性對照組 (致突變劑) 及試驗組，每組三重複，共五隻試驗菌株，各組詳細添加成分請見表 1。本試驗採用平板混合測試 (plate incorporation assay) 方法，取 100  $\mu\text{L}$  的試驗物質溶液或陰性/陽性對照組溶液，與 100  $\mu\text{L}$  隔夜培養之沙門氏菌菌液混合，並加入 0.5 mL 的 0.2 M 磷酸緩衝溶液 (不添加 S9 組) 或 S9 混合液 (添加 S9 組) 使其均勻後，再加入已溶化保存於  $47\pm 1^\circ\text{C}$  含 histidine/ biotin 之軟性瓊脂中，均勻倒於 minimal glucose agar (MA) plate 上，待凝固後倒置於  $35\pm 1^\circ\text{C}$  培養 48 小時後計算菌落數。若試驗物質劑量組之回復突變數高於陰性對照組之自然回復突變數 2 倍以上，經統計軟體 SPSS 計算， $p < 0.05$  (One-Way ANOVA)，且具有濃度劑量關係者，則判定為陽性反應。在本試驗條件下，各沙門氏菌菌株自然突變菌落數範圍請見表 2。

表 1. 沙門氏菌回復突變試驗各試驗組別配製內容

	試驗菌株	S9 酵素*	添加物質 / 濃度 ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )
陰性對照組	TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537	+	無
		-	
	TA98	+	Benzo [a] pyrene / 4.0
		-	4-nitroquinoline-N-oxide / 0.5
	TA100	+	2-aminofluorene / 4.0
		-	Sodium azide / 0.4
陽性對照組 (致突變劑)	TA102	+	Benzo [a] pyrene / 4.0
		-	Mitomycin C / 0.5
	TA1535	+	2-aminoanthracene / 4.0
		-	Sodium azide / 0.4
TA1537	+	2-aminoanthracene / 4.0	
	-	9-aminoacridine / 50.0	
試驗組	TA98, TA100, TA102, TA1535, TA1537	+	試驗物質 / 5000, 2500, 1250, 625, 312.5
		-	

每 50 mL 含 2.50 mL Rat liver S9 (Aroclor-1254-induced) · 1.0 mL 0.4 M MgCl<sub>2</sub> · 1.65 M

\*S9 酵素成分: KCl · 0.25 mL 1 M glucose-6-phosphate · 2.0 mL 0.1 M NADP · 25.0 mL 0.2 M phosphate buffer (pH7.4) 及 19.25 mL sterile distilled H<sub>2</sub>O。

表 2. 各沙門氏菌菌株自然突變菌落數範圍

菌株	S9 酵素	自然突變菌落數 (CFU/plate)
TA98	+	15-50
	-	14-50
TA100	+	100-283
	-	125-278
TA102	+	141-500
	-	110-480
TA1535	+	12-30
	-	10-35
TA1537	+	5-20
	-	5-20

### 體外哺乳類細胞染色體結構異常試驗

使用中國倉鼠卵巢細胞 (Chinese hamster ovary cells; CHO-K1, 購自財團法人食品工業發展研究所 BCRC 60006, 台灣) 作為試驗細胞株, 以 Ham's F-12 培養液 (含 1.0 mM L-Glutamine) (Sigma, 美國) 添加 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum; FBS, SAFC, 美國), 調整 pH 至 7.2-7.4, 置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱中培養。

將試驗物質溶於含 1% DMSO 之 Ham's F-12 培養液中調整為不同濃度, 配製成試驗組。本試驗中各組別的測試溶液成分如表 3, 每個試驗皆包含陰性對照組、陽性對照組 (致突變劑) 及試驗組。

在進行染色體結構異常試驗之前, 先進行細胞存活率試驗觀察試驗物質是否會對 CHO-K1 細胞造成細胞毒性, 結果顯示在試驗物質濃度 5.0 mg/mL 之下, 三種處理方法之細胞存活率皆為 100%, 並未觀察到細胞毒性 (資料未呈現), 因此染色體結構異常試驗之試驗物質劑量依據「健康食品安全性評估方法」<sup>[15]</sup> 定為 5.0、2.5 及 1.25 mg/mL。

染色體結構異常試驗可檢測是否試驗物質會造成細胞染色體變異。將細胞活化後去除培養液並分別加入陰性對照組、陽性對照組及試驗組之測試溶液進行培養, 處理條件

詳見表 3, 每組二重複。待實驗結束收取細胞固定染色後以顯微鏡觀察, 試驗每一重複計算 100 個分裂中期 (metaphase) 細胞中具異常染色體結構型態的數目, 異常項目包括 chromosome gap (G)、chromosome break (B)、dicentric (D)、ring (R)、chromatid gap (g)、chromatid break (b)、interchange (Int)、intrachange (Itr); 當陽性對照組之染色體異常高於 3% 且陰性對照組之染色體異常低於 3% 時實驗數據視為有效; 若試驗組之染色體異常細胞數目高於 3%, 且出現濃度趨勢反應時, 試驗結果判定為陽性。

