

蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉於 Sprague-Dawley 大鼠之 28 天口服亞急毒性試驗分析

江逸敏¹，吳家駒²，洪鳴遠²，陳宜廷²，廖俊旺³，施養佳⁴，陳勁初^{1,5-7*}

葡萄王生技股份有限公司，桃園市¹；財團法人食品工業發展研究所，新竹市²；國立中興大學獸醫病理研究所，台中市³；
亞洲大學生物科技學系，台中市⁴；國立台灣大學食品科技研究所，台北市⁵，實踐大學食品營養與保健生技學系，
台北市⁶；國立彰化師範大學生物科技研究所，彰化市⁷，台灣

摘要

蜜環菌（學名：*Armillaria mellea*），屬白蘑科(*Tricholomataceae*)，分布於全球各地區，為藥食兼用菌。本實驗依據衛福部食藥署健康食品安全性評估方法，檢驗試驗物質以蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉 0.4 g/kg bw/day（低劑量）、2.0 g/kg bw/day（中劑量）及 4.0 g/kg bw/day（高劑量）三種劑量連續經口服給予 Sprague-Dawley 大鼠 28 天後，每日進行試驗動物之臨床觀察，且每周測量試驗動物之體重及攝食量。試驗結束後，犧牲大鼠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。結果顯示各劑量組實驗動物未顯示任何臨床毒性症狀；在平均體重與體重增長百分率(%)以及試驗大鼠的攝食量方面，各處理組均與對照組間無顯著性差異。血液學檢查、血清生化檢查，雖有少數項目與對照組具顯著差異，但無劑量關係。在尿液相關數值及臟器重量與臟器相對重量百分比(%)測定上，各劑量組與對照組間均無顯著性差異。肉眼及組織病理檢查結果，各劑量組均無明顯與試驗物質有關之病理變化。其他非特異性病變及發生率於對照組與處理組間之雌雄鼠並無劑量與病變相關性。綜合以上實驗結果，大鼠經連續管餵 28 天蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉之無毒害作用劑量(no observed adverse effect level, NOAEL)大於 4.0g/kg bw/day。

關鍵字：蜜環菌、28 天口服亞急毒性試驗、NOAEL

前言

蜜環菌(*Armillaria mellea*)又名榛蘑、臻蘑、蜜蘑、蜜環蕈或櫟蕈，屬於擔子菌門、傘菌綱、傘菌目，蜜環菌屬之真菌。為一中國傳統民間藥物，有清肺、驅寒、益胃等功效，可治療皮膚乾燥、眼炎和夜盲症^[1]。其菌索 (Rhizomorph) 常生長於天麻的塊莖上，是一種與天麻(*Gastrodia elata Blume*)共

生的藥用真菌^[2]，天麻為中醫臨床常用之中藥，《本草綱目》中記載，天麻主治風濕、四肢痙攣、暈眩頭痛、小兒驚癇等。蜜環菌其子實體，菌絲體及菌索皆可入藥，具有很高的開發價值^[3]。蜜環菌含有多種化合物，包含固醇類，脂肪酸，萜類，吡啶化合物及腺苷衍生物等成分^[4]。近年來更有以利用液態發酵技術進行培養之研究^[5]，不僅能縮短培養時間，且栽培不受天候影響等優點。液態培養產生之多醣為重要活性成分之一^[6,7]，具有免疫調節^[8-11]、調節血糖^[12]、抗氧化^[13]、抗暈眩^[14]等活性。

由於過去少有文獻探討蜜環菌菌絲體發

*具通訊地址：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. 2994
E-mail address：gkbioeng@grapeking.com.tw

酵液的安全性，故依照衛服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，以提供未來產品開發之安全性考量。

材料與方法

蜜環菌菌絲體凍乾粉製備

蜜環菌菌種來源(BCRC-36361)係購自財團法人食品工業發展研究所生資中心(新竹，台灣)。利用深層液態發酵方式培養而成之菌絲體發酵液凍乾粉做為測試材料。

液態發酵培養方法

將培養於 PDA 平板上之蜜環菌菌絲，擷取 0.5 cm 正方大小菌塊，接入 2 L 三角(一升科技，台灣)搖瓶中，培養溫度控制為 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，在震盪器轉速為 120 rpm 的條件下培養二週後，接入 500 L 發酵槽，培養條件為攪拌 50 rpm，通氣量 0.5 vvm 下培養一週後，再接入 20 噸發酵槽培養一週(培養條件：溫度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ，攪拌 50 rpm，通氣量 0.5 vvm)，蜜環菌發酵液經濃縮、冷凍乾燥及磨粉後即成為「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」。

