

## 蛹蟲草發酵液凍乾粉之 28 天重複劑量安全性分析

劉曉卉<sup>1</sup> 葉淑幸<sup>1</sup> 陳椒華<sup>2</sup> 陳勁初<sup>1,3,4,5,6\*</sup>

<sup>1</sup> 葡萄王生技股份有限公司  
<sup>2</sup> 嘉南藥理科技大學食品科技系  
<sup>3</sup> 實踐大學食品營養與保健生技學系  
<sup>4</sup> 台灣大學食品科技研究所  
<sup>5</sup> 新竹教育大學應用科學系  
<sup>6</sup> 中原大學生物科技學系

本研究針對蛹蟲草菌絲體發酵液粉(*Cordyceps militaris* mycelium powder)進行28天亞急性餵食毒性評估。以口服途徑餵食SD大鼠，低、中及高三個劑量分別為1,000、2,000及3,000 mg/kg b.w.，另設空白對照組。每組各20隻，雌雄各半，大鼠經連續口服投予28天，每日進行臨床觀察，每週測量體重及攝食量。28天後進行臨床病理分析，解剖觀察有無明顯病變並進行組織病理檢測。結果顯示，SD大鼠經口餵食後，無明顯臨床症狀差異以及死亡現象發生，在試驗期間之體重變化及飼料攝取量，與對照組相較下均無明顯差異。各劑量組大鼠之尿液分析、血液學檢查、血清生化學檢查、臟器重量以及組織病理變化，與對照組亦皆無顯著性差異，因此，證明其無毒性顯示之劑量(no-observed-adverse-effect level, NOAEL)大於3,000 mg/kg b.w.。

**關鍵字：**蛹蟲草、菌絲體發酵液粉、28天亞急性餵食毒性評估試驗

### 前 言

蛹蟲草(*Cordyceps militaris*)，又名北冬蟲夏草，又稱蛹草、北方蟲草或北蟲草，1958年在中國吉林省首次被發現。屬於子囊菌亞門(Ascomycotina)，子囊菌綱(Ascomycetes)，肉座菌目(Hypocreales)，麥角菌科(Clavicipitaceae)、蟲草屬真菌(*Cordyceps*)<sup>[1]</sup>。《中國藥用孢子植物》記載蛹蟲草「用於肺結核，老人虛弱，貧血虛弱等」；1985年出版的《中藥採集收購鑑別手冊》則指出，「由於冬蟲夏草藥源緊張，近些年來，常發現以蟲草屬植物做冬蟲夏草入藥」。日本稱其為「終極漢方」；日本保健食品《活用事典》記載「北冬蟲草可說是營養價值最高、最優異的蟲草」。近幾年的研究證實，蛹蟲草有減緩肝纖維化產生<sup>[2]</sup>、增進免疫系統<sup>[3-5]</sup>、降血糖<sup>[6, 7]</sup>、降血脂<sup>[8]</sup>、抗腫瘤<sup>[9]</sup>、抗氧化<sup>[10, 11]</sup>及

抗發炎清除自由基<sup>[12]</sup>等功效。蛹蟲草具有的生理活性成分包括核苷類如蟲草素(cordycepin)及腺核苷(adenosine)、神經醯胺類(ceramide)、酯化合物類和醣類如蟲草多醣(cordyceps polysaccharide)及甘露醇(mannitol)等成分<sup>[13, 14]</sup>。

蛹蟲草對寄主範圍廣泛，較易栽培及取得，是分離出化合物最多的蟲草屬菌種，蛹蟲草具有與冬蟲夏草相似的活性成分和保健功效<sup>[15-17]</sup>，2009年中國批准蛹蟲草子實體為「新資源食品」，可普遍應用於食品中且無警語，2014年我國衛福部公告應標註每日食用蟲草素和腺核苷限量，分別不得超過3.6毫克和0.5毫克，以及標示「不建議嬰幼兒、兒童、孕婦與真菌過敏者使用」警語，亦列為可供食品使用原料。

儘管如此，以生物科技發展蛹蟲草作為冬蟲夏草的替代品，仍為現今重要趨勢。與固態發酵相比，以液態發酵方式量產蛹蟲草菌絲體，能在短時間內即獲得大量的菌絲體、產能較高、不受季節影響、衛生條

收稿日期：105年2月19日 修稿日期：105年4月25日 接受日期：105年4月26日

\*通訊地址：陳勁初，葡萄王生技股份有限公司，桃園市中壢區龍岡路三段60號

電話：(03)4572121 ext. 234，E-mail: gkbioeng@grapeking.com.tw

件佳、易於均勻取樣品管以及可得到相近的活性成分等優點；菌絲體產品已普遍在國際市場販售多年，包括美國、加拿大、日本、韓國、香港、東南亞和中國大陸等地區，但由於相關的安全性研究文獻稀少，菌絲體目前尚未正面表列。先前已發表文獻<sup>[18]</sup>指出，蛹蟲草菌絲體發酵液粉的三項基因毒性試驗無毒性，連續 7 天餵食 SD 大鼠 2000 mg/kg b.w.後，無任何動物死亡，活動狀況皆正常。本文進一步進行 28 天重複劑量安全性評估試驗，作為日後產品開發之劑量考量依據。

## 材料方法

### 試驗物質

蛹蟲草菌絲體發酵液粉為本次試驗物質，蛹蟲草 (*C. militaris*)菌種 BCRC-34380 購自食品工業發展研究所生物資源與保存中心。以馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基 (potato dextrose agar, PDA)於平板 22°C 恆溫培養，每月於無菌操作台進行繼代培養，並密封保存。

### 液態發酵條件

將蛹蟲草菌絲培養於 PDA 平板，擷取 2×2 cm<sup>2</sup> 菌塊，溫度控制 25±2°C，接入 2 L 三角搖瓶培養四天後 (震盪轉速為 120 rpm)，接入 500 L 發酵槽培養四天 (攪拌 30 rpm，通氣量 0.25 vvm，溫度控制 22±2 °C)，再接入 50 ton 發酵槽培養四天 (攪拌 30 rpm，通氣量 0.05 vvm，溫度控制 22±2°C)，100°C 加熱 30 分鐘後，經過濃縮、冷凍乾燥及磨粉，最後即成為蛹蟲草菌絲體發酵液粉。

