

舞茸菌絲體發酵液凍乾粉於 Spraque-Dawley 大鼠之 28 天口服重複劑量亞急毒性試驗分析

陳彥博¹，陳勁初^{1-5*}

葡萄王生技股份有限公司，桃園縣¹；台灣大學食品科技研究所，台北市²；實踐大學食品營養與保健生技學系，台北市³；彰化師範大學生物技術研究所，彰化縣⁴；新竹教育大學應用科學系，新竹市⁵，台灣

摘要

舞茸（學名 *Grifola frondosa*）為一種多孔菌，生長在北半球溫帶森林中，普遍用作為傳統醫藥和營養補充品，在台灣市場上亦可見其蹤跡。本試驗之目的即是依據衛福部公告之健康食品安全評估方式，檢驗試驗物質舞茸菌絲體發酵液凍乾粉連續經口服給予 Spraque-Dawley 大鼠 28 天後，是否引起不良反應及毒性症狀。以舞茸菌絲體 1,000、2,000、3,000 mg/kg B.W. 三種劑量連續 28 天以口服方式投予試驗物質，每日進行試驗動物之臨床觀察，且每週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，試驗期間所有試驗大鼠均無出現異常之臨床症狀，各劑量組大鼠均能正常增重，而眼睛檢查結果顯示各組大鼠均無異常。試驗結束時之尿液學檢查、血液學檢查、血清生化檢查雖有少數項目與對照組間具顯著差異，但均未超過正常生理值範圍。病理解剖、肉眼病變檢查以及組織病理學檢查結果顯示，各劑量組與對照組大鼠均無明顯組織病理變化。綜合上述試驗結果，試驗組皆與陰性對照組無顯著差異，指出舞茸菌絲體發酵液凍乾粉之 NOAEL (no-observed-adverse-effect level) 為 3,000 mg/kg/day。

關鍵字：舞茸、大鼠 28 天亞急性毒性試驗

前言

舞茸的食用歷史有上千年，野生舞茸十分稀有且體積龐大，最大可重達 20 公斤，因其菇體型態似花瓣飛舞而得名。由於舞茸獨特的香味，且肉質柔軟脆嫩，在日本有「菇王」的美譽。農試所自 1987 年引進台灣經栽培成功後技轉給其他廠商進行量產^[1,2]，而目前市場上常可見到由好菇道自日本進口至台灣的舞茸，顯見舞茸在台灣市場上的接受度

日益漸增。研究發現舞茸富含多醣體而被認為具有抗腫瘤^[3,4]、強化免疫系統功效作用^[5-7]，亦能促進體內辨識和吞噬外來病原菌的白血球的活性^[8]，同時也能刺激免疫細胞活性，如自然殺手細胞、毒殺型 T 細胞等^[9]。舞茸也具有促進白血球細胞製造細胞介白素和增加淋巴細胞的活動^[10]，以增加身體抵禦疾病能力。另外舞茸尚有降低血糖^[11]、血壓^[12]和血中膽固醇的功效^[13]。其中以熱水萃取舞茸菌絲體後進一步純化所得之 D-fraction 成分物質，含有獨特的β-葡聚糖多醣體（主鏈β-1,3，支鏈β-1,6 聚合的葡聚糖多醣體）^[14]，具有更好的抗腫瘤活性^[15]。舞茸萃取物經口服投予，亦可發揮抗癌作用，目前已投入

*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. 294
Email: gkbioeng@grapeking.com.tw

人體臨床試驗。研究也指出，以熱水萃取出之舞茸多醣連續餵食 9 天後，對小鼠 S-180 腫瘤的抑制率達 38% 以上^[16]。最近的研究也指出從舞茸分離出的 lyso phosphatidylethanolamine (LPE) 能藉促進 PC 12 細胞 MAPK 訊息傳遞路徑進而影響細胞的分化與增生^[17]，也能影響神經細胞的鈣離子調控^[18]，被認為具有減緩神經退化疾病的潛力。

自舞茸多醣體被認為具有抗腫瘤活性後，深層液態發酵舞茸菌絲體的有效成分開發亦逐漸受到重視，各國相繼投入研究，並成功地分析出具抗腫瘤活性之舞茸多糖，並製成產品販售。但利用深層發酵技術培養之舞茸菌絲體則尚無安全性的評估報告；依我國法規則是屬於非傳統性食品原料，故需評估其安全性^[19]，依照衛福部食品藥物管理署公告之「非傳統性食品原料」安全性評估方法應進行 28 天亞急性毒性餵食測試^[20]。本試驗利用大鼠 28 天亞急性毒性試驗評估本研究室所研發出的舞茸菌絲體發酵液凍乾粉的安全性。

材料與方法

舞茸菌絲體凍乾粉制備

舞茸菌種來源(BCRC-36434)係購自財團法人食品工業發展研究所生資中心(新竹，台灣)。利用深層液態方式加以發酵培養可得到菌絲體及其培養液，其製法為先將新繼代後之菌種，接種至馬鈴薯葡萄糖洋菜培養基(potato dextrose agar, PDA)上，放置於恆溫培養室(24°C)培養約 2-3 周。液態發酵培養時則是先將長好舞茸菌絲之平板接種到內含 1 L 培養基(1.0% 葡萄糖、0.5% 黃豆粉、0.5% 消化蛋白胨、0.5% 酵母萃取物，調整至 pH 5.5) 的 2-L Hinton 燒瓶中，於 25±1°C，轉速 120 rpm 下，培養 3-4 天後接入一內含 400 L 上述培養基的 500 L 醱酵槽中，在 25°C 下發酵 7 天。最後將發酵完成所得之菌絲體發酵液加熱至 100°C，攪拌 2 小時，將其於 55°C

