

蝙蝠蛾擬青黴菌絲體發酵液凍乾粉之 大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性評估

盛莉莎¹，葉淑幸¹，方惟正¹，陳彥博¹，江逸敏¹，蔡岳廷²，陳勁初^{1,3~7*}

葡萄王生技股份有限公司，桃園市¹；台美檢驗科技有限公司，新北市²；新竹教育大學應用科學系，新竹市³；台灣大學食品科技研究所，台北市⁴；實踐大學食品營養與保健生技學系⁵，台北市⁵；中原大學生物技術系，桃園市⁶；彰化師範大生物技術研究所，彰化市⁷，台灣

摘要

蝙蝠蛾擬青黴是分離自冬蟲夏草的一無性菌株，本試驗依衛福部公告之健康食品安全性評估方法，測試蝙蝠蛾擬青黴（學名：*Paecilomyces hepiali*）菌絲體發酵液凍乾粉餵食大鼠 28 天後，對體內可能產生之毒性。本試驗共設 4 組試驗組，分為對照組、低、中及高劑量組。其每日投予劑量分別為低劑量組 1 g/kg B.W.、中劑量組 2 g/kg B.W. 及高劑量組 5 g/kg B.W.。每組使用雄性及雌性之 Sprague-Dawley (SD) 品系大鼠各 10 隻，以口服管餵方式投予蝙蝠蛾擬青黴菌絲體發酵液凍乾粉連續經過 28 天，對於試驗動物每日進行臨床觀察，並每週測量體重和攝食量。試驗結束後，犧牲大鼠採集臟器及血液做血液學分析、血清生化分析及病理學檢查。結果顯示，試驗期間所有實驗大鼠均無出現異常的臨床症狀，體重均能正常增重，眼睛檢查也無異常。綜合以上實驗結果，蝙蝠蛾擬青黴菌絲體發酵液凍乾粉對大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性試驗之無毒性顯示之劑量(no-observed-adverse-effect level, NOAEL)為大於 5 g/kg B.W.。

關鍵字：蝙蝠蛾擬青黴菌絲體粉、冬蟲夏草、28 天重複劑量亞急性毒性試驗

前言

冬蟲夏草為名貴中藥材，具有補虛損、益精氣、止血化痰、對虛喘癆咳、盜汗、抗衰老、免疫調節^[1]等均有療效^[2,3]。近年來，由於生長環境要求嚴苛及因暴利和需求量增加，對天然蟲草的過度挖掘導致野生蟲草的產量越來越少，發生供不應求的趨勢，因此希望分離出其中的菌種用人工發酵生產其替代品，以解決目前的問題，蝙蝠蛾擬青黴 (*Paecilomyces hepiali*) 是從冬蟲夏草中分離

得到的伴生菌株，在中國被列為可用於保健食品的真菌菌種名單中，並有研究顯示蝙蝠蛾擬青黴製成的產品可用於治療高脂血症、慢性支氣管炎及男性性功能失調等病症，均有一定改善效果^[4]。

中國中醫研究院中藥研究所於 1982 年採集分離出其伴生菌株^[5]，並經過菌種研究鑒定後定名為蝙蝠蛾擬青黴 (*Paecilomyces hepiali*)，屬於叢梗孢科 (*Moniliaceae*) 擬青黴菌屬 (*Paecilomyces*)。之後中國醫學科學院藥物所採集新鮮冬蟲夏草分離得到的蟲草菌 Cs-4 菌株，經鑒定也是蝙蝠蛾擬青黴。該菌經發酵所得菌絲與天然蟲草化學成分比對分析研究證實，兩者主要成分、藥理作用基本相似，臨床試驗證明其對人體的功效有護腎

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

益肺^[6]、抑菌^[7]、降血脂^[8]、促進免疫調節^[9]等功效。在菌絲體發酵成分分析中知含有D-甘露醇、腺苷、麥角甾類、多醣等^[10]。為了開發天然冬蟲夏草在製藥業和食品工業上的替代品，了解蝙蝠蛾擬青黴菌絲體的安全性，在中國大陸山東省疾病預防控制中心對其食用安全性試驗也有相關研究，結果顯示蝙蝠蛾擬青黴菌絲體粉在試驗期間內的各項指標均未見明顯毒性反應，由此認定其作為保健食品的安全性^[11]。

雖然在中國，蝙蝠蛾擬青黴發酵菌絲膠囊已販售二十餘年，但不同的發酵條件及菌株其發酵凍乾粉的成分可能並不一致，因此完成蝙蝠蛾擬青黴菌絲體發酵液的三項基因毒性試驗（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齧齒類週邊血液微核試驗）證實無基因毒性後^[6]，接著探討大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性試驗，以作為人體食用安全性之參考。

材料與方法

樣品製備

從新鮮的冬蟲夏草子實體中進行菌種分離純化培養，挑選出不產生孢子，白色菌絲菌落，委託財團法人食品工業發展研究所生資中心（Bioresource collection and research center, BCRC, Food Industry Research and Development Institute, FIRDI，新竹市，台灣）依其菌株培養形態學、顯微構造及 rDNA ITS1-5.8S-ITS2 片段定序進行鑑定而確認為蝙蝠蛾擬青黴(*Paecilomyces hepiali*)菌種。