### 試驗動物

參考衛生署 28 天餵食毒性試驗之規範，選用樂斯科生物科技股份有限公司之雌雄 SD 大鼠各 40 隻，於 4 週齡時購入。馴化 2 週，至六週齡或以上才開始進行實驗。

### 飼育管理

飼養環境條件為溫度 22 ± 3°C、60 ± 10 % 相對濕度及 12 小時之光暗週期。飼養於經高溫高壓滅菌之塑

膠製飼育籠(46cm×20cm×20cm)，飼料為 Laboratory Autoclavable Rodent Diet 5010 (PMI® Nutrition International, USA)，將試驗動物以耳號方式進行標記，飼育籠附上標示卡，分別記載室別、籠號、品系、性別、週齡、試驗編號、試驗名稱、試驗期間、入室日期及動物編號。

將實驗動物隨機分為四組，每組 20 隻，雌雄各半。蛹蟲草菌絲體發酵液粉以口服途徑餵食 SD 大鼠，低、中及高三個劑量分別為 1,000、2,000 及 3,000 mg/kg b.w.，將上述三種濃度已滅菌水配置成 100、200 及 300 mg/ml，進行不同濃度口服投予，另設空白對照組。餵食後每日觀察試驗動物臨床症狀 (clinical observations)，每週秤量一次動物體重 (body weighing)，並記錄飼料攝食量 (food consumption)。

### 血液學檢測

連續餵食 28 天犧牲剖檢前，進行眼窩採血，並以血液分析儀 (Automated hematology analyzer, XT-2000i, Sysmex Corporation, Japan) 檢測。檢測項目包括紅血球數 (red blood cell count, RBC)、血紅素 (hemoglobin, HGB)、血球容積比 (hematocrit, HCT)、平均紅血球體積 (mean corpuscular volume, MCV)、平均血紅素 (mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均血紅素濃度 (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)、血小板數 (platelet, PLT)、平均血小板容積 (mean platelet volume, MPV)、白血球數 (white blood cell count, WBC)、嗜中性球 (neutrophil, NEUT)、淋巴球 (lymphocyte, LYMPH)、單核球 (monocyte, MONO)、嗜酸性球 (eosinophil, EOS) 及嗜鹼性球 (asophil, BASO)。

### 血清生化檢測

連續餵食 28 天犧牲剖檢前，禁食 8 小時以上，再進行採血，1500×g 離心 15 分鐘，分離所得之血清以血清生化儀 (Automated biochemistry analyzer, Vitros 5.1 FS, Johnson & Johnson, USA) 檢測。檢測項目包括：丙胺酸轉胺酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate aminotransferase, AST)、鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、總膽紅素 (total bilirubin, BIT)、麩胺基轉胺酶 ( $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, GGT)、總蛋白 (total protein, TP)、白蛋白 (albumin,

ALB)、球蛋白(globulin, GLO)、澱粉酶(amylase, AMY)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌胺酸(creatinine, CRE)、乳酸脫氫酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶(creatinine phosphokinase, CPK)、葡萄糖(glucose, GLU)、總膽固醇(total cholesterol, TC)、三酸甘油酯(triglyceride, TG)、鈉(sodium, Na)、鉀(potassium, K)、氯(chloride, Cl)、鈣(calcium, Ca)及磷(inorganic phosphorous, P)離子濃度。

## 解剖並採取臟器組織

試驗結束後，所有鼠隻均以 CO<sub>2</sub> 安樂死犧牲，進行解剖，肉眼檢查外觀、口腔、胸腔及腹腔內所有組織與器官，取腎上腺、腦、心、腎、肝、脾、睪丸或卵巢等臟器分別稱重及記錄。將組織製成石蠟組織塊，再以石蠟組織切片機(Accu-Cut® SRM-100, Sakura Finetechnical Co., Ltd., Japan)切片，以光學顯微鏡(BX51, Olympus, Tokyo, Japan)觀察 H&E 染色切片標本，並由中興大學動物醫學研究中心執行各臟器組織病理變化判讀。

## 統計方法

實驗數據以平均值(Mean)±均值標準誤差(SEM)來表示，以單尾變異數分析(one-way analysis of variance)，依 Duncan's multiple range test 進行統計，若  $p < 0.05$  時，則視為具有統計上的差異，需進一步進行劑量-效應(dose-response)分析統計。

## 結 果

### 動物體重與飼料餵食量

於試驗期間，各組雌鼠與雄鼠平均體重(圖 1)所示。試驗結果顯示，所有動物皆無死亡現象，外觀非常正常，對照組或實驗組於實驗開始至第四週，體重持續穩定增加中。同時，由飼料消耗量(data not show)來觀察，無論對照組或實驗組於實驗開始至第三週結束，皆顯著增加，僅低劑量雄鼠於第二週至第三週與中劑量雌鼠於第一週至第二週，食量有減少趨勢，但各劑量組大鼠體重變化與對照組之雌、雄性大鼠並無顯著性差異( $p > 0.05$ )。