實驗動物和飼養

四周齡之 Sprague-Dawley 品系老鼠，係購買自樂斯科生技園區實驗動物培育及研發中心(宜蘭，台灣)。試驗開始之動物週齡為 5 週。動物耳朵分別標記，每飼育盒附有識別卡，加以識別。本試驗經由食工所動物管理小組審核通過(動物實驗審查字號「動管字第 102-29 號」)。動物飼養室之環境設定為 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ，12 小時光照/黑暗， $60 \pm 10\%$ 相對溼度。飼料(由德國 altromin 公司生產 1324N 真空包裝 SPE 級粒狀飼料，購自捷懿企業股份有限公司)與飲水則無限制供應。每次給予飼料時皆需秤重並記錄之。動物經過 1 週適應後，始進行試驗，試驗期共 4 週。

試驗設計

在適應期間，進行動物秤重及臨床觀察，並以隨機方式分組。試驗劑量共 4 組，雌、雄鼠分開計，各組均為 12 隻，合計 96 隻。動物之組別乃依餵食「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」劑量分為 0、0.4、2.0 與 4.0 g/kg b.w./day 等四組。試驗物質每天秤取適量溶於過濾水中，震盪均勻後，即依大鼠體重分別餵食低、中及高劑量投與實驗動物，連續管餵食 28 天。

試驗觀察及記錄

試驗期間，觀察所有實驗動物並記錄動物是否死亡或瀕死，記錄其臨床症狀，觀察期為 4 週。實驗動物於試驗第一天、試驗期間每週及試驗終結前進行秤重。每週秤重飼料量一次，計算實驗動物每隻每天平均飼料消耗量。

血液常規檢測

於試驗結束前，所有實驗動物至少禁食 16 小時。試驗結束當天，實驗動物以異氟醚(isoflurane)麻醉進行下腔靜脈採血，再以 CO_2 安樂死，血液收集在含 EDTA 抗凝劑的試管中(BD)，以全自動血球計數儀(Sysmex KX-21, Japan)測定：白血球數(white blood cell count, WBC count)、紅血球數(red blood cell count, RBC count)、血色素(hemoglobin, HGB)、血球容積比(hematocrit, HCT)、平均紅血球體積(mean corpuscular volume, MCV)、平均紅血球血紅素(mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均紅血球濃度(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)及血小板(platelet, PLT)等項目。

血清生化值分析

實驗動物以異氟醚(isoflurane)麻醉採血，再以 CO_2 安樂死，血液收集在試管中(BD)，

離心並分離血清後，以血清生化自動分析儀 (Vitros® 350, US) 測定：白蛋白(albumin, ALB)、鹼性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、丙氨酸轉氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天門冬氨酸轉氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、麩胺醯轉移酶(γ -glutamyl transferase, GGT)、總膽紅素(total bilirubin, T-BIL)、總蛋白(total protein, T-PROT)、葡萄糖(glucose, GLU)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌氨酸(creatinine, CREA)及總膽固醇(cholesterol, CHOL)、高密度膽固醇(high density lipoprotein, HDL)、低密度膽固醇(low density lipoprotein, LDL)、三酸甘油酯(triglyceride, TG)及磷(inorganic phosphorus, P⁻³)、鈉(sodium, Na⁺)、鉀(potassium, K⁺)、氯(chloride, Cl⁻)、鈣(calcium, Ca²⁺)等離子濃度。

尿液檢驗

每組動物於試驗前及試驗結束前，將每隻實驗動物分別置於自製鐵籠中，收取尿液，進行尿液分析，並以尿液化學分析儀(Urilux® S, Boehringer Mannheim, Germany)測定：比重(specific gravity)、酸鹼值(pH)、白血球(leukocyte)、硝基鹽(nitrite)、蛋白質(protein)、

葡萄糖(glucose)、酮體(ketones)、尿膽紅素原(urobilinogen)、膽紅素(bilirubin)及潛血反應(occult blood)等。除 specific gravity 以數值表示外，其餘多項測定以陰性(-; negative)、微弱反應(\pm ; trace)、弱反應(+; slight)、中度反應(++; moderate)以及嚴重反應(+++; severe)等五級表示，區分如表 1，測定結果以動物隻數計數。