下減壓濃縮，再冷凍乾燥及磨粉後即成為「舞茸菌絲體發酵液凍乾粉」，保存於-20°C 備用。

實驗動物和飼養

本試驗中所使用之 Spraque-Dawley 品系老鼠，係購買自樂斯科生物科技股份有限公司(宜蘭，台灣)，試驗動物為 6 周齡，且體重範圍不超過該批動物平均體重±20%。動物於飼育室觀察無異狀後經過 7 天之隔離檢疫與適應後(每籠 5 隻)，始進行試驗。動物飼養於進階生物科技股份有限公司(Level Biotechnology Inc., New Taipei city, Taiwan.) 並獲得國際實驗動物管理評估及認證協會(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC) 認證之動物房，每籠飼養 2 隻大鼠，並提供一個通風良好的環境及維持溫度在 21±2 °C，室內相對溼度 55±20 %，每天恆定 12 小時的光照制度；使用飼料為經滅菌後之 LabDiet 5010 (PMI® Nutrition International, LLC. Richmond, Indiana, USA)，試驗期間不限食，飲水為經高壓蒸氣滅菌處理的 RO 水。墊料為 Aspen Chips (Northeastern Products Corp., USA)，每週更換。

試驗設計

試驗前將動物秤重，依體重隨機分成 4 組試驗組，分別為對照組、低、中及高劑量組，每組 20 隻動物，公母鼠各半，共 80 隻大鼠；低、中及高劑量組大鼠試驗物質投予量分別為 1 g/kg B.W.、2 g/kg B.W. 及 3 g/kg B.W.。試驗期間，試驗物質均每天新鮮配置，加入無菌水配置所需體積，攪拌均勻後配置成適當濃度之懸浮液，以餵食針方式進行管餵。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 10 mL/kg/day。每隻大鼠每日所需管餵之試驗物質均乙次投

予，所有試驗物質均在配置完成後 4 小時內使用完畢。

血液常規及血液凝固檢查

28 天連續餵食試驗完成後，試驗動物於犧牲前經隔夜禁食，以腹主動脈採血實施血液學檢查。血液置於含有 K₂ EDTA 的抗凝血管中，並置於室溫下混和均勻，以全自動血球分析儀(Xt-1800i, Sysmex, Canada)測定。檢測項目包括 WBC（白血球計數）、RBC（紅血球計數）、platelet（血小板）、hemoglobin（血紅素量）、hematocrit（血球容積比）、MCV（平均紅血球容積）、MCH（平均紅血球血紅素量）、MCHC（平均紅血球血紅素濃度）、neutrophil（嗜中性球）、eosinophil（嗜酸性球）、basophil（嗜鹼性球）、monocyte（單核球）及 lymphocyte（淋巴球）。另以含 sodium citrate 抗凝血管收集血液並以全自動血液凝固分析儀(CA-1500, Sysmex)檢測凝血酶原時間(prothrombin time)及部份凝血活酶時間(activated partial thromboplastin time)。

血清生化值分析

28 天連續餵食試驗完成後，試驗動物於犧牲前經隔夜禁食，利用腹主動脈採血所得之血液靜置凝固後，離心分離血清，以血清生化自動分析儀(Model-7080 Autoanalyzer, Hitachi, Japan)檢測常規項目，包括澱粉酵素(amylase)、白蛋白(albumin)、鹼性磷酸酶(ALP; alkaline phosphatase)、總膽紅素(total bilirubin)、天門冬胺酸轉胺酶(AST; aspartate aminotransferase)、丙胺酸轉胺酶(ALT; alanine aminotransferase)、丙麩氨酸轉移酶(γ -glutamyltransferase; γ -GT)、血清總蛋白質(total protein)、肌酸酐(creatinine)、血中尿素氮(BUN; blood urea nitrogen)、膽固醇(cholesterol)、三酸甘油酯(triglyceride)、肌酸激酶

(creatine kinase)、氯離子(chloride)、鈉離子(sodium)、鉀離子(potassium)、葡萄糖(glucose)、鈣離子(calcium)、及磷離子(phosphorus)。

組織病理檢查

試驗結束當天，以 ketamine 80 mg/mL 與 Xylazine 8 mg/mL 混和液麻醉動物放血後進行解剖，肉眼觀察其外觀、口腔、胸腔、腹腔內器官與組織，並進行組織病理檢驗，以了解毒性變化的嚴重程度。摘取腎上腺、胸腺、脾臟、心臟、腎臟、肝臟、卵巢（含輸卵管）、睪丸及副睪等器官。對各臟器秤重並記錄其重量，以計算臟器相對重量比率(%)（臟器重量/體重 \times 100%）。組織病理檢查主要是將各組大鼠採樣之器官以 10 % 中性福馬林處理，經脫水、澄清、石蠟包埋後，再以石蠟組織切片機切成 5 μ m 厚度之組織切片。以光學顯微鏡(Nickon E200)觀察 H&E (Hematoxylin and Eosin stain) 染色切片標本，並分析各臟器之組織病理變化。

統計分析

實驗結果數據以平均值(Mean) \pm 標準誤差(SD)表示。試驗數據以單向變異數分析 one-way ANOVA 及 Dunnett's test (SPSS®, Version 12.0) 決定多組間差異。若 $p < 0.05$ 則視為具有統計上的顯著差異。