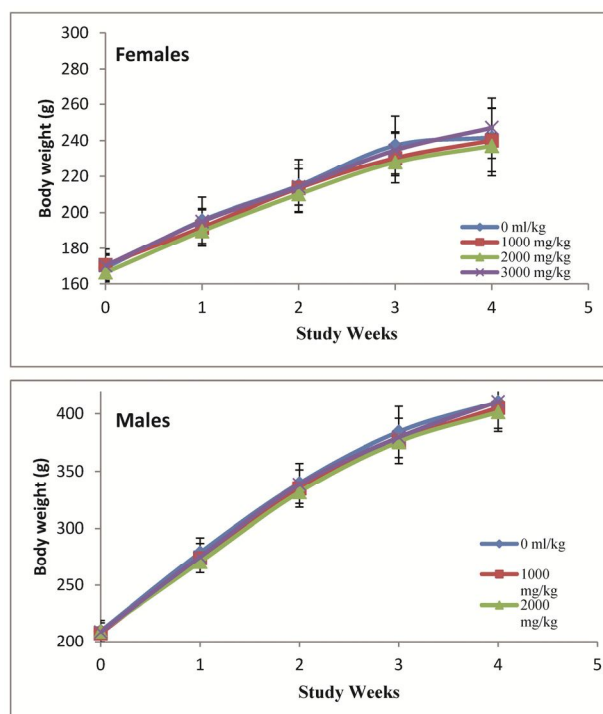


圖 1 亞急性毒性測試餵食「蛹蟲草菌絲體發酵液粉」後，對 SD 大鼠體重變化之影響

## 臨床病理檢驗

試驗結束時，所有動物經二氧化碳麻醉，腹腔大靜脈採血犧牲，解剖，以肉眼檢查外觀、口腔、顱腔、胸腔及腹腔內所有臟器，皆無與試驗物質有關之明顯肉眼可見病變。

試驗結束後，試驗動物的主要臟器包括腎上腺、腦、心臟、腎臟、肝臟、脾臟、睪丸或卵巢皆取出秤重，其相對與絕對重量(表 1)顯示，除了低劑量雄鼠腦重量較對照組有顯著性增重，低劑量及高劑量雄鼠心臟相對於腦的重量百分率，較對照組有顯著減輕的情形外，但仍皆在正常生理值範圍內，各劑量組臟器與對照組相比，均無明顯肉眼可觀察之病變和病理組織上的變化，且無劑量與反應之相關性。

給予蛹蟲草的實驗組在血液學檢查上，與對照組比較，隨著劑量的增加，紅血球數(RBC)、血紅素(HGB)、血球容積比(HCT)、平均紅血球體積(MCV)、平均血紅素(MCH)、平均血紅素濃度(MCHC)、平均血小板容積(MPV)、單核球(MONO)、嗜酸性球(EOS)及嗜鹼性球(BASO)均未見到明顯的變化(表 2)，唯有中劑量雄鼠，血小板數(PLT)和嗜中性球百分率(NEUT)較對照組顯著增加，低、中劑量雄鼠白血球數(WBC)和淋巴球百分率(LYMPH)顯著性下降；中、高

劑量雌鼠，白血球數隨著劑量的增加顯著性上升，而低、中劑量雌鼠的嗜中性球和淋巴球百分率，則分別較對照組有顯著升高及降低。然而，上述數值雖與對照組相比有統計上的差異，但這些項目的平均值仍落在參考範圍內，且無劑量與反應之相關性。因此，可推測並非試驗物質所引起的毒性反應。

另外，血清生化學分析方面(表 3)顯示，與對照組相比對，發現隨著劑量增加，血清生化常規未見到明顯的升高或下降，僅在低、中劑量雄鼠方面，氯離子濃度顯著性增加；中劑量雌鼠，尿素氮濃度(BUN)有顯著性下降，但其差異仍在正常生理值範圍內，且無劑量與反應之相關性。

表 1 亞急性毒性測試餵食「蛹蟲草菌絲體發酵液粉」後，對 SD 大鼠臟器重量之影響

Item	Dosage (mg/kg)				
	0	1000	2000	3000	
<b>Male</b>					
Brain	weight (g)	1.98 ± 0.037	2.061 ± 0.094*	1.985 ± 0.080	2.049 ± 0.070
Adrenal	weight (g)	0.0532 ± 0.0083	0.0498 ± 0.0082	0.0515 ± 0.0038	0.0477 ± 0.0082
	ratio (%)	2.6893 ± 0.4361	2.4202 ± 0.4075	2.6050 ± 0.2995	2.3271 ± 0.3873
Heart	weight (g)	1.478 ± 0.214	1.378 ± 0.058	1.355 ± 0.153	1.362 ± 0.090
	ratio (%)	0.748 ± 0.103	0.671 ± 0.044*	0.681 ± 0.066	0.666 ± 0.035*
Kidney	weight (g)	3.015 ± 0.282	2.968 ± 0.324	2.952 ± 0.443	3.134 ± 0.257
	ratio (%)	1.524 ± 0.134	1.440 ± 0.148	1.485 ± 0.195	1.529 ± 0.120
Liver	weight (g)	12.811 ± 1.676	13.302 ± 1.825	12.591 ± 1.812	13.151 ± 1.101
	ratio (%)	6.477 ± 0.896	6.453 ± 0.817	6.330 ± 0.765	6.415 ± 0.444
Spleen	weight (g)	0.720 ± 0.108	0.707 ± 0.097	0.758 ± 0.137	0.709 ± 0.130
	ratio (%)	0.364 ± 0.054	0.344 ± 0.041	0.382 ± 0.066	0.347 ± 0.064
Testes	weight (g)	3.276 ± 0.264	3.181 ± 0.276	3.303 ± 0.321	3.329 ± 0.165
	ratio (%)	1.653 ± 0.125	0.154 ± 0.121	1.666 ± 0.158	1.626 ± 0.078
<b>Female</b>					
Brain	weight (g)	1.834 ± 0.071	1.870 ± 0.060	1.851 ± 0.085	1.855 ± 0.042
Adrenal	weight (g)	0.0606 ± 0.0108	0.0615 ± 0.0046	0.0763 ± 0.0270	0.0610 ± 0.0064
	ratio (%)	3.2955 ± 0.5105	3.2899 ± 0.2280	4.1005 ± 1.3237	3.2936 ± 0.3951
Heart	weight (g)	0.806 ± 0.0850	0.835 ± 0.069	0.849 ± 0.054	0.857 ± 0.081
	ratio (%)	0.438 ± 0.047	0.445 ± 0.029	0.459 ± 0.032	0.463 ± 0.049
Kidney	weight (g)	1.823 ± 0.301	1.803 ± 0.126	1.755 ± 0.089	1.842 ± 0.150
	ratio (%)	0.992 ± 0.147	0.963 ± 0.052	0.951 ± 0.059	0.993 ± 0.090
Liver	weight (g)	7.375 ± 0.679	7.362 ± 0.836	7.172 ± 0.382	7.821 ± 0.684
	ratio (%)	4.027 ± 0.406	3.931 ± 0.368	3.878 ± 0.222	4.221 ± 0.419
Spleen	weight (g)	0.434 ± 0.067	0.463 ± 0.082	0.437 ± 0.040	0.476 ± 0.044
	ratio (%)	0.237 ± 0.036	0.247 ± 0.038	0.237 ± 0.022	0.257 ± 0.028
Ovaries	weight (g)	0.0736 ± 0.0179	0.0845 ± 0.0297	0.0812 ± 0.0077	0.0786 ± 0.0156
	ratio (%)	4.0158 ± 0.9677	4.5243 ± 1.6372	4.3907 ± 0.4081	4.2459 ± 0.8845

