

液態發酵樟芝菌絲體之致畸性試驗分析

李宜蓁¹ 王迪聖² 彭依婷³ 郭家芬⁴ 陳勁初^{1, 4*}

葡萄王生技股份有限公司, 中壢市¹; 進階生物科技股份有限公司, 新北市²;
葡眾企業股份有限公司, 台北市³; 實踐大學食品營養與保健生物學系, 台北市⁴, 台灣

摘要

本試驗參考衛生福利部健康食品安全性評估方法, 旨在評估高劑量(3500 mg/kg/day)樟芝菌絲體在懷孕母鼠及胎鼠之二期生殖與發育毒性。試驗物質以口服給予, 投予期間為胎鼠器官形成期(G6-G15)。試驗至少使用 80 隻懷孕 SD 母鼠, 分成四組(溶劑對照組, 低劑量組、中劑量組及高劑量組), 每組至少包含 20 隻懷孕母鼠。低、中及高劑量組分別投予試驗物質 1500、2500 及 3500 mg/kg/day, 溶劑對照組投予注射用水 10 mL/kg。試驗期間進行懷孕母鼠死亡率與臨床觀察, 體重與飼料消耗量之測量。母鼠於懷孕後第 20 天解剖, 進行母鼠檢查與胎鼠檢查, 評估試驗物質之致畸胎性及生殖與發育影響。試驗結果顯示, 沒有與試驗物質相關之動物死亡及臨床症狀。各劑量組懷孕母鼠平均體重及平均增重皆和對照組無統計差異。在飼料消耗量方面, 未發現與試驗物質相關之毒性證據。雖有部份統計差異, 但未超過正常參考值範圍。由 G6-G15 整個投藥期間數據分析, 低、中、高劑量組食物消耗量分別較溶劑對照組下降 7.2%、8.3% 及 12.6%, 此現象應非試驗物質毒性, 可能因試驗物質大量給予及其熱量影響, 取代了部分食物攝取量之故。在母體檢查部分, 解剖時未發現與試驗物質相關之肉眼病變。各項生殖毒性參數包含帶胎子宮重、著床數、黃體數、胎兒數、活胎或死胎數、雄性或雌性胎兒數、胎兒性別比值、重吸收數、著床前損失、著床後損失等參數, 組間均無統計差異且均落於正常參考範圍中。懷孕母鼠生殖參數於此部分中, 並未發現生殖毒性反應。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之發育毒性(致畸胎性)反應。依據試驗結果, 未發現明顯與試驗物質相關的二期生殖與發育毒性證據。本試驗懷孕母鼠之最小無毒性劑量 no-observed-adverse-effect level (NOAEL) 為 3500 mg/kg/day。試驗結果可供人體使用安全性依據之參考。

關鍵字:樟芝菌絲體; 致畸性試驗; 最小無毒性劑量

前言

牛樟芝 (*Antrodia cinnamomea*), 又名牛樟菇、樟菇、窟內菰、神明菇, 為多孔菌科 (*Polyporaceae*) 薄孔菌屬 (*Antrodia*) 的一種藥用真菌, 生長在中、低海拔的常綠闊葉大喬木的牛樟樹 (*Cinnamomum kanehirae*) 上

^[1]。牛樟芝富含三萜類化合物、超氧歧化酶、腺苷、多醣體、β-D-葡聚醣, 常用於保肝^[2]、抗炎^[3]、抗癌^[4]、抗氧化^[5]、抗疲勞^[6]及調節免疫系統^[7]。在傳統療法, 牛樟芝被喻為是一種「補肝良藥」^[8]。然而, 由於樟芝只專門寄生於台灣特有種的牛樟樹, 真菌又生長速度緩慢, 野生子實體牛樟芝正面臨被滅絕的危險之中。除了固態培養, 深層液體培養也已經成功大規模生產^[9]。深層發酵是一種快速、清潔衛生、可控制品質的生產方法並可用於從培養菌絲體生產特定有效物質, 例

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

如: Antrosterol^[10]、4-acetylanthroquinonol B (4-AAQB)^[11]、Hepasim®^[12]、多醣 (polysaccharide)、苯環型化合物 (benzenoids)、琥珀酸和馬來酸衍生物 (succinic and maleic derivatives)、麥角固醇 (ergosterol) 及三萜類化合物 (triterpenoids)。功效性則有可預防四氯化碳誘導肝纖維化^[13]、特異性的殺死^[14]及抑制癌細胞生長^[15]、防止血清缺乏的PC12神經細胞凋亡^[16]、降低自發性高血壓^[17]、舒緩血管^[18]及抗B型肝炎病毒生長^[19]。目前，深層培養樟芝菌絲體作為一種功能性食品已經在市場上銷售超過 10 年，並考慮正式作為膳食補充劑。雖然樟芝的藥理作用已在體外 (*in vitro*) 和體內 (*in vivo*) 被證實。到目前為止樟芝菌絲體的安全性在 Ames 試驗、體外和體內染色體畸變試驗^[20]、28 天亞急性毒性試驗、90 天亞慢性毒性試驗^[21]及二期生殖與發育毒性試驗中^[22]，結果均未觀察到任何毒性症狀。其中在致畸胎試驗，陳等人所使用的最高劑量為 500 mg/kg/day 且未對胎鼠之內臟及骨骼部分做深入之探討。故本案擬對更高劑量，為其安全性評價提供依據，以提供未來產品開發時之劑量考量。本試驗以人體建議攝取量不含膠囊重為計算基礎，每日 3 粒為 1.26 克。成人以 60 公斤體重換算後，一倍劑量為 21 mg/kg/day。本試驗低、中及高劑量分別為人體建議攝取量之 71、119 及 167 倍（依據體重換算），其結果將可作為安全性評價之依據。