### 嚙齒類週邊血液微核試驗

本試驗使用之實驗動物為 ICR 品系雌性小鼠, 體重約 30.2-37.0 g, 購自樂斯科生物科技股份有限公司 (宜蘭, 台灣), 小鼠飼養條件為溫度 22±3°C、相對溼度 55±15%、換氣頻率 10-15 次/小時、12 小時光暗週期, 飼料使用 MF-G (Oriental Yeast Co., Ltd, 日本), 墊料為 Beta Chip (Northeastern Products Crop, 美國)。每籠飼養 5 隻小鼠, 以打耳洞方式進行標記, 飼育籠外貼上動物標示卡詳細註明動物編號、品系、數量性別、IACUC 編號及實驗負責人等資訊。

試驗設計參考政府公佈之「健康食品安全性評估方法」進行<sup>[15]</sup>。將試驗物質以逆滲透水配製成 62.5、125 及 250 mg/mL 濃度之試驗溶液, 並將小鼠分為陰性對照組、陽性對照組 (致突變劑) 及試驗組, 每組 5 隻。試驗組包含低、中、高劑量組, 分別根據小鼠體重調整管餵溶液體積 (20 mL/kg·bw 體重) 使試驗物質投予劑量為 1.25、2.5、5.0 g/kg·bw 體重, 陰性對照組則管餵同體積 (20 mL/kg·bw 體重) 之逆滲透水; 陽性對照組以腹腔注射方式給予 0.05 g/kg·bw 體重之 Cyclophosphamide, 注射體積為 10 mL/kg·bw 體重。投予試驗物質後 48 及 72 小時, 由小鼠尾靜脈採

表 3. 體外哺乳類細胞染色體結構異常試驗處理條件及染色體異常數目與狀態

處理時間	試驗組別	添加物質	S9 酵素 <sup>1</sup>	染色體異常 <sup>2</sup> 之細胞數	細胞染色體 異常比例	染色體 <sup>2</sup> 異常總數	染色體異常狀態 <sup>2,3</sup>	
3 小 時	陰性對照組	Ham's F-12 培養液	+	0/0	0%	0/0	0/0	
		含 10%FBS 之 Ham's F-12 培養液	-	0/0	0%	0/0	0/0	
	陽性對照組	25 µg/mL cyclophamide	+	13/11	12%	13/11	3B, 4D, 2R, 2b, 1Int, 1ltr / 3B, 1D, 6b, 1Int	
		2.5µg/mL mitomycin C	-	14/13	13.5%	14/18	1B, 2D, 7b, 2Int, 2ltr / 7b, 4Int, 7ltr	
	試驗組 (mg/mL)	5.000	+	0/0	0%	0/0	0/0	
		2.500	+	0/0	0%	0/0	0/0	
		1.250	+	0/0	0%	0/0	0/0	
		5.000	-	0/0	0%	0/0	0/0	
		2.500	-	0/0	0%	0/0	0/0	
		1.250	-	0/0	0%	0/0	0/0	
	20 小 時	陰性對照組	含 10%FBS 之 Ham's F-12 培養液	-	0/0	0%	0/0	0/0
		陽性對照組	2.5µg/mL mitomycin C	-	14/16	15%	19/18	2B, 7b, 9Int, 1ltr / 6b, 10Int, 2ltr
試驗組 (mg/mL)		5.000	-	0/0	0%	0/0	0/0	
		2.500	-	2/0	1%	2/0	2b/0	
		1.250	-	0/0	0%	0/0	0/0	

<sup>1</sup> S9 酵素配製: 50.0 µL 之 Rat liver S9 (Aroclor 1254-induced) · 5.0 µL 之 1 M G6P · 20.0 µL 之 0.1M NADP 及 4927.5 µL 之 Ham's F-12 培養液。

<sup>2</sup> 數值為各組 100 個細胞中出現染色體異常之細胞數或異常狀態總數，每組試驗皆進行二重複。

<sup>3</sup> 細胞染色體異常狀態以"前數字後英文"表示，2D 即表示出現 2 個 dicentric 狀態。

各種染色體異常標註如下所述：chromosome gap (G) · chromosome break (B) · dicentric (D) · ring (R) · chromatid gap (g) · chromatid break (b) · interchange (Int) · intrachange (ltr)。

取 3-4 µL 血液均勻薄鋪於預染 acridine orange 的載玻片上，室溫靜置 3-4 小時後以螢光顯微鏡觀察網狀紅血球 (reticulocytes; RETs) 之微核 (micronucleus) 現象是否增加。記錄試驗前後小鼠的體重及臨床症狀，並且計算樣本中 1000 個紅血球 (erythrocytes; RECs) 裡網狀紅血球的數量，以及 1000 個網狀紅血球中產生微核的數量，以統計軟體 one-way ANOVA 及 Duncan's multiple range test 進行分析，若  $p < 0.05$  表示組間具有顯著差異。