將鑑定後的菌株在發酵槽進行液態培養。其生產流程是由三角瓶液體培養基接種，培養五到七天後，接入 200L 發酵槽進行液態發酵，七天後再經由接管路打入 20 噸發酵槽進行放大培養。其發酵條件需控制溫度在 17~25°C，轉速 50~120 rpm/min，起始 pH 為 5.0~7.5，及較高的通氣量，培養 5~7 天後於

100°C 加熱 1hr 後收槽。先將發酵液離心留下菌體，濾液則進一步濃縮，再混合菌體進行乾燥，磨粉製成發酵全液粉末。

實驗動物

Sprague-Dawley (SD) 品系大鼠係購自樂斯科生物科技股份有限公司（BioLASCO Taiwan Co., Ltd，宜蘭縣，台灣）共計雄性 40 隻、雌性 40 隻，試驗開始為 8~9 週齡，飼養於通過 TFDA-GLP 與 OECD-GLP 認證的台美檢驗科技有限公司動物房。飼養環境為 22 ± 3°C、相對濕度 55 ± 15%、照明 12 小時、換氣頻率每小時 10-15 次的動物房。飼養方式為雌雄大鼠分開飼養，每籠兩隻，飼養於經高溫高壓滅菌後之塑膠製飼育籠。飼料使用 MFG (Oriental Yeast Co., Ltd, Tokyo, Japan)。飲水係經高溫高壓滅菌之逆滲透水以水瓶方式供應。試驗依據大鼠體重進行排序及隨機分組，而每隻大鼠以打耳洞的方式作為識別方法，各動物組別的飼育籠均貼上實驗動物標示卡，分別記載動物來源、品系、性別、試驗編號、試驗期間等。試驗物質投予方式是以塑膠針筒套上餵食針（16 gauge，80 mm 長）進行管餵。

檢測項目

試驗期間每日進行臨床觀察，並記錄投予試驗物質後試驗大鼠是否出現異常之臨床症狀或死亡情形。在投予前及試驗期間每週量測一次體重，而攝食量則用每週給予定量飼料的消耗量計算，一週結算一次。動物經隔夜禁食，在試驗結束當天以二氧化碳麻醉後經心臟進行血液採樣，繼而安樂死。採樣的血液有一部分置於含 EDTA 抗凝血管中混合均勻，以自動血球分析儀(XT-1800, Sysmex, Canada)進行檢測。另一部分血液樣品則靜置於室溫待其凝固後，離心分離出血清，並以血清生化分析儀(7070 Autoanalyzer, Hitachi,

Japan)進行檢測。

在對安樂死的試驗動物進行屍體解剖時，以肉眼觀察外觀、口腔、顱腔及體內所有組織器官，繼而採取各組動物的腦、心臟、腎臟、肝臟、脾臟、腎上腺、睪丸或卵巢等組織，保存於10%中性福馬林緩衝固定液，其中睪丸需以modified Davidson's solution固定24小時後，再放置於10%中性福馬林溶液保存^[12]。取下的主要器官在去除週邊脂肪組織後，分別秤重、以計算臟器相對重量比率(%) (臟器重量/體重 $\times 100\%$)。將對照組和高劑量組大鼠臟器進行組織病理切片檢查，完成福馬林溶液固定之器官，經脫水、澄清、石蠟浸潤及包埋等處理程序，製成石蠟組織塊，再以石蠟組織切片機(RM 2145, Leica)切成2 μm 厚度之組織切片，以Hematoxylin & Eosin (H&E)染色，於光學顯微鏡(BX51, Olympus, Japan)下觀察各臟器之組織病理變化。

數據分析

各實驗數據皆以平均值(mean) \pm 標準差(standard deviation, S.D.)表示，動物之體重、攝食量、臟器重量、血液學分析及血清生化分析等數據，皆利用生物統計軟體中單因子變異數分析(One-Way ANOVA)及 Duncan's multiple range test 分析各組別間的差異性，並以 $p < 0.05$ 作為顯著性差異之標準。

結 果

臨床觀察

於試驗期間，每天取試驗物質，以逆滲透水溶解攪拌均勻，配製成濃度分別為50 mg/mL、100 mg/mL 及 250 mg/mL 之懸浮液，且限當日使用完畢。本試驗共設置四組，分別為對照組、低、中、高劑量組，本產品以口服方式使用於人體，因此用管餵投予途徑來反映使用過程之安全性。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.。試驗期間，對照組與各劑量組大鼠每日由獸醫師進行臨床症狀觀察，結果顯示大鼠皆未出現任何異常之臨床症狀，全部大鼠均存活至試驗結束，無發生死亡情形。

體重與攝食量

各劑量組雄鼠和雌鼠與對照組相比較，試驗結果顯示如圖1所示，體重變化並無顯著性差異($p > 0.05$)，代表試驗物質並不影響大鼠體重正常增加。各試驗組間攝食量變化如圖2所示，以每籠每週飼料的消耗量來觀察，各劑量組與對照組之間的大鼠攝食量也無顯著性差異($p > 0.05$)。

臨床病理檢驗^[13]

試驗大鼠的眼睛由獸醫師以肉眼及檢眼鏡檢查，比較投予試驗物質前與試驗結束日之臨床症狀，並無發現任何異常。在試驗結束時，將各組大鼠安樂死並解剖後，以肉眼檢查所有組織器官，皆無發現與試驗物質有關之肉眼病變。

