

台灣道地牛樟椴木牛樟芝子實體油萃取物 SN3-OE1 之亞慢性毒性安全性評估

黃嘉新^{1*}、曾雅詩¹、陳明資¹、許晉勳¹、謝伯潛¹、許庭瑜¹，葉宗銘²

¹中華醫事科技大學醫學檢驗生物技術系

²神農真菌生技公司

摘 要

牛樟椴木牛樟芝子實體 (*Antrodia cinnamomea*, 牛樟椴木)，是台灣特有種具有多樣化生物活性的菇類，萃取技術和溶劑是否會影響其生物活性和毒理。本試驗材料是使用油萃取物 (SN3-OE1)，混合飼料每日投與ICR小鼠90 天後，分析鼠體內可能產生之毒性變化。試驗分組為對照組、低中高劑量試驗組(0、208.3、500.0、1249.5 mg/Kg B.W./day)等四組。方法是依據衛生福利部公告之健康食品安全性評估方法進行試驗。分析每週測量試驗動物之體重及攝食量，試驗期間鼠的生理活動狀況及外觀，與對照組無統計上差異($p>0.05$)。試驗結束後，犧牲小鼠採集尿液、血液及臟器進行，血清生化及組織病理上分析顯示，三劑量各試驗組與對照組小鼠均無明顯組織病理變化。綜合上述實驗數據，本試驗材料對小鼠90 天餵食毒性試驗之無毒性顯示之劑量1249.5 mg/kg B.W./day。

關鍵詞：90天餵食動物、牛樟芝子實體油萃取物、無毒性顯示之劑量

*通訊作者：黃嘉新 Email: hjsh101@mail.hwai.edu.tw

中華醫事科技大學醫學檢驗生物技術系

台南市仁德區文華一街89號

Safety assessment of subchronic toxicity of SN3-OE1, oil extraction from fruit body of *Antrodia cinnamomea*

Chia-Hsin Huang^{1*}, Ya-Shih Tseng¹, Min-Tzu Chen¹, Chin-Hsun Hsu¹, Bo-Qian Xie¹, Ting-Yu Hsu¹, Tsung-Ming Yeh²

¹Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, Chung Hua University of Medical Technology

²Shennong Fungal Biotech Co. LTD.

Abstract

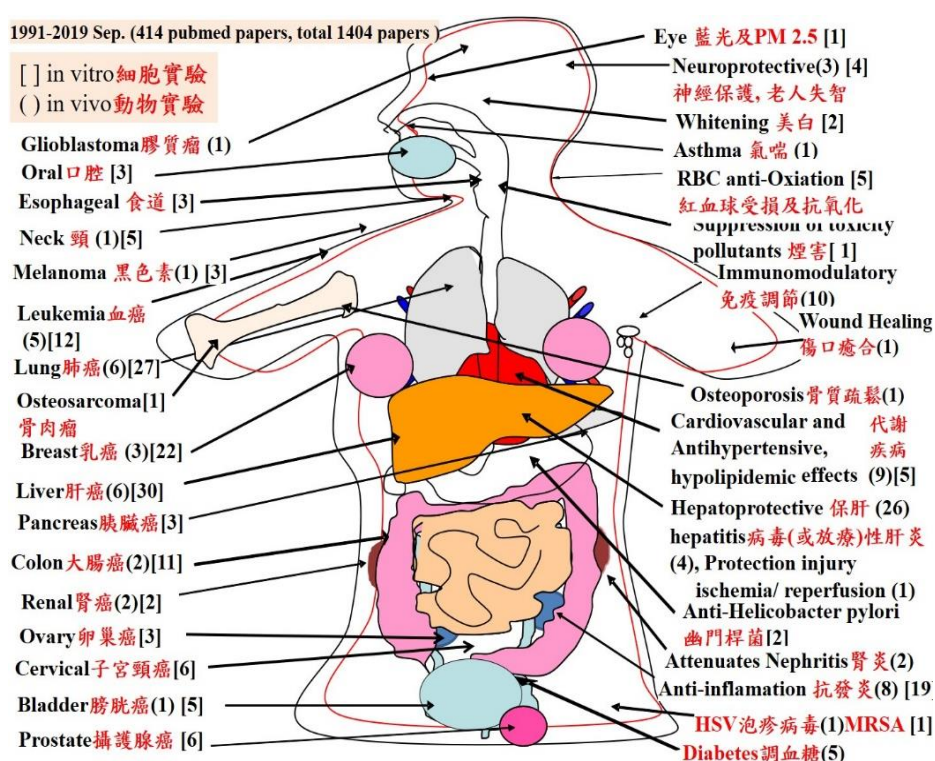
Fruit body of *Antrodia cinnamomea*, a medicinal mushroom indigenous to Taiwan, grows only in the inner cavity of *Cinnamomum kanehirai* Hayata basswood. The biological activity of the components in *Antrodia cinnamomea* depends on the different solvents and extraction techniques. To evaluate the toxicity of the oil extracts, we treated ICR mice with SN3-OE1, oil extraction from fruit body of *Antrodia cinnamomea*. Animals were daily treated with SN3-OE1 administered in the diet at dosage levels of 0 (reverse osmosis water), 208.3, 500.0, 1249.5 mg/kg B.W./day for 90 days, respectively. The evaluation method is according to OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 408 (Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents), suggesting from Ministry of health and welfare. Body weight, food consumption, activity and physical appearance were measured weekly. At the end of the study, urinary test, hematological analysis and biochemical parameters were determined and the major organs, including liver, brain, heart, adrenals, kidneys, and gonads were also evaluated. There was no significant difference ($p > 0.05$), in pathophysiological effects, observed in the three different groups, compared to the control. Together, 90-days repeated oral dose toxicity tests shows the NOAEL (No-Observed-Adverse- Effect Level) of oral administration of SN3-OE1 at doses up to 1249.5 mg/kg B.W./day in mice.

Keywords: 90-day Safety Assessment, *Antrodia cinnamomea* Fruiting body Oil Extracts, NOAEL

壹、前言

牛樟芝(*Antrodia cinnamomea*)是台灣特有種真菌類，又名牛樟菇、樟菇、窟內菰、神明菇，在生物分類上，屬於真菌界(Fungi)、擔子菌門(Basidiomycota)、擔子菌亞門(Basidiomycotina)、同擔子菌綱(Homobasidiomycetes)、無褶菌目(Aphyllporales)、多孔菌科(Polyporaceae)、薄孔菌屬(*Antrodia*)，原生寄生於牛樟木(*Cinnamomum kanehirae*)之真菌。牛樟芝具有多樣化生物活性其相關研究，於1991 年之碩士論文以中藥樟菇活性成分之研究。自此開始到2019年九月底，已經有超過1404篇關於牛樟芝的各式研究散見於各大學之學術期刊和碩博士論文及專利的統計，如圖一。

牛樟芝之功能研究性有培養方式(不同椴木子實體、皿培式固態或液態培養)，物理性磨粉或化學性水、酒精或二氧化碳萃取，產生效果和毒性不同會受其萃取方式不同，而有所差異(黃等，2017)。目前已完成90天亞慢性有液態培養(陳等、吳等；2012)、子實體及其酒精萃取物(王等2016及2018)，但使用油萃取物尚未相關論文發表在重複餵食給予90天毒性，分析其無毒性顯示之劑量(no-observed - adverse-effect level, NOAEL)。



圖一、牛樟芝的功能性。由1991年至2019年09月被刊載文章篇數，()小括號表示用動物實驗被發表，[]中括號表示以細胞實驗發表，括號內數字表示發表篇數。來源：自行整理(黃和許，2020)。

貳、材料與方法

一、供試動物

試驗動物為雄性與雌性ICR品系小鼠各40 隻，共80 隻。經由樂斯科生物科技股份有限公司購入4週齡，試驗開始時小鼠為5 週齡。飼育環境為 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、濕度 $55\% \pm 15\%$ 、照明12 小時的乾淨動物房。飼養於中華醫事科技大學醫技系基因轉殖實驗室(中華醫事科技大學實驗動物照護及使用委員會審動物同意書編號104-12)。

