

## 液態發酵蛹蟲草菌絲體的致畸性試驗分析

周柏誼<sup>1</sup>，劉曉卉<sup>1</sup>，葉淑幸<sup>1</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>；台灣大學食品科技研究所，台北市<sup>2</sup>；實踐大學食品營養與保健生物學系，台北市<sup>3</sup>；  
中原大學生命科技學系，桃園市<sup>4</sup>；新竹教育大學應用科學系，新竹市<sup>5</sup>；彰化師範大學生物技術研究所，彰化縣，台灣<sup>6</sup>

### 摘要

本研究依據行政院衛生署公布的「健康食品安全及功效評估方法」，評估高劑量(3,000 mg/kg BW/day) 蛹蟲草菌絲體對懷孕雌鼠可能引發的毒性反應以及對於胚胎發育的影響。本試驗使用 80 隻懷孕 SD 大鼠，將試驗動物分成對照組及液態發酵蛹蟲草菌絲體低、中與高劑量組(1000、2000 與 3000 mg/kg BW/day) 共四組，於妊娠期間(懷孕第 6-15 天，為胎鼠器官形成期)每日口服給予試驗物質，並於分娩前一天(懷孕第 20 天)將母鼠犧牲剖檢，進行母鼠檢查與胎鼠檢查。試驗期間進行懷孕雌鼠死亡率與臨床觀察，並測定體重與飼料攝取量。結果顯示，試驗期間所有受試動物生長情況良好，沒有與試驗物質相關的動物死亡及臨床症狀，各劑量組懷孕雌鼠飼料攝取量及平均體重皆和對照組無統計上的顯著差異。在母體檢查部分，解剖時未發現與試驗物質相關的肉眼病變。子宮內檢查參數包括著床數、胎鼠數、性別比率、著床前及著床後胚胎損失率，各劑量組與對照組的懷孕雌性大鼠相較之下均無顯著性差異，僅黃體素在中劑量組有顯著高於對照組。胎鼠檢查部分，包含外觀、內臟與骨骼檢查，並未發現與試驗物質相關的發育毒性(致畸胎性)反應。總之，上述的發現指出液態發酵蛹蟲草菌絲體經口連續餵食懷孕雌鼠 10 日(懷孕第 6-15 天)，並不會引發懷孕雌鼠毒性反應及影響胚胎發育，也無發現試驗物質相關的二期生殖與發育毒性。本試驗懷孕雌鼠的無毒性顯示劑量 no-observed-adverse-effect level (NOAEL) 大於 3,000 mg/kg BW/day，因此，本試驗結果可供人體使用安全性依據的參考。

**關鍵字：**蛹蟲草 (*Cordyceps militaris*)、致畸性試驗、最小無毒性劑量

### 前言

蛹蟲草(*Cordyceps militaris*)，又名北冬蟲夏草、北方蟲草或北蟲草，屬真菌門、子囊菌亞門，子囊菌綱，肉座菌目<sup>[1]</sup>、麥角菌科、蟲草屬，是由蛹蟲草菌感染昆蟲幼體或蛹體所形成，是蟲草屬(*Cordyceps*)的模式種<sup>[2]</sup>。天然蛹蟲草為具有藥用及滋補功能的珍貴中藥材，其產地分布廣泛，大多生長於海

拔 500 公尺以上的林地及丘陵，生產季節集中在 6~8 月份，通常分布於樹下光照較弱之處<sup>[3]</sup>。蛹蟲草的名稱最早記載於中國【新華本草綱目】一書，書裡提到蛹蟲草具有『味甘、性平、有益肺腎、補精髓、止血化痰的功能』。【中華藥海】一書，則記載其『性味歸經，入肺腎二經，功能主治健忘不寐、腰膝酸軟、久咳虛喘、勞咳痰血者』。近幾年的研究也發現，蛹蟲草具有多樣生理活性，包括調節免疫功能<sup>[4-6]</sup>、降血糖<sup>[7, 8]</sup>、降血脂<sup>[9]</sup>、抗腫瘤<sup>[10]</sup>及抗氧化<sup>[11, 12]</sup>等功效，在目前品質評估上所著重的機能性成分有核苷類如蟲草素(cordycepin)及腺甘(adenosine)、神經醯胺類(ceramide)、酯化合物類和醣類如蟲