試驗結束時，將試驗動物的腦、肝臟、腎臟、脾臟、心臟、腎上腺、睪丸或卵巢取出秤重。其結果如表1所示，各劑量組與對照組的臟器絕對重量皆無明顯差異($p > 0.05$)。

試驗動物於安樂死後進行血液採樣，檢測以下項目：血球容積比(hematocrit)、血紅素量(hemoglobin)、紅血球數(RBC)、白血球數(WBC)、血小板數(platelet count)、平均紅血球容積(mean corpuscular volume, MCV)、平均紅血球血紅素(mean corpuscular hemoglobin, MCH)、平均紅血球血紅素濃度(mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)、淋巴球(lymphocyte)、嗜中性球(neutrophil)及單核球(monocyte)。另以含

EDTA 抗凝血管收集血液並以全自動血液凝固分析儀(XT-1800, Sysmex, Canada)檢測凝血酶原時間(prothrombin time)。結果如表 2 所示，各劑量組與對照組間相比較皆無明顯差異。

另一部分血液樣本待其凝固後，分離出血清進行生化檢測，其項目有：鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、麩胺酸草醯乙酸轉胺酶(aspartate aminotransferase, AST)、麩胺酸丙酮酸轉胺酶(alanine aminotransferase, ALT)、白蛋白(albumin)、血總蛋白質(total protein)、總膽紅素(total bilirubin)、肌酸酐(creatinine)、血中尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、葡萄糖(glucose)、膽固醇(cholesterol)、三酸甘油酯(triglyceride)、磷離子(phosphorus)、鈣離子(calcium)、氯離子(chloride)、鉀離子(potassium)及鈉離子(sodium)。檢測結果顯示如表 3，各劑量組雄鼠或雌鼠與對照組相比較皆無明顯差異($p>0.05$)。

組織病理檢驗^[14]

試驗結束後將對照組及高劑量組大鼠之主要臟器製成石蠟組織塊，以 H&E 染色，於光學顯微鏡觀察，此組織病理切片檢查結果如圖 3 所示，其腦、心臟、腎臟、腎上腺、肝臟、脾臟、睪丸及卵巢均無明顯與試驗物質有關之組織病理變化。

但有少數非特異性組織病理變化案例，如對照組及高劑量組各有一隻雄鼠心臟出現局部、極微、單核炎症細胞浸潤(focal mononuclear cell infiltration, 圖 4A)，發生率各為 1/10。另外，在肝臟組織切片部分，出現對照組及高劑量組雌雄鼠有局部、極微、單核炎症細胞浸潤(focal mononuclear cell infiltration, 圖 4B)，對照組及高劑量組雄鼠發生率各為 3/10 及 3/10；雌鼠發生率各為 1/10 及 0/10。僅有對照組一隻雌鼠肝臟門脈區出現多發性、輕微、脂肪滴浸潤(multiple

fat droplet infiltration, 圖 4C)，發生率為 1/10。最後，在生殖系統切片顯示，僅高劑量組一隻雄鼠睪丸出現局部、輕微、生精小管細胞變性及萎縮(focal seminiferous tubular degeneration/atrophy, 圖 4D)，發生率為 1/10。綜合上述切片結果看來，以上非特異性病理變化皆為少數案例，且發生率與試驗物質並無正相關性，顯示對照組與高劑量組大鼠間並無試驗物質與組織病變發生的正相關性。

討 論

本試驗依據 1999 年公告的「健康食品安全性評估方法」^[15]，進行蝙蝠蛾擬青黴菌絲體發酵液凍乾粉的食用安全性探討，其試驗結果顯示，在雄鼠主要臟器相對重量部分，顯示在脾臟部分各劑量組有略高於對照組之傾向，但沒有統計上差異，亦沒有劑量效應；且在雌鼠脾臟部分，各劑量組和對照組之間並沒有類似之趨勢，故認為無影響性；另在雄鼠睪丸部分，各劑量組和對照組相比雖有較高趨勢，但在統計上並無差異。在雌鼠卵巢相對重量部分，各劑量組和對照組相較，皆有隨劑量上升而偏低之傾向，但並無統計上之明顯差異。至於在大鼠血液學分析項目中，Reticulocyte(%)，網狀紅血球計數)和 PT(sec, 凝血酶原時間)在雄鼠或雌鼠之各劑量組和對照組相比較，皆有看到下降趨勢；但皆未達統計上之顯著差異。PT 縮短之情況可能和抽血過程提早活化凝固因子有關。網狀紅血球以百分比相對值來判讀，較難表達實際增減情況，故須有絕對值的概念來輔助判斷，當絕對數增加時稱為網狀紅血球增加症(reticulocytosis)，減少則稱為網狀紅血球減少症(reticulocytopenia)，兩者在貧血均有可能出現。本實驗未探討到絕對值，或許未來在餵食 90 天試驗時，可再加以探討釐清。