二、試驗材料

台灣牛樟椴木牛樟芝子實體油萃取物SN3-OE1，由神農真菌生技有限公司所提供。

三、試驗分組及方法

本試驗共設置四組，分別為對照組、高中低劑量試驗組等設計。對照組：逆滲透水+飼料(0 mg/Kg B.W./day)。高劑量試驗組：1249.5 mg/Kg B.W./day，中劑量試驗組：500.0 mg/Kg B.W./day，低劑量試驗組：208.3 mg/Kg B.W./day。試驗期間，每天秤取12.495 mg、5.0 mg、2.083 mg、0 mg之試驗材料，攪拌10克飼料加入1倍逆滲透水至所需體積，均勻混合後 50°C 烘乾，配製成濃度分別為1249.5 mg/Kg B.W.，500.0 mg/Kg B.W.，208.3 mg/KgB.W. 及0 mg/Kg B.W.。使用試驗材料採用混入飼料餵食每日投與，確認食畢試驗材料，再投與一般飼料。飼料使用福壽牌LabDiet5001實驗室鼠飼料，投與劑量依體重量調整。依據衛生福利部健康食品安全性評估方法90天餵食試驗，880802衛署食字第88037803號公告方法。

四、檢測項目

1. 臨床症狀觀察及體重測定：

試驗期間每兩日進行臨床觀察(毛色、生理活動、眼睛及腫瘤)，並記錄投予試驗材料後試驗小鼠，觀察是否顯現異常臨床症狀或死亡情形，所有異常臨床症狀或死亡情形均須記錄於個別動物臨床觀察紀錄表試驗期間每週進行結算1 次。

2. 尿液分析：

試驗結束前一日收集動物的尿液，利用sysmex UF100i，CHAO-DEE折射

計及Medi-Test Combi 10[®] VET尿試紙，分析物理性質與生化指標。

3. 血液檢驗：

試驗小鼠於犧牲前採集血液，進行血液檢驗項目應包括：Erythrocyte count, total and differential leukocyte counts, Hematocrit, Hemoglobin, MCV、MCH, MCHC, Platelet count, Clotting time。CBC血液常規檢查，儀器: Sysmex K4500。

4. 血清生化檢驗：

試驗小鼠於犧牲前採集血液，進行血清生化檢驗。血清生化檢測項目包含 Alanine aminotransferase、Albumin、Alkaline phosphatase、Aspartate aminotransferase、Bilirubin (total)、Calcium、Chloride、Creatinine、Gamma-glutamyl transferase、Glucose、Phosphorus、Potassium、Protein (total)、Sodium、Urea nitrogen 等。Roche MODULAR PPEE 全自動生化免疫分析儀測定。

五、組織病理檢驗：

試驗期間死亡的小鼠進行解剖，肉眼檢查器官與組織之變化。試驗結束，全部存活的小鼠行安樂死後，屍體解剖時，肉眼觀察及記錄動物的器官與組織之變化，並測量主要臟器重量。一般器官與組織的稱重及組織病理檢驗之項目liver、brain、heart、adrenals、kidneys、及gonads等分別稱重，組織病理檢驗kidneys、liver、lung(s)、spleen、stomach、small intestine、large intestine、esophagus、pancreas。使用Tissue-Tek[®] TEC、LEICA TP 1020包埋及Thermo SHANDON FINESSE 325切片機，以光學顯微鏡觀察H&E染色切片標本，由中華醫事科技大學獸醫師和病理醫檢師來判讀。

六、統計分析

各試驗組所得數值以Microsoft Excel 之AVERAGE 法求取平均值及STDEV 法求取標準偏差值，以Wilcoxon Signed-Rank Test分析法比較各處理組與對照組值之組間差異顯著性。

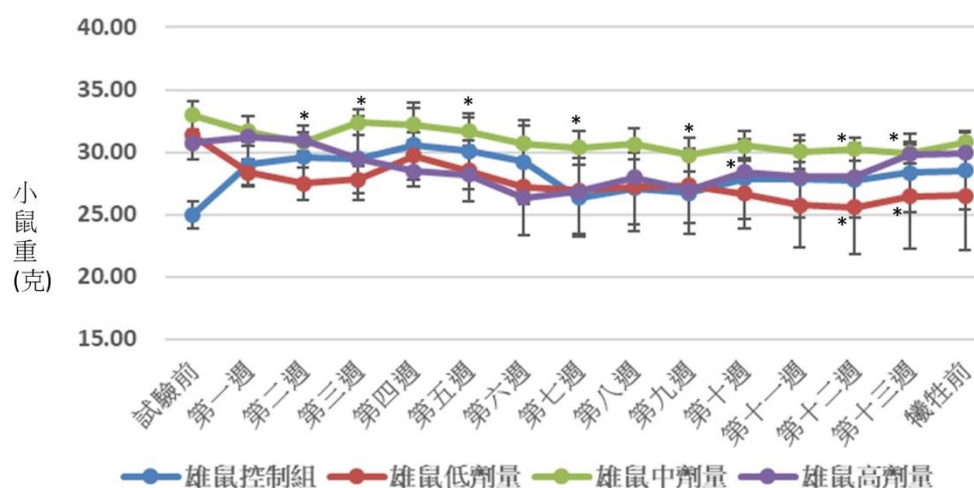
參、結果

一、臨床觀察

試驗期間至試驗結束，對照組與試驗組小鼠全部存活，每兩日觀察小鼠之臨床外觀及活動能力等症狀觀察，小鼠皆未發現任何之臨床異常症狀。

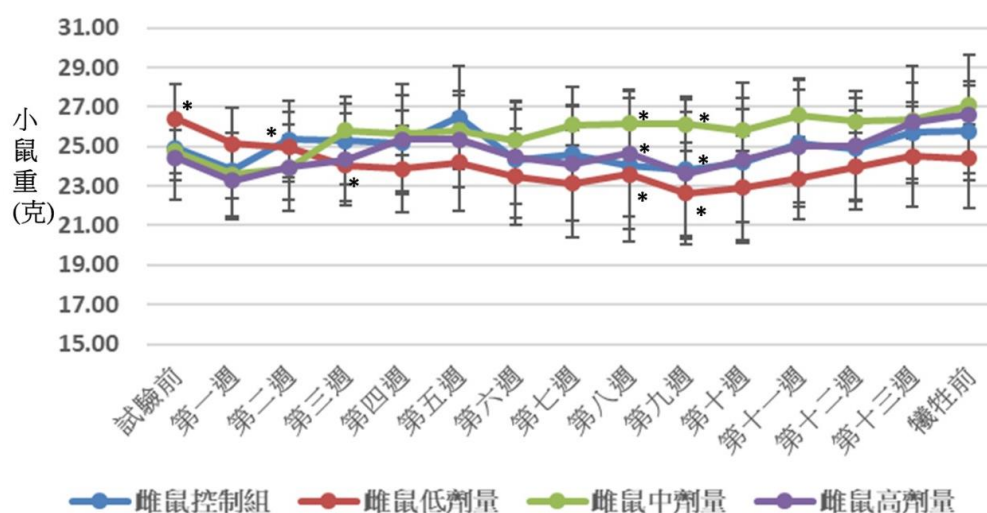
二、體重與攝食量

各組雄雌鼠平均體重如圖二及三所示。試驗結果顯示，試驗組各劑量與對照組相比較，



圖二、雄性小鼠體重變化情形

對照組為0 mg/Kg B.W./day，低劑量為208.3 mg/kg B.W./day，中劑量為500.0 mg/kg B.W./day，高劑量為 1249.5 mg/Kg B.W./day。小鼠犧牲前經隔夜禁食後之空腹體重，n = 10。*與對照組相比較具顯著性差異 ($p < 0.05$)。