組織病理檢查

試驗終結，所有存活的實驗動物以 CO₂ 進行安樂死，放血後進行解剖，以肉眼檢查外觀、胸腔、腹腔內所有標的組織及器官，並記錄之。並取下所有實驗動物之肝、腎、腎上腺、脾、睪丸或卵巢等分別秤重並加以記錄，並以最後一周之體重(g)作為相對重量百分比(%)之計算基準。包括肝臟、睪丸(副睪尾)及卵巢、腎上腺及迴腸部、心臟、腎臟、脾臟及肺臟等，以 10% 中性福馬林固定保存。各臟器經粗修後，以石臘包埋，用石臘組織切片基(Leica RM 2145, Nussloch, Germany)製成 2 μ m 厚度之組織切片，以 Hematoxylin & Eosin (H&E) 染色，於顯微鏡 (BX-51, Olympus, Tokyo, Japan) 觀察各臟器之組織病理變化。

表 1 蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉於 Sprague-Dawley 大鼠之 28 天口服亞急性毒性試驗的尿液試驗項目分級對照表

尿液測驗項目	測量單位	反應分級				
		-	\pm	+	++	+++
Glucose	mg/dL		30-50	70-100	150-200	300-500
Protein	mg/dL		10-20	30-70	100-200	300-300
Bilirubin	mg/dL			0.5-1.0	2-4	6-10
Urobilinogen	mg/dL			2-3	4-6	6-10
Occult Blood	erythrocyte/ μ L		0.03	0.06-0.1	0.2-0.5	1.0-
Ketones	mg/dL			10-20	40-60	80-100
Nitrite	mg/dL			+	++	
Leukocyte	leukocyte/ μ L		25	75	250	500

統計分析與結果判定

實驗結果之數據以平均值(Mean) \pm 均數標準誤差(SEM)表示。體重、飼料消耗量、臨床病理檢驗值及臟器重量等數據，依 one-way ANOVA 進行統計，以 Dunnett t-test 進行實驗組與對照組間之比較。若 $p < 0.05$ ，則表示有顯著性差異。

結 果

臨床症狀觀察

28 天試驗期間，每天觀察各劑量組與對照組之雌、雄動物均存活，且皆無顯現任何臨床毒性症狀（表 2）。

體重與攝食量

各劑量組之大鼠平均體重與對照組比較，各處理組均與對照組間無顯著性差異（ $p > 0.05$ ，表 3）。大鼠餵食不同劑量試驗物質後，雖雌鼠在高劑量組餵食第 3 週之每天平均飼料消耗量均略低於對照組，具顯著差異性（ $p < 0.05$ ），但其大鼠體重均未因此減少，其餘處理組均與對照組間無顯著性差異（表 4）。

臨床病理與血液生化值分析

大鼠餵食不同劑量之「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」後，血液分析結果顯示，雖雌屬於低、中劑量組之 MCHC，高劑量組之 WBC、血色素(HGB)、及 MCHC 項目檢測有顯著性差異（ $p < 0.05$ ，表 5），但無明顯劑量關係，其值仍在正常背景值範圍內(MCHC：32.2-36.4 g/dL；WBC：4.2-16.7 $10^3/\mu\text{L}$ ；HGB：14.1-16.8 g/dL)，其餘項目檢測與雄鼠之各項目檢測皆無顯著性差異（ $p > 0.05$ ，表 5 及表 6）。

雌鼠血清生化分析結果，高劑量組在肌氨酸(CREA)、氯(Cl⁻)等項目與對照組間有顯著性差異（ $p < 0.05$ ），但無劑量關係，其值仍

在正常背景值範圍內(CREA：0.30-0.66 mg/dL；Cl⁻：92-104 mEq/L)，其餘項目各劑量組與對照組間無顯著性差異(表 7)。雄鼠血清生化分析結果顯示，低劑量組在天門冬氨酸轉氨酶(ALT)、AST、鈉(Na⁺)、Cl⁻，高劑量組在 ALT、AST、總蛋白(T-PROT)、CREA、鈣(Ca²⁺)等項目與對照組間有顯著差異，但無劑量關係，其值仍在正常背景值範圍內(AST：43-134 U/l；CREA：0.36-0.56 mg/dl；Cl⁻：96-104 mEq/l；ALT：35-70 U/l；NA⁺：139-150 mEq/l；T-PROT：4.6-8.9 g/dl；Ca²⁺：8.4-14.5 mg/dl)，其餘項目各劑量組與對照組無顯著性差異（表 8）。