#### 單一劑量口服急性毒性試驗

本試驗使用之實驗動物 ICR 品系小鼠購自樂斯科生物科技股份有限公司 (宜蘭，台灣)，試驗起始週齡為 7-8 週。實驗動物飼養條件為溫度  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相對溼度  $60 \pm 10\%$ 、12 小時光暗週期，飲水及飼料 (德國 Altromin

公司生產之 1324N 真空包裝 SPF 級粒狀飼料) 採無限制供應。試驗前一天進行小鼠秤重及臨床觀察，並隨機分組，每組雌雄鼠各 6 隻，至試驗進行前小鼠需禁食至少 16 小時。

試驗設計根據政府公佈之安全性評估辦法進行<sup>[15, 16]</sup>，將試驗物質以過濾水配製成 333 mg/mL 之懸浮液，依小鼠體重進行 2 次管餵至達到 12 g/kg·bw 之設定劑量，對照組小鼠則管餵 36 mL/kg·bw 之對照溶液。餵食後每日觀察記錄動物之臨床症狀，觀察期共 7 日，若在觀察期間有小鼠死亡應立即進行解剖分析，若無明顯臨床異常症狀，則待試驗結束將小鼠秤重後進行犧牲解剖，以血清自動分析儀 (Vitros® 350，美國) 分析丙氨酸轉氨酶 (alanine aminotransferase; ALT)、天門冬氨酸轉氨酶 (aspartate aminotransferase; AST) 及尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)

三項血清生化值，並觀察各項臟器外觀，秤重肝臟、腎臟、脾臟後進行切片染色 (hematoxylin and eosin stain) 及組織病理判讀。本試驗數據以平均值 (mean)  $\pm$  標準偏差 (SD) 表示，並使用 Student t-test 與對照組進行分析比較，若  $p < 0.05$  則表示兩者具顯著差異。

## 結果

### 指標成分分析

將蝙蝠蛾擬青霉菌絲體發酵液凍乾粉進行指標成分分析，與標準品對照計算後得出樣品含有 0.533 mg/g 的腺苷、0.043 mg/g 的蟲草素及 3.08 mg/g 的麥角固醇，HEA 則未檢出 (圖 1)。

### 沙門氏菌回復突變試驗

在本試驗中將試驗物質各自與 5 株沙門氏菌共培養，並進行添加 S9 及不添加 S9 兩組，觀察沙門氏菌產生回復突變的菌落數，若菌落數為自然回復突變數的 2 倍以上，且統計分析具顯著差異及劑量效應，則判定反應為陽性，即該物質具誘導沙門氏菌突變的特性。

本試驗結果見圖 2，所有組別之陰性對照組之菌落平均數皆落在自然回復突變之範圍內 (表 2)，而陽性對照組也符合預期，其菌落數高於陰性對照組 2 倍且具顯著差異 ( $p < 0.05$ )，因此本次試驗視為有效數據。而試驗組不論添加 S9 與否，各劑量組其菌落平