材料與方法

試驗物質

樟芝菌絲體為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）之 BCRC 35398 菌株經液體發酵而得，其發酵條件如下。

液態發酵條件

將培養於 potato dextrose agar (PDA) 平板上之樟芝菌絲體，擷取 1 cm 正方大小菌塊，接入 2-L 三角搖瓶中，培養溫度控制為 28 °C，震盪轉速為 120 rpm 條件下培養一週後，接入 500-L 發酵槽培養一週後，再接入 40 噸發酵槽培養 14 天。成熟的帶紅棕色菌絲體連同培養液體一起解壓濃縮、冷凍乾燥、研磨成粉末、儲存在室溫並用於本研究作為試驗物質。

成分分析

秤取樟芝菌絲體 1 g 分別加入 50 ml 甲醇（分析 Antrosterol 及 Sesamin）、50ml 水（分析 adenosine）及 70% 乙醇（分析 GABA）震盪搖勻後，經超音波震盪萃取 30 分鐘，離心 5000 rpm 五分鐘並以 0.45 μm 濾膜過濾後備用。樟芝菌絲體指標成分有 Antrosterol、GABA 及 Adenosine。其各自之高效液相層析儀分析條件如表 1。

試驗動物

180（60 隻雄鼠做為配種用與 120 隻雌鼠做為試驗使用）隻 Sprague-Dawley (SD) 大鼠經過至少 5 天適應，並由進階生技實驗動物中心完成檢疫後，才開始試驗配種。配種期時，一隻雄鼠與一隻雌鼠共飼養於一個不銹鋼吊籠中。配種完成後，雌鼠移回至飼育籠中。各飼育籠尺寸符合 *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*^[23]之建議。環境控制於溫度 21±2°C，相對溼度 55±20%。飼育室光照週期為 12 小時亮，12 小時暗，且無外界病媒存在。飼料為滅菌後之 Laboratory rodent diet 5010, (LabDiet, PMI® Nutrition International, USA)，而試驗期間皆不限飲水。

試驗設計

本生殖與發育毒性試驗依據衛生署健康

食品安全性評估方法進行，健康雌鼠配種後，依亂數分配於四個劑量組別。分組後以 student's t-test 比較對照組與各試驗物質處理組之平均體重，不具顯著差異。基本設計如表 2。

投藥當日新鮮配製低、中、高劑量組之試驗物質懸浮液。口服為人體使用之途徑，故本試驗以管餵食方式做為投予路徑。雌性動物依據配種期之交配行為，認定成功配種後，移出配種籠進行秤重及定義懷孕第零日 (G0) 並個別飼養。配種後，雌性動物於胎兒器官形成期 (G6 - G15) 每日給藥一次。母鼠懷孕期間，於 G0、3、6、9、12、15、18 及

20 記錄動物體重及飼料攝取量。在 G20，預計於產前犧牲之動物以二氧化碳進行安樂死，並儘快移出卵巢與子宮。所有懷孕動物於犧牲時均執行肉眼解剖檢查（包含死亡動物）。並檢查外觀、黏膜、胸腔及腹腔內所有組織與器官與其內容物。解剖時，記錄子宮含胎兒重量。子宮於取出母體後，胎兒檢查是否存活。個別胎鼠進行秤重，記錄性別，檢查外觀之異常與變異。記錄個別胎鼠身長（單位：mm）。外觀檢查後胎鼠以腹腔注射 Pentobarbital 進行安樂死。並依照其在子宮內之位置與序號執行後續之內臟或骨骼檢查。每胎中二分之一之胎鼠以 Bouin's solution 固