其他毒理試驗結果顯示，蝙蝠蛾擬青黴菌絲體發酵液凍乾粉在各劑量組與對照組大鼠的臨床症狀皆無異常差異，例如增重、食

量均正常，在眼睛檢查、尿液檢查、血液分析、血清生化分析、病理解剖、肉眼病理學檢查以及組織病理學檢查上皆無統計上明顯

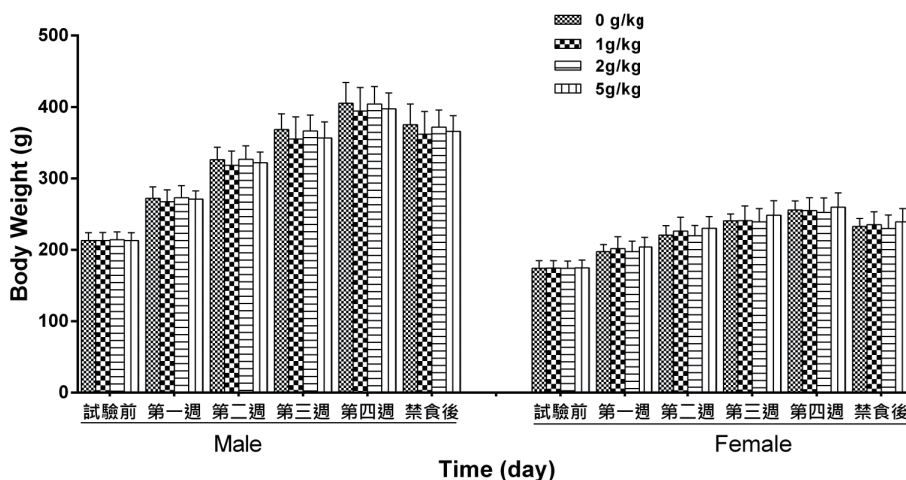


圖 1. 蝙蝠蛾擬青黴菌絲體發酵液凍乾粉進行亞急性毒性試驗時在不同飼養時間的大鼠體重變化。

在試驗物質連續餵食大鼠 28 天期間，所有大鼠體重均能正常增加。禁食後：指大鼠犧牲前經隔夜禁食後之空腹體重。所有數據均以 Mean±S.D. 表示，n=10。

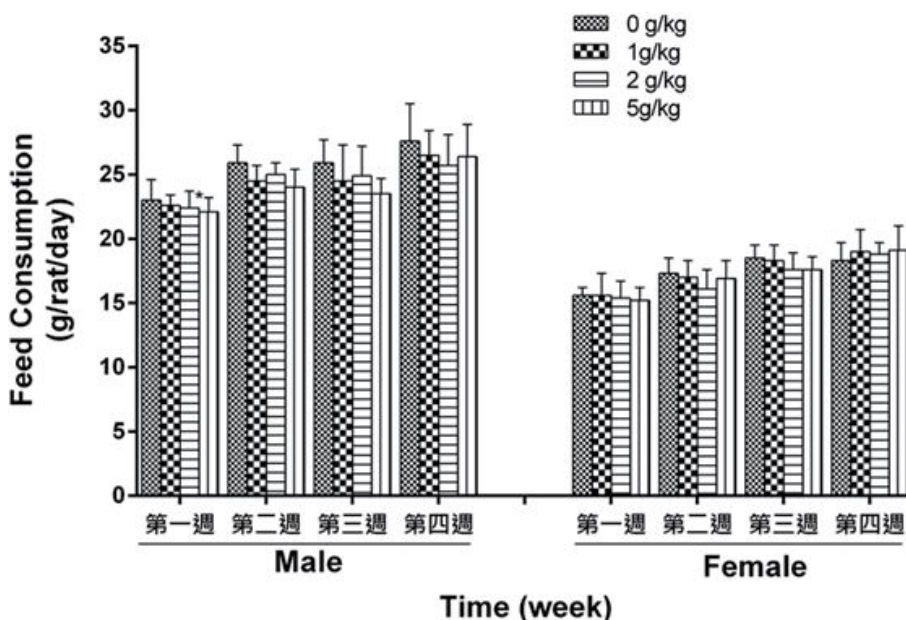


圖 2. 蝙蝠蛾擬青黴菌絲體發酵液凍乾粉進行亞急性毒性試驗時在不同飼養時間的雌性及雄性大鼠攝食量。

餵食試驗物質的實驗劑量組和對照組相比較，其每週每籠的飼料消耗量，並沒有顯著性差異 ($p>0.05$)。所有數據均以 Mean±S.D. 表示，n= 5 (共五個飼育籠，每個鼠籠飼養兩隻大鼠)。