<sup>a</sup> Relative organ weight (%) = [organ weight (g)/body weight(g)] × 100%

表 2 亞急性毒性測試餵食「蛹蟲草菌絲體發酵液粉」後，對 SD 大鼠血液分析之影響

Item		Dosage (mg/kg)			
		0	1000	2000	3000
<b>Male</b>					
RBC	(10 <sup>6</sup> /μl)	7.989 ± 0.353	8.144 ± 0.358	7.794 ± 0.243	8.109 ± 0.443
HGB	(g/dl)	15.67 ± 0.49	15.77 ± 0.48	15.27 ± 0.61	15.72 ± 0.81
HCT	(%)	50.42 ± 1.64	50.61 ± 1.59	49.33 ± 1.44	50.55 ± 2.40
MCV	(fl)	63.16 ± 1.71	62.22 ± 2.20	63.31 ± 1.43	62.37 ± 1.5
MCH	(pg)	19.64 ± 0.64	19.39 ± 0.72	19.58 ± 0.43	19.38 ± 0.40
MCHC	(g/dl)	31.09 ± 0.48	31.16 ± 0.61	30.95 ± 0.62	31.10 ± 0.45
PLT	(10 <sup>3</sup> /μl)	1106.6 ± 128.2	1146.1 ± 152.7	1329.4 ± 209.2*	1173.7 ± 125.0
MPV	(fl)	7.7 ± 0.24	7.83 ± 0.31	7.73 ± 0.27	7.74 ± 0.19
PT	(sec)	12.86 ± 1.64	13.68 ± 1.05	12.64 ± 1.13	12.82 ± 1.49
WBC	(/uL)	10534 ± 1849.8	8046 ± 1474.0*	8188.0 ± 2497.0	10194.0 ± 2799.1
NEUT	(%)	13.29 ± 1.93	16.86 ± 5.48	19.08 ± 4.01*	16.88 ± 2.40
LYMPH	(%)	82.01 ± 3.79	78.51 ± 6.29	75.78 ± 4.59*	78.95 ± 3.63
MONO	(%)	3.98 ± 2.56	3.85 ± 1.92	4.39 ± 0.87	3.31 ± 1.51
EOS	(%)	0.63 ± 0.28	0.71 ± 0.31	0.70 ± 0.33	0.76 ± 0.28
BASO	(%)	0.09 ± 0.06	0.07 ± 0.07	0.05 ± 0.07	0.1 ± 0.07
<b>Female</b>					
RBC	(10 <sup>6</sup> /μl)	8.174 ± 0.354	8.243 ± 0.435	8.066 ± 0.240	7.841 ± 0.261
HGB	(g/dl)	15.78 ± 0.57	15.85 ± 0.59	15.64 ± 0.69	15.28 ± 0.52
HCT	(%)	52.30 ± 1.48	52.02 ± 1.70	51.14 ± 2.08	51.35 ± 1.29
MCV	(fl)	64.07 ± 2.88	63.20 ± 2.44	63.43 ± 2.48	65.53 ± 2.15
MCH	(pg)	19.33 ± 0.63	19.26 ± 0.67	19.40 ± 0.62	19.50 ± 0.70
MCHC	(g/dl)	30.17 ± 0.83	30.45 ± 0.50	30.59 ± 0.77	29.77 ± 1.04
PLT	(10 <sup>3</sup> /μl)	1120.6 ± 68.9	1186.2 ± 114.6	1103.9 ± 137.9	1035.8 ± 176.4
MPV	(fl)	7.73 ± 0.20	7.73 ± 0.22	7.68 ± 0.23	7.73 ± 0.25
PT	(sec)	9.46 ± 0.23	9.49 ± 0.30	9.57 ± 0.32	9.37 ± 0.25
WBC	(/uL)	10000 ± 1441.6	8299.0 ± 2205.1	7208.0 ± 1614.4*	8048.0 ± 1704.7*
NEUT	(%)	12.11 ± 1.69	20.15 ± 4.54*	17.89 ± 3.67*	14.46 ± 3.78
LYMPH	(%)	82.22 ± 2.11	74.47 ± 3.74*	77.05 ± 4.51*	80.50 ± 4.49
MONO	(%)	4.81 ± 1.46	4.10 ± 1.96	3.81 ± 1.17	3.92 ± 1.94
EOS	(%)	0.76 ± 0.33	1.17 ± 0.42	1.12 ± 0.53	1.00 ± 0.41
BASO	(%)	0.10 ± 0.05	0.11 ± 0.09	0.13 ± 0.12	0.12 ± 0.09