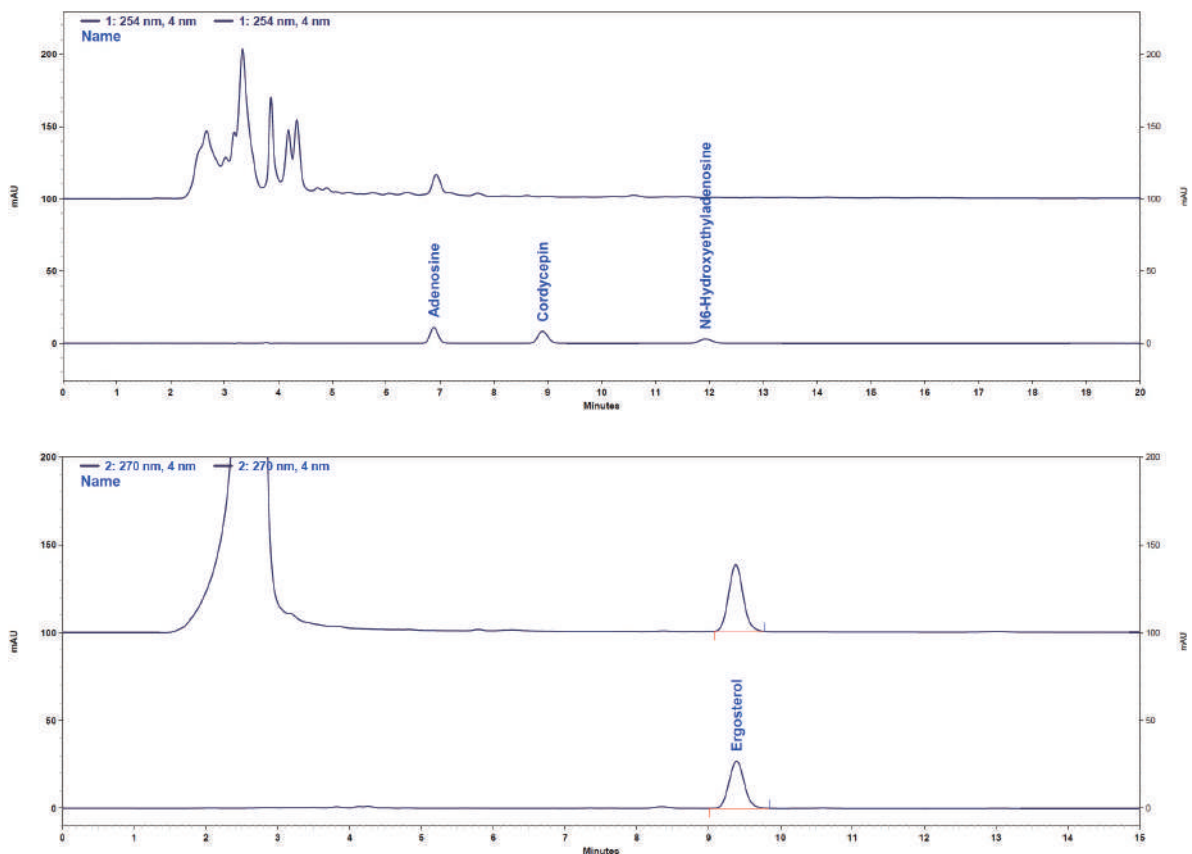


圖 1. 蝙蝠蛾擬青霉菌絲體發酵液凍乾粉 HPLC 指標成分分析。上圖為腺苷 (adenosine)、蟲草素 (cordycepin) 及 N6-(2'-hydroxyethyl)-adenosine (HEA) 之分析結果，下圖為麥角固醇 (ergosterol) 之分析結果。

均數皆落於自然回復突變範圍內，且未達陰性對照組菌落數 2 倍以上，因此判斷在本試驗條件下，沙門氏菌回復突變試驗結果判定為陰性。

### 體外哺乳類細胞染色體結構異常試驗

本試驗欲觀察試驗物質是否會對細胞染色體造成不良影響，包含 chromosome gap、chromosome break、dicentric、ring、chromatid gap、chromatid break、interchange、intrachange