尿液分析

大鼠餵食不同劑量之試驗物質後，各劑量組與對照組間之尿液測值均無顯著性差異。

臟器重量

重要器官（胸腺、肝臟、腎臟、腎上腺、脾臟、睪丸、卵巢）之平均重量及其相對重量百分比之結果如表 7 及 8 所示。各劑量組臟器之平均重量、相對重量百分比與對照組間均無顯著性差異。

組織病理檢查

試驗物質以 0 g/kg b.w./day（對照組）、0.4 g/kg b.w./day（低劑量）、2.0 g/kg b.w./day（中劑量）及 4.0 g/kg b.w./day（高劑量）餵食大鼠 28 天毒性試驗之組織切片檢查，結果顯示，處理組之腎上腺、心臟、腎臟、肝臟、肺臟、脾臟、腸道、睪丸（雄鼠）或卵巢（雌鼠）均無明顯與試驗物質有關之組織病理變化。其他非特異性病變，如腎臟出現局部腎小管囊腔、間質性纖維化、單核炎症細胞浸潤及腎小管再生等病變，其病變程度均為極微等級，均與試驗物質無關。高劑量(4.0 g/kg b.w./day)經連續餵食 28 天後，

表 2 「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」餵食 28 天對雌雄鼠所造成死亡率

分析項目	劑量(g/kg b.w./day)			
	0	0.4	2.0	4.0
雌鼠				
死亡率／總數	0/12 ^a	0/12	0/12	0/12
死亡率(%)	0	0	0	0
死亡紀錄	N	N	N	N
雄鼠				
死亡率／總數	0/12	0/12	0/12	0/12
死亡率(%)	0	0	0	0
死亡紀錄	N ^b	N	N	N

^a 各組雌、雄鼠均為 12 隻。

^b N 表示測試樣品給予期間無動物死亡。

縮寫：b.w., body weigh (體重)

表 3 「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」餵食 28 天各組雌雄鼠之平均體重

飼養週數	平均體重(g)			
	劑量(g/kg b.w./day)			
	0	0.4	2.0	4.0
雌鼠				
第 0 週	124.8±1.9 ^a	124.9±2.0	124.4±1.9	124.0±2.0
第 1 週	157.0±3.4	156.1±2.4	156.0±2.6	154.9±2.3
第 2 週	180.4±4.4	182.4±2.9	181.2±2.9	178.5±3.2
第 3 週	201.7±5.1	203.5±3.3	198.7±2.7	199.2±3.5
第 4 週	216.9±5.8	216.1±3.6	212.4±3.5	215.0±4.4
雄鼠				
第 0 週	136.0±2.5	139.6±2.1	131.2±3.3	136.9±2.6
第 1 週	195.2±3.1	200.5±2.6	191.5±5.0	198.1±3.9
第 2 週	256.9±3.9	260.1±3.8	250.0±6.4	260.4±5.8
第 3 週	312.8±4.6	314.4±5.1	305.5±7.9	318.2±7.7
第 4 週	352.1±4.8	356.3±5.8	346.2±9.0	360.4±9.1

^a 測定結果以平均值±均數標準誤差(Mean±SEM)表示之(n=12)。同列者與對照組(0劑量組)之間無顯著差異($p>0.05$, Dunnett's t-test, 2-sides)。

縮寫：b.w., body weigh (體重)

對雌雄大鼠各重要臟器並未造成器官毒性反應相關之病理變化。

討 論

本實驗依據衛福部食藥署健康食品安全性評估方法，評估餵食「蜜環菌菌絲體發酵

表 4 「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」餵食 28 天各組雌雄鼠每隻每天平均飼料消耗量

飼養週數	飼料消耗量(g)			
	劑量(g/kg b.w./day)			
	0	0.4	2.0	4.0
雌鼠				
第 1 週	16.6±0.5 ^a	16.2±0.5	16.2±0.2	15.4±0.4
第 2 週	17.0±0.6	16.6±0.4	16.8±0.3	15.8±0.2
第 3 週	17.8±0.6	17.4±0.5	16.9±0.3	16.2±0.2*
第 4 週	17.5±0.7	17.0±0.5	17.0±0.3	16.2±0.2
雄鼠				
第 1 週	21.7±0.1	22.0±0.0	21.5±0.4	21.3±0.6
第 2 週	25.4±0.2	24.7±0.2	24.0±0.2	24.3±0.8
第 3 週	27.6±0.4	27.2±0.4	26.0±0.4	26.2±1.1
第 4 週	27.6±0.7	27.4±0.4	26.7±0.4	26.6±1.1