結 果

臨床症狀觀察

試驗期間，每天觀察試驗動物的臨床症狀 2 次，紀錄試驗動物顯示的毒性症狀。除一隻高劑量組母鼠於第 19 天死亡外，其他各組餵食試驗物質之動物均存活，毛髮色澤無明顯變化，活動、飲食皆正常，呼吸、鼻、眼、口腔亦無異常分泌物。死亡母鼠經解剖後發現胸腔蓄積試驗物質，為投藥意外導致，

與試驗物質無關。

體重與攝食量

各餵食試驗組公鼠與母鼠平均體重如圖 1 所示，結果顯示，各試驗劑量組大鼠與對照組相比，體重增加的幅度並無顯著差異 ($p>0.05$)。同時觀察各試驗組間對飼料的消耗量如圖 2 所示，結果顯示，高劑量組公鼠於第 1、第 2 及第 4 周攝食量明顯低於對照組外 ($p<0.05$)，其餘時間各劑量組公鼠攝食量與對照組相比，並無顯著差異 ($p>0.05$)。母鼠方面，各劑量組母鼠攝食量與對照組相比亦無顯著差異 ($p>0.05$)。

臨床病理與血液生化值分析

連續餵養 28 天後，逐隻秤重，以腹主動脈採血進行血液學、生化學、電解質檢查。犧牲後解剖觀察無明顯病變。取肝、腎、脾、心、等臟器進行秤重。試驗結果如表 1 所示，除中劑量組公鼠胸腺重量 (0.496 g) 低於對照組外 ($p<0.05$)，其餘臟器各劑量組與對照組相比無顯著差異 ($p>0.05$)。而在查詢參考大

鼠 28 天重複劑量亞急性毒性臨床歷史數據後顯示^[21]，胸腺重量正常參考值落在 0.363~0.797g，故中劑量組公鼠胸腺重量仍位於正常範圍內，且在高劑量組並未發現異常，故判定未具毒性。

餵食試驗完成後，各組動物以腹主動脈採血實施血液生化值檢查。檢測結果如表 2 所示，公鼠高劑量組 MCH 19.06 pg 明顯低於對照組 ($p<0.05$)，母鼠則未見到此現象，而在大鼠 28 天重複劑量亞急性毒性臨床歷史數據中顯示，公鼠 MCH 正常參考值落在 18.35~20.96 pg 之間，故依此判斷高劑量組公鼠 MCH 仍位於正常範圍內。而公鼠中、高劑量組 MCHC 分別為 36.15 與 36.19 g/dL 均顯著低於對照組 ($p<0.05$)，而臨床歷史數據顯示，公鼠 MCHC 正常參考值落在 33.84~36.26 g/dL，故中、高劑量組公鼠 MCHC 亦位於正常範圍內。其餘項目各劑量組與對照組相比均無顯著差異 ($p>0.05$)。在母鼠方面，中、高劑量組 MCHC 分別為 36.26 與 35.7 g/dL 均顯著低於對照組 ($p<0.05$)，而臨床歷史數據顯示，母鼠 MCHC 正常參考值

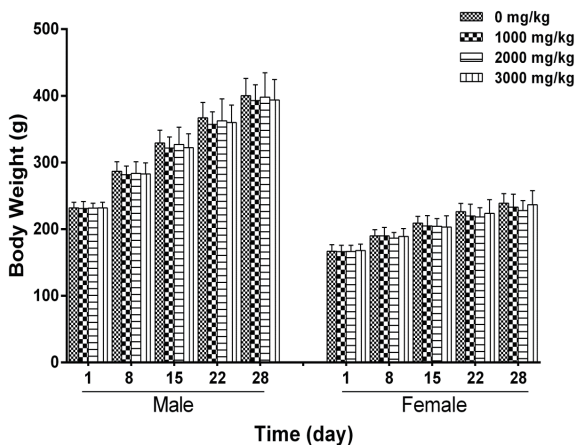


圖 1 28 天亞急性毒性試驗中受試大鼠體重增加變化量。數據皆以平均值±標準差 (mean±SD) 呈現，n=10。

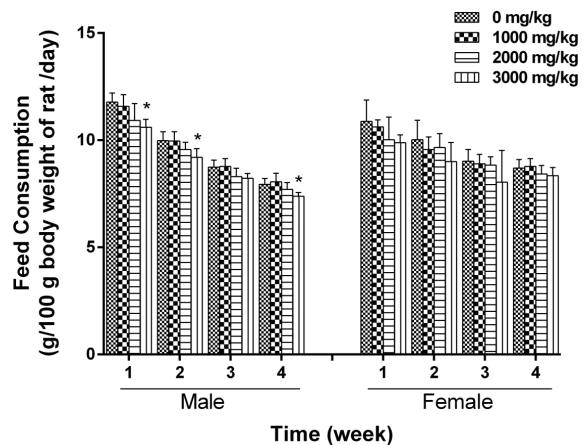


圖 2 28 天亞急性毒性試驗中受試各籠動物攝食變化量。數據皆以平均值±標準差 (mean±SD) 呈現，n=5 (五籠動物，每籠飼養兩隻大鼠，共 10 隻大鼠)。