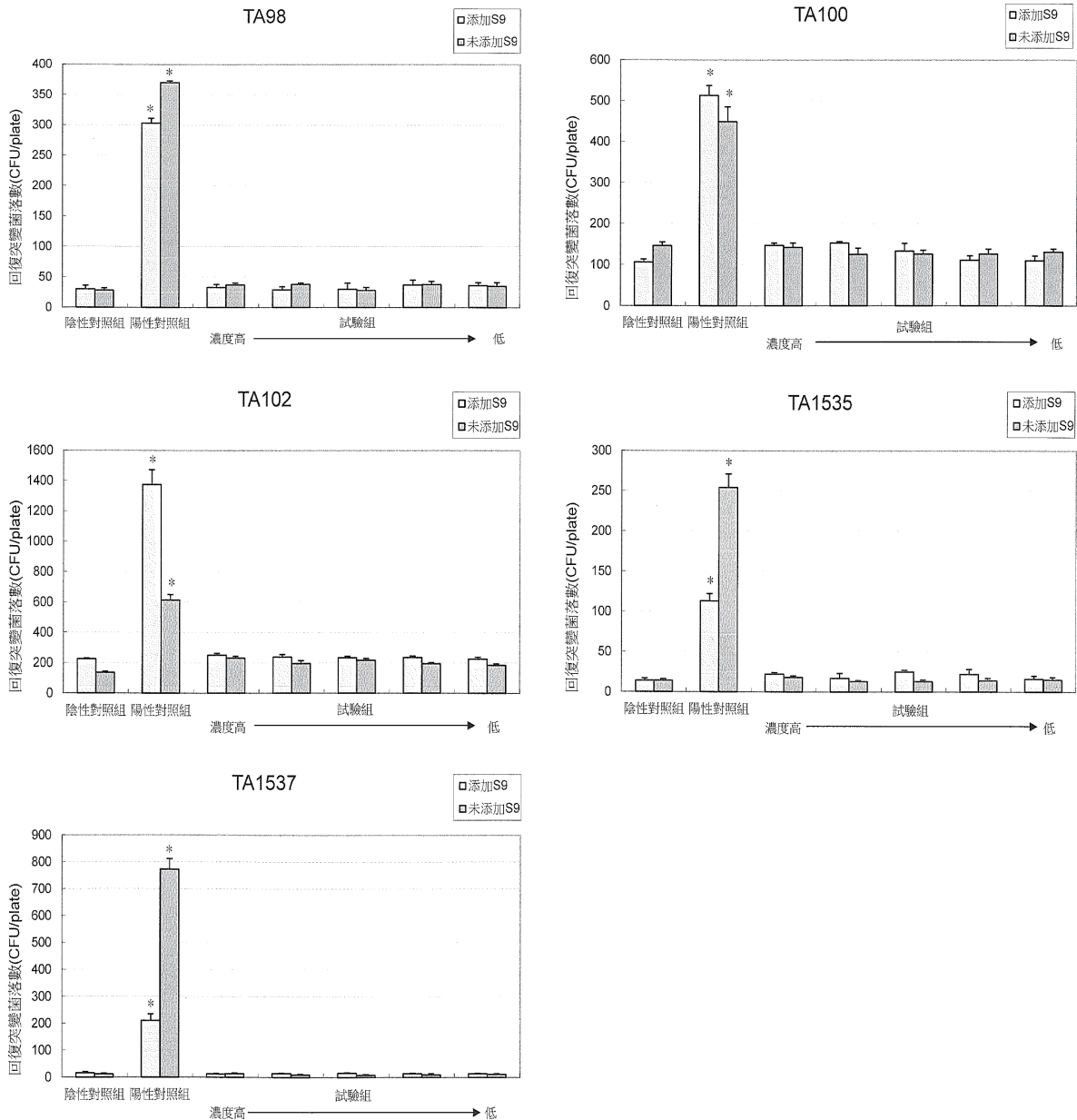


圖 2. 沙門氏菌回復突變試驗。以上各圖分別為沙門氏菌 TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537，添加 S9 或不添加 S9 之平板混合測試結果，計算每盤上產生回復突變之菌落數。試驗組各組濃度由高至低分別為 5.0、2.5、1.25、0.625 及 0.3125 mg/plate。所有數據以 Mean±SD 表示，n=3，圖中星號 (\*) 表示經 one-way ANOVA 分析， $p < 0.05$ ，結果間具顯著差異。

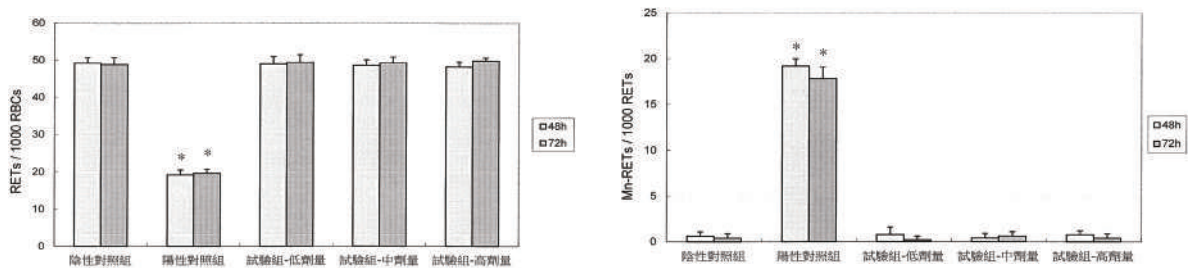


圖 3. 嚙齒類週邊血液微核試驗，左圖為計數 1000 個紅血球 (RBCs) 中網狀紅血球 (RETs) 的數目；右圖為計數 1000 個網狀紅血球中微核網狀紅血球 (Mn-RETs) 數目。試驗組 (低劑量、中劑量、高劑量) 投予濃度分別為 1.25、2.5、5.0 g/kg 小鼠體重。所有數據以 Mean±SD 表示，n=5，圖中星號 (\*) 表示經 one-way ANOVA 及 Duncan's multiple range test 分析， $p < 0.05$ ，結果間具顯著差異。

等，結果詳見表 3，在三種處理條件下 (添加 S9 處理 3 小時、未添加 S9 處理 3 小時及未添加 S9 酵素處理 20 小時)，陰性對照組之細胞染色體異常率皆為 0%，而陽性對照組則分別為 12.0%、13.5% 及 15.0%，試驗組在濃度 2.5 mg/mL 未添加 S9 處理 20 小時條件的其中一重複出現 2 個細胞 chromatid break 現象，其餘各濃度及條件之染色體異常率為 0%。根據上敘結果判斷，陰性對照組異常率在 3% 以下，陽性對照組異常率超過 3%，因此認為本次試驗具有可信度；而試驗組僅在其中一組條件中劑量組別的其中一重複出現異常，沒有劑量效應、無重複性且染色體異常率低於 3%，故認為試驗物質在體外哺乳類細胞染色體結構異常試驗的結果為陰性。

### 嚙齒類週邊血液微核試驗

本試驗以 ICR 品系雄性小鼠作為試驗對象，管餵投予試驗物質，在 48 及 72 小時抽取樣本，觀察小鼠週邊血液中網狀紅血球的比例及微核發生率，以評估試驗物質是否會對小鼠產生不良影響。在試驗期間每日皆觀察紀錄小鼠的體重及狀態，結果顯示在陰性對照組、陽性對照組及試驗組，小鼠的臨床觀察皆為正常，且各組間體重無顯著差異 (data not shown)。