表 1. 樟芝菌絲體指標成分 Antrosterol、GABA 及 Adenosine 的高效液相層析儀分析條件+

| 指標成分 | 分離管柱 | 移動相 | 流速 (ml/min) | 溫控 (°C) | 偵測波長 (UV) | 注射量 (μL) | 分析時間 (min) |
|-------------|--|---|-------------|---------|-----------|----------|------------|
| Antrosterol | Phenomenex Luna 5u C18 (2), 100A, 4.6 x 250 mm | A- CH ₃ CN B- MeOH A/B=5/95 | 1.0 | 40 | 270 | 10 | 15 |
| GABA | LiChrosCART 250-4, RP-18e, 5μm | A- GABA(A) B- GABA(B) A/B=80/20 | 10 | 40 | 254 | 10 | 15 |
| Adenosine | LiChrospher 100 RP-18e, 5μm, 250-4 | A- MeOH B- 10mM KH ₂ PO ₄ A/B=10/90 | 1.0 | 40 | 254 | 10 | 25 |

表 2. 健康雌鼠配種後進行生殖與發育毒性試驗的四個劑量組別

| 組別 | 劑量 (mg/kg/day) | 劑量濃度 (mg/mL) | 劑量體積 (mL/kg) | 動物數目 |
|--------------------------|----------------|--------------|--------------|------|
| 1 (控制組 ^a) | 0 | 0 | 10 | 20♀ |
| 2 (低劑量組) | 1500 | 150 | 10 | 20♀ |
| 3 (中劑量組) | 2500 | 250 | 10 | 20♀ |
| 4 (高劑量組) | 3500 | 350 | 10 | 20♀ |

^a 溶劑對照：注射用水。

定後執行頭顱與內臟檢查，並以 modified Wilson razor-blade 方式檢查軟組織之缺陷。每胎剩餘胎鼠，以 95% 酒精固定後，再以 KOH 處理，最後以 Alizarin Red S 與 Alcian Blue 染色，保存於甘油中以觀察並記錄各別胎鼠之骨骼骨化異常或變異。

數據分析與評估

數據以實驗結果之平均值 (Mean) \pm 標準誤差 (SD) 或百分比來表示。各試驗組別均獨立進行分析，並以變異數同質性檢定、常態分布和變異數分析來避免推論性之比較。以每胎 (litter) 做為試驗評估之計算單位。數據分析 (母鼠體重、增重、飼料消耗量、帶胎子宮重、胎兒體重/身長、著床數、黃體數、胎兒數、活胎或死胎數、雄性或雌性胎兒數及胎兒性別比值等) 採用 One-Way ANOVA 及 Dunnett's 檢定 (SPSS Ver. 12.0) 進行統計分析。各胎之著床前損失、著床後損失以及異常發生率 (外觀、內臟、骨骼異常) 則以 Kruskal-Wallis nonparametric ANOVA method 進行。若 p 值小於 0.05 則具有顯著差異。

結果

成分分析

萃取物經由 HPLC 分析，並以三種指標成份的出現情形當質方面的品管。三種指標成份分別為 Antrosterol、GABA 及 Adenosine，其分析結果與各別標準品比較所得的滯留時間及含量各為 9.600 min; 3.908 mg/g、7.840 min; 6.127 mg/g 及 9.440min; 0.950 mg/g (圖未顯示)。

樟芝菌絲體對母鼠的影響

各組受孕鼠 0 天~20 天 體重變化呈現於圖 1，數據顯示樟芝菌絲體與陰性對照組相比，均無顯著性差異。各組受孕鼠 0 天~20 天 飼料攝取量變化呈現於圖 2，數據顯示在 G6-G9、G9-G12 期間，各劑量組於統計上低於溶劑對照組，且有輕微劑量相關性 ($P < 0.05$)。在 G12-G15，各劑量組低於溶劑對照組，且高劑量組 (7.35 ± 0.81) 和溶劑對照組 (8.08 ± 0.49) 具有統計差異 ($P < 0.05$)。在 G15-G18 及 G18-G20，各劑量組低於溶