*與對照組比較具有顯著差異 ($p<0.05$)。

表 1 28 天亞急性毒性試驗中大鼠主要臟器重量

Weight (g)	Control (Distilled water)	<i>Grifola frondosa</i> (mg/kg)			
		1,000 mg/kg	2,000 mg/kg	3,000 mg/kg ^a	
Male (雄)					
Adrenal Glands	0.054 ± 0.0072	0.051 ± 0.0056	0.054 ± 0.0061	0.056 ± 0.0042	
Thymus	0.606 ± 0.101	0.506 ± 0.065	0.496 ± 0.090*	0.522 ± 0.112	
Heart	1.317 ± 0.076	1.266 ± 0.096	1.261 ± 0.152	1.255 ± 0.068	
Kidney	3.05 ± 0.394	3.016 ± 0.181	2.968 ± 0.311	3.022 ± 0.308	
Liver	11.75 ± 1.125	11.439 ± 1.378	11.728 ± 1.787	11.8 ± 1.98	
Spleen	0.701 ± 0.085	0.696 ± 0.11	0.758 ± 0.147	0.715 ± 0.079	
Testes	0.211 ± 0.361	3.18 ± 0.187	3.15 ± 0.16	3.307 ± 0.137	
Epididymis	0.953 ± 0.082	0.979 ± 0.068	0.937 ± 0.094	0.991 ± 0.053	
Female (雌)					
Adrenal Glands	0.064 ± 0.0077	0.069 ± 0.006	0.066 ± 0.0114	0.061 ± 0.0078	
Thymus	0.5 ± 0.106	0.421 ± 0.088	0.492 ± 0.114	0.499 ± 0.113	
Heart	0.875 ± 0.055	0.831 ± 0.088	0.84 ± 0.065	0.91 ± 0.145	
Kidney	1.761 ± 0.149	1.753 ± 0.216	1.794 ± 0.159	1.794 ± 0.135	
Liver	6.861 ± 0.348	6.903 ± 0.847	6.836 ± 0.697	7.094 ± 0.706	
Spleen	0.481 ± 0.044	0.487 ± 0.077	0.473 ± 0.054	0.473 ± 0.055	
terus	0.525 ± 0.145	0.573 ± 0.183	0.719 ± 0.281	0.533 ± 0.149	
Ovary	0.1284 ± 0.0177	0.1253 ± 0.017	0.1193 ± 0.0156	0.1158 ± 0.0116	

數據皆以平均值±標準差(mean ± SD)呈現，n =10。

^a n=9 (高劑量母鼠)

落在 33.77~36.84 g/dL，故中、高劑量組母鼠 MCHC 亦位於正常範圍內。其餘項目各劑量組與對照組相比均無顯著差異(p>0.05)。

至於血清生化值檢測結果如表 3 所示，低劑量公鼠 glucose (145.94 mg/dL) 明顯低於對照組(p<0.05)、中劑量公鼠 creatinine (0.41 mg/dL)、高劑量公鼠 creatinine (0.41 mg/dL) 則高於對照組(p<0.05)，高劑量公鼠 calcium (9.9 mg/dL) 明顯低於對照組(p<0.05)，高劑量公鼠 sodium (146.23 mmol/L) 明顯高於對照組(p<0.05)，但各項數皆落在臨床歷史數據內，其餘項目各劑量組與對照組相比均無顯著差異(p>0.05)。母鼠則在各劑量試驗組與對照組相比均無顯著差異(p>0.05)。尿液分析定量數據如表 4 顯示，公鼠與母鼠各劑

量組與對照組相比均無顯著差異(p>0.05)。

組織病理分析

28 天餵食試驗結束後肉眼觀察其器官組織，並進行組織病理切片檢驗，其組織切片以 H&E 染色後發現，高劑量組試驗動物與對照組間，在組織方面並沒有明顯變化，顯示試驗物質並不會造成試驗動物各器官組織產生病變。進一步針對非特異性病變判讀^[22]，如表 5 所示。部分試驗動物肝臟出現局部單核細胞浸潤及多發性脂肪滴浸潤、腎臟出現空泡化變性及腎小管腔礦物質化等病變，如圖 3 所示。但在對照組與高劑量組公母鼠間，並不顯示試驗物質與各病變程度及發生有正相關性。