表 3 亞急性毒性測試餵食「蛹蟲草菌絲體發酵液粉」後，對 SD 大鼠血清生化分析之影響

Item		Dosage (mg/kg)			
		0	1500	3000	5000
<b>Male</b>					
ALT	( $\mu$ l)	45.7 $\pm$ 5.3	48.9 $\pm$ 9.4	41.8 $\pm$ 6.0	45.7 $\pm$ 3.2
AST	( $\mu$ l)	120.9 $\pm$ 23.9	122.2 $\pm$ 19.1	110.2 $\pm$ 13.5	133.8 $\pm$ 19.4
ALP	( $\mu$ l)	169.6 $\pm$ 38.4	170.1 $\pm$ 41.1	180.3 $\pm$ 24.1	161.6 $\pm$ 40.3
BIT	(mg/dl)	0.500 $\pm$ 0.105	0.480 $\pm$ 0.148	0.480 $\pm$ 0.132	0.510 $\pm$ 0.099
GGT	( $\mu$ l)	0.80 $\pm$ 0.48	1.65 $\pm$ 1.76	1.85 $\pm$ 2.08	2.15 $\pm$ 2.17
TP	(g/dl)	5.61 $\pm$ 0.17	5.79 $\pm$ 0.27	5.65 $\pm$ 0.33	5.68 $\pm$ 0.24
ALB	(g/dl)	4.36 $\pm$ 0.13	4.45 $\pm$ 0.19	4.40 $\pm$ 0.24	4.45 $\pm$ 0.11
GLO	(g/dl)	1.25 $\pm$ 0.10	1.34 $\pm$ 0.30	1.25 $\pm$ 0.17	1.23 $\pm$ 0.17
AMY	( $\mu$ l)	1893.6 $\pm$ 173.2	1910.4 $\pm$ 280.9	1714.8 $\pm$ 290.3	2088.8 $\pm$ 370.7
BUN	( $\mu$ l)	12.95 $\pm$ 2.05	13.58 $\pm$ 2.08	13.92 $\pm$ 1.84	12.87 $\pm$ 2.26
CRE	(mg/dl)	0.627 $\pm$ 0.122	0.640 $\pm$ 0.093	0.546 $\pm$ 0.075	0.726 $\pm$ 0.094
LDH	( $\mu$ l)	896.5 $\pm$ 586.3	732.8 $\pm$ 486.7	595.5 $\pm$ 273.9	1077.8 $\pm$ 496.0
CPK	( $\mu$ l)	475.6 $\pm$ 322.9	362.6 $\pm$ 211.8	327.6 $\pm$ 159.6	439.8 $\pm$ 157.2
GLU	(mg/dl)	123.8 $\pm$ 34.0	136.9 $\pm$ 44.6	140.8 $\pm$ 39.0	116.5 $\pm$ 22.3
TC	(mg/dl)	29.9 $\pm$ 6.4	31.0 $\pm$ 13.1	339. $\pm$ 9.8	27.8 $\pm$ 10.1
TG	(mg/dl)	36.3 $\pm$ 15.5	37.8 $\pm$ 23.5	19.1 $\pm$ 15.8	36.9 $\pm$ 15.4
Na	(mEq/l)	146.4 $\pm$ 0.8	147.3 $\pm$ 1.3	147.0 $\pm$ 1.6	147.3 $\pm$ 1.2
K	(mEq/l)	7.41 $\pm$ 0.86	7.42 $\pm$ 0.84	8.16 $\pm$ 0.73	7.24 $\pm$ 1.10
Cl	(mEq/l)	98.4 $\pm$ 1.2	100.6 $\pm$ 1.3*	100.6 $\pm$ 2.2*	98.1 $\pm$ 2.1
Ca	(mg/dl)	10.78 $\pm$ 0.43	11.03 $\pm$ 0.41	11.09 $\pm$ 0.53	10.94 $\pm$ 0.39
P	(mg/dl)	13.92 $\pm$ 1.67	13.44 $\pm$ 1.55	13.48 $\pm$ 1.36	14.90 $\pm$ 1.44
<b>Female</b>					
ALT	( $\mu$ l)	46.0 $\pm$ 5.9	43.4 $\pm$ 4.5	45.2 $\pm$ 4.9	44.9 $\pm$ 5.3
AST	( $\mu$ l)	156.7 $\pm$ 21.8	150.8 $\pm$ 18.8	155.5 $\pm$ 16.0	143.0 $\pm$ 12.0
ALP	( $\mu$ l)	111.2 $\pm$ 38.3	109.0 $\pm$ 30.8	109.2 $\pm$ 12.9	96.7 $\pm$ 15.9
BIT	(mg/dl)	0.720 $\pm$ 0.114	0.640 $\pm$ 0.135	0.570 $\pm$ 0.142	0.600 $\pm$ 0.105
GGT	( $\mu$ l)	0.80 $\pm$ 0.48	1.45 $\pm$ 1.50	1.65 $\pm$ 2.10	1.55 $\pm$ 1.26
TP	(g/dl)	6.10 $\pm$ 0.31	5.92 $\pm$ 0.24	3.26 $\pm$ 0.32	5.92 $\pm$ 0.25
ALB	(g/dl)	4.96 $\pm$ 0.29	4.75 $\pm$ .27	4.91 $\pm$ 0.31	4.86 $\pm$ 0.21
GLO	(g/dl)	1.14 $\pm$ 0.38	1.17 $\pm$ 0.14	1.32 $\pm$ 0.11	1.06 $\pm$ 0.15
AMY	( $\mu$ l)	1168.2 $\pm$ 167.2	1167.0 $\pm$ 149.4	1129.7 $\pm$ 148.5	1363.6 $\pm$ 349.2
BUN	( $\mu$ l)	14.49 $\pm$ 1.07	14.23 $\pm$ 2.08	12.53 $\pm$ 1.3*	14.07 $\pm$ 1.61
CRE	(mg/dl)	0.748 $\pm$ 0.076	0.748 $\pm$ 0.095	0.729 $\pm$ 0.075	0.731 $\pm$ 0.072
LDH	( $\mu$ l)	1609.9 $\pm$ 281.0	1750.0 $\pm$ 560.5	1711.7 $\pm$ 414.6	1572.2 $\pm$ 207.9
CPK	( $\mu$ l)	711.0 $\pm$ 214.4	712.7 $\pm$ 320.1	716.1 $\pm$ 221.3	719.6 $\pm$ 189.7
GLU	(mg/dl)	90.9 $\pm$ 25.6	101.0 $\pm$ 31.9	90.5 $\pm$ 25.1	111.2 $\pm$ 18.2
TC	(mg/dl)	42.4 $\pm$ 8.1	37.5 $\pm$ 7.8	36.7 $\pm$ 5.7	40.3 $\pm$ 10.7
TG	(mg/dl)	44.6 $\pm$ 13.3	37.6 $\pm$ 15.7	39.6 $\pm$ 7.3	43.3 $\pm$ 17.6
Na	(mEq/l)	144.4 $\pm$ 1.6	144.9 $\pm$ 1.7	144.8 $\pm$ 1.5	144.6 $\pm$ 1.4
K	(mEq/l)	7.58 $\pm$ 0.62	7.19 $\pm$ 0.72	7.80 $\pm$ 1.45	7.28 $\pm$ 0.75
Cl	(mEq/l)	99.3 $\pm$ 1.3	98.1 $\pm$ 1.7	99.9 $\pm$ 1.7	98.6 $\pm$ 1.5
Ca	(mg/dl)	11.05 $\pm$ 0.48	10.87 $\pm$ 0.40	10.95 $\pm$ 0.49	10.88 $\pm$ 0.28
P	(mg/dl)	14.82 $\pm$ 1.91	14.27 $\pm$ 1.38	14.03 $\pm$ 1.84	13.61 $\pm$ 1.06