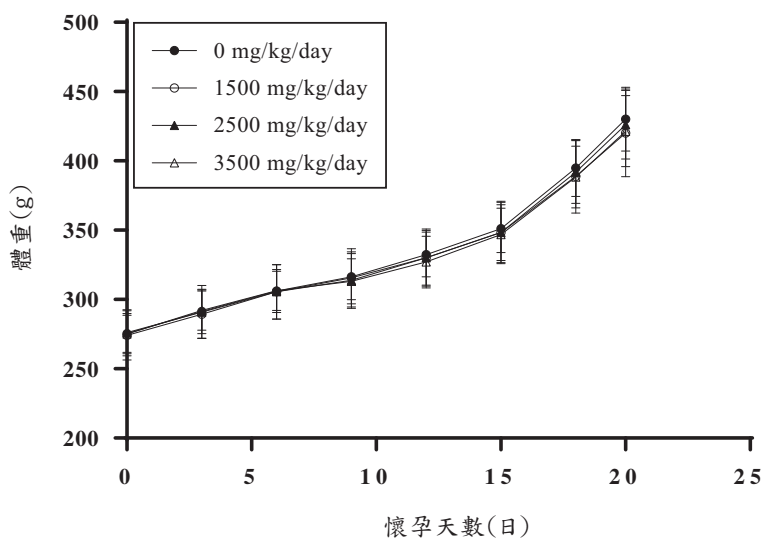


圖 1. 懷孕母鼠平均體重

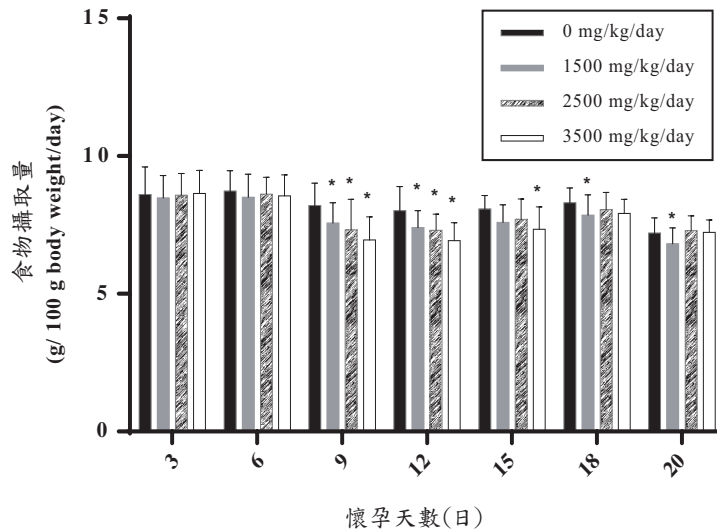


圖 2. 懷孕母鼠飼料消耗

劑對照組，而低劑量組 (7.86 ± 0.73 及 6.82 ± 0.57) 和溶劑對照組 (8.31 ± 0.53 及 7.21 ± 0.55) 具有統計差異 ($P < 0.05$)。G20 後，所有母鼠於執行肉眼解剖檢查 (含胎盤外觀)，並未發現與試驗物質投予相關之肉眼病變 (結果未顯示)。

懷孕母鼠生殖毒性參數評估數據呈現於表 3。胎兒數及性別比率 (男/女) 為 366, 307, 380, 401 及 1.03 ± 0.48 , 1.07 ± 0.79 , 1.05 ± 0.69 , 1.05 ± 0.69 在 0, 1500, 2500, 和 3500 mg/kg/day 組別裡 (表 3)。胎兒數及性別比率似乎沒有受到的樟芝菌絲體劑量的影響，各劑量組與溶劑對照組間均無統計差異 ($P > 0.05$)，且數據都落在正常的參考範圍之內 (表 3)。其餘生殖毒性參數包含帶胎子宮重、著床數、黃體數、活胎或死胎數、著床前損失、著床後損失等參數，組間均無統計差異 ($P > 0.05$)。

樟芝菌絲體對胎鼠的影響

胎鼠外觀、內臟與骨骼檢查呈現於表 4。解剖觀察時，所有胎鼠均執行外觀檢查。同時測量體重與身長。並記所有外觀異常。在

胎鼠體重中，溶劑對照組與各劑量組間無統計差異 ($P > 0.05$)。雖然胎鼠身長在各劑量組於統計上高於溶劑對照組 (37.42 ± 1.72)，但全未超過正常參考值範圍 ($29.24-40.26$)。觀察胎數外觀時，低劑量組有一隻胎鼠觀察到有腦外露、軀幹短小及脊柱分裂等症狀，其餘各劑量組外觀檢查均無異常 (表 4)。但因隻胎鼠症狀發生率均位於正常參考範圍內，且無明顯劑量相關性 ($P > 0.05$)，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。

之後，每胎中二分之一之胎鼠執行內臟檢查。樣本於 Bouin's solution 固定後，進行相關頭顱與軟組織/臟器觀察，並觀察到中劑量組有心房中隔缺損但因落於正常參考值範圍內，因此可以推論胎鼠內臟檢查並未發現致畸胎反應。

最後，每胎中二分之一之胎鼠執行骨骼檢查。樣本於 Alizarin Red S 與 AlcianBlue 染色後，進行觀察胎鼠是否有顱蓋缺失、胸骨骨化不全、胸骨錯位、胸骨畸形、胸骨裂、胸骨未骨化、肋骨缺失、肋骨融合、肋骨多餘、頸椎骨化不全、頸椎中心軟骨分裂、頸