表 2 28 天亞急性毒性試驗中大鼠血液生化值分析

Parameters	Control (Distilled water)	<i>Grifola frondosa</i> (mg/kg)		
		1,000 mg/kg	2,000 mg/kg	3,000 mg/kg ^a
Male (雄)				
WBC (10 ³ /μL)	8.512 ± 2.884	8.366 ± 1.409	8.68 ± 1.321	8.657 ± 2.613
RBC (10 ⁶ /μL)	7.973 ± 0.257	8.094 ± 0.279	8.097 ± 0.292	8.118 ± 0.154
Hemoglobin (g/dL)	15.73 ± 0.371	5.71 ± 0.31	15.69 ± 0.52	15.46 ± 0.39
Hematocrit (%)	42.87 ± 0.67	43.04 ± 0.82	43.41 ± 1.43	42.72 ± 1.21
MCV (fL)	53.82 ± 1.77	53.21 ± 1.29	53.64 ± 1.6	52.65 ± 1.83
MCH (pg)	19.74 ± 0.59	19.41 ± 0.32	19.38 ± 0.51	19.06 ± 0.55*
MCHC (g/dL)	36.69 ± 0.53	36.49 ± 0.42	36.15 ± 0.38*	36.19 ± 0.41*
Platelet (10 ³ /μL)	1179.7 ± 135.8	1183.8 ± 113.6	1144.7 ± 86.6	1263.1 ± 87.9
Neutrophil (%)	20.03 ± 4.35	19.62 ± 3.442	1.18 ± 4.95	18.68 ± 3.91
Lymphocyte (%)	75.59 ± 4.33	76.10 ± 3.65	74.69 ± 4.85	77.52 ± 3.98
Monocyte (%)	4.01 ± 1.09	3.96 ± 1.14	3.74 ± 0.75	3.47 ± 0.82
Eosinophil (%)	0.30 ± 0.24	0.26 ± 0.23	0.30 ± 0.37	0.22 ± 0.20
Basophil (%)	0.07 ± 0.05	0.06 ± 0.05	0.09 ± 0.06	0.11 ± 0.07
Prothrombin time (sec)	12.93 ± 1.05	13.03 ± 1.09	12.59 ± 1.26	12.01 ± 0.49
APTT (sec)	15.32 ± 1.64	15.97 ± 1.08	15.86 ± 0.8	15.22 ± 1.30
Female (雌)				
WBC (10 ³ /μL)	5.995 ± 1.745	5.685 ± 1.545	8.031 ± 3.773	6.284 ± 1.559
RBC (10 ⁶ /μL)	7.770 ± 0.210	7.905 ± 0.238	7.688 ± 0.247	7.519 ± 0.328
Hemoglobin (g/dL)	15.30 ± 0.59	15.08 ± 0.32	15.06 ± 0.59	14.77 ± 0.48
Hematocrit (%)	41.65 ± 1.58	41.09 ± 0.71	51.52 ± 1.42	41.36 ± 1.16
MCV (fL)	53.6 ± 2.05	52.01 ± 1.39	54.02 ± 1.49	55.07 ± 2.20
MCH (pg)	19.71 ± 0.76	19.1 ± 0.50	19.6 ± 0.53	19.66 ± 0.68
MCHC (g/dL)	36.74 ± 0.31	36.70 ± 0.46	36.26 ± 0.39*	35.7 ± 0.34*
Platelet (10 ³ /μL)	1103.5 ± 195.7	1100.6 ± 117.0	1114.9 ± 158.4	1047.1 ± 96.4
Neutrophil (%)	13.79 ± 5.59	15.12 ± 4.26	13.28 ± 4.39	16.28 ± 6.65
Lymphocyte (%)	83.33 ± 5.57	82.62 ± 4.26	84.06 ± 4.77	80.49 ± 7.03
Monocyte (%)	2.64 ± 0.90	2.97 ± 0.82	2.48 ± 0.66	2.98 ± 0.80
Eosinophil (%)	0.17 ± 0.11	0.22 ± 0.20	0.12 ± 0.08	0.22 ± 0.11
Basophil (%)	0.07 ± 0.08	0.07 ± 0.09	0.06 ± 0.07	0.03 ± 0.05
Prothrombin time (sec)	9.60 ± 0.15	9.70 ± 0.35	9.54 ± 0.24	9.59 ± 0.19
APTT (sec)	14.16 ± 0.87	14.34 ± 0.97	13.53 ± 0.81	13.48 ± 0.91

MCV: Mean corpuscular volume ; MCH: Mean corpuscular hemoglobin ; MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration ; APTT: Activated partial thromboplastin time 。

數據皆以平均值±標準差(mean ± SD)呈現，n=10 。

^a n=9 (高劑量母鼠)

*與對照組比較具有顯著差異(p<0.05) 。

表 3 28 天亞急性毒性試驗中大鼠血清生化值分析

Parameters	Control (Distilled water)		<i>Grifola frondosa</i> (mg/kg)					
			1,000 mg/kg		2,000 mg/kg		3,000 mg/kg ^a	
Male (雄)								
AST (U/L)	106.98	± 13.49	111.61	± 33.53	99.21	± 10.71	107.36	± 15.14
ALT (U/L)	35.49	± 14.06	32.46	± 5.11	30.74	± 5.39	31.29	± 5.69
Glucose (mg/dL)	169.38	± 19.02	145.94	± 20.45*	157.76	± 24.8	154.72	± 18.44
Total protein (g/dL)	5.63	± 0.24	5.64	± 0.21	5.67	± 0.30	5.71	± 0.16
Albumin (g/dL)	4.00	± 0.18	4.12	± 0.12	4.19	± 0.19	4.16	± 0.24
Total bilirubin (mg/dL)	< 0.04		< 0.04		< 0.04		< 0.04	
Blood urea nitrogen (mg/dL)	12.87	± 1.41	12.89	± 1.08	13.6	± 1.37	13.18	± 1.77
Creatinine (mg/dL)	0.34	± 0.05	0.33	± 0.05	0.41	± 0.07*	0.41	± 0.06*
GGT (U/L)	< 2.0		< 2.0		< 2.0		< 2.0	
Alkaline phosphatase (U/L)	542.76	± 137.4	539.77	± 116.71	502.16	± 96.74	551.0	± 137.53
Cholesterol (mg/dL)	55.30	± 14.8	49.01	± 13.39	50.35	± 8.99	50.20	± 17.47
Triglyceride (mg/dL)	33.48	± 10.07	28.02	± 19.33	22.94	± 8.58	21.39	± 16.14
Calcium (mg/dL)	10.31	± 0.34	10.00	± 0.36	10.13	± 0.29	9.90	± 0.26*
Phosphorus (mg/dL)	8.41	± 0.55	7.84	± 0.41	8.00	± 0.54	7.92	± 0.56
Creatine kinase (U/L)	512.09	± 166.4	585.76	± 118.82	471.70	± 155.26	578.03	± 220.32
Amylase (U/L)	1289	± 152.5	1319.2	± 156.6	1315.4	± 198.4	1288.7	± 261
Sodium (mmol/L)	144.13	± 1.27	144.67	± 1.42	145.35	± 1.15	146.23	± 1.09*
Potassium (mmol/L)	4.552	± 0.455	4.540	± 0.345	4.360	± 0.212	4.287	± 0.247
Chloride (mmol/L)	107.0	± 2.76	105.21	± 1.39	105.65	± 1.21	106.35	± 1.65
Female (雌)								
AST (U/L)	92.29	± 10.47	101.15	± 16.77	101.56	± 12.87	101.64	± 14.03
ALT(U/L)	25.06	± 4.83	27.09	± 3.82	23.39	± 2.46	22.54	± 3.27
Glucose (mg/dL)	136.19	± 16.96	136.75	± 17.88	136.76	± 19.98	131.42	± 21.55
Total protein (g/dL)	5.99	± 0.31	5.92	± 0.33	5.86	± 0.21	5.79	± 0.34
Albumin (g/dL)	4.57	± 0.28	4.5	± 0.30	4.56	± 0.21	4.48	± 0.25
Total bilirubin (mg/dL)	< 0.05		< 0.04		< 0.08		< 0.04	
Blood urea nitrogen (mg/dL)	14.82	± 2.74	14.74	± 2.41	14.97	± 3.20	14.73	± 1.57
Creatinine (mg/dL)	0.45	± 0.07	0.46	± 0.07	0.48	± 0.09	0.47	± 0.05
GGT (U/L)	< 2.0		< 2.6		< 2.0		< 2.0	
Alkaline phosphatase (U/L)	368.51	± 69.66	331.91	± 61.36	347.0	± 94.07	299.89	± 62.7
Cholesterol (mg/dL)	67.04	± 12.24	62.94	± 16.46	72.12	± 11.72	62.7	± 15.83
Triglyceride (mg/dL)	15.32	± 6.95	14.71	± 8.34	10.49	± 3.60	10.22	± 4.40
Calcium (mg/dL)	10.12	± 0.32	10.11	± 0.45	9.97	± 0.22	9.91	± 0.30
Phosphorus (mg/dL)	7.430	± 0.33	7.04	± 0.53	7.16	± 0.58	7.03	± 0.63
Creatine kinase (U/L)	473.19	± 119.69	502.79	± 241.3	524.01	± 105.89	547.27	± 180.0
Amylase (U/L)	697.0	± 78.6	746.6	± 85.3	784.7	± 133	776.7	± 144.6
Sodium (mmol/L)	143.54	± 1.21	143.97	± 1.78	143.22	± 1.22	143.38	± 1.54
Potassium (mmol/L)	4.44	± 0.382	4.409	± 0.374	4.33	± 0.312	4.39	± 0.380
Chloride (mmol/L)	106.78	± 1.84	108.19	± 1.86	106.86	± 1.31	107.32	± 1.81