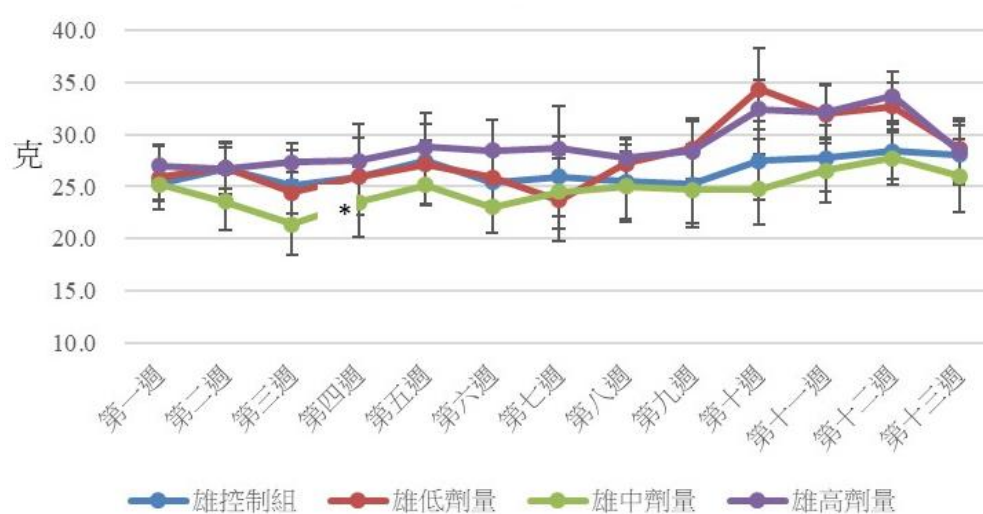


圖三、雌性小鼠90天餵食體重變化情形

對照組為0 mg/Kg B.W./day，低劑量為208.3 mg/kg B.W./day，中劑量為500.0 mg/kg B.W./day，高劑量為 1249.5 mg/Kg B.W./day。小鼠犧牲前經隔夜禁食後之

空腹體重， $n = 10$ 。*與對照組相比較具顯著性差異 ($p < 0.05$)。

雄性小鼠除高劑量第十週、中劑量之第二、三、五、七、十二及十三週和低劑量第十二及十三週與對照組統計上差異 ($p < 0.05$)，雌性小鼠除低劑量試驗前第二、三、八及九週，中高劑量皆於第八及九週與對照組統計上差異 ($p < 0.05$)，其餘小鼠體重並無統計上差異 ($p > 0.05$)。同飼料的消耗量每週來觀察，試驗組各劑量與對照組的小鼠的攝食量分析，除低劑量第三週低於對照組統計上差異 ($p < 0.05$)，其餘試驗無明顯性差異 ($p > 0.05$)，如圖四及五所示。

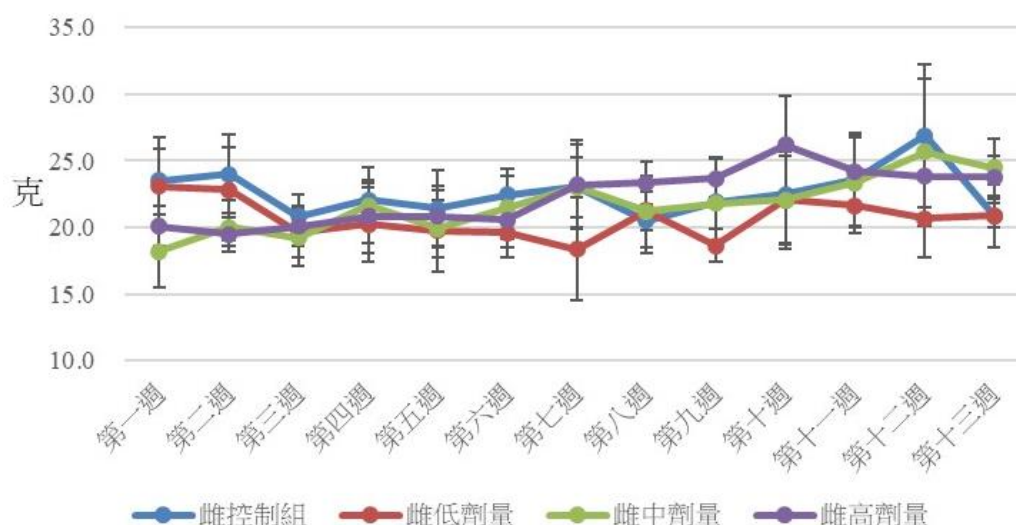


圖四、雄性小鼠攝食變化量

對照組為0 mg/Kg B.W./day，低劑量為208.3 mg/kg B.W./day，中劑量為500.0 mg/kg B.W./day，高劑量為 1249.5 mg/Kg B.W./day。每周分析每隻鼠攝食量重， $n = 10$ 。*與對照組相比較具顯著性差異 ($p < 0.05$)。

三、臨床病理檢驗：

試驗小鼠的眼睛肉眼檢查，觀察餵食試驗材料前到試驗結束時，無顯示異常。試驗結束後解剖以肉眼觀察安樂死的試驗鼠，試驗組各劑量與對照組小鼠之腦、心、肝、脾、肺腎、消化道及生殖系統等器官，以肉眼觀察臟器試驗組各劑量與對照組病變。取肝、腦、心、腎、脾、腎上腺、睪丸或卵巢皆取出秤重，其相對重量如表一及二所示。臟器各劑量組與對照組相比較，皆無顯著性差異 ($p > 0.05$)。



圖五、雌性小鼠攝食變化量

對照組為0 mg/Kg B.W./day，低劑量為208.3 mg/kg B.W./day，中劑量為500.0 mg/kg B.W./day，高劑量為 1249.5 mg/Kg B.W./day。每周分析每隻鼠攝食量重， $n = 10$ 。*與對照組相比較具顯著性差異 ($p < 0.05$)。

四、血液學分析

雄鼠方面，中劑量組血溶比(Hematocrit)明顯低於對照組($p < 0.05$)，低劑量組白血球計數(WBC)明顯低於對照組($p < 0.05$)，中及低劑量組血小板計數(Platelet)明顯低於對照組($p < 0.05$)，高劑量雄鼠血液測試項目與對照組相比較，均無明顯差異($p > 0.05$)，如表三所示。

雌鼠方面，中劑量組平均細胞血紅蛋白濃度(MCHC)明顯低於對照組($p < 0.05$)，低劑量組白血球計數(WBC)明顯低於對照組($p < 0.05$)，中及低劑量血小板計數(Platelet)明顯低於對照組($p < 0.05$)，高劑量雌鼠血液測試項目與對照組相比較，均無明顯差異($p > 0.05$)，如表四所示

五、血清生化分析：

雄鼠方面，低劑量組Globulin明顯高於對照組($p < 0.05$)，Albumin，B.U.N，及Creatinine明顯低於對照組($p < 0.05$)，其他血清生化測試項目與對照組相比較，均無明顯差異($p > 0.05$)。高及中劑量雄鼠血清生化測試項目與對照組相比較，均無明顯差異($p > 0.05$)，如表五所示。

雌鼠方面，高劑量組Globulin及Bilirubin-total明顯高於對照組($p < 0.05$)，Albumin明顯低於對照組($p < 0.05$)。中劑量組BUN明顯低於對照組($p < 0.05$)。低劑