表 1. 蝙蝠蛾擬青黴菌絲體發酵液凍乾粉進行 28 天亞急性毒性試驗時在不同組別的雌性及雄性大鼠主要臟器相對體重比值

臟器	臟器相對重量(g/100 g b.w.)			
	試驗劑量(g/kg)			
	對照組	低劑量組	中劑量組	高劑量組
	0	1	2	5
雄鼠				
睪丸	0.869±0.077	0.899±0.123	0.880±0.084	0.933±0.086
腎上腺	0.017±0.003	0.017±0.002	0.016±0.002	0.017±0.002
脾臟	0.173±0.019	0.187±0.020	0.193±0.016	0.195±0.031
腎臟	0.855±0.067	0.874±0.047	0.853±0.050	0.897±0.054
心臟	0.398±0.028	0.395±0.025	0.412±0.036	0.413±0.016
腦	0.543±0.042	0.567±0.043	0.558±0.034	0.565±0.040
肝臟	3.38±0.23	3.40±0.23	3.39±0.22	3.53±0.20
雌鼠				
卵巢	0.042±0.009	0.040±0.005	0.040±0.004	0.037±0.006
腎上腺	0.029±0.005	0.030±0.005	0.026±0.004	0.030±0.004
脾臟	0.223±0.016	0.216±0.031	0.205±0.024	0.210±0.016
腎臟	0.861±0.046	0.863±0.047	0.846±0.050	0.860±0.053
心臟	0.422±0.023	0.413±0.016	0.419±0.027	0.412±0.022
腦	0.820±0.061	0.812±0.068	0.825±0.065	0.795±0.051
肝臟	3.57±0.22	3.57±0.21	3.45±0.20	3.49±0.22

數據皆以平均值±標準差(mean ± SD)呈現，n =10。

差異。周雯等於 2009 年發表的結果顯示：以蝙蝠蛾擬青黴菌絲體飼養小鼠的口服急性毒性 LD₅₀ 大於 10 g/kg.bw，Ames 試驗、微核試驗和精子畸型試驗結果均為陰性，大鼠 30 天飼養各項觀察指標也未見毒性作用，故據以判定其應為實際無毒物質，無遺傳毒性和亞急性毒性作用^[11]，確認了蝙蝠蛾擬青黴菌絲體的安全性。本試驗也獲得相同的結果。

冬蟲夏草子實體，在中國被稱為「軟黃金」，屬於珍貴稀有的中藥材，有其獨特不可或缺的藥理作用，因生長環境特殊，採集不易，天然產量日漸枯竭，在中國已被列為二級瀕危野生動植物管理清單中^[16]。但冬蟲夏草目前在市場上仍以野生為主，人工栽培技術還不成熟，因有下列問題未解決：如冬蟲

夏草純正菌種分離困難、缺乏大量寄主蟲源、接種侵染途徑尚不清楚、環境複雜難以模擬^[17]。近年來面臨保護天然資源生存，及滿足藥源市場需求的難題，開發冬蟲夏草菌之發酵相關產品以做為其替代品，已是必然趨勢。又因中華被毛孢菌絲體（為冬蟲夏草無性世代菌種）需於低溫培養，造成時間長、成本高的問題。近年來因導入分子生物學方法，配合傳統菌株形態學及特性分析，才更瞭解冬蟲夏草的伴生菌，而蝙蝠蛾擬青黴就是眾多伴生菌其中之一，具有抗疲勞^[18]、免疫調節、抗腫瘤^[19, 20]特性，加上此菌種已有 30 年以上的研究歷史，在中國完成臨床驗證並行銷 20 年以上（發酵菌絲體製成的金水寶膠囊），其液態發酵培養生長快速，便於工業

表 2. 蝙蝠蛾擬青黴菌絲體發酵液凍乾粉進行 28 天亞急毒性試驗時在不同組別的雌性及雄性大鼠血液生化值分析

項目	試驗劑量(g/kg)			
	對照組	低劑量組	中劑量組	高劑量組
雄鼠	0	1	2	5
C (10 ³ /μL)	10.5±3.2	11.3±3.6	10.6±4.4	10.6±2.2
RBC (10 ⁶ /μL)	8.59±0.43	8.76±0.28	8.53±0.48	8.58±0.46
Hemoglobin (g/dL)	16.5±0.5	16.7±0.5	16.3±0.7	16.1±0.7
Hematocrit (%)	47.9±1.1	48.9±1.3	47.7±1.6	47.2±1.8
MCV (ft)	55.8±2.2	55.8±1.8	56.0±2.2	55.1±2.3
MCH (pg)	19.2±0.8	19.0±0.5	19.1±0.7	18.7±0.7
MCHC (g/dL)	34.4±0.3	34.1±0.4	34.2±0.5	34.0±0.5
Platelet (10 ³ /μL)	1054.8±105.3	983.9±128.5	1004.9±142.2	975.3±121.9
Neutrophil (%)	18.6±3.0	17.8±2.6	20.4±7.4	21.5±3.7
Lymphocyte (%)	75.0±3.3	75.5±3.4	73.6±6.7	72.2±4.1
Monocyte (%)	5.3±1.1	5.3±1.2	4.9±0.7	5.2±0.7
Eosinophil (%)	1.0±0.6	1.2±0.5	1.0±0.3	1.0±0.2
Basophil (%)	0.1±0.1	0.2±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1
Reticulocyte (%)	3.3±0.8	3.2±0.8	3.1±1.2	2.8±0.9
PT (sec)	17.0±3.0	16.8±1.0	16.8±2.5	14.6±2.2
雌鼠				
WBC (10 ³ /μL)	11.0±1.8	11.0±3.1	11.8±1.0	8.9±3.0
RBC (10 ⁶ /μL)	8.41±0.37	8.42±0.28	8.44±0.21	8.42±0.53
Hemoglobin (g/dL)	16.1±0.5	16.0±0.5	16.1±0.4	16.0±0.7
Hematocrit (%)	46.5±1.1	46.4±1.3	47.0±1.3	46.3±1.9
MCV (ft)	55.4±1.8	55.2±2.1	55.8±2.0	55.1±2.1
MCH (pg)	19.2±0.5	19.0±0.6	19.1±0.6	19.0±0.5
MCHC (g/dL)	34.7±0.4	34.5±0.5	34.3±0.4	34.5±0.6
Platelet (10 ³ /μL)	1143.0±142.3	1191.4±106.7	1169.4±136.0	1069.9±176.4
Neutrophil (%)	16.2±3.1	17.5±6.1	16.0±4.3	14.9±2.5
Lymphocyte (%)	78.4±3.8	76.3±6.1	77.5±5.2	78.6±2.6
Monocyte (%)	4.3±0.8	5.0±0.6	5.2±1.5	4.9±1.0
Eosinophil (%)	0.9±0.3	1.1±0.4	1.2±0.5	1.4±0.5
Basophil (%)	0.3±0.2	0.2±0.1	0.2±0.1	0.3±0.1
Reticulocyte (%)	2.5±0.8	2.3±0.9	2.2±0.8	2.2±0.6
PT (sec)	10.2±0.3	10.1±0.1	10.1±0.3	10.2±0.2