縮寫：AST, aspartate aminotransferase；ALT, Alanine aminotransferase； γ -GT, gamma-glutamyl transferase 數據皆以平均值 \pm 標準差(mean \pm SD)呈現，n=10。

^a n=9 (高劑量母鼠)

*與對照組比較具有顯著差異(p<0.05)。

表 4 28 天亞急毒性試驗中大鼠尿液定量分析

Parameters	Control (Distilled water)	<i>Grifola frondosa</i> (mg/kg)		
		1,000 mg/kg	2,000 mg/kg	3,000 mg/kg ^a
Male (雄)				
Volume (mL)	19.30 ± 6.10	19.00 ± 6.40	20.25 ± 10.34	22.40 ± 9.74
Specific Gravity	1.0165 ± 0.0034	1.0160 ± 0.0032	1.0165 ± 0.0041	1.0165 ± 0.0047
pH	7.15 ± 0.24	7.10 ± 0.21	7.05 ± 0.16	7.00 ± 0.00
Urobilinogen (EU/dL)	0.20 ± 0.00	0.28 ± 0.25	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00
Female (雌)				
Volume (mL)	10.20 ± 3.36	17.45 ± 12.70	12.45 ± 6.95	11.56 ± 6.02
Specific Gravity	1.0160 ± 0.0021	1.0167 ± 0.0056	1.0160 ± 0.0046	1.0171 ± 0.0049
pH	7.00 ± 0.00	6.80 ± 0.35	7.00 ± 0.24	6.78 ± 0.36
Urobilinogen (EU/dL)	0.20 ± 0.00	0.2 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00

數據皆以平均值±標準差(mean ± SD)呈現，n=10。

^a n=9 (高劑量母鼠)