量組BUN明顯低於對照組($p<0.05$)，其他血清生化測試項目與對照組相比較，均無明顯差異($p>0.05$)，如表六所示。

表一、雄鼠臟器相對重量

臟器重量 (g) a				
	對照組	高劑量 (1249.5 mg/Kg)	中劑量 (500.0 mg/Kg)	低劑量 (208.3 mg/Kg)
睪丸	0.0114±0.017	0.0130±0.0020	0.0116 ±0.0038	0.0118±0.0027
腎上腺	0.0007±0.0001	0.0007±0.0001	0.0007±0.0002	0.0007±0.0002
脾臟	0.0017±0.0003	0.0034±0.0019	0.0029±0.0014	0.0021±0.007
腎臟	0.0181±0.0024	0.0186±0.0025	0.0185 ±0.0036	0.0177±0.0042
心臟	0.0056 ±0.0015	0.0062±0.0008	0.0068±0.0022	0.0065±0.0015
腦	0.0161±0.0024	0.0165±0.0020	0.0179±0.0052	0.0175±0.0028
肝臟	0.0591±0.010	0.0556±0.0051	0.0519±0.0138	0.0538±0.0110

a所有數據均以Mean±S.D.表示，n = 10。

表二、雌鼠臟器相對重量

臟器重量 (g) a				
	對照組	高劑量 (1249.5 mg/Kg)	中劑量 (500.0 mg/Kg)	低劑量 (208.3 mg/Kg)
卵巢	0.0142±0.0036	0.0015±0.0001	0.0012±0.0006	0.0014 ±0.0004
腎上腺	0.0008±0.0001	0.0154±0.0016	0.0007±0.0002	0.0008±0.0002
脾臟	0.0029±0.005	0.0039±0.0010	0.0039±0.0013	0.0029±0.0008
腎臟	0.0159±0.0014	0.0154±0.0016	0.0148 ±0.0037	0.0174 ±0.0024
心臟	0.0065±0.0012	0.0075 ±0.0017	0.0073±0.0022	0.0063±0.0012
腦	0.0192±0.0025	0.0171±0.0017	0.0179±0.0051	0.0189±0.0024
肝臟	0.0534±0.0048	0.0493±0.0041	0.0514±0.0049	0.0514±0.0049

a所有數據均以Mean±S.D.表示，n = 10。

六、尿液分析：

雄雌小鼠各劑量試驗組與對照組相比較，均無顯著異常如表七及八所示。

七、組織病理分析：

雄雌小鼠各劑量試驗組與對照組相比較，均無顯著異常，如表九所示。

腎上腺皮質部束狀層細胞：輕微脂質堆積，對照組發生率在雄鼠及雌鼠分別為3/10 及2/10。高劑量試驗組發生率在雄及雌鼠為3/10及1/10，中劑量發生率在雄及雌鼠試驗組為3/10及2/10，低劑量試驗組發生率在雄及雌鼠2/10及1/10。對照組及三劑量試驗鼠不具病變嚴重度與發生率之統計相關性。

腎臟腎小管圓柱體(tubular cast)：對照組發生率在雄鼠及雌鼠為6/10及7/10，高劑量發生率在雄及雌鼠試驗組為6/10及7/10，中劑量發生率在雄及雌鼠試驗組為6/10及7/10，低劑量發生率在雄及雌鼠試驗組為4/10及5/10。對照組及三劑量試驗鼠不具病變嚴重度與發生率之統計相關性。

局部腎小管梗塞(focal tubular infarction)：對照組發生率在雄鼠及雌鼠為2/10及2/10，高劑量試驗組發生率在雄及雌鼠為2/10及2/10，中劑量試驗組發生率在雄及雌鼠為2/10及2/10，低劑量發生率試驗組在雄及雌鼠為2/10及1/10。對照組及三劑量試驗鼠不具病變嚴重度與發生率之統計相關性。

肝臟：局部脂肪堆積(focal lipidosis) 對照組發生率在雄鼠及雌鼠為6/10及6/10，高劑量試驗組發生率在雄及雌鼠為5/10及6/10，中劑量試驗組發生率在雄及雌鼠為6/10及4/10，低劑量試驗組發生率在雄及雌鼠6/10及2/10，脂肪浸潤如圖六所示。對照組及三劑量試驗鼠不具病變嚴重度與發生率之統計相關性。

淋巴結:局部脂肪堆積((focal lipidosis)對照組發生率在雄鼠及雌鼠為2/10及1/10，高劑量試驗組發生率在雄及雌鼠為1/10及1/10，中劑量試驗組發生率在雄及雌鼠為1/10及1/10，低劑量試驗組發生率在雄及雌鼠2/10及1/10。對照組及三劑量試驗鼠不具病變嚴重度與發生率之統計相關性。

卵巢:局部黃體脂肪堆積(local corpus luteum lipidosis)對照組及高低劑量組雌鼠黃體脂肪堆積，對照組及高中低劑量試驗組雌鼠發生率分別為2/10，2/10，2/10及1/10。對照組及三劑量試驗組雌鼠不具病變嚴重度與發生率之統計相關性。

胰臟:局部蘭式小島增生(focal hyplasia of islet) 對照組及高中低劑量試驗組雌鼠極微蘭式小島增生堆積，對照組發生率在雄鼠及雌鼠為2/10及2/10。高劑量試驗組發生率在雄及雌鼠實驗組為1/10及2/10，中劑量試驗組發生率在雄及雌鼠實驗組為2/10及2/10，低劑量試驗組發生率在雄及雌鼠2/10及2/10。對照組及三劑量試驗鼠不具病變嚴重度與發生率之統計相關性。

表三、雄性小鼠血液分析

	血液分析 a			
	對照組 (0 mg/Kg)	高劑量 (1249.5 mg/Kg)	中劑量 (500.0 mg/Kg)	低劑量 (208.3 mg/Kg)
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	8.5 $\pm$ 0.6	8.0 $\pm$ 1.1	7.8 $\pm$ 1.3	8.1 $\pm$ 1.6
Hemoglobin (g/dL)	14.5 $\pm$ 0.9	13.0 $\pm$ 1.6	13.0 $\pm$ 2.2	13.7 $\pm$ 2.5
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	4.4 $\pm$ 2.4	4.6 $\pm$ 2.6	4.1 $\pm$ 2.8	2.6 $\pm$ 2.2*
Hematocrit (%)	48.4 $\pm$ 3.1	44.4 $\pm$ 5.4	43.3 $\pm$ 7.1*	45.6 $\pm$ 8.4
Mean Corpuscular Volume (M.C.V.; fL)	57.0 $\pm$ 1.7	55.9 $\pm$ 2.1	55.7 $\pm$ 1.7	56.4 $\pm$ 2.8
Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH; pg)	17.1 $\pm$ 0.5	16.4 $\pm$ 0.6	16.7 $\pm$ 0.5	17.0 $\pm$ 0.8
Mean corpuscular hemoglobin concentration, (M.C.H.C; g/dL)	30.0 $\pm$ 0.7	29.3 $\pm$ 0.8	29.9 $\pm$ 0.6	30.1 $\pm$ 0.6
Platelet 千/uL)	1048.6 $\pm$ 151.4	1165.2 $\pm$ 2700	861.9 $\pm$ 186.8*	900.6 $\pm$ 299.5*
Clotting time, sec)	92.0 $\pm$ 73.6	196.1 $\pm$ 145.9	141.7 $\pm$ 102.9	152.6 $\pm$ 99.8
Neutrophils band (%)	1.5 $\pm$ 1.6	1.7 $\pm$ 0.9	0.0 $\pm$ 0.0	2.4 $\pm$ 1.7
Neutrophils segmented; (%)	16.2 $\pm$ 3.8	23.2 $\pm$ 6.9	16.8 $\pm$ 1.4	20.1 $\pm$ 7.3
Lymphocytes (%)	78.0 $\pm$ 4.1	70.9 $\pm$ 7.8	82.6 $\pm$ 3.4	72.6 $\pm$ 9.2
Monocytes (%)	3.8 $\pm$ 2.9	3.9 $\pm$ 4.1	1.8 $\pm$ 1.3	4.7 $\pm$ 2.8
Eosinophils (%)	0.3 $\pm$ 0.5	0.2 $\pm$ 0.4	0.0 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.4
Basophils (%)	0.2 $\pm$ 0.4	0.1 $\pm$ 0.3	0.0 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.3

a 所有數據均以Mean $\pm$ S.D.表示，n = 10。*與對照組相比較具顯著性差異 ($p < 0.05$)。

心臟：局部單核炎症細胞浸潤（focal mononuclear cell infiltration）部分雌雄鼠心臟輕微單核炎症細胞浸潤，如圖七所示，對照組發生率在雄鼠及雌鼠為1/10及1/10。高劑量試驗組發生率在雄及雌鼠實驗組為1/10及1/10，中劑量試驗組發生率在雄及雌鼠實驗組為0/10及0/10，低劑量試驗組發生率在雄及雌鼠1/10及0/10。對照組及三劑量試驗鼠不具病變嚴重度與發生率之統計相關性。