縮寫：MCV: Mean corpuscular volume；MCH: Mean corpuscular hemoglobin；MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration；PT: prothrombin time。數據皆以平均值±標準差(mean ± SD)呈現，n=10。

表 3. 蝙蝠蛾擬青黴菌絲體發酵液凍乾粉進行 28 天亞急性毒性試驗時在不同組別的雌性及雄性大鼠血清生化值分析

項目	試驗劑量(g/kg)			
	對照組	低劑量組	中劑量組	高劑量組
雄鼠	0	1	2	5
Glucose (mg/dL)	150.0±31.2	144.1±17.4	150.8±38.4	164.7±33.3
BUN (mg/dL)	12.1±2.1	12.9±2.9	12.2±1.5	11.8±1.3
Creatinine (mg/dL)	0.63±0.05	0.63±0.05	0.62±0.06	0.60±0.05
AST (U/L)	109.6±29.6	111.5±24.8	96.9±15.2	100.8±21.5
ALT (U/L)	33.7±19.0	31.6±5.2	29.6±7.4	29.4±7.6
Total protein (g/dL)	5.9±0.4	6.0±0.4	6.0±0.3	6.0±0.4
Albumin (g/dL)	4.2±0.2	4.2±0.3	4.2±0.3	4.2±0.3
ALP (U/L)	118.2±19.9	134.3±26.4	139.5±33.1	136.1±35.9
Cholesterol (mg/dL)	57.8±14.7	60.6±11.9	73.7±20.6	65.9±9.0
Triglyceride (mg/dL)	57.7±22.1	41.6±10.5	53.4±13.0	49.9±11.1
Calcium (mg/dL)	10.8±0.7	10.8±0.7	10.7±0.6	11.1±0.9
Phosphorus (mg/dL)	11.7±1.1	11.3±1.2	11.4±1.0	10.9±1.2
Sodium (meq/L)	140.8±5.3	143.2±5.6	141.0±5.0	143.4±4.5
Potassium (meq/L)	6.4±1.2	6.5±0.9	6.2±0.7	6.6±1.1
Chloride (meq/L)	95.7±3.8	96.8±3.3	94.3±3.4	96.8±2.6
Globulin (g/dL)	1.7±0.2	1.8±0.2	1.8±0.3	1.9±0.2
Total bilirubin (mg/dL)	0.002±0.001	0.003±0.002	0.003±0.002	0.003±0.002
雌鼠				
Glucose (mg/dL)	122.2±15.5	117.3±15.9	122.7±20.6	122.7±19.1
BUN (mg/dL)	12.0±1.6	12.5±1.2	12.9±1.1	12.7±2.1
Creatinine (mg/dL)	0.65±0.05	0.69±0.03	0.63±0.05	0.69±0.06
AST (U/L)	92.8±20.2	84.3±7.9	86.3±5.9	95.3±25.0
ALT (U/L)	24.1±3.5	21.4±2.5	23.2±3.6	31.2±23.1
Total protein (g/dL)	6.6±0.3	6.6±0.3	6.5±0.3	6.7±0.3
Albumin (g/dL)	4.8±0.3	4.8±0.2	4.7±0.2	4.8±0.2
ALP (U/L)	67.0±18.5	73.3±18.3	70.1±16.8	72.2±24.1
Cholesterol (mg/dL)	83.1±17.4	81.9±19.5	78.5±16.9	87.1±16.8
Triglyceride (mg/dL)	41.4±7.5	41.8±10.1	42.6±8.7	45.4±13.3
Calcium (mg/dL)	11.1±0.5	11.4±0.4	11.2±0.5	11.4±0.5
Phosphorus (mg/dL)	10.5±1.1	10.3±0.7	10.1±0.9	10.9±1.0
Sodium (meq/L)	144.5±1.5	144.9±2.2	142.0±5.5	143.8±2.2
Potassium (meq/L)	7.5±1.1	6.9±0.4	7.1±0.4	7.5±1.1
Chloride (meq/L)	99.2±0.8	99.4±1.9	97.5±3.5	98.5±1.8
Globulin (g/dL)	1.8±0.1	1.8±0.2	1.7±0.2	1.9±0.2
Total bilirubin (mg/dL)	0.008±0.004	0.009±0.003	0.007±0.002	0.008±0.002