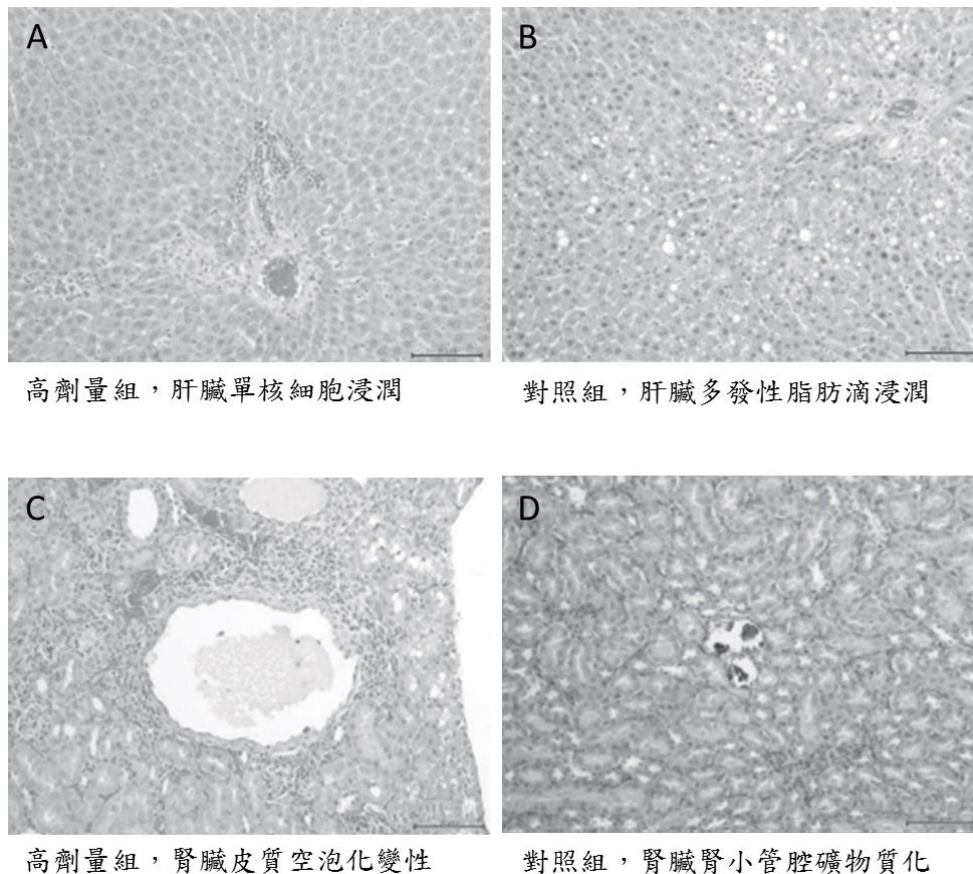


圖 3 亞急毒性試驗中受試動物組織病理切片。圖為對照組或高劑量組大鼠，組織切片以 H&E 染色做觀察(400x)。部分試驗動物臟器出現局部病變，但在對照組與高劑量組公母鼠間，並不顯示試驗物質與各病變程度及發生有正相關性。

表 5 28 天亞急毒性試驗中大鼠組織病理學評估結果

器 官	損傷 ^a	雄		雌	
		對照組	高劑量組	對照組	高劑量組 ^c
肝 臟	多發性脂肪滴浸潤，輕微至中度	-	-	3/10 ^b	1/9
	局部單核細胞浸潤，輕微	2/10 ^b	2/10	1/10	-
腎 臟	局部空泡化變性，極微	-	1/10	-	-
	局部腎小管腔礦物質化，輕微	-	-	3/10	4/9

- 無影響

^a 損傷端視嚴重程度分為 1-5 級：極微(<1%)；輕微(1-25%)；中度(26-50%)；中度至嚴重(51-75%)；嚴重至極為嚴重(76-100%)。

^b 發生率: 受影響動物隻數/每組受試動物隻數(n=10)。

^c n=9 (高劑量母鼠)

討 論

在試驗期間各劑量組或對照組大鼠的試驗結果均無顯現任何臨床異常症狀，各劑量大鼠體重均正常增加，高劑量組公母鼠在攝食量方面均有減少趨勢，公鼠甚至有顯著減少，可能與舞茸菌絲體富含大量膳食纖維，不易消化而有飽足感有關，能減少動物攝食量。

試驗結束後，各大鼠解剖觀察發現各劑量組與對照組大鼠之心臟、肝臟、脾臟、腎臟、胸腺及生殖系統等器官，均未發現與試驗物質有關之病變。此外，各劑量組大鼠臟器重量與對照組相比均無明顯差異。尿液分析定量數據顯示，各劑量組與對照組相比均無顯著差異(p>0.05)。血液生化檢驗結果顯示，高劑量組公鼠與母鼠的平均紅血球血紅素量(MCH)與平均紅血球血紅素濃度(MCHC)明顯低於對照組(p<0.05)，可能與貧血有關，但在紅血球(RBC)血紅素(hemoglobin)、血球容積(hematocrit)與平均血球容積(MCV)等數值上則未見其與對照組之差異，且其 MCH 與 MCHC 數值仍落在正常參考值內，因此推斷並非試驗物質所引發的毒物反應；而血清生化學檢驗結果顯示低劑量公鼠 glucose 與高劑量公鼠 Calcium 均明顯低於對照組

(p<0.05)，高劑量公鼠 creatinine 與 sodium 則高於對照組(p<0.05)，但其數值與正常參考值相距不大，因此推斷並非試驗物質所引發的毒物反應。

根據病理組織檢查結果，部分試驗動物肝臟出現局部單核細胞浸潤及多發性脂肪滴浸潤、腎臟出現空泡化變性及腎小管腔礦物質化等病變。以上病變於對照組與高劑量組病變程度及發生率並無正相關性，為非特異性病變，與試驗物質無關。

綜合以上結果，試驗物質舞茸菌絲體發酵液凍乾粉對大鼠 28 天重複劑量亞急毒性試驗，其無毒性顯示劑量(NOEL)為大於 3000 mg/kg B.W.。

參考文獻

1. 宋細福，許玲卿。舞菇之開發與研究(一)。農試所技術服務。1996; 25:11-7。
2. 宋細福，許玲卿。舞菇之開發與研究(二)。農試所技術服務。1996; 26:5-7。
3. Suzuki I, Itani T, Ohno N *et al.* Antitumor activity of a polysaccharide fraction extracted from cultured fruiting bodies of *Grifola frondosa*. J Pharmacobio-dynamics 1984; 7:492-500.
4. Ohno N, Iino K, Suzuki I *et al.* Neutral and acidic antitumor polysaccharides extracted from cultured fruiting bodies of *Grifola frondosa*. Chem Pharmaceutical Bull 1985; 33:1181-6.