肆、討論

台灣道地牛樟椴木牛樟芝子實體油萃取物SN3-OE1材料90 天以小鼠餵食三

劑量試驗評估之毒性影響，試驗期間進行生理上之臨床觀察、體重與攝食量的變化量。分析及組織病理學檢查，探討台灣牛樟椴木牛樟芝子實體油萃取物SN3-OE1餵食90天小鼠可能產生之毒性風險，作為安全性評估劑量之參考。試驗期間在臨床生理活動及毛色等觀察和眼睛檢查，與對照組分析並無明顯異常症狀發現。鼠體重及其攝食量

表四、雌鼠血液分析

	血液分析 a			
	對照組 (0 mg/Kg)	高劑量 (1249.5 mg/Kg)	中劑量 (500.0 mg/Kg)	低劑量 (208.3 mg/Kg)
RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	8.0 $\pm$ 2.0	8.9 $\pm$ 0.3	8.6 $\pm$ 0.8	8.8 $\pm$ 0.6
Hemoglobin (g/dL)	13.7 $\pm$ 3.3	15.0 $\pm$ 0.8	41.0 $\pm$ 1.1	14.7 $\pm$ 0.8
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	4.4 $\pm$ 4.7	4.5 $\pm$ 2.5	4.7 $\pm$ 2.0	2.9 $\pm$ 1.3*
Hematocrit (%)	46.0 $\pm$ 11.4	49.2 $\pm$ 2.3	46.2 $\pm$ 4.0	48.6 $\pm$ 2.2
Mean Corpuscular Volume (M.C.V.; fL)	57.2 $\pm$ 2.7	55.1 $\pm$ 1.7	54.0 $\pm$ 1.6*	55.2 $\pm$ 2.7
Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH; pg)	17.1 $\pm$ 1.1	16.7 $\pm$ 0.6	16.4 $\pm$ 0.6	16.7 $\pm$ 0.7
Mean corpuscular hemoglobin concentration, (M.C.H.C; g/dL)	29.8 $\pm$ 2.0	30.4 $\pm$ 0.3	30.4 $\pm$ 0.7	30.3 $\pm$ 0.8*
Platelet 千/uL)	1074.5 $\pm$ 357.9	1015.8 $\pm$ 135.9	844.9 $\pm$ 204.9*	877.5 $\pm$ 209.7*
Clotting time, sec)	148.9 $\pm$ 112.1	169.4 $\pm$ 80.7	200.0 $\pm$ 134.6	116.0 $\pm$ 105.6
Neutrophils band (%)	1.6 $\pm$ 2.1	2.3 $\pm$ 1.7	0.0 $\pm$ 0.0	1.9 $\pm$ 1.8
Neutrophils segmented; (%)	16.7 $\pm$ 5.0	16.5 $\pm$ 6.5	17.2 $\pm$ 4.4	19.4 $\pm$ 7.3
Lymphocytes (%)	79.2 $\pm$ 4.3	77.8 $\pm$ 9.1	82.2 $\pm$ 4.6	75.4 $\pm$ 9.3
Monocytes (%)	2.2 $\pm$ 1.6	2.9 $\pm$ 3.4	0.6 $\pm$ 1.0	3.1 $\pm$ 3.5
Eosinophils (%)	0.2 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.4	0.0 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.3
Basophils (%)	0.2 $\pm$ 0.4	0.3 $\pm$ 0.5	0.0 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.3

a 所有數據均以Mean $\pm$ S.D.表示，n = 10。*與對照組相比較具顯著性差異 (p<0.05)。

分析試驗組三劑量試驗組與對照組相比較，雖實驗結果有部分試驗期間與對照組具有統計上差異，且對照組與試驗組都有不穩定的上下震盪差異，但合併爾後相關實驗數據，且此差異並無劑量正相關，所以上述造成差異與原料無關。一開始就少5克，這是試驗小鼠不喜食用萃取物，適應2到3天就會開始進食，但餵

食後最後統計是無顯著差異。

表五、雄鼠血清生化分析

	血清生化分析 a			
	對照組 (0 mg/Kg)	高劑量 (1249.5 mg/Kg)	中劑量 (500.0 mg/Kg)	低劑量 (208.3 mg/Kg)
G.O.T.(U/L)	98.6 ± 41.2	135.9 ± 157.2	128.2±44.8	90.8 ± 49.1
G.P.T.(U/L)	34.2 ± 9.8	50.8 ± 48.0	41.4±15.5	31.2 ± 7.4
Alkaline phosphatase (IU/L)	114.7 ± 48.1	97.2 ± 54.7	84.3±35.1	63.8 ± 24.9
Total protein (g/dL)	5.2 ± 0.2	4.9 ± 1.2	4.7±0.7	5.2 ± 1.0
Albumin (g/dL)	3.2 ± 0.5	2.5 ± 1.1	2.7±0.7	2.2 ± 0.8*
Globulin (g/dL)	2.0 ± 0.5	2.3 ± 0.5	2.0±0.6	3.0 ± 0.9*
Bilirubin-total (mg/dL)	0.16 ± 0.10	0.30 ± 0.20	0.18±0.16	0.30 ± 0.15
γ-GT (U/L)	<3	<3	<3	<3
B.U.N (mg/dL)	46.0 ± 12.7	40.7 ± 7.4	40.0±13.5	28.8 ± 11.6*
Creatinine (mg/dL)	0.19 ± 0.06	0.17 ± 0.06	0.21±0.09	0.14 ± 0.06*
Glucose (mg/dL)	110.7 ± 34.5	93.2 ± 41.7	81.9±13.7	84.7 ± 39.3
Triglyceride (mg/dL)	49.7 ± 16.3	49.7 ± 23.3	33.2±16.6	42.7 ± 12.7
Cholesterol-total (mg/dL)	126.0 ± 32.8	127.7 ± 48.0	109.2±25.1	126.1 ± 33.0
L.D.H. (U/L)	304.8 ± 106.4	339.6 ± 259.4	385.6±305.7	289.0 ± 127.7
Amylase (U/L)	2171.8 ± 417.7	2313.2 ± 653.4	1804.6±442.0	2092.7 ± 627.6
Na (Sodium, mEq/L)	163.9 ± 4.6	163.3 ± 4.2	161.4±4.1	165.5 ± 4.0
K (Potassium, mEq/L)	6.0 ± 1.2	6.9 ± 2.2	6.6±0.5	6.6 ± 1.6
Cl (Chloride, mEq/L)	123.4 ± 17.1	125.6 ± 15.9	118.6±3.6	118.5 ± 10.0
Ca (Calcium, mg/dL)	7.7 ± 1.9	7.6 ± 2.5	6.9±1.1	8.1 ± 2.4
P (Phosphorus, mg/dL)	12.6 ± 2.3	9.3 ± 1.8	9.5±1.8	9.6 ± 2.2*

a 所有數據均以Mean±S.D.表示，n = 10。*與對照組相比較具顯著性差異 (p<0.05)。

以肉眼分析三劑量試驗組和對照組小鼠之外觀、顱腔、胸及腹腔等臟腔之臟器，沒有發現與試驗材料有正劑量的肉眼病變及沒有在臨床毒性症狀呈現。

小鼠在血液分析上試驗組之WBC、Hematocrit、MCHC、Platelet與對照組相比較具有統計上差異，皆於文獻的參考值範圍內可接受 [雄性小鼠參考值WBC： $1.8\sim 7.5 \times 10^3/\text{mm}^3$ 、Hematocrit：39.3~47.0%、MCHC：29.0~30.1 g/dL 及platelet： $490\sim 1,200 \times 10^3/\text{mm}^3$ ；雌性小鼠參考值WBC： $2.6\sim 5.9 \times 10^3/\text{mm}^3$ 、MCHC：