表 3. 懷孕母鼠生殖毒性參數評估

| 參 數 | 組別/劑量 (mg/kg/day) | | | | 正 常 參 考 範 圍 |
|------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|-------------------------|
| | 溶劑對照組 0 | 低劑量組 1500 | 中劑量組 2500 | 高劑量組 3500 | |
| 配種確認動物數 | 27 | 28 | 27 | 29 | - |
| 懷孕動物數 | 24 | 23 | 26 | 29 | - |
| 配種率 (%) | 88.9 | 82.1 | 96.3 | 100.0 | 62.5-100.0 ^b |
| 有效動物數 | 24 | 22 | 26 | 28 | - |
| 帶胎子宮重 (g) | 95.30±9.95 | 90.29±23.56 | 94.41±12.71 | 92.80±15.24 | 95.30±9.95 |
| 著床數 | 16.1±1.7 | 15.0±3.5 | 15.2±1.8 | 15.3±2.4 | 16.1±1.7 |
| 黃體數 | 16.4±1.7 | 15.3±2.5 | 15.7±1.6 | 16.0±1.8 | 16.4±1.7 |
| 活胎數 | 15.3±1.6 | 14.0±3.8 | 14.6±2.1 | 14.8±2.5 | 15.3±1.6 |
| 雄性胎鼠數 | 7.5±2.3 | 7.0±3.0 | 6.8±2.4 | 7.6±2.1 | 7.5±2.3 |
| 雌性胎鼠數 | 7.8±1.6 | 7.0±2.0 | 7.8±2.8 | 7.1±2.2 | 7.8±1.6 |
| 死胎數 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 |
| 重吸收數 | 0.8±0.9 | 1.0±1.8 | 0.5±0.9 | 0.6±0.6 | 0.8±0.9 |
| 雌雄比例 (M/F) | 1.03±0.48 | 1.07±0.79 | 1.05±0.69 | 1.23±0.67 | 1.03±0.48 |
| 著床前損失 (%) | 1.99±3.29 | 4.70±17.71 | 3.43±6.87 | 4.44±9.70 | 1.99±3.29 |
| 著床後損失 (%) | 5.08±5.14 | 6.60±12.39 | 3.61±5.87 | 3.57±4.36 | 5.08±5.14 |

配種率 (%) = (懷孕動物數/配種確認動物數) x 100

著床前損失 (%) = (黃體數-著床數) / 黃體數 x 100

著床後損失 (%) = (著床數-活胎數) / 著床數 x 100

^aHistorical Control Data Rat CD® IGS, 2011. Level Biotechnology Inc.

^bHistorical Control Data Rat CD® IGS (crl:CD[SD]), 1996-2004. Charles River Laboratories Preclinical Service, Montreal.

椎骨異位、胸椎中心骨化對裂、胸椎中心啞鈴型、胸椎中心軟骨啞鈴型、胸椎中心畸形、胸椎中心軟骨骨裂、單側胸椎中心軟骨、胸椎骨異位、腰椎中心啞鈴型及腰椎中心骨化不全等症狀。本次試驗主要因為低劑量組一隻偶發的腦外露胎鼠，造成較多症狀。但其餘骨骼異常參數在溶劑對照組與各劑量組間無統計差異，且無劑量相關性或落於正常族群自然發生率中。故我們可以結論在胎鼠骨骼檢查中，並未發現致畸胎反應。

討 論

據統計，每年估計有 800 萬嬰兒（佔全球的 6%）出生時帶有嚴重的缺陷^[24]，其中

的 25% 為先天性遺傳或部分遺傳的嚴重缺陷，10% 為母體暴露於一些環境因素而導致孩童出生時帶有缺陷，然而，對於大多數重大出生缺陷（約 65%），病因是不明的^[25]。因此，為保障孕婦服用樟芝菌絲體之安全性以及胎兒的健康，致畸胎試驗相當重要。

此試驗將樟芝菌絲體經口服投予懷孕母鼠後，評估其對胚胎之影響及造成畸形胎的可能性。結果顯示，樟芝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、臨床毒性症狀及解剖檢查，各劑量組與溶劑對照組均無統計差異。母鼠飼料消耗量顯示在 G6-G9、G9-G12 期間，各劑量組於統計上低於溶劑