5. Suzuki I, Itani T, Ohno N *et al.* Effect of a polysaccharide fraction from *Grifola frondosa* on immune response in mice. *J Pharmacobio-dynamics* 1985; 8:217-26.
6. Suzuki I, Hashimoto K, Oikawa S, Sato K, Osawa M, Yadomae T. Antitumor and immunomodulating activities of a beta-glucan obtained from liquid-cultured grifola frondosa. *Chem Pharmaceutical Bull* 1989; 37:410-3.
7. Kodama N, Murata Y, Nanba H. Administration of a polysaccharide from *Grifola frondosa* stimulates immune function of normal mice. *J med Food* 2004; 7:141-5.
8. Wang L, Ha CL, Cheng TL, Cheng SY, Lian TW, Wu MJ. Oral administration of submerged cultivated *Grifola frondosa* enhances phagocytic activity in normal mice. *J Pharmacy and pharmacol* 2008; 60:237-43.
9. Tsao YW, Kuan YC, Wang JL, Sheu F. Characterization of a novel maitake (*Grifola frondosa*) protein that activates natural killer and dendritic cells and enhances antitumor immunity in mice. *J Agr Food Chem* 2013; 61:9828-38.
10. Mao GH, Ren Y, Feng WW *et al.* Antitumor and immunomodulatory activity of a water-soluble polysaccharide from *Grifola frondosa*. *Carbohydrate polymers* 2015; 134:406-12.
11. Shen KP, Su CH, Lu TM, Lai MN, Ng LT. Effects of *Grifola frondosa* non-polar bioactive components on high-fat diet fed and streptozotocin-induced hyperglycemic mice. *Pharm Biol* 2015; 53:705-9.
12. Adachi K, Nanba H, Otsuka M, Kuroda H. Blood pressure-lowering activity present in the fruit body of *Grifola frondosa* (maitake). I. *Chem Pharm Bull* 1988; 36:1000-6.
13. Sato M, Tokuji Y, Yoneyama S *et al.* Effect of dietary maitake (*Grifola frondosa*) mushrooms on plasma cholesterol and hepatic gene expression in cholesterol-fed mice. *J Oleo Sci* 2013; 62:1049-58.
14. Iino K, Ohno N, Suzuki I, Sato K, Oikawa S, Yadomae T. Structure-function relationship of antitumor beta-1,3-glucan obtained from matted mycelium of cultured *Grifola frondosa*. *Chem Pharm Bull* 1985; 33:4950-6.
15. Matsui K, Kodama N, Nanba H. Effects of maitake (*Grifola frondosa*) d-fraction on the carcinoma angiogenesis. *Cancer lett* 2001; 172:193-8.
16. Li X, Rong J, Wu M, Zeng X. Anti-tumor effect of polysaccharide from *Grifola frondosa* and its influence on immunological function. *J Chinese Med materials* 2003; 26:31-2.
17. Nishina A, Kimura H, Sekiguchi A, Fukumoto RH, Nakajima S, Furukawa S. Lysophosphatidylethanolamine in *Grifola frondosa* as a neurotrophic activator via activation of mapk. *J Lipid Res* 2006; 47:1434-43.
18. Lee JM, Park SJ, Im DS. Lysophosphatidylethanolamine increases intracellular ca(2+) through lpa(1) in pc-12 neuronal cells. *Biochem Biophys Research Comm* 2015; 461:378-82.
19. 行政院衛生福利部。健康食品安全性評估方法。880802 衛署食字第 88037803 號公告。1999。行政院衛生福利部，台灣。
20. El Hilaly J, Israili ZH, Lyoussi B. Acute and chronic toxicological studies of ajuga iva in experimental animals. *J Ethnopharmacol* 2004; 91:43-50.
21. Giknis MLA, Clifford CB. Clinical laboratory parameters for crl: Cd (sd) rat. Charles River Laboratories. 2006.
22. Shackelford C, Long G, Wolf J, Okerberg C, Herbert R. Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 93-6.

Evaluation of the toxicological safety of *Grifola frondosa* mycelium in a 28-day oral feeding study in SD rats

Yen-Po Chen¹, Chin-Chu Chen^{1-5*}

Bioengineering Center of Grape King Bio Ltd., Taoyuan city¹ ; Institute of Food Science and Technology, National Taiwan University Taipei city² ; Department of Food Science, Nutrition, and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei city³ ; Institute of Biotechnology, National Changhua University of Education, Changhua city⁴ ; Department of Applied Science, National Hsin-Chu University of Education, Hsin-Chu city⁵, Taiwan

Abstract

Grifola frondosa, belonging to the family *Polyporaceae*, is usually distributed in temperate rainforests of northern hemisphere. They are also seen in Taiwan. *Grifola frondosa* is one of the traditional Chinese medicines and dietary supplements. The present study was conducted to investigate the 28-day oral toxicity of freeze dried *Grifola frondosa* mycelium powder in Spague-Dawley (SD) rats according to the safety assessment guideline of Health Food announced by Ministry of Health and Welfare (Taiwan). Rats were orally administrated with reverse osmosis water (control) or 1,000, 2,000 and 3,000 mg/kg BW/day *Grifola frondosa* 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 urinalysis, hematology, clinical chemistry and histopathological examination. During the study period, no abnormality occurred in clinical signs, body weight and ophthalmological examination. A few parameters in urinalysis, hematology and clinical biochemistry analysis showed significant differences between the treatment and control group, but these parameters were all within the normal range. Necropsy and histopathological examination indicated that no treatment-related change was found. According to the results, the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) of *Grifola frondosa* mycelium was greater than 3,000 mg/kg BW/day in SD rats.

Keywords: *Grifola frondosa*, 28-day oral feeding study in SD rats