\*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

草多醣(cordycepic polysaccharide)及甘露醇(mannitol)<sup>[13, 14]</sup>。

蛹蟲草的寄主範圍較為廣泛，容易栽培及取得，是分離出最多化合物的蟲草屬菌種，具有與冬蟲夏草相似的活性成分和保健功效<sup>[15-17]</sup>。日本CAITAC group於2002年時即有名為「松原無菌養蠶冬蟲夏草」的蛹蟲草子實體商品問市；在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；台灣則於2014年將蛹蟲草子實體列為可供食品使用原料，但應標註每日食用限量及標示「不建議嬰幼兒、兒童、孕婦與真菌過敏者使用」警語。儘管如此，以生物技術發展蛹蟲草作為冬蟲夏草的替代品，仍為現今重要趨勢。現今市場有不少以蟲草為主的保健食品，但由於天然產量稀少，近年來紛紛採用人工液態培養技術量產蟲草菌絲體及其代謝物。與固態培養方式相比，以液態發酵方式量產蛹蟲草菌絲體，產品品質穩定、生長週期短，能在短時間內獲得大量的菌絲體、產能較高、不受季節影響及可得到相近的活性成分。但目前相關的安全性研究文獻甚少，且蛹蟲草菌絲體目前尚無正面表列。本研究室已完成的安全性試驗包括28天急毒性試驗以及基因毒試驗<sup>[18]</sup>，結果均未顯現出與蛹蟲草菌絲體相關的毒性反應。本研究進行蛹蟲草菌絲體發酵液凍乾粉之致畸胎試驗，其結果將可作為日後產品開發的劑量考量依據。

## 材料與方法

### 試驗物質

本次試驗物質為蛹蟲草菌絲體發酵液凍乾粉，蛹蟲草(*C. militaris*)菌種購自食品工業發展研究所生物資源與保存中心（新竹市，台灣）。以馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基(potato dextrose agar, PDA)平板於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

將培養於PDA平板上的蛹蟲草菌絲體，擷取2×2 cm<sup>2</sup>菌塊，接入2 L三角搖瓶中，培養溫度控制為25±2°C，震盪轉速為120 rpm培養四天後，接入500 L發酵槽培養四天（攪拌30 rpm，通氣量0.25 vvm），再接入50 ton發酵槽培養四天（攪拌30 rpm，通氣量0.05 vvm）。蛹蟲草發酵液經過下游階段固液分離、濃縮、冷凍乾燥及磨粉後，最後即成為蛹蟲草菌絲體發酵液凍乾粉。

### 試驗動物

120隻8週齡的Sprague-Dawley (SD)大鼠(40隻雄鼠做為配種用與80隻雌鼠做為試驗使用)經過馴化適應，由動物房完成檢疫後，才開始試驗配種。性成熟的雌、雄性大鼠，分別以2:1的方式交配，每日觀察陰道腔栓及進行陰道抹片檢查以確定其是否交配成功。配種完成後，雌鼠移回至飼育籠中，分別以一隻一籠，飼養於經高溫高壓滅菌的塑膠製飼育籠(46x20x20 cm)。交配成功日（見陰道腔栓及或陰道抹片含有精子）定為懷孕第0天，物質投予的期間為懷孕第6~15天，解剖日期為懷孕第20天。飼養環境條件為溫度22±3°C、濕度60±10%及12小時的光暗週期。飼料為Laboratory Autoclavable Rodent Diet 5010 (LabDiet®, PMI® Nutrition International, USA)，而試驗期間飲水自由供飲。