表 4 亞急性毒性測試餵食「蛹蟲草菌絲體發酵液粉」後，對 SD 大鼠病理切片判讀

Organ	Lesions	Male		Female	
		control	high	control	high
Adrenals		0/10	0/10	0/10	0/10
Brain		0/10	0/10	0/10	0/10
Heart					
	infiltration, mononuclear cells, interstitial, focal miminal†	1/10	0/10	0/10	0/10
Kidneys					
	cyst, focal slight†	1/10	0/10	0/10	0/10
	fibrosis, interstitial, focal miminal†	0/10	0/10	0/10	1/10
	slight†	1/10	0/10	0/10	0/10
	hyaline cast, tubule, focal miminal†	0/10	0/10	0/10	1/10
	infiltration, mononuclear cells, interstitial, focal miminal†	0/10	0/10	0/10	1/10
	slight†	1/10	0/10	0/10	0/10
	mineralization, tubule, focal miminal†	0/10	0/10	4/10	2/10
	regeneration, tubule, focal miminal†	0/10	2/10	0/10	1/10
	slight†	1/10	0/10	0/10	0/10
Spleen		0/10	0/10	0/10	0/10
Ovaries		-	-	0/10	0/10
Testes		0/10	0/10	-	-

## 組織病理檢驗

高劑量組及對照組之雌、雄鼠體臟器更進一步以 H&E 染色，觀察腎上腺、腦、心、腎、肝、脾、睪丸或卵巢之臟器組織病理變化(圖 2)，少數非特異性病變案例包括：對照組一隻雌鼠的心臟(圖 3A)出現局部單核炎症細胞浸潤(mononuclear cell infiltration)，發生率 1/10；另外，腎臟組織切片圖顯示(圖 3B-D)，對照組雌鼠腎臟出現局部腎小管囊腔(tubular cyst)、對照組及高劑量雌鼠腎小球出現間質纖維化(interstitial fibrosis)

及單核炎症細胞浸潤，發生率各為 1/10；高劑量雌鼠出現局部腎小管透明圓柱(tubular hyaline cast)，發生率 1/10；對照組雄鼠、高劑量雄鼠及雌鼠出現腎小管再生(tubular regeneration)，發生率各為 1/10、2/10 及 1/10；對照組與高劑量雌鼠發生腎小管內礦物質沉積(mineralization)病變，發生率為 4/10 及 2/10，整體來說，以上非特異病理變化皆為少數案例，統計結果顯示，以上病變與發生率於對照組與高劑量雌、雄大鼠間，並不具有試驗物質與病變發生之正相關性。