血液樣本的結果詳見圖 3；各組的小鼠網狀紅血球比例如下：投予後 48 小時，陰性對照組為  $49.2 \pm 1.5\%$ ，陽性對照組為  $19.2 \pm 1.3\%$ ，試驗組之低、中、高劑量組分別為  $49.0 \pm 2.0\%$ 、 $48.6 \pm 1.5\%$  及  $48.2 \pm 1.3\%$ ；72 小時的陰性對照組則為  $48.8 \pm 1.9\%$ ，陽性對照組為  $19.6 \pm 1.1\%$ ，試驗組之低、中、高劑量組分別為  $49.4 \pm 2.1\%$ 、 $49.2 \pm 1.6\%$  及  $49.8 \pm 0.8\%$ ；分析以上結果，陰性對照組與試驗組間無顯著差異 ( $p > 0.05$ )，而陽性對照組顯著低於陰性對照組 ( $p < 0.05$ )。

而各組微核網狀紅血球的發生率如下：陰性對照組為  $0.6 \pm 0.5\%$ ，陽性對照組為  $19.2 \pm 0.8\%$ ，試驗組之低、中、高劑量組分別為  $0.8 \pm 0.8\%$ 、 $0.4 \pm 0.5\%$  及  $0.8 \pm 0.4\%$ ；72 小時的陰性對照組則為  $0.4 \pm 0.5\%$ ，陽性對照組為  $17.8 \pm 1.3\%$ ，試驗組之低、中、高劑量組分別為  $0.2 \pm 0.4\%$ 、 $0.6 \pm 0.5\%$  及  $0.4 \pm 0.5\%$ 。陰性對照組與試驗組間無顯著差異 ( $p > 0.05$ )，而陽性對照組顯著高於陰性對照組 ( $p < 0.05$ )。

綜合以上結果，在體重、臨床狀態、網狀紅血球比例及微核網狀紅血球發生率上，試驗組與陰性對照組皆無顯著差異 ( $p > 0.05$ )，因此判斷試驗物質在嚙齒類週邊血液微核試驗的結果為陰性。



### 單一劑量口服急性毒性試驗

本試驗以 12 g/kg·bw 劑量之試驗物質進行管餵，經 7 天臨床觀察後犧牲小鼠，分析其血清生化值、臟器重量及組織病理鏡檢結果，藉此評估試驗物質是否會造成小鼠急性毒性病變。觀察結果顯示，在試驗期間所有組別小鼠均存活，且無任何臨床異常症狀，各項試驗數據詳見表列，包含小鼠平均體重及體重增長百分率(%) (表 4)、血清生化值 (表 5)、各項臟器平均重量及臟器相對重量百分比(%) (表 6)，在解剖肉眼檢查及組織病理鏡檢項目則皆未發現與試驗物質處理相關之病變 (data not shown)。

綜合上述結果，雖然在試驗組之雄鼠體重增長百分率(%)、尿素氮 (BUN)，及雌鼠之腎臟相對重量百分比(%) 三項數值比起對照組有所提升 ( $p < 0.05$ )，但其變化仍在正常背景值內，且各組別之組織病理檢查皆未出現異常，因此判斷試驗物質之 LD<sub>50</sub> 大於 12 g/kg·bw，即以此口服劑量下不會造成小鼠產生急性毒性之損傷與病變。

### 討論

冬蟲夏草因其獨特藥理作用，一直是無可取代的名貴中藥材，但由於其生長條件限制，使得野生蟲草產量有限，且因濫採有逐

表4. 口服急性毒性試驗小鼠平均體重及體重增長百分率

性別	試驗物質	劑量 / kg·bw	平均體重(g) <sup>1</sup>		體重增長百分率(%) <sup>2</sup>
			D0	D7	
雄性	對照組	0 g	26.6±1.1	29.5±1.7	10.8±2.2
	試驗組	12 g	26.9±1.2	30.4±1.7	13.2±2.0*
雌性	對照組	0 g	23.2±1.5	24.8±1.6	7.0±2.4
	試驗組	12 g	21.8±1.1	23.7±1.5	8.8±3.2

<sup>1</sup> 數值以 Mean±SD (平均值±標準差) 表示，n=6，雌雄分別計算。

<sup>2</sup> 體重增長百分率(%) = ((D7-D0)/D0) × 100%。\*表示統計分析具有顯著差異( $p < 0.05$ )。

表5. 口服急性毒性試驗小鼠之血清生化值

性別	試驗物質	劑量 / kg·bw	血清生化項目 <sup>1, 2</sup>		
			ALT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)
雄性	對照組	0 g	54.7±15.9	73.8±17.0	24.8±1.9
	試驗組	12 g	53.8±8.8	94.2±15.6	29.8±3.6*
雌性	對照組	0 g	45.8±6.6	73.7±16.2	21.3±3.5
	試驗組	12 g	45.7±2.7	86.7±25.2	21.0±3.5

<sup>1</sup> ALT: 丙氨酸轉氨酶 (alanine aminotransferase)、AST: 天門冬氨酸轉氨酶 (aspartate aminotransferase)、BUN: 尿素氮 (blood urea nitrogen)。

<sup>2</sup> 數值以 Mean±SD (平均值±標準差) 表示，n=6，雌雄分別計算，\*表示統計分析具有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