數據皆以平均值±標準差(mean ± SD)呈現，n=10。

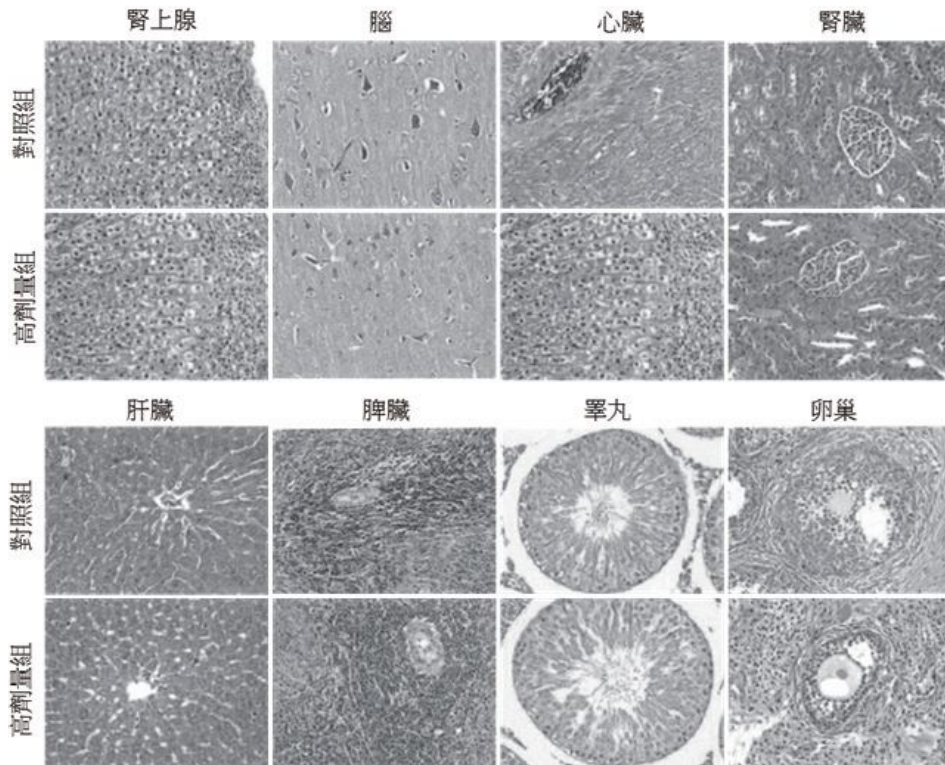


圖 3. 蝙蝠蛾擬青黴菌絲體發酵液凍乾粉進行 28 天亞急性毒性試驗時在對照組及高劑量組之臟器的組織病理觀察。圖中指出組織病理觀察結果皆顯示無明顯組織病理變化〔以 Hemotoxylin & Eosin 染色的組織切片(400 x)〕。

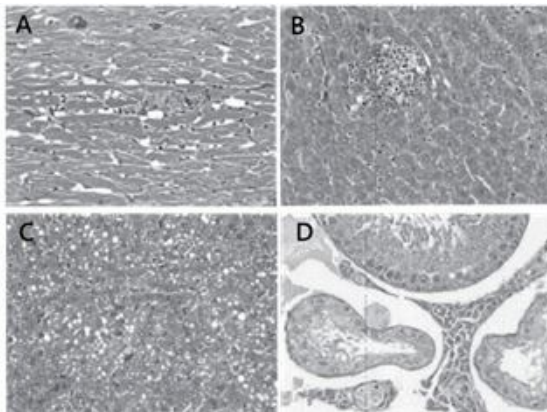


圖 4. 蝙蝠蛾擬青黴菌絲體發酵液凍乾粉進行大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性試驗中少數非特异性之組織病理變化情形。圖中指出部分鼠隻(A)心臟及(B)肝臟出現局部、極微、單核炎症細胞浸潤；(C)肝臟門脈區出現多發性、輕微、脂肪滴浸潤；(D)睪丸出現局部、輕微、生精小管細胞變性及萎縮〔以 Hemotoxylin & Eosin 染色的組織切片(400 x)〕。

化大量生產。故應可考慮使用蝙蝠蛾擬青黴菌絲體，作為蟲草類保健產品的原料素材。

又行政院衛福部公告之食品標示中規範：分離自冬蟲夏草之蟲草相關菌株可標示「冬蟲夏草菌絲體」，但需有該菌株分離之來源、加工或製造過程、規格及食用安全性等相關證明文件備查。故若有添加蝙蝠蛾擬青黴菌絲體當原料之產品，就需做安全性試驗。本案所使用的蝙蝠蛾擬青黴菌絲體發酵液凍乾粉，其在大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性試驗之無毒性顯示劑量為大於 5 g/kg/day，是人體建議食用量(1.2 g/60kg/day)的 250 倍。

參考文獻

1. Park SY, Jung SJ, Ha KC *et al.* Anti-inflammatory effects of mycelium (cbg-cs-2) in raw264.7 murine macrophages. *Oriental Pharm Experiment Med* 2015; 15:7-12.