^a 測定結果以平均值±均數標準誤差(Mean ± SEM)表示之(n=12)。

*表示同列者與對照組(0劑量組)之間有顯著差異($p < 0.05$, Dunnett's t-test, 2sides)。縮寫: b.w., body weigh (體重)

液凍乾粉」之 28 天毒性試驗，結果顯示各劑量組實驗動物未顯示任何臨床毒性症狀；在平均體重及體重增長百分率(%)比較上，各處理組均與對照組間無顯著差異；在攝食量方面，大鼠餵食不同劑量試驗物質後，雖雌鼠在高劑量組餵食第 3 週之每天平均飼料消耗量均略低於對照組，具顯著差異性($p < 0.05$)，但其大鼠體重均未因此減少，其餘處理組均與對照組間無顯著性差異(表 3)。

血液學檢查、血清生化檢查，雖有少數項目與對照組具顯著差異，但無劑量關係。在尿液相關數值及臟器重量與臟器相對重量百分比(%)測定上，各劑量組與對照組間均無顯著性差異。肉眼及組織病理檢查結果，各劑量組均無明顯與試驗物質有關之病理變化。其他非特異性病變及發生率於對照組與處理組間之雌雄鼠並無劑量與病變相關性。綜合以上實驗結果，大鼠經連續管餵 28 天蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉之無毒害作用劑量

(no observed adverse effect level, NOAEL) 大於 4.0 g/kg b.w./day。

參考文獻

1. 王嵐、楊祝良。中國西南的蜜環菌屬真菌。中國食用菌 2003; 22:4-6。
2. 林曉民、李振岐、侯軍、王少先。大型真菌的生態類型。西北農林科技大學學報 2005; 33:89-92
3. 楊淑雲、林遠崇、羿紅、王琛、楊永彬、藍家細。珍稀食藥用菌-蜜環菌的開發與應用。生物學雜誌 2007; 24:52-4。
4. Muszyńska B1, Sułkowska-Ziaja K, Wołkowska M, Ekiert H. Chemical, pharmacological, and biological characterization of the culinary-medicinal honey mushroom, *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. (Agaricomycetidae): a review. Int J Med Mushrooms 2011; 13:167-75.
5. 程昱好、劉林德、董洪新、屈慧鵠、蔡德華。蜜環菌菌絲體液體培養條件的優化。中藥材 2007; 30:509-12
6. 王秋穎、郭順星、樊錦艷。不同蜜環菌菌株生物學特性及菌絲體多醣含量的研究。中藥及天然物 2001; 36:588-90。
7. 譚周進、謝達平、王微、肖啟明、李立恆。蜜環菌多醣分離純化及性質之研究。食品科學 2002; 23: 49-52。