28.8~29.8 g/dL 及platelet : $840\sim1,000 \times 10^3/\text{mm}^3$] (Schnell et al., 2002 ; Serfilippi et al., 2003), 由上述

試驗結果, 雖有統計上差異但無劑量正相關性, 再由病理切片上組織並無觀察到與試驗材料有相關之特異性病變, 所以判定此差異性變化沒有在臨床毒性症狀呈現。

小鼠在於血清生化分析上雄鼠試驗組: Globulin、Bilirubin-total、Albumin、B.U.N、Creatinine、Phosphorus。雌鼠試驗組: B.U.N、Globulin、Bilirubin-total、Albumin與對照組相比較具有統計上差異, 皆於文獻的參考值範圍內可接受[雄性小鼠參考值Globulin : 1.2~1.6 g/dL、Bilirubin-total : 0.2~0.3 mg/dL、Alkaline phosphatase : 54~80 IU/L、Albumin : 2.4~3.3 g/dL、B.U.N : 24~33 mg/dL、Creatinine : 0.4~0.9 mg/dL、Phosphorus : 6.8~11.3 mg/dL ; 雌鼠- BUN : 18.0~29.0 mg/dL、Globulin : 2.6~3.7 g/dL、Bilirubin-total : 0.2~0.5 mg/dL、Albumin : 3.3~4.5 mg/dL] (Schnell et al., 2002 ; Serfilippi et al., 2003), 與對照組相比較具有統計上差異, 皆於文獻的參考值範圍內可接受。由上述試驗結果, 雖有統計上差異但無劑量正相關性, 再由病理切片上組織並無觀察到與試驗材料有相關之特異性病變, 所以判定此差異變化沒有在臨床毒性症狀呈現。

小鼠在於病理切片上組織檢查結果顯示, 雄雌性小鼠三劑量試驗組與對照組分析各組織及器官並無發現明顯與造成試驗材料有關性的病理組織異常的變化。部份小鼠心臟局部單核炎症細胞浸潤、肝臟脂肪浸潤、腎上腺皮質部束狀層細胞、胰臟脂肪浸潤、腎臟圓柱及梗塞等病變。上述的組織病變在對照組及高劑量組皆有發現, 其發生病變程度及發生率並無劑量正相關性(Freeman and Klenner, 2015; King and Alroy, 1997; Kittel et al., 2004; Levine, 2001; Long and Luong, 2009; Mann et al., 2001; Schnell et al., 2002; Shackelford et al., 2002), 這些為非特異性組織改變造成病變與試驗材料無關。

由於目前有文獻證實牛樟芝的LD₅₀ (Lethal Dose, 50%)的研究如固態培養大於2000 mg/kg (藍等, 2002], 子實體大於2 g/kg (吳宗正, 2014)。牛樟芝子實體酒精萃取物(1 g/kg bw及2 g/kg bw)及水萃取物2 g/kg bw餵食28天大鼠影響的差異, 結果發現只有牛樟芝子實體酒精萃取物會導致肝臟、腎上腺及卵巢重量增加, 腎上腺皮質及卵巢間質細胞肥大, 而水萃取物則未發生相關病變 (李育翰, 2016)。以劑量 3000 mg/kg 固體栽培樟芝、固態發酵樟芝菌絲體或液態發酵樟芝菌絲體經連續投予SD大鼠 28 天 (吳明儒 2012), 1072 mg/Kg BW 固態安全劑量 (陳等, 2010), 液態培養3 g/Kg BW (Chen et al., 2011), 6 g/Kg BW (Huang et al., 2014), 子實體使用5%與菌絲體混合為2.8 /Kg BW (Lina et al., 2014)。執行90天有文獻發表為子實體NOAEL (No-Observed-Adverse-Effect Level)為150 mg/Kg BW, 酒精萃取物為40 mg/Kg BW(王等, 2016 ; 2018)。在本試驗材料由野外分離菌種寄存

於財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心編號BCRC39170的SN1牛樟芝菌種，栽培於台灣牛樟櫟木後再以油萃取技術 (葉宗銘，2013)。此萃取物之有效成分與毒理關係，未來仍需探討油與油萃取物之毒理及相關藥理分析。

表六、雌鼠血清生化分析

	血清生化分析 a			
	對照組 (0 mg/Kg)	高劑量 (1249.5 mg/Kg)	中劑量 (500.0 mg/Kg)	低劑量 (208.3 mg/Kg)
G.O.T.(U/L)	114.9 ± 35.3	123.5 ± 76.0	92.8±34.1	95.2 ± 54.3
G.P.T.(U/L)	35.9 ± 20.4	65.2 ± 70.4	23.6±6.5	45.2 ± 43.4
Alkaline phosphatase (IU/L)	89.9 ± 24.4	82.1 ± 22.4	58.6±22.2	72.8 ± 29.4
Total protein (g/dL)	5.1 ± 0.6	4.8 ± 0.9	4.6±0.7	5.0 ± 0.6
Albumin (g/dL)	3.1 ± 0.5	2.1 ± 0.9*	2.7±0.6	2.5 ± 0.7
Globulin (g/dL)	2.1 ± 0.4	2.7 ± 0.6*	1.9±0.7	2.5 ± 0.5
Bilirubin-total (mg/dL)	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1*	0.10±0.10	0.2 ± 0.1
γ-GT (U/L)	<3	<3	<3	<3
B.U.N (mg/dL)	38.8 ± 9.1	44.6 ± 9.2	20.8±8.3*	25.9 ± 5.0*
Creatinine (mg/dL)	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.25±0.06	0.2 ± 0.1
Glucose (mg/dL)	112.6 ± 53.0	92.4 ± 35.9	81.5±19.4	131.8 ± 37.2
Triglyceride (mg/dL)	40.0 ± 16.5	40.9 ± 9.4	41.3±13.3	51.4 ± 10.9
Cholesterol-total (mg/dL)	103.8 ± 14.0	93.5 ± 17.3	99.4±24.8	112.4 ± 19.5
L.D.H. (U/L)	361.6 ± 118.4	330.2 ± 134.3	320.5±165.1	324.0 ± 107.1
Amylase (U/L)	1889.6 ± 206.8	1890.6 ± 490.3	1962.7±289.8	1973.5 ± 408.7
Na (Sodium, mEq/L)	162.6 ± 4.3	163.8 ± 3.8	159.1±3.3	162.9 ± 4.6
K (Potassium, mEq/L)	6.6 ± 1.6	6.6 ± 0.8	7.0±1.1	6.5 ± 1.5
Cl (Chloride, mEq/L)	125.4 ± 15.6	124.3 ± 14.7	140.6±14.7	126.7 ± 16.8
Ca (Calcium, mg/dL)	7.9 ± 1.6	7.3 ± 1.7	6.9±1.3	7.1 ± 2.4
P (Phosphorus, mg/dL)	11.4 ± 2.5	10.7 ± 2.0	10.9±2.6	10.2 ± 1.4

a 所有數據均以Mean±S.D.表示，n = 10。*與對照組相比較具顯著性差異 (p<0.05)。

表七、雄性小鼠尿液分析

		血液分析 a			
項目		對照組 (0 mg/Kg)	高劑量 (1249.5 mg/Kg)	中劑量 (500.0 mg/Kg)	低劑量 (208.3 mg/Kg)
Color	Yellow	10/10	10/10	10/10	10/10
	Pale Yellow	0/10	0/10	0/10	0/10
Blood	Negative	9/10	9/10	10/10	9/10
	Ca10	1/10	1/10	0/10	1/10
Bilirubin	Negative	6/10	5/10	6/10	8/10
	1+	4/10	5/10	4/10	2/10
Glucose	Negative	10/10	10/10	10/10	10/10
	Ca50	-	0/10	0/10	0/10
Ketone	Negative	10/10	10/10	10/10	10/10
	1+	0/10	0/10	0/10	0/10
pH	≤ 6.0	2/10	8/10	2/10	4/10
	6.0~8.0	6/10	2/10	8/10	5/10
	≥ 8.0	2/10	0/10	0/10	1/10
Protein	Negative	8/10	7/10	7/10	8/10
	1+	2/10	3/10	3/10	2/10
Leukocytes	Negative	9/10	9/10	10/10	10/10
	1+	1/10	1/10	0/10	0/10
Specific gravity	≤ 1.015	1/10	0/10	3/10	0/10
	1.005~1.030	1/10	5/10	3/10	2/10
	≥ 1.030	8/10	5/10	4/10	8/10
RBC(LPF)	0~1	10/10	10/10	10/10	10/10
	1~5	0/10	0/10	0/10	0/10
WBC(LPF)	0~1	10/10	10/10	10/10	10/10
	1~5	0/10	0/10	0/10	0/10
Crystal	Negative	10/10	10/10	10/10	10/10
	Hyaline	0/10	0/10	0/10	0/10
	Other	0/10	0/10	0/10	0/10