2. 倪潔珊, 胡臻, 吳笑英。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。
3. 傅惠英, 張利棕, 壽旗揚。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。
4. 楊金玲, 肖薇, 何惠霞。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。
5. 戴如琴, 蘭江麗, 陳偉華。蝙蝠蛾擬青霉新種的研究。北京農業大學學報 1989; 15:221-4。
6. Wang N, Qi M, Liang SR. [Protective effects of *Paecilomyces hepiali* cs-4 on rats with adriamycin-induced nephropathy]. Zhongguo Zhong xi yi jie he za zhi Zhongguo Zhongxiyi jiehe zazhi = Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine / Zhongguo Zhong xi yi jie he xue hui, Zhongguo Zhong yi yan jiu yuan zhu ban. 2010; 30:957-60.
7. 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。
8. Wang J, Teng L, Liu Y *et al.* Studies on the antidiabetic and antinephritic activities of *Paecilomyces hepiali* water extract in diet-streptozotocin-induced diabetic sprague dawley rats. J Diabetes Res 2016; 2016:4368380.
9. Jang SH, Kim SH, Lee HY *et al.* Immune-modulating activity of extract prepared from mycelial culture of chinese caterpillar mushroom, *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes). Internat J Med Mushrooms 2015; 17: 1189-99.
10. 姜文俠, 孫武岳, 馬琳。蝙蝠蛾擬青霉菌絲體最適發酵條件研究。食用菌學報 1999; 6:38-40。
11. 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。
12. 吳思穎, 葉淑幸, 蔡岳廷等。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。檢驗及品保雜誌 2015; 4: 67-77。
13. Harleman JH, Nolte T. Testicular toxicity: Regulatory guidelines--the end of formaldehyde fixation? Toxicol Pathol 1997; 25:414-8.
14. Levine BS. Animal clinical pathology. In Derelanko MJ, Hollinger MA (eds). CRC Handbook of Toxicology. 2nd ed., 2002:742-68.
15. Shackelford C, Long G, Wolf J, Okerberg C, Herbert R. Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies. Toxicol Pathology 2002; 30:93-6.
16. 行政院衛生福利部。健康食品安全性評估方法。1999。行政院衛生福利部, 台灣。
17. 徐泰浩, 薛逸煌。冬蟲夏草的前世今生—談冬蟲夏草、蟲草及其真偽科學觀。市場資訊 2015;265:30-40。
18. 楊長水, 陳云超, 陳魏。冬蟲夏草目前的市場狀況。冬蟲夏草藍皮書 2012:98-107。
19. 席昭雁, 趙起華, 向前。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。
20. Wu Z, Lu J, Wang X *et al.* Optimization for production of exopolysaccharides with antitumor activity *in vitro* from *Paecilomyces hepiali*. Carbohydrate polymers. 2014; 99:226-34.
21. Thakur A, Hui R, Hongyan Z, Tian Y, Tianjun C, Mingwei C. Pro-apoptotic effects of *Paecilomyces hepiali*, a *Cordyceps sinensis* extract on human lung adenocarcinoma a549 cells *in vitro*. J Cancer Res Therapeut 2011; 7:421-6.

Sub-chronic (28 days) Oral Toxicity Evaluation of Freeze-dried *Paecilomyces hepiali* Mycelium from Liquid-media Fermentation in Rats

Lee-Sar Sheng¹, Shu-Xing Yeh¹, Wei-Chen Fang¹, Yen-Po Chen¹, Yih-Min Jiang¹,
Yueh-Ting Tsai² and Chin-Chu Chen^{1,3-7*}

Bioengineering Center of Grape King Bio Ltd, Taoyuan city¹; Testing Center, Super Laboratory Inc., New Taipei City²; Department of Applied Science, National Hsin-Chu University of Education, Hsin-Chu City³; Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University, Taipei city⁴; Department of Food Science, Nutrition, and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei city⁵; Chung Yuan Christian University Bioscience Technology, Taoyuan city⁶; Institute of Biotechnology, National Changhua University of Education, Changhua⁷, Taiwan.

Abstract

Paecilomyces hepiali was isolated from the culture of asexual form of *Cordyceps sinensis*. This study was conducted to assess the 28-day oral toxicity of the freeze-dried *P. hepiali* mycelium from liquid-media fermentation according to the safety assessment guideline of Health Food promulgated by the Ministry of Health and Welfare. The rats used in this study were divided into four groups, including the control, low (1 g/kg B.W.), medium (2 g/kg B.W.) and high dose (5 g/kg B.W.) group. Ten male and ten female Sprague-Dawley (SD) rats in each group were orally fed by gavage with freeze-dried *P. hepiali* mycelium for 28 consecutive days. Clinical observation of the rats was carried out daily. The body weight and feed intake of

the rats were recorded weekly. At the end of the study, all rats were sacrificed and the blood and organs were collected for hematology, clinical biochemistry and histopathological examination. Results indicated that all rats in all groups did not show any abnormal clinical signs during the study period. All rats gained weight normally and no abnormality were found during the ophthalmological examination. According to the results, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of freeze-dried *P. hepiali* mycelium for the rats was greater than 5 g/kg B.W.

Keywords: *Paecilomyces hepiali* mycelium; *Cordyceps sinensis*; Repeated dose 28-day oral toxicity study.