表 5 「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」餵食 28 天各組雌鼠之血液血清生化分析值

分析項目	劑量(g/kg b.w./day)			
	0	0.4	2.0	4.0
WBC($10^3/\mu\text{l}$)	4.2±0.2 ^a	5.7±0.4	5.8±0.5	7.9±0.8*
RBC($10^6/\mu\text{l}$)	7.4±0.1	7.3±0.1	7.4±0.2	7.4±0.1
HGB(g/dl)	14.1±0.2	14.5±0.2	14.7±0.2	15.2±0.3*
HCT(%)	42.4±0.6	42.1±0.6	42.9±0.7	43.4±0.7
MCV(fl)	57.6±0.4	57.8±0.5	58.1±0.3	58.6±0.4
MCH(pg)	19.2±0.2	19.9±0.2	20.0±0.3	20.6±0.3
MCHC(g/dl)	33.3±0.2	34.4±0.2*	34.4±0.4*	35.1±0.3*
PLT($10^3/\mu\text{l}$)	1227±45	1241±44	1212±48	1252±56
ALB(g/dl)	3.14±0.10	3.23±0.04	3.27±0.06	3.13±0.10
ALP(U/l)	126.0±7.8	139.8±9.8	149.3±12.5	137.3±13.0
ALT(U/l)	39.1±2.2	37.3±2.1	38.1±1.8	46.4±5.9
AST(U/l)	85.7±4.5	86.9±6.0	77.3±4.6	92.7±5.0
GGT(U/l)	5.0±0.0	5.0±0.0	5.0±0.0	5.0±0.0
T-BIL(mg/dl)	0.13±0.01	0.13±0.01	0.13±0.01	0.17±0.02
T-PROT(g/dl)	5.6±0.1	5.7±0.1	5.7±0.1	5.5±0.1
GLU(mg/dl)	121.4±5.1	124.2±4.9	127.4±4.4	126.8±4.7
BUN(mg/dl)	16.8±0.8	18.9±0.6	17.3±1.3	18.2±0.6
CREA(mg/dl)	0.30±0.01	0.35±0.02	0.33±0.0	10.36±0.02*
CHOL(mg/dl)	91.5±3.6	81.9±5.6	87.1±3.4	90.3±3.6
HDL(mg/dl)	49.2±1.9	44.3±2.7	48.1±1.6	48.6±1.8
LDL(mg/dl)	34.5±1.1	30.2±3.0	30.8±1.9	34.3±2.5
TG(mg/dl)	39.3±4.0	36.8±2.5	40.8±3.3	37.1±3.9
P- ³ (mg/dl)	10.6±0.2	10.7±0.2	9.9±0.3	10.8±0.3
Na ⁺ (mEq/l)	143.1±0.3	142.1±0.6	142.8±0.4	142.3±0.4
K ⁺ (mEq/l)	4.3±0.1	4.4±0.2	4.3±0.1	4.2±0.1
Cl ⁻ (mEq/l)	105.8±0.4	104.6±0.6	105.3±0.5	104.0±0.4*
Ca ²⁺ (mg/dl)	10.0±0.1	10.0±0.1	10.1±0.1	9.9±0.1

^a 測定結果以平均值±均數標準誤差(Mean ± SEM)表示之(n=12)。

*表示同列者與對照組(0劑量組)之間有顯著差異($p < 0.05$, Dunnett's t-test, 2-sides)。

縮寫：b.w., body weigh (體重)；其他縮寫如內文。

表 6 「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」餵食 28 天各組雄鼠之血液血清生化分析值

分析項目	劑量(g/kg b.w./day)			
	0	0.4	2.0	4.0
WBC($10^3/\mu\text{l}$)	8.5±0.5 ^a	7.7±0.5	7.7±0.6	9.5±0.8
RBC($10^6/\mu\text{l}$)	7.5±0.1	7.8±0.1	7.5±0.1	7.4±0.1
HGB(g/dl)	15.0±0.2	15.3±0.1	14.9±0.2	15.2±0.3
HCT(%)	46.4±0.7	47.1±0.5	45.8±0.5	45.5±0.7
MCV(fl)	61.8±0.4	60.5±0.4	60.7±0.3	61.2±0.4
MCH(pg)	20.1±0.2	19.7±0.2	19.8±0.2	20.4±0.3
MCHC(g/dl)	32.5±0.2	32.5±0.2	32.6±0.3	33.3±0.4
PLT($10^3/\mu\text{l}$)	1306±27	1343±33	1325±34	1249±33
ALB(g/dl)	2.98±0.04	3.02±0.0	42.88±0.03	2.92±0.05
ALP(U/l)	201.3±9.4	210.9±13.7	222.9±13.0	188.8±13.6
ALT(U/l)	46.7±1.4	49.7±3.1	55.3±1.7*	60.1±2.2*
AST(U/l)	69.8±3.8	8.6±5.3*	90.2±5.6*	94.6±4.1*
GGT(U/l)	5.0±0.0	5.0±0.0	5.0±0.0	5.0±0.0
T-BIL(mg/dl)	0.10±0.00	0.12±0.0	10.13±0.0	20.12±0.01
T-PROT(g/dl)	5.3±0.1	5.4±0.0	5.2±0.1	5.1±0.1*
GLU(mg/dl)	146.7±5.7	141.8±4.0	133.1±6.3	129.1±4.1
BUN(mg/dl)	18.3±0.5	18.5±0.6	17.2±0.5	18.3±0.4
CREA(mg/dl)	0.36±0.01	0.43±0.02*	0.42±0.02	0.43±0.02*
CHOL(mg/dl)	74.9±2.2	74.0±2.8	75.8±3.3	66.7±4.1
HDL(mg/dl)	43.9±1.7	41.9±1.5	41.8±1.7	38.9±2.0
LDL(mg/dl)	22.8±0.9	22.9±1.3	22.1±2.2	17.3±1.9
TG(mg/dl)	40.8±4.2	43.6±3.6	55.3±4.8	52.2±4.6
P ⁻³ (mg/dl)	12.4±0.2	12.2±0.4	12.2±0.1	12.6±0.2
Na ⁺ (mEq/l)	143.3±0.4	143.0±0.5	141.8±0.4*	143.2±0.5
K ⁺ (mEq/l)	4.8±0.1	4.8±0.1	4.9±0.1	4.8±0.1
Cl ⁻ (mEq/l)	103.3±0.5	101.3±0.5*	101.2±0.6*	102.0±0.4
Ca ⁺² (mg/dl)	9.9±0.1	9.9±0.1	9.7±0.1	9.4±0.1*