表 4. 胎鼠外觀、內臟與骨骼檢查

| 胎鼠檢查 | 組別/劑量 (mg/kg/day) | | | | 正 常 參 考 範 圍 |
|-----------|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------------------|
| | 溶劑對照組 0 | 低劑量組 1500 | 中劑量組 2500 | 高劑量組 3500 | |
| 胎鼠重 (g) | 4.06±0.30 | 4.26±0.30 | 4.21±0.27 | 4.22±0.30 | 2.67-4.75 ^a |
| 胎鼠身長 (mm) | 37.42±1.72 | 39.16±1.86* | 38.94±1.50* | 38.51±1.38* | 29.24-40.26 ^a |
| 總檢查數 | 366 | 307 | 380 | 401 | - |
| 外觀檢查數 | 366 | 307 | 380 | 401 | - |
| 內臟檢查數 | 177 | 147 | 184 | 193 | - |
| 骨骼檢查數 | 189 | 160 | 196 | 208 | - |
| 外觀異常 (%) | | | | | |
| 腦外露 | 0.00±0.00 | 0.27±1.25 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00-5.00 ^b |
| 軀幹短小 | 0.00±0.00 | 0.27±1.25 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00-4.00 ^c |
| 脊柱分裂 | 0.00±0.00 | 0.27±1.25 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00-4.00 ^c |
| 內臟異常 (%) | | | | | |
| 心房中隔缺損 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.55±2.80 | 0.00±0.00 | 0.00-2.63 ^a |
| 腎盂擴張 | 2.89±7.65 | 1.87±6.15 | 2.51±6.07 | 2.48±7.14 | 0.00-78.26 ^e |
| 骨骼異常 (%) | | | | | |
| 顱蓋缺失 | 0.00±0.00 | 0.51±2.37 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00-5.00 ^b |
| 胸骨骨化不全 | 10.13±14.48 | 13.88±19.09 | 13.54±18.52 | 11.04±14.63 | 4.0-62.5 ^c |
| 胸骨錯位 | 0.00±0.00 | 0.76±3.55 | 0.48±2.45 | 0.45±2.36 | 0.0-5.0 ^b |
| 胸骨畸形 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.48±2.45 | 0.00±0.00 | 0.0-27.8 ^e |
| 胸骨裂 | 0.00±0.00 | 0.51±2.37 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0-21.74 ^e |
| 胸骨未骨化 | 9.72±19.16 | 4.93±13.2 | 6.58±10.14 | 7.68±11.87 | 0.0-33.3 ^d |
| 肋骨缺失 | 0.52±2.55 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00-4.55 ^b |
| 肋骨融合 | 0.00±0.00 | 0.51±2.37 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.0-4.2 ^c |
| 肋骨多餘 | 10.62±22.26 | 7.33±12.06 | 8.88±17.36 | 11.18±21.38 | 0.00-24.17 ^a |
| 頸椎骨化不全 | 0.00±0.00 | 0.51±2.37 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | - |
| 頸椎中心軟骨分裂 | 0.00±0.00 | 0.51±2.37 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00-4.35 ^e |
| 頸椎骨異位 | 0.00±0.00 | 0.51±2.37 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | - |
| 胸椎中心骨化對裂 | 1.64±5.77 | 1.07±3.48 | 0.55±2.8 | 0.96±3.52 | 0.00-41.17 ^a |
| 胸椎中心啞鈴型 | 3.08±6.39 | 1.64±4.24 | 3.64±9.56 | 7.68±12.55 | 0.00-30.04 ^a |
| 胸椎中心軟骨啞鈴型 | 0.00±0.00 | 2.02±9.48 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00-70.00 ^e |
| 胸椎中心畸形 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 1.54±7.84 | 0.00±0.00 | 0.0-13.6 ^c |
| 胸椎中心軟骨骨裂 | 3.03±6.3 | 9.69±11.89 | 3.99±9.96 | 7.6 ±11.37 | 0.00-34.78 ^e |
| 單側胸椎中心軟骨 | 0.00±0.00 | 0.51±2.37 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.0-4.3 ^c |
| 胸椎骨異位 | 0.00±0.00 | 0.51±2.37 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00-0.45 ^b |
| 腰椎中心啞鈴型 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.51±2.7 | 0.00-7.14 ^e |
| 腰椎中心骨化不全 | 0.00±0.00 | 0.51±2.37 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | - |

* p < 0.05; %: 胎發生率

^aHistorical Control Data Rat CD® IGS, 2011. Level Biotechnology Inc.^bHistorical Control Data Rat CD® IGS (crI:CD[SD]), 1996-2004. Charles River Laboratories Preclinical Service, Montreal.^cHistorical Control Data Rat CD® IGS (crI:CD[SD]), 2003-2005. Charles River Laboratories Preclinical Service, Pennsylvania.^dHistorical Control Data Rat CD® IGS (crI:CD[SD]), 2000-2006. Charles River Laboratories Preclinical Service, Ohio.^eHistorical Control Data CrI:CD® BR Rat, 1993. Charles River Laboratories.

對照組，且有輕微劑量相關性 ($P < 0.05$)。在 G12-G15，各劑量組低於溶劑對照組，且高劑量組 (7.35 ± 0.81) 和溶劑對照組 (8.08 ± 0.49) 具有統計差異 ($P < 0.05$)。在 G15-G18 及 G18-G20，各劑量組低於溶劑對照組，而低劑量組 (7.86 ± 0.73 及 6.82 ± 0.57) 和溶劑對照組 (8.31 ± 0.53 及 7.21 ± 0.55) 具有統計差異 ($P < 0.05$)。雖然有統計差異，但未超過正常參考值範圍。由 G6-G15 整個餵食樟芝菌絲體期間數據來看，低、中、高劑量組食物消耗量分別較溶劑對照組下降 7.2%、8.3% 及 12.6%，此現象應非樟芝菌絲體毒性，可能因樟芝菌絲體大量給予及熱量影響，取代了部份食物攝取量之故。動物飼料及樟芝菌絲體含熱量分別為 3.42 kcal/g 及 4.1 kcal/份。