### 試驗設計

本生殖與發育毒性試驗依據衛生署健康食品安全及功效評估方法進行，健康雌鼠接受孕先後順序進行S型排序方式分配於四個劑量組別。試驗物質配製方式為將蛹蟲草菌絲體凍乾粉末以滅菌水配製成100、200與

300 mg/ml 等濃度後，進行口服投予。配種後，雌性動物於胎兒器官形成期（懷孕第 6~15 天），每日口服投與對照物質（滅菌水）或試驗物質，此投予途徑乃按照人體臨床適用的途徑。投予量的計算乃根據投予當日量測的體重為準，投予劑量單位為 mg/kg，投予體積單位為 mL/kg。母鼠懷孕期間，每日進行臨床觀察，並於懷孕第 6、9、12、15、18 及 20 天記錄動物體重及飼料攝取量。分娩前一天（懷孕第 20 天），全部雌性大鼠經二氧化碳麻醉犧牲，並進行剖檢，以肉眼檢查外觀、口腔、顱腔、胸腔及腹腔內所有臟器。雌性大鼠進行犧牲時，切開並取出子宮，紀錄子宮重、總胎數、活胎數、死胎數、吸收胎數、黃體數和著床數，並計算著床前胚胎損失率〔（黃體數-著床數）/黃體數×100〕和著床後胚胎損失率〔（著床數-胎鼠數）/著床數×100〕。雌性大鼠進行犧牲時，切開子宮，取出胎鼠，紀錄各胎鼠的性別及其著床部位，檢查存活的胎鼠，並進行外觀檢查及活胎鼠身長、體重等測定。計算每胎的平均胎鼠重量及胎鼠身長，並將每一胎中半數的胎鼠進行茜素紅 S (Alizarin red S, Sigma-Aldrich, Lot no.: SLBF4378V) 固定的臟器組織檢查（半數胎鼠的選擇則依其著床部位的奇數或偶數來區分），觀察並記錄每胎胎鼠在外觀、內臟及骨骼異常的數目。

#### 數據分析與評估

數據以試驗結果的平均值 (mean) ± 標準差 (standard deviation, S.D.) 或百分比來表示。採用電腦統計套裝軟體分析雌鼠隻體重、飼料消耗量、子宮內參數值、胎鼠的身長及體重，先依單因子變異數分析 (one-way analysis of variance, ANOVA) 進行檢定，再以 Dunnett's test 比較各組間是否具有差異性；其餘胎鼠外觀、內臟、骨骼的異常發生率則以 Kruskal-Wallis test 進行統計分析，若  $p$  值小於 0.05

則表示具有統計上顯著差異。

## 結 果

### 蛹蟲草菌絲體對母鼠的影響

於試驗期間，對照組及各劑量組的懷孕雌性大鼠均無任何異常臨床症狀且均未發現死亡，各劑量組與對照組的懷孕雌性大鼠相較下，體重變化均無顯著性差異（圖 1）。各組受孕鼠於懷孕第 0 天~20 天飼料攝取量變化呈現如圖 2，數據顯示在試驗期間，各劑量組與對照組的懷孕雌性大鼠的飼料攝取量均無顯著性差異。於分娩前一天（懷孕第 20 天），所有母鼠執行肉眼解剖檢查，並未發現與試驗物質投予相關的肉眼病變（結果未顯示）。

懷孕母鼠生殖毒性參數評估數據呈現於表 1。在子宮重、著床數、總胎數、活胎數、吸收胎數、雌、雄性胎數、性別比率、著床前及著床後胚胎損失率等分析項目，各劑量組與對照組的懷孕雌性大鼠相較下均無顯著性差異；僅黃體數在中劑量組有顯著高於對照組，但無劑量與反應的正相關性。此外，對照組及各劑量組的懷孕雌性大鼠均未觀察到死胎情形。