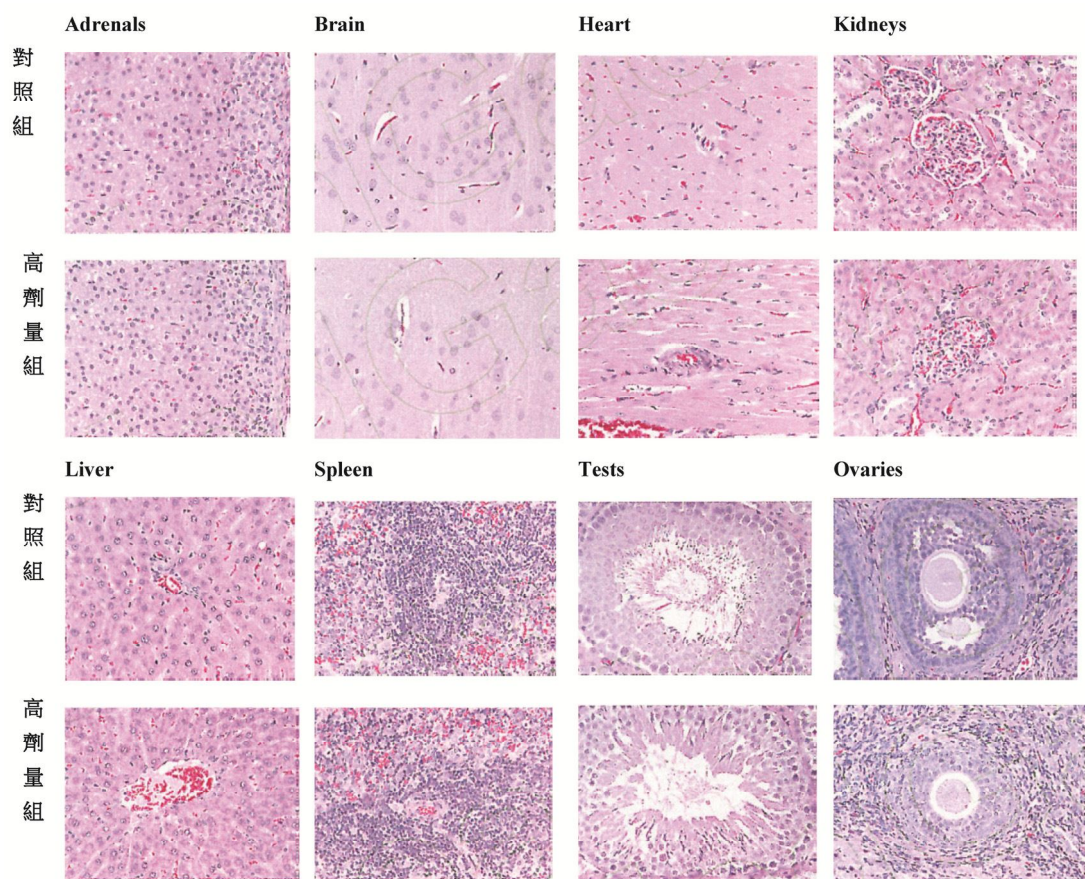


圖 2 亞急性毒性測試餵食「蛹蟲草菌絲體發酵液粉」後，對 SD 大鼠各臟器無明顯組織病理變化。圖為以 H&E 染色切片，400 X

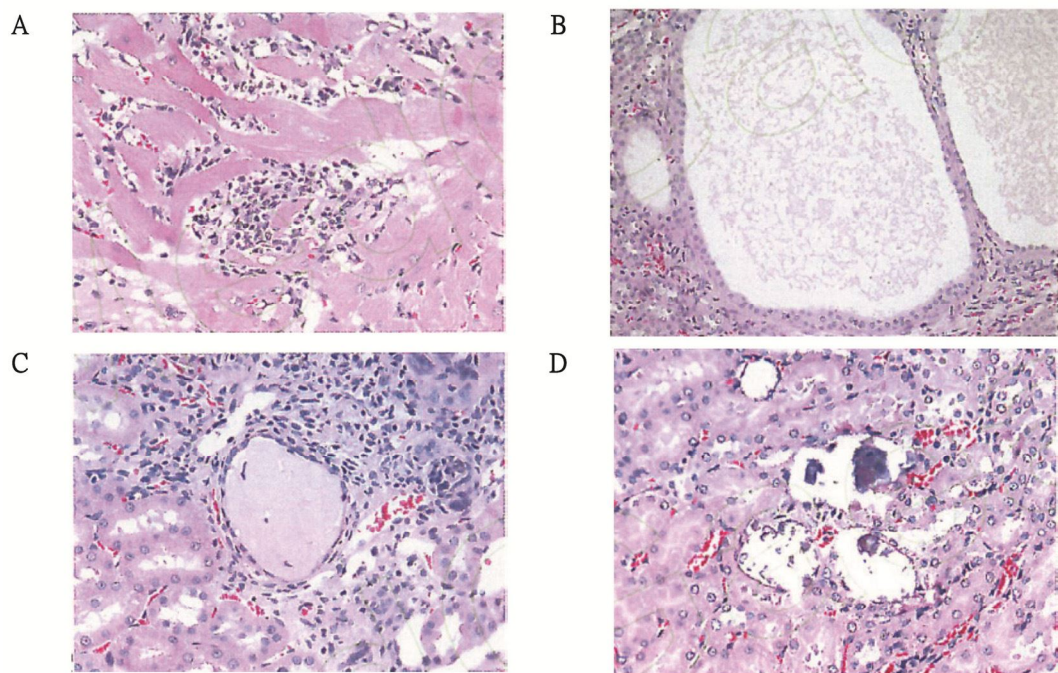


圖 3 亞急性毒性測試中少數非特異之組織病理變化：(A)心臟出現局部極微單核炎症細胞浸潤；(B)局部極微之輕微腎間質纖維化、單核；(C)炎症細胞浸潤、腎小管再生及圓柱體堆積；(D)局部極微腎臟礦物質化。圖為以 H&E 染色切片，400 X



蛹蟲草(*C. militaris*)與冬蟲夏草(*C. sinensis*)同屬於蟲草屬，由於冬蟲夏草自古即被視為珍貴滋補的中藥材，有滋肺補腎的功能，但因濫採亂挖使其產量逐年遞減且價格飆漲，故人們開始尋找與冬蟲夏草具有相同活性的替代品。蛹蟲草分布廣泛，取得容易，已成功發展蛹蟲草的人工培養技術，且含有蟲草素和蟲草多醣等成分貢獻獨特的藥理作用，因此，蛹蟲草已逐漸取代冬蟲夏草，產學各界也積極的對蛹蟲草栽培及保健功效等進行研究，目前各國法規中，僅台灣對子實體部分有規範，至於蛹蟲草菌絲體發酵液粉，目前則尚無規範。

液體發酵最大的優點是菌種來源穩定，製程時間縮短、產能放大及確保有效成分再現性。菌絲體由於菌絲未分化，能產生之二級代謝物的種類較少，且含量較低，所以 cordycepin 含量亦低於子實體很多(約 1/10)，可較不擔心其危害，但仍須先建立其安全性資料，以供評量之依據。先前已發表文獻<sup>[18]</sup>，顯示蛹蟲草菌絲體發酵液粉不具有基因毒性及口服急毒性的疑慮，故進一步進行大鼠 28 天餵食毒性試驗，本實驗依據衛福部食藥署健康食品安全性評估方法並依循國際經濟合作暨開發組織(OECD)之規範來進行。

在組織病理切片染色上，觀察到幾個非特異病變的案例，其中，對照組與高劑量雌鼠發生腎小管內礦物質沉積(mineralization)病變(發生率為 4/10 及 2/10)，可能為腎鈣化的初期現象，推測的原因有二，其一為此現象於 SD、Wistar 及 F344 雌鼠之發生率高，可能與雌性荷爾蒙作用有關<sup>[19]</sup>。其二為飼料中含鈣與磷比率小於 1、缺鎂、缺氯，以及尿中 pH 值太高，均可能誘發高發生率之鈣沉積<sup>[20]</sup>。鈣沉積於腎盂部，可能阻塞腎小管，尿液排出速度較慢，進而導致腎小管擴張，腎絲球體鮑氏囊腔及腎小管腔內有蛋白質樣均質滲出液堆積等慢性進行性腎病，但是，慢毒性長期試驗中鈣沉積病變與癌症發生，兩者間並無直接相關性<sup>[21,22]</sup>。綜合上述各項研究結果，蛹蟲草菌絲體發酵液粉經口連續餵食大鼠 28 天安全性試驗之無毒性顯示劑量(no observed adverse effect level, NOVAEL)大於 3000mg/kg/day，顯示不具 28 天急毒性的疑慮。