表6. 口服急性毒性試驗小鼠臟器平均重量及臟器相對重量百分比

性別	試驗物質	劑量 / kg·bw	臟器平均重量 (g) <sup>1</sup>			臟器相對重量百分比 (%) <sup>2</sup>		
			肝臟	腎臟	脾臟	肝臟	腎臟	脾臟
雄性	對照組	0 g	1.14±0.17	0.40±0.04	0.07±0.01	3.86±0.52	1.35±0.07	0.25±0.04
	試驗組	12 g	1.18±0.65	0.40±0.04	0.09±0.02	3.87±0.18	1.32±0.09	0.28±0.05
雌性	對照組	0 g	0.93±0.11	0.26±0.02	0.09±0.01	3.74±0.25	1.05±0.05	0.35±0.03
	試驗組	12 g	0.87±0.10	0.28±0.02	0.09±0.02	3.65±0.22	1.17±0.05*	0.37±0.05

<sup>1</sup> 數值以 Mean±SD (平均值±標準差) 表示，n=6，雌雄分別計算，\*表示統計分析具有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

<sup>2</sup> 臟器相對重量百分比(%) = 臟器重量值(g) / 體重 (g) × 100%。

年下降的趨勢。故自 1980 年代起，研究人員嘗試自冬蟲夏草中分離真菌以期用人工方式培育生產，隨後十數株真菌陸續被發現，因當時的技術無法成功培育出冬蟲夏草有性型，直到西元 2000 年前後，科學家導入分子鑑定技術後才確立中華被毛孢為冬蟲夏草之無性型<sup>[3]</sup>，導致蝙蝠蛾擬青霉等蝙蝠蛾幼蟲之伴生菌在之前十餘年間，因眾說紛紜，皆被當成是冬蟲夏草的無性型而研究，造成早期發表了許多使用錯誤菌株進行試驗之論文，以及市售冬蟲夏草產品中混充、誤用、標示不清等情形發生。

於是近年台灣與中國皆就冬蟲夏草名稱之使用進行規範；在中國，非中華被毛孢、蝙蝠蛾擬青霉之伴生菌菌絲體僅準許標示「蟲草菌絲體」進行販售；而我國衛生福利部則規定，分離自冬蟲夏草之蟲草相關菌株可標示「冬蟲夏草菌絲體」，但需具備該菌株分離之來源、詳細加工或製造過程、規格及食用安全性等相關證明文件備查（署授食字第 1001303885 號），因此若產品需要使用蝙蝠蛾擬青霉菌絲體作為原料添加，進行安全性試驗是必須的。

本研究以蝙蝠蛾擬青霉菌絲體發酵液凍乾粉（葡萄王生技股份有限公司，台灣）作為試驗對象，經 HPLC 分析比對標準品之 retention time 後可得其含有腺苷、麥角固醇及微量蟲草素等成分，發現與已發表之文獻成分含量無太大差異<sup>[13]</sup>，惟目前尚無研究指出液態發酵之蝙蝠蛾擬青霉菌絲體含有蟲草素，於本試驗中則可測得些微含量，可能為培養條件差異所致，此分析結果有待後續進一步以 LC/MS/MS 確認。於蝙蝠蛾擬青霉之食用安全性方面，與周雯等人<sup>[14]</sup>進行之菌絲體安全性試驗不同之處在於本研究使用液態發酵全液凍乾粉（即含有菌絲體與發酵液）作為試驗對象，為首篇就發酵全液安全性進行探討之論文；試驗結果顯示，本公司生產之蝠

蛾擬青霉菌絲體發酵液凍乾粉在急性毒性、28 天亞急性毒性（尚未發表）及基因毒性試驗中皆無不良反應發生，而周雯等人<sup>[14]</sup>的試驗也支持以上論述，加之此菌種已於中國大陸完成臨床試驗並銷售 20 年以上（金水寶膠囊，江西濟民可信，中國），因此我們認為蝙蝠蛾擬青霉菌絲體發酵液凍乾粉應具有相當的食用安全性。

雖然蝙蝠蛾擬青霉並非冬蟲夏草之無性世代菌種，但中華被毛孢菌絲體液態發酵條件較為嚴苛，需維持溫度 15-18°C 且培養時間長達 3 週以上<sup>[1]</sup>，導致成本較高不利工業化生產。蝙蝠蛾擬青霉投入研究已將近 30 年，具備完整的功效性驗證及長期的食用經驗，加之生長快速易培養等特性，因此在現今尚無法工業化生產人工培育冬蟲夏草子實體的情況下<sup>[17]</sup>，蝙蝠蛾擬青霉仍舊被認為是非常優質的蟲草類保健食品素材，極具研究生產價值。