### 蛹蟲草菌絲體對胎鼠的影響

胎鼠外觀、內臟與骨骼檢查呈現於表 2。解剖觀察時，所有胎鼠均執行外觀檢察，同時測量體重與身長，並記錄所有外觀異常。對照組、低劑量、中劑量及高劑量組進行外觀異常檢查的胎鼠數分別為 263、272、268 及 260 隻，對照組及各劑量組的胎鼠均無明顯肉眼可觀察的異常情形；胎鼠體重及體長於各劑量組與對照組的胎鼠相較下無顯著性差異，所以可以評估外觀檢查未發現與試驗物質相關的致畸胎反應。

對照組、低劑量、中劑量及高劑量組進行內臟異常檢查的胎鼠數分別為 126、134、

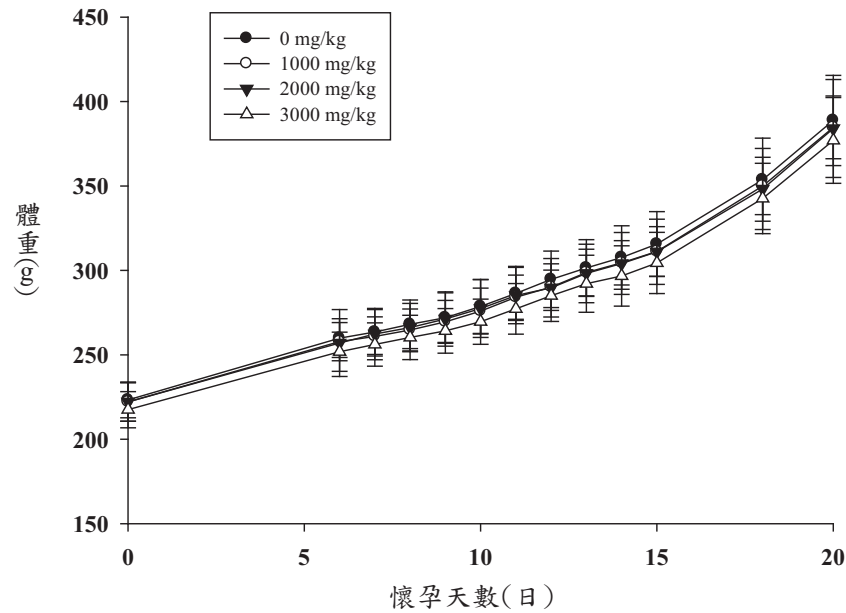


圖 1. 用於蛹蟲草菌絲體致畸性試驗的懷孕母鼠平均體重情形

表 1. 用於蛹蟲草菌絲體致畸性試驗的懷孕母鼠生殖參數毒性評估

組別及劑量 檢測項目	對照組 0 mg/kg	低劑量組 1,000 mg/kg	中劑量組 2,000 mg/kg	高劑量組 3,000 mg/kg
子宮重	78.402±12.576	79.192±7.811	80.543±13.381	79.526±14.854
黃體數	16.3±2.1	17.1±2.0	18.0±2.4*	16.1±2.6
著床數	13.8±1.1	14.4±1.5	14.0±2.1	13.5±2.0
活胎數	13.2±1.3	13.6±1.4	13.4±2.3	13.0±2.0
總胎數	13.3±2.6	12.9±3.1	13.5±3.3	12.9±3.1
雄性胎數	6.6±2.0	6.7±2.3	6.6±2.4	5.98±2.4
雌性胎數	6.6±1.6	6.9±2.2	6.9±2.0	7.1±2.4
性別比例(M/F)	1.14±0.72	1.14±0.58	1.19±0.96	0.98±0.61
吸收胎數	0.6±1.1	0.8±1.2	0.6±0.6	0.5±0.7
死胎數	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
著床前胚胎損失率 (%)	14.24±11.65	15.15±10.13	21.83±12.27	15.21±11.12
著床後胚胎損失率 (%)	4.24±7.37	4.93±7.58	4.20±4.95	3.97±5.83