¹⁾ 測定結果以平均值±均數標準誤差(Mean ± SEM)表示之(n=12)。

*表示同列者與對照組(0劑量組)之間有顯著差異($p < 0.05$, Dunnett's t-test, 2-sides)。

縮寫: b.w., body weigh (體重); 其他縮寫如內文。

表 7. 「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」餵食 28 天各組臟器平均重量

臟器項目	平均重量(g)			
	劑量(g/kg b.w./day)			
	0	0.4	2.0	4.0
雄鼠				
胸腺	0.55±0.03 ^a	0.55±0.02	0.53±0.05	0.54±0.03
肝	6.32±0.23	6.18±0.13	6.00±0.16	6.23±0.26
脾	0.51±0.02	0.48±0.02	0.51±0.03	0.52±0.03
腎	1.55±0.06	1.57±0.04	1.52±0.03	1.60±0.06
腎上腺	0.07±0.00	0.07±0.00	0.07±0.00	0.07±0.00
卵巢	0.13±0.01	0.13±0.01	0.13±0.01	0.13±0.01
雌鼠				
胸腺	0.55±0.03	0.61±0.04	0.61±0.04	0.57±0.04
肝	10.02±0.20	10.03±0.31	9.12±0.79	10.49±0.34
脾	0.68±0.02	0.68±0.03	0.73±0.02	0.73±0.03
腎	2.48±0.04	2.41±0.05	2.39±0.0	72.47±0.06
腎上腺	0.06±0.00	0.06±0.00	0.06±0.00	0.06±0.00
睪丸	3.16±0.04	3.19±0.07	2.96±0.07	3.09±0.11

^a 測定結果以平均值±均數標準誤差(Mean ± SEM)表示之(n=12)。同列者與對照組(0劑量組)之間無顯著差異($p>0.05$, Dunnett's t-test, 2-sides)。

縮寫：b.w., body weigh (體重)

表 8 「蜜環菌菌絲體發酵液凍乾粉」餵食 28 天各組臟器相對重量百分比

臟器項目	相對重量百分比(%)			
	劑量(g/kg b.w./day)			
	0	0.4	2.0	4.0
雄鼠				
胸腺	0.25±0.02 ^a	0.26±0.01	0.25±0.02	0.25±0.02
肝	2.91±0.05	2.86±0.04	2.83±0.07	2.90±0.11
脾	0.24±0.01	0.22±0.01	0.24±0.01	0.24±0.01
腎	0.71±0.02	0.73±0.02	0.72±0.01	0.74±0.02
腎上腺	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00
卵巢	0.07±0.01	0.06±0.00	0.06±0.00	0.06±0.00
雌鼠				
胸腺	0.15±0.01 ^a	0.17±0.01	0.18±0.01	0.17±0.01
肝	2.78±0.07	2.85±0.09	2.70±0.24	3.08±0.16
脾	0.19±0.01	0.19±0.01	0.21±0.01	0.22±0.0
腎	0.69±0.02	0.69±0.02	0.70±0.03	0.72±0.03
腎上腺	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.00
睪丸	0.88±0.02	0.91±0.02	0.87±0.02	0.91±0.04

^a 各鼠臟器之相對重量百分比(%)係以臟器重量值(g)除以其體重(g)後，再乘以 100。測定結果以平均值±均數標準誤差(Mean±SEM)表示之(n=12)。同列者與對照組(0劑量組)之間無顯著差異($p>0.05$, Dunnett's t-test, 2-sides)。