表八、雌鼠尿液分析

		血液分析 a			
項目		對照組 (0 mg/Kg)	高劑量 (1249.5 mg/Kg)	中劑量 (500.0 mg/Kg)	低劑量 (208.3 mg/Kg)
Color	Yellow	10/10	10/10	10/10	10/10
	Pale Yellow	0/10	0/10	0/10	0/10
Blood	Negative	10/10	10/10	10/10	9/10
	Ca10	0/10	0/10	0/10	1/10
Bilirubin	Negative	10/10	10/10	9/10	9/10
	1+	0/10	0/10	1/10	1/10
Glucose	Negative	10/10	10/10	10/10	10/10
	Ca50	0/10	0/10	0/10	0/10
Ketone	Negative	10/10	10/10	10/10	10/10
	1+	0/10/10	0/10	0/10	0/10
pH	≤ 6.0	1/10	1/10	8/10	1/10
	6.0~8.0	9/10	8/10	2/10	8/10
	≥ 8.0	0	1/10	0/10	1/10
Protein	Negative	1/10	6/10	9/10	8/10
	1+	9/10	4/10	1/10	2/10
Leukocytes	Negative	10/10	10/10	10/10	10/10
	1+	0/10	0/10	0/10	0/10
Specific gravity	≤ 1.015	0/10	3/10	4/10	0/10
	1.005~1.030	5/10	3/10	4/10	2/10
	≥ 1.030	5/10	6/10	2/10	8/10
RBC(LPF)	0~1	10/10	10/10	10/10	10/10
	1~5	0/10	0/10	0/10	0/10
WBC(LPF)	0~1	10/10	10/10	10/10	10/10
	1~5	0/10	0/10	0/10	0/10
Crystal	Negative	10/10	10/10	10/10	10/10
	Hyaline	0/10	0/10	0/10	0/10
	Other	0/10	0/10	0/10	0/10

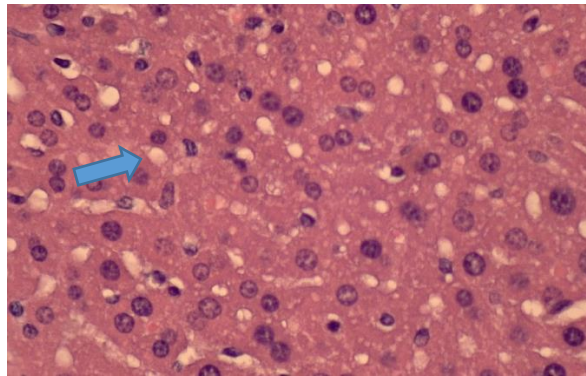
表九、組織病理學評估結果

器官	病變	組別							
		雄鼠				雌鼠			
		對照組	高劑量組	中劑量	低劑量	對照組	高劑量組	中劑量	低劑量組
Adrenal	Lipidosis and vacuolization of zona fasciculate, minimal to slight	3/10	3/10	3/10	2/10	2/10	1/10	2/10	1/10
			-	-					
Heart	Focal mononuclear cell infiltration								
Kidneys	Tubular hyaline cast	6/10	6/10	6/10	4/10	7/10	7/10	7/10	5/10
	Focal tubular Infarction, minimal to slight	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10	1/10
Liver	Focal lipidosis, minimal to slight	6/10	5/10	6/10	6/10	6/10	6/10	4/10	2/10
Lymph nodes	Focal lipidosis, minimal to slight	2/10	1/10	1/10	2/10	1/10	1/10	1/10	1/10
Ovaries	Focal corpus luteum lipidosis. minimal to slight	N	N	N	N	2/10	2/10	2/10	1/10
Testis		-	-	-	-	N	N	N	N
Pancreas	Focal lipidosis, minimal to slight	2/10	1/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10
Prostate		-	-	-	-	N	N	N	N
Uterus		N	N	N	N	-	-	-	-

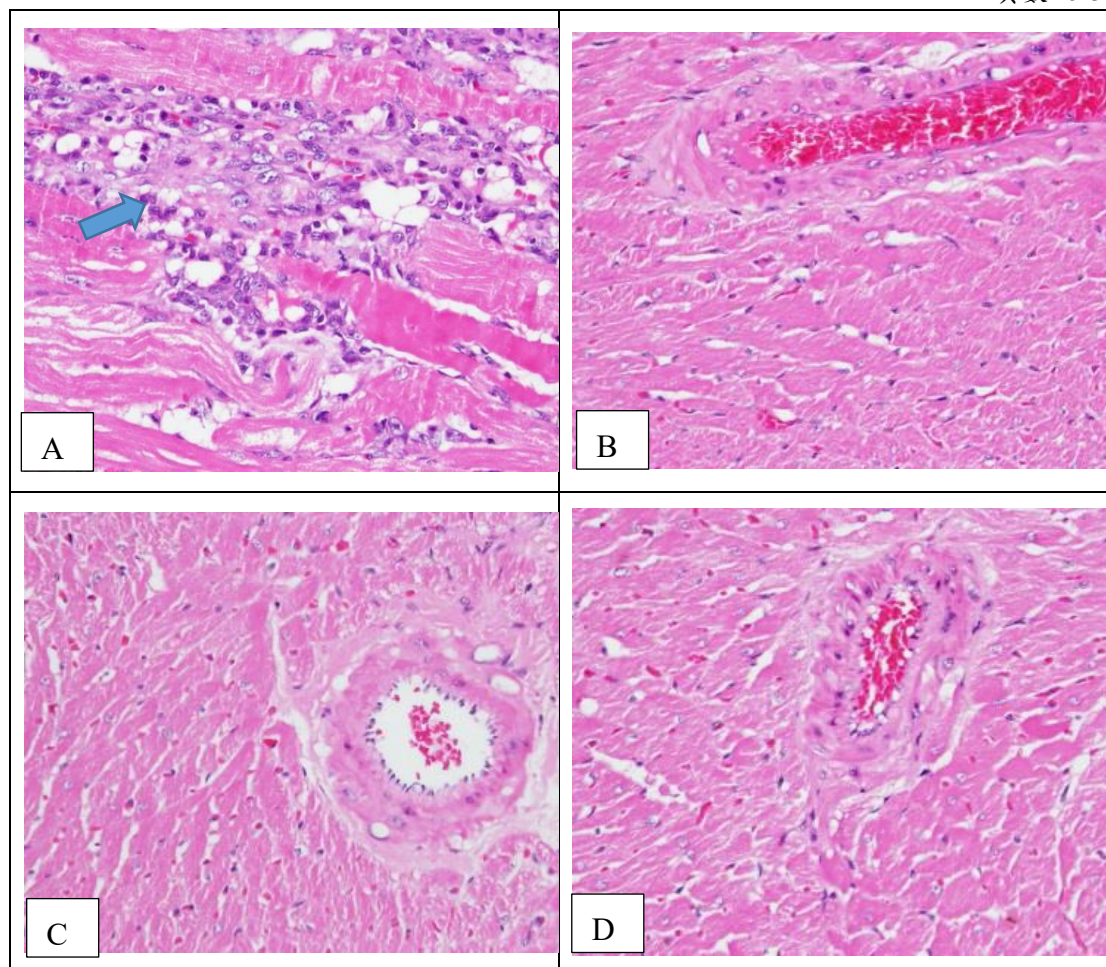
-: No effect. N: tissue was not available.(n = 10).