M：雄性胎數；F：雌性胎數

\*相較於對照組有顯著差異， $p < 0.05$

表示方法為平均值 (mean) ± 標準差 (S.D.)， $n = 20$  ( $n$  為計算樣本數)

著床前胚胎損失率為 (黃體數-著床數) / 黃體數 x100

著床後胚胎損失率為 (著床數-胎鼠數) / 著床數 x100

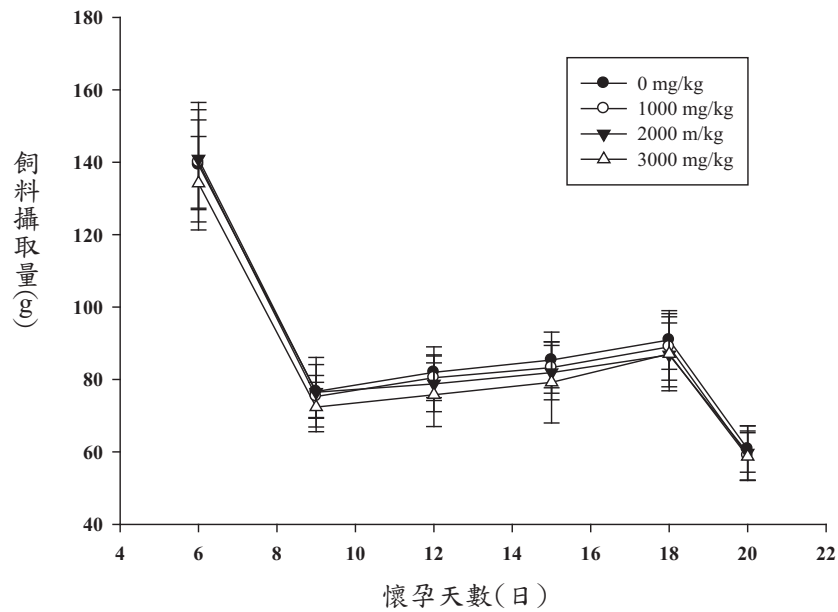


圖 2. 用於蛹蟲草菌絲體致畸性試驗的懷孕母鼠飼料消耗情形

表 2. 用於蛹蟲草菌絲體致畸性試驗的胎鼠外觀、內臟與骨骼檢查

組別及劑量 檢測項目	對照組 0 mg/kg		低劑量組 1,000 mg/kg		中劑量組 2,000 mg/kg		高劑量組 3,000 mg/kg	
	L	F	L	F	L	F	L	F
總胎數	263		272		268		260	
外觀檢察鼠數	263		272		268		260	
內臟檢察鼠數	126		134		129		126	
骨骼檢察鼠數	137		138		139		134	
胎鼠體重 (g)	3.93±0.2		3.89±0.23		4.05±0.23		4.00±0.18	
胎鼠體長(mm)	38.17±0.58		38.02±0.51		38.45±0.48		38.47±0.33	
外觀檢查異常	0		0		0		0	
內臟檢查								
側腦室擴大(%)	5.0	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
胸腺殘留 (%)	15.0	2.4	15.0	3.0	15.0	2.3	20.0	3.2
骨骼檢查								
胸椎骨分離(%)	10.0	1.5	5.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0

L：每胎發生率 [per litter incidence (%)]；F：胎鼠發生率 [per fetal incidence (%)]

n/n：異常動物隻數/觀察動物總數

129 及 126 隻，對照組及各劑量組的胎鼠體內各重要臟器均無明顯與毒性反應相關的異常情形，僅部分胎鼠出現非特異性的異常情形，包括測腦室擴大及胸腺殘留等現象，其發生率於對照組與各劑量組的胎數間並不具試驗物質與異常發生的正相關性，因此可以推論胎鼠內臟檢查並未發現致畸胎反應。