8. 于敏、沈業壽、梅一德、王芳。蜜環菌菌索多醣的免疫增強作用研究。生物學雜誌 2001; 18:16-8。
9. 戴玲、王華、沈業壽。蜜環菌多醣對小鼠腹腔巨噬細胞免疫功能的影响。生物學雜誌 2000; 17:20-1。
10. Chen YJ, Chen CC, Huang HL. Induction of apoptosis by *Armillaria mellea* constituent armillarikin in human hepatocellular carcinoma. *Onco Targets Ther* 2016; 9:4773-83.
11. Liu TP, Chen CC, Shiao PY, Shieh HR, Chen YY, Chen YJ. Armillaridin, a honey medicinal mushroom, *Armillaria mellea* (Higher Basidiomycetes) component, inhibits differentiation and activation of human macrophages. *Int J Med Mushrooms* 2015; 17:161-8.
12. 于敏、沈業壽。蜜環菌菌索多醣對小鼠血糖及急性毒性作用研究。中國食用菌 2002; 21:35-6。
13. Lung MY, Chang YC. Antioxidant properties of edible basidiomycete *Armillaria mellea* in submerged cultures. *Int J Mol Sci* 2011; 12:6367-84.
14. 虞磊、沈業壽、李廣、吳建民、謝群英。培養方式對蜜環菌胞內多醣合成與抗暈眩症活性影響的研究。中國食用菌 2006; 25:37-9。
15. 行政院衛福部食藥署。28 天餵食毒性試驗。「健康食品安全及功效評估方法」。衛署食字第 8803780 號公告。1999。行政院衛生福利部，台灣。
16. 衛福部食藥署。重複劑量毒性試驗。藥品非臨床試驗安全性規範。行政院衛福部食藥署出版。2000: 49-55。行政院衛生福利部，台灣。
17. 劉振軒，何逸遷，張文發，祝志平，王琇真。H&E 染色。組織病理染色技術與圖譜。1996:86-9。養研所，台灣。
18. Klaassen C. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 8th ed. 2013. McGraw-Hill Education. New York, USA.
19. Food and Drug Administration. Good laboratory practice regulations: final rules, 1987. Food And Drug Administration, USA.

Genotoxicity and Acute Oral Toxicity Test of *Armillaria mellea* Mycelium

Yih-Min Jiang¹, Jia-Jiu Wu², Ming-yuan Hung², Yi-ting Chen², Jiunn-Wang Liao³,
Yang-Chia Shih⁴, Chin-Chu Chen^{1,5-7*}

Bioengineering Center of Grape King Bio Ltd., Taoyuan City¹; Food Industry Research and Development Institute, Hsin-chu City²; Graduate Institute of Veterinary Pathobiology, National Chung Hsing University, Taichung City³; Department of Biotechnology, Asian University, Taichung city⁴; Institute of food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei City⁵; Department of Food Science, Nutrition and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei City⁶; Institute of Biotechnology, National Changhua University of Education, Changhua⁷, Taiwan.

Abstract

Armillaria mellea belongs to an edible and medicinal mushroom of the *Tricholomataceae* family that is found worldwide. Following the safety assessment guideline of Health Food announced by Ministry of Health and Welfare, this study was conducted to assess the 28-day oral toxicity of freeze dried *Armillaria mellea* mycelium powder at doses of 0.4 (low dose), 2.0 (mid dose) and 4.0 (high dose) g/kg b.w./day in Spague-Dawley (SD) rats. Clinical observation of rats was carried out daily. The body weight and feed intake of the rats were

recorded weekly. At the end of the stipulated experiment period, all animals were euthanized and the blood and organs were collected for 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. No significant differences in average body weight and body-weight gain (%) were seen between treated and control groups. There was no significant reduction in feed and water intake of the treated rats in either sex

through the study. A few parameters in hematology and clinical biochemistry analysis showed significant differences between the treatment and control group, but these parameters were not dose-dependent and therefore not considered treatment-related. Analysis of urinalysis, organ weight and relative organ weight (%) revealed no significant differences between the control and treated groups. Necropsy and histopathological

examination indicated that no treatment-related change was found. According to these results, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of *Armillaria mellea* mycelium was greater than 4.0 g/kg b.w./day in SD rats.

Keywords: *Armillaria mellea*; 28-day oral toxicity study; NOAEL