在懷孕母鼠生殖毒性，各項生殖毒性參數包含帶胎子宮重、著床數、黃體數、胎兒數、活胎或死胎數、雄性或雌性胎兒數、胎兒性別比值、著床前損失、著床後損失等參數，組間均無統計差異。在低劑量組的胎鼠外觀有一隻胎鼠觀察到有腦外露、軀幹短小及脊柱分裂等症狀，其餘各劑量組外觀檢查均無異常。此隻胎鼠症狀發生率均位於正常參考範圍內，且無明顯劑量相關性。故外觀檢查未發現與樟芝菌絲體相關的致畸胎反應。在胎鼠內臟與骨骼檢查中，並未發現致畸胎反應。因此，根據本研究的條件下，樟芝菌絲體對懷孕母鼠之最小無毒性劑量“no-observed-adverse-effect level (NOAEL)”為 3500 mg/kg/day。

參考文獻

1. Chang TT, Chou WN. *Antrodia cinnamomea* sp. nov. on *Cinnamomum kanehirai* in Taiwan. *Mycolog Res* 1995; 99:756-8.
2. Ker YB, Peng CC, Chang WL, Chyau CC, Peng RY. Hepatoprotective bioactivity of the glycoprotein, antrodan, isolated from *Antrodia cinnamomea* mycelia. *PLoS one*. 2014; 9:e93191.
3. Chen CC, Liu YW, Ker YB, Wu YY, Lai EY, Chyau CC *et al.* Chemical characterization and anti-inflammatory effect of polysaccharides fractionated from submerged-cultured *Antrodia camphorata* mycelia. *J Agricul Food Chem* 2007; 55:5007-12.
4. Hsu YL, Kuo PL, Cho CY, Ni WC, Tzeng TF, Ng LT *et al.* *Antrodia cinnamomea* fruiting bodies extract suppresses the invasive potential of human liver cancer cell line PLC/PRF/5 through inhibition of nuclear factor kappaB pathway. *Food Chem Toxicol* 2007; 45:1249-57.
5. Hsiao G, Shen MY, Lin KH, Lan MH, Wu LY, Chou DS *et al.* Antioxidative and hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract. *J Agricul Food Chem* 2003; 51:3302-8.
6. Huang CC, Hsu MC, Huang WC, Yang HR, Hou CC. Triterpenoid-rich extract from *Antrodia camphorata* improves physical fatigue and exercise performance in mice. *Evidence-based Complement Alternat Med: eCAM* 2012; 2012:364741.
7. Cheng PC, Huang CC, Chiang PF, Lin CN, Li LL, Lee TW *et al.* Radioprotective effects of *Antrodia cinnamomea* are enhanced on immune cells and inhibited on cancer cells. *Internat J Radiat Bio* 2014:1-12.
8. Ao ZH, Xu ZH, Lu ZM, Xu HY, Zhang XM, Dou WF. Niuchangchih (*Antrodia camphorata*) and its potential in treating liver diseases. *J Ethnopharmacol* 2009; 121: 194-212.
9. Liu DZ, Liang HJ, Chen CH, Su CH, Lee TH, Huang CT *et al.* Comparative anti-inflammatory characterization of wild fruiting body, liquid-state fermentation, and solid-state culture of *Taiwanofungus camphoratus* in microglia and the mechanism of its action. *J Ethnopharmacol* 2007; 113:45-53.
10. Huang GJ, Deng JS, Huang SS, Shao YY, Chen CC, Kuo YH. Protective effect of antrosterol from *Antrodia camphorata* submerged whole broth against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Food Chem* 2012; 132:709-16.
11. Lin YW, Pan JH, Liu RH, Kuo YH, Sheen LY, Chiang BH. The 4-acetylanthroquinol B isolated from mycelium of *Antrodia cinnamomea* inhibits proliferation of hepatoma cells. *J Sci Food Aricul* 2010; 90:1739-44.
12. Nakamura N, Hirakawa A, Gao J-J, Kakuda H, Shiro M, Komatsu Y *et al.* Five new maleic and succinic acid derivatives from the mycelium of *Antrodia camphorata* and their cytotoxic effects on LLC tumor cell line. *J Natur Prod* 2003; 67:46-8.
13. Lin WC, Kuo SC, Lin WL, Fang HL, Wang BC. Filtrate