對照組、低劑量、中劑量及高劑量組進行骨骼異常檢查的胎鼠數分別為 137、138、139 及 134 隻，對照組及各劑量組的胎鼠骨骼及骨化程度均無明顯與毒性反應相關的異常情形，僅部分對照組及低劑量組胎鼠出現非特異性的異常情形，如胸椎骨分離，其發生率於對照組與各劑量組的胎鼠間並不具試驗物質與異常發生的正相關性。因此，可推論在胎鼠骨骼檢查中，並未發現致畸胎反應。

### 討 論

根據統計，全球每年約有 800 萬名嬰兒出生時帶有嚴重的缺陷<sup>[19]</sup>，其中 25% 為先天性遺傳或部分遺傳，而其中 10% 為母親暴露於某些環境因子而導致孩童出生時帶有缺陷<sup>[20]</sup>。因此，為保障孕婦食用蛹蟲草菌絲體的安全性以及胎兒的健康，進行致畸胎試驗相當重要。

本試驗評估蛹蟲草菌絲體經口連續投予懷孕雌鼠後，可能引發的毒性反應，以及對胎鼠自胚胎著床前至器官完全形成的階段導致胎鼠死亡、發育遲緩或畸形的可能性。結果顯示，蛹蟲草菌絲體對母鼠生殖或胚胎沒有負面影響。在試驗期間沒有發現任何動物死亡。母鼠在平均重量、飼料消耗量、臨床毒性症狀及解剖檢察，各劑量組與溶劑對照組均無統計差異。

在懷孕雌鼠生殖毒性的部分，各項生殖毒性參數包括子宮重、黃體數、著床數、活胎數、總胎數、雄性胎數、雌性胎數、性別比率(M/F)、吸收胎數、死胎數、著床前胚胎

損失率(%)、著床後胚胎損失率(%)等參數，各劑量組懷孕雌性大鼠子宮內參數檢查與對照組相較下均無顯著差異，僅黃體數在中劑量組有顯著高於對照組，但無劑量與反應的正相關性。在胎鼠外觀檢查方面，各試驗組及對照組均未發現明顯肉眼可觀察的異常情形。在胎鼠內臟和骨骼檢查項目，各劑量組與對照組的胎鼠相較下，均無明顯與毒性反應相關組織臟器及骨化異常的情形。因此，根據本研究的結果，蛹蟲草菌絲體對懷孕雌鼠的最小無毒性劑量(no observed adverse level, NOAEL)大於 3,000 mg/kg/day。

### 參考文獻

1. 林樹前。中國藥用菌生產與產品開發。2000:401。中國農業出版社。
2. 敬一兵、陸魯生。蟲草。1986:74。雲南科技出版社。
3. 李楠、龔長虹及張宏。北冬蟲夏草人工栽培技術研究。食用菌 2001; 4:34-5。
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Li SP, Zhang GH, Zeng Q *et al.* Hypoglycemic activity of polysaccharide, with antioxidation, isolated from cultured *Cordyceps* mycelia. Phytomedicine 2006; 13:428-33.
8. Kiho 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.
9. Koh JH, Kim JM, Chang UJ *et al.* Hypocholesterolemic effect of hot-water extract from mycelia of *Cordyceps sinensis*. Biol Pharmacol Bull 2003; 26:84-7.
10. 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.
11. 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.
  12. 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.
  13. Russell R, Paterson M. *Cordyceps* -A traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? Review Phytochem 2008; 69:1469-95.
  14. 胡豐林、李增智。蟲草及相關真菌之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、朱述鈞及錢大順。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、葉淑幸及陳椒華。蛹蟲草發酵液凍乾粉之 28 天重複劑量安全性分析。生物醫學暨檢驗科學雜誌 2016; 28. (出版中)
  19. Christianson AH, CP; Modell, CB. March of dimes global report on birth defects: the hidden toll of dying and disabled children. 2006. March of Dimes Birth Defects Foundation. White Plains, NY.
  20. Schardein J. Chemically Induced Birth Defects. 3rd ed. 2000. Taylor & Francis : New York.