伍、結論

此試驗材料經本次試驗結果顯示，試驗期間三劑量組與對照組小鼠均無明顯有異常臨床之症狀。雖重量及攝食量與對照組有部份差異，但無劑量正相關性。肉眼分析其臨床生理活動、毛色及眼睛狀態，各組小鼠並無發現異常。試驗結束後，分析其尿液分析、血液學檢查及血清生化，雖有部分檢測項目有統計差異，但這差異是文獻參考值可接受的範圍。臟器相對重量及病理切片上組織學顯微分析，三劑量試驗組與對照組小鼠並無發現與試驗材料有相關的病理變化。由上述分析之結果，本試驗為台灣道地牛樟椴木牛樟芝子實體油萃取物SN3-OE1以小鼠 90 亞慢性毒性安全性評估的NOAEL為1249.5 mg/kg B.W./day。



圖六、小鼠 90 天餵食毒性試驗非特異性肝臟脂肪浸潤之組織病理變化。H&E stain，100x。



圖七、非特異性組織病理變化。部份雄鼠心臟出現局部、輕微、單核炎症細胞浸潤等非特異性病變。A: 對照組、B為高劑量試驗組、C為中劑量試驗組、D為低劑量試驗組。H&E stain，400x。

參考文獻

- 行政院衛生福利部：健康食品安全性評估方法，衛署食字第88037803 號，1999，台灣。
- 王志源，古幸宜，蔡岳廷。牛樟椶木牛樟芝子實體萃取物於Sprague-Dawley小鼠之90天重複劑量亞慢性毒性試驗。(2018)。檢驗及品保雜誌 7卷4期，195-210。
- 王志源，楊長青，王千眉，蔡慶龍，蔡岳廷。牛樟椶木栽培之牛樟芝子實體的小鼠90天重複劑量亞慢性毒性評估。(2016)。檢驗及品保雜誌 5卷3期，99-110。
- 李育翰。(2016)。牛樟芝子實體萃取物對大鼠之影響。國立中興大學獸醫病理生物學研究所碩士論文。
- 吳明儒。(2012)。三種不同生產製程牛樟芝的安全性評估。大同大學生物工程學

系碩士論文。

吳銘芳，黃幸妮，吳龍源，周建聖，葉明陽，呂旭峰。(2012)。以牛樟芝餵食小鼠亞急性與亞慢性毒性試驗。傳統醫學雜誌 23卷1期，11-22。

吳宗正。100%牛樟芝子實體粉末之基因毒理與食用安全劑量值對大鼠90天餵食毒性試驗http://www.tnccia.org.tw/method.php?method_sn=8

童詠舜、陳恩憫、陳怡君、周志遠、佳惠、鄭文棋、范似諭、曾雅詩、許晉勳、黃嘉新、葉宗凱，陳忠裕、陳宏銘 吳謝平、葉淑貞、葉淑美。

(2017)。牛樟芝產業 90天餵食毒性試驗之風險評估。

<http://temfba.org/front/bin/photo.phtml?Category=10>

黃嘉新，許晉勳。牛樟與牛樟芝的安全性。林業研究專訊。(2020)。27(1)，12-15。

劉振軒，何逸遷，張文發，祝志平，王琇真。1996。H&E 染色。病理切片上組織染色技術與圖譜。86-89。養研所：竹南。

陳娟，姜興華，範青生，餘宙，付俊鶴。(2010)。樟芝的食用安全性研究進展，中國微生態學雜誌 (9)857-864。

陳泰伊，仲偉鑒， 尚萍，洪新宇，林定威，許勝傑，陳勁初。(2012)。樟芝菌絲體發酵全液凍乾粉長期食用安全性評估。食用菌學報。

陳勁初，林文鑫，陳清農，許勝傑，黃仕政，陳炎煉。(2001)。臺灣特有真菌—樟芝菌絲體之開發。Fungal Science。16 卷 1&2 期，7-22。

葉宗銘。(2016)。牛樟芝之萃取方法及其萃取裝置。I549614

藍明煌，藍蒼洲，藍仲良，藍仲民。(2002) A Solid culture method of antrodia camphorata, its cultured solid substance, and its product and application CN1379082

Chang JB, Wu MF, Lu HF, Chou J, Au MK, Liao NC, Chang CH, Huang YP, Wu CT, Chung JG. (2013) Toxicological evaluation of Antrodia cinnamomea in BALB/c mice. In Vivo. 27(6):739-45.

Chen TI, Chen CC, Lin TW, Tsai YT, Nam MK. (2011) A 90-day subchronic toxicological assessment of Antrodia cinnamomea in Sprague-Dawley rats. Food Chem Toxicol. 49:429-433.

Freeman, and Klenner S. (2015) Veterinary Clinical Pathology A case-Based Approach, CRC Press Taylor & Francis Group, eBook 978-1-4822-2590-7

Huang CC, Nam MK, Tsai YT, Lan A. (2014) Evaluation of the Sub-Chronic Toxicity and Teratogenicity of Antrodia cinnamomea mycelia. Life sciences. 11(11)

Giknis MLA. and Clifford CB (2006) Clinical Laboratory Parameters for Crl: CD (SD) Rats. Charles River Laboratories.

King NW, and Alroy J. (1997) Intracellular and extracellular depositions; degenerations In: Veterinary Pathology, Hones, T. C., Hunt, R. D., and King, N. W. Eds., Six edition, pp.25-56. Williams & Wilkins, A Waverly Company, Baltimore, USA.

Kittel B, Ruehl-Fehlert C, Morawietz G, Klapwijk J, Elwell MR, Lenz B, O'Sullivan

- MG, Roth DR, Wadsworth PF; RITA Group; NACAD Group. (2004) Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice 1-3. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 55(6):413-31
- Kuod YH Wang SY (2015) Genotoxic, teratotoxic and oral toxic assessments of Antrodia cinnamomea health food product (Leader Deluxe Antrodia cinnamomea®) *Toxicology Reports* 2:1409-1417
- Levine BS. (2001) *Animal Clinical Pathology In: Handbook of Toxicology*, Derelanko M.J. and Hollinger M.A., 2nd edition, pp. 741-768. CRC Press LLC, Florida, USA.
- Long CT and Luong R. (2009) What's your diagnosis. Tail mass in a mouse. *Cutaneous hemangiosarcoma. Lab Anim (NY)*.38(2):49-51.
- Mann, PC, Hardisty, JF, and Parker, MD (2001) Managing pitfalls in toxicology pathology. In: *Handbook of Toxicologic Pathology*, Haschek, W. M., Rousseaux, C. G., and Wallig, M.A., Eds., Two-Volume Set, 187-206, 2001. Elsevier Science & Technology Books.
- Schnell MA, Hardy C, Hawley M, Propert KJ, Wilson JM. (2002) Effect of blood collection technique in mice on clinical pathology parameters. *Hum Gene Ther*. 1;13(1):155-61.
- Shackelford, C., Long, G., Wolf, J., Okerberg, C., and Herbert, R. (2002) Qualitative and quantitative analysis of nonneoplastic lesions in toxicology studies. *Toxicol. Pathol.* 30: 93-96.
- Serfilippi LM, Pallman DR, Russell B. (2003) Serum clinical chemistry and hematology reference values in outbred stocks of albino mice from three commonly used vendors and two inbred strains of albino mice. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 42(3):46-52.
- Toren A, Or R, Kapelushnik J, Chividalli G, Aku M, Slavin S, Nagler A. (1996). Normalization of serum lactic dehydrogenase in beta-thalassemia patients following bone marrow transplantation. *Am J Hematol*. 51(2):166-7.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD).(1998) OECD guideline for the testing of chemicals. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. OECD 408. France.
- Environmental Protection Agency. Health effects test guidelines. 90-day oral toxicity in rodents. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.350, 1998. U.S.A.