- of fermented mycelia from *Antrodia camphorata* reduces liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World J Gastroenterol* : WJG 2006; 12:2369-74.
14. Hseu YC, Chang WC, Hseu YT, Lee CY, Yech YJ, Chen PC *et al.* Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Antrodia camphorata* mycelia in normal human erythrocytes. *Life Sci* 2002; 71:469-82.
 15. Yang HL, Chen CS, Chang WH, Lu FJ, Lai YC, Chen CC *et al.* Growth inhibition and induction of apoptosis in MCF-7 breast cancer cells by *Antrodia camphorata*. *Cancer Let* 2006; 231:215-27.
 16. Huang NK, Cheng JJ, Lai WL, Lu MK. *Antrodia camphorata* prevents rat pheochromocytoma cells from serum deprivation-induced apoptosis. *FEMS Microbiol Let* 2005; 244:213-9.
 17. Liu DZ, Liang YC, Lin SY, Lin YS, Wu WC, Hou WC *et al.* Antihypertensive activities of a solid-state culture of *Taiwanofungus camphoratus* (Chang-chih) in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71:23-30.
 18. Wang GJ, Tseng HW, Chou CJ, Tsai TH, Chen CT, Lu MK. The vasorelaxation of *Antrodia camphorata* mycelia: involvement of endothelial Ca (2+)-NO-cGMP pathway. *Life Sci* 2003; 73:2769-83.
 19. Lee IH, Huang RL, Chen CT, Chen HC, Hsu WC, Lu MK. *Antrodia camphorata* polysaccharides exhibit anti-hepatitis B virus effects. *FEMS Microbiol Let* 2002; 209:63-7
 20. Wu MF, Peng FC, Chen YL, Lee CS, Yang YY, Yeh MY *et al.* Evaluation of genotoxicity of *Antrodia cinnamomea* in the Ames test and the *in vitro* chromosomal aberration test. *In Vivo* 2011; 25:419-23.
 21. Chen TI, Chen CC, Lin TW, Tsai YT, Nam MK. A 90-day subchronic toxicological assessment of *Antrodia cinnamomea* in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol* 2011; 49:429-33.
 22. Chen TI, Chen CW, Lin TW, Wang DS, Chen CC. Developmental toxicity assessment of medicinal mushroom *Antrodia cinnamomea* T.T. Chang et W.N. Chou (higher *Basidiomycetes*) submerged culture mycelium in rats. *Internat J Med Mushrooms* 2011; 13:505-11.
 23. Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 1996. The National Academies Press: Washington, DC, USA
 24. Christianson AH, CP; Modell, CB. March of dimes global report on birth defects: The hidden toll of dying and disabled children. 2006. White Plains, NY.
 25. Schardein J. Chemically Induced Birth Defects. 3rd ed. 2000. Taylor & Francis : New York.

Evaluating the Teratogenicity of *Antrodia Cinnamomea* Mycelium in Submerged Fermentation

I-Chen Li¹, Di-Sheng Wang², Yi-Ting Peng³, Chia-feng Kuo⁴, Chen, Chin-chu^{1, 4*}

¹Grape King Biotechnology Inc., Zhong-Li City; ²Level Biotechnology Inc., New Taipei City; ³Pro-partner Ltd., Taipei City;

⁴Department of Food Science, Nutrition, and Nutraceutical Biotechnology, Shih Chien University, Taipei City, Taiwan

Abstract

This study was conducted in accordance with the "Safety Evaluation Methods for Health Food (1999). DOH, Taiwan, R.O.C.". The purpose of this study was to evaluate the adverse effects in the pregnant rats, embryofetal development and teratogenicity after administration of the *Antrodia cinnamomea* mycelium, via oral gavage during the major embryonic organogenesis period (G6-G15). A total of 80 pregnant SD female rats were randomly divided into three treatment groups and a control group, each consisting of 20 pregnant female rats. Three doses of 1500 mg/kg/day (Low dose), 2500 mg/kg/day (Mid dose) and 3500 mg/kg/day (High dose) were selected for the study, whereas 10 mL/kg distilled water was served as the control. Examinations were conducted on pregnant rats and fetuses respects to mortality, body weights, body weights gains, food consumption and clinical observations. The pregnant females were gross necropsied on G20, followed by maternal and fetus examination, to evaluate the teratogenicity, reproductive, and developmental performance of *Antrodia cinnamomea* mycelium. The study results showed that no *Antrodia cinnamomea* mycelium-related animal death and abnormal clinical sign were noted. No statistical differences were noted in maternal mean body weight and maternal mean body weight gains. During the G6-G15 period, the feed intake of low, medium and high dose

groups decreased by 7.2%, 8.3% and 12.6%, respectively, when compared with the control group. However, such values were found to be within the normal range of rats, thus indicating the high-calorie *Antrodia cinnamomea* mycelium replacing parts of normal diet. In maternal gross necropsy, no *Antrodia cinnamomea* mycelium-related gross lesion was noted. Other parameters such as gravid uterus weight, implantation number, corpora lutea number, litter size, live or dead fetal number, male or female fetus number, fetal sex ratio (M/F), resorption number, pre-implantation loss and post-implantation loss, were all within the normal reference ranges and showed no significant difference when compared to the control group. In fetus examination, including external, visceral and skeletal evaluations, there were no significant changes between any of the *Antrodia cinnamomea* mycelium treated groups and the control group. Based on the study results, the no-observable-adverse-effect level (NOAEL) for pregnant female rats under the conditions of this study was 3500 mg/kg/day. All data generated from the study will provide safety criteria information for human exposure.

Key words: *Antrodia cinnamomea* mycelium; teratogenicity; no-observable-adverse-effect level (NOAEL).