1. 林樹前。中國藥用菌生產與產品開發。中國農業出版社，2000：401。
2. Nan JX, Park EJ, Yang BK, *et al*: Antifibrotic effect of extracellular biopolymer from submerged mycelial cultures of *Cordyceps militaris* on liver fibrosis induced by bile duct ligation and scission in rats. Arch Pharm Res 2001; 24(4):327-32.
3. Kuo CF, Chen CC, Lin CF *et al*: Abrogation of streptococcal pyrogenic exotoxin B-mediated suppression of phagocytosis in U937 cells by *Cordyceps sinensis* mycelium via production of cytokines. Food Chem Toxicol 2007; 45:278-85.
4. Won SY, Park EH: Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. J Ethnopharmacol 2005; 96:555-61.
5. Kim HG, Shrestha B, Lim SY *et al*: Cordycepin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation by the suppression of NF- $\kappa$ B through Akt and p38 inhibition in RAW 264.7 macrophage cells. Eur J Pharmacol 2006; 545:192-9.
6. Li SP, Zhang GH, Zeng Q *et al*: Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured *Cordyceps* mycelia. Phytomedicine 2006; 13:428-33.
7. Kihō T, Hui JI, Yamane A *et al*: Polysaccharides in fungi XXXII. Hypoglycemic activity and chemical properties of a polysaccharides from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis*. Biol Pharm Bull 1993; 16:1291-3.
8. Koh JH, Kim JM, Chang UJ *et al*: Hypocholesterolemic effect of hot-water extract from mycelia of *Cordyceps sinensis*. Biol Pharmacol 2003; 26:84-7.
9. Lin YW, Chiang BH: Anti-tumor activity of the fermentation broth of *Cordyceps militaris* cultured in the medium of *Radix astragali*. Process Biochem 2008; 43:244-50.
10. Yamaguchi Y, Kagota S, Nakamura K *et al*: Antioxidant activity of the extracts from fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis*. Phytother Res 2000; 14:647-9.
11. Yu HM, Wang BS, Huang SC *et al*: Comparison of protective effects between cultured *Cordyceps militaris* and natural *Cordyceps sinensis* against oxidative damage. J Agric Food Chem 2006; 54:3132-8.
12. Won SY, Park EH: Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. J. Ethnopharmacol. 2005; 96:555-561.
13. Russell R, Paterson M: Cordyceps -A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? Review Phytochemistry 2008; 69:1469-95.
14. 胡豐林、李增智。蟲草及相關真菌的次生代謝產物及其活性。菌物學報 2007；26:607-32。
15. 溫魯、張平、唐玉玲。蛹蟲草孢子粉活性成分分析。江蘇農業學報 2005；21:139-40。

16. 溫魯、尹起范、唐玉玲。蛹蟲草與有關蟲草活性成分檢測比較。食品科學 2004 ; 25:155-7。
17. 張平、朱述鈞、錢大順、蔣孫、李建軍。北冬蟲夏草功能成分及保健作用分析。江蘇農業科學 2003 ; 6:105-7。
18. 劉曉卉、謝逸璇、陳家榮、施君翰、彭依婷、陳勁初。蛹蟲草發酵液凍乾粉之基因毒性及急毒性分析。TTQAA 2015 ; 4:23-33。
19. Reeves PG, Rossow KL, Lindlauf J: Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. *J. Nutr* 1993; 123:1023-1031.
20. Schoenmakers AC, Ritskes HJ, *et al*: Influence of dietary phosphorus metabolism in rats. *Internat. J. Vit. Res* 1989; 59:200-206.
21. Owen RA, Heywood R: Age-related variations in renal structure and function in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol* 1986; 14:158-167.
22. Rao GN: Diet and kidney diseases in rats. *Toxicol Pathol* 2002; 30:651-656.

## 28-Day Subacute Oral Toxicity Assessment of *Cordyceps Mmilitaris* Mycelium in Rats

Hsiao-Hui Liu<sup>1</sup>, Shu-Hsing Yeh<sup>1</sup>, Chiao-Hua Chen<sup>2</sup>, Chin-Chu Chen<sup>1,3,4,5,6\*</sup>

<sup>1</sup>Bioengineering Center of Grape King Bio Ltd., Taoyuan City;

<sup>2</sup>Chia Nan University of Pharmacy and Science, Tainan City;

<sup>3</sup>Department of Food Science, Nutrition, and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei City;

<sup>4</sup>Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei City;

<sup>5</sup>School of Applied Science, National Hsinchu University of Education, Hsinchu City;

<sup>6</sup>School of Bioscience Technology, Chung Yuan Christian University, Taoyuan City; Taiwan

The 28-day subacute oral toxicity of *Cordyceps militaris* mycelium powder produced by liquid fermentation technology was defined in this study. The SD rats were allocated to one of four groups, each consisting of ten males and ten females by treating different oral dosage from 0 (control), 1000, 2000 to 3,000 mg/kg (b.w.). Rats were orally administered for 28 days in a row. Daily observations such as obvious anatomical and pathological lesions and body weight measurement, and weekly food intake calculation were performed. All animals survived to the end of the study, and results showed no significant differences on clinical presentations including urinalysis, hematology, clinical chemistry, organ weight and histopathological changes. Therefore, no-observed--adverse-effect level (NOAEL) on *C. militaris* powder is considered to be at least greater than 3,000 mg/kg b.w..

**Key words:** *Cordyceps militaris*, mycelium powder, 28-day subacute oral toxicity

---

Received: February 19, 2016    Revised: April 25, 2016    Accepted: April 26, 2016

\*Correspondence to: Chin-Chu Chen, Bioengineering Center of Grape King Bio Ltd., Taoyuan City; No.60, Sec.3, Long-gang Rd., Zhong-Li Dist., Taoyuan City 320, Taiwan, R.O.C.

Tel : +886 34572121 ext. 234,    E-mail: gkbioeng@grapeking.com.tw