## 參考文獻

1. 秦鵬，趙玉卉，王龍等。冬蟲夏草無性型發酵技術研究進展。中國釀造 2014; 33:10-2。
2. 李增智，黃勃，李春如等。確認冬蟲夏草無性型的分子生物學證據 I. 中國被毛孢與冬蟲夏草之間的關係。菌物系統 2000; 19:60-4。
3. 蔣毅，姚一建。冬蟲夏草無性型研究概況。菌物系統 2003; 22:161-76。
4. 田劭丹，李冬雲，侯麗等。冬蟲夏草抗腫瘤研究進展。食用中醫內科雜誌 2006; 20:7-8。
5. 楊金玲，肖薇，何惠霞等。蝙蝠蛾擬青霉與冬蟲夏草關係的分子系統學研究。藥學學報 2008; 43:421-6。
6. 席昭雁，趙起華，向前等。蝙蝠蛾擬青霉菌絲體抗疲勞功能實驗研究。中國自然醫學雜誌 2006; 8:143-5。
7. 王娜，亓敏，梁素忍等。蝙蝠蛾擬青霉 Cs-4 對阿霉素腎病大鼠的保護作用。中國中西醫結合雜誌 2010; 30:957-60。
8. 倪潔珊，胡臻，吳笑英等。蝙蝠蛾擬青霉 Cs-4 菌粉輔助治療糖尿病腎病的臨床觀察。中華中醫藥學刊 2013; 31:1974-6。
9. 劉俊，楊本壽，姜國銀。蝙蝠蛾擬青霉的抑菌活性與菌絲體發酵化學組分的研究。昆明醫科大學學報

- 2012; 6:32-4。
10. 張潔宏，趙鵬，李彬等。蝙蝠蛾擬青霉菌絲體增強免疫力功能動物試驗研究。廣西醫科大學學報 2013; 4:520-2。
  11. 傅惠英，張利棕，壽旗揚等。中國被毛孢和蝙蝠蛾擬青霉小鼠免疫功能調節作用的比較。中國比較醫學雜誌 2012; 22:16-20。
  12. Wu Z, Lu J, Wang X *et al.* Optimization for production of exopolysaccharides with antitumor activity *in vitro* from *Paecilomyces hepiali*. *Carbohydr Polym* 2014; 99: 226-34.
  13. 洪志來，王文宣，熊娟等。蝙蝠蛾擬青霉菌發酵菌絲體的化學成份研究。中草藥 2013; 44:947-50。
  14. 周雯，唐慧，陳敏。關於蝙蝠蛾擬青霉菌絲體安全性的實驗研究。中國衛生檢驗雜誌 2009; 19:420-4。
  15. 衛福部。健康食品安全性評估方法。1999。行政院衛福部。台北，台灣。
  16. 衛福部。單一劑量毒性試驗。藥品非臨床試驗安全性規範。2000:46-8。行政院衛福部。台北，台灣。
  17. 朱斗錫，何榮華，周俊承等。中國冬蟲夏草人工栽培研究進展。中國食用菌 2007; 26:11-3。

## Evaluation of Acute Toxicity and Genotoxic Activity of *Paecilomyces hepiali* in Submerged Culture

Szu-Yin Wu<sup>1</sup>, Shu-Hsing Yeh<sup>1</sup>, Yueh-Ting Tsai<sup>2</sup>, Ming-Yuan Hung<sup>3</sup>,  
Chun-Wei Kao<sup>3</sup>, Chia-Feng Kuo<sup>4</sup>, Chin-Chu Chen<sup>1,4,5\*</sup>

<sup>1</sup>Bioengineering Center of Grape King Bio Ltd., Zhong-Li City; <sup>2</sup>Super laboratory Co., Ltd., New Taipei City;

<sup>3</sup>Food Industry Research and Development Institute, Hsin-Chu City;

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

<sup>5</sup>Department of Applied Science, National Hsinchu University of Education, Hsin-Chu City, Taiwan

### Abstract

*Paecilomyces hepiali*, isolated from natural [*Ophiocordyceps sinensis* (Berk.)], is known to possess several functional activities and hence has potential beneficial use in healthcare. To ensure more information about the safety of *Paecilomyces hepiali* whole broth, the standard battery of genotoxicity tests and acute oral toxicity were performed. In results, *Paecilomyces hepiali* whole broth showed no mutagenicity up to 5 mg/plate when tested with five *Salmonella typhimurium* strains with or without metabolic activation. Similarly, *in vitro* chromosomal aberration assay did not reveal any significant alterations up to 5 mg/mL as compared to the negative control both in the presence and absence of the metabolic activation (S9 mix). Moreover,

the *Paecilomyces hepiali* whole broth with doses up to 5.0 g/kg·bw, did not increase the incidence of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow. Lastly, oral administration of *Paecilomyces hepiali* whole broth resulted in no mortalities or evidence of adverse effects and the lethal dosage (LD<sub>50</sub>) was greater than 12 g/kg·bw. Based on the above observations, it can be concluded that *Paecilomyces hepiali* whole broth is not mutagenic, is generally non-toxic on acute oral administration and should not be considered as a potential concern for humans.

**Keywords:** *Paecilomyces hepiali*, *Ophiocordyceps sinensis*, genotoxicity, acute toxicity.