

ISSN 1017-9969
中華郵政特准掛號認爲新聞紙類
登記證台記認字第1261號
國內郵資已付
臺中郵局許可證
台中字第1261號
雜誌
申請位價特請逕函

藥毒所專題報導



第 114 期

中華民國 103 年 7 月出版

呼吸暴露之毒理測試方法及應用評估概述

發行單位：行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所
Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute

發行人：費雯綺
編輯：技術服務組

呼吸暴露之毒理測試方法及應用評估概述

洪佳雯、陳筱青、蔡鍵任

前 言

呼吸道是人類或動物暴露毒性物的主要途徑之一，使得肺臟成為多種有害物質的標的器官，其中農藥在不同的施用情況下對於操作者或農民的暴露風險亦常被重視。雖然農藥在登記上市前，我國採取與世界先進國家一致的做法，必須繳交足以評估農藥安全性的各項毒理資料，但使用者若不依推薦的施用量或做好完善的防護措施，則易造成暴露風險。加上不同的作物的需求、使用時機及效能等因素發展出許多不同劑型種類的農藥，尤其是一些特定劑型須以噴灑的方式施用在高棚架作物上，易使施藥者有較高的呼吸毒性的風險。因此，本文將針對呼吸道結構及功能、呼吸之毒理測試方法、呼吸毒暴露試驗系統、氣膠產生及呼吸毒理試驗的應用做進一步的說明，使讀者對呼吸毒理及其應用評估能有更深一層的認知。

呼吸道結構及功能

在人類及其他哺乳動物的呼吸系統包括呼吸道、肺和呼吸肌，物種不同，相對構造組織有些許差異，但主要分為四個部份，鼻口咽喉到支氣管(Large airwaves)、小支氣管與細支氣管(Small airwaves)、末端細支氣管與肺泡管及肺泡(The acinus)與血管(The blood vessels)。整體呼吸道由鼻子將吸入的空氣進行加溫、溼潤及過濾等作用，由氣管、支氣管進入到肺中，在肺泡進行氣體的交流。若空氣中夾雜細小粒子，是無法穿透肺泡壁的細胞層，因此不同大小粒子會藉由作用力而沉降在不同的位置。而不同的顆粒進入呼吸道時，在人類與大鼠所沉降的區域亦不同。較大粒子在鼻咽處沉降比例多，較小粒子易進入鼻腔沉降在支氣管及肺泡。大致而言，粒子粒徑分別小於10 μm 及4 μm 的顆粒容易進入人體與大鼠的呼吸道而沉降，不同大小粒子沉降區域如圖1.及圖2.所示。

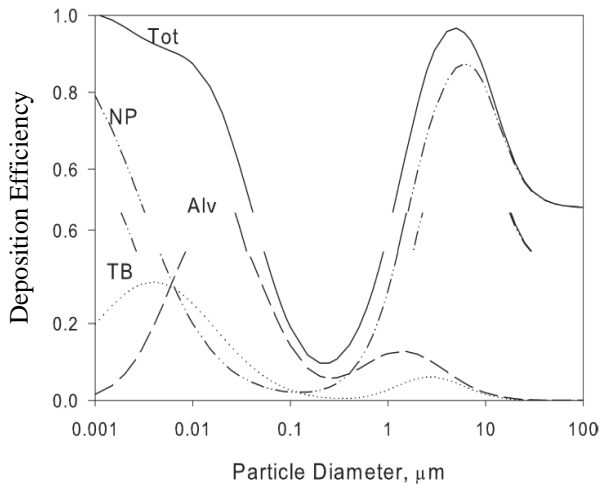


圖 1. 人類呼吸道沉降效率。NP：鼻咽處沉降率 (nasopharyngeal deposition)；TB：氣管及支氣管沉降率 (tracheobronchial tract deposition)；Alv：肺泡沉降率 (alveolar deposition)；Tot：總括性沉降率 (Total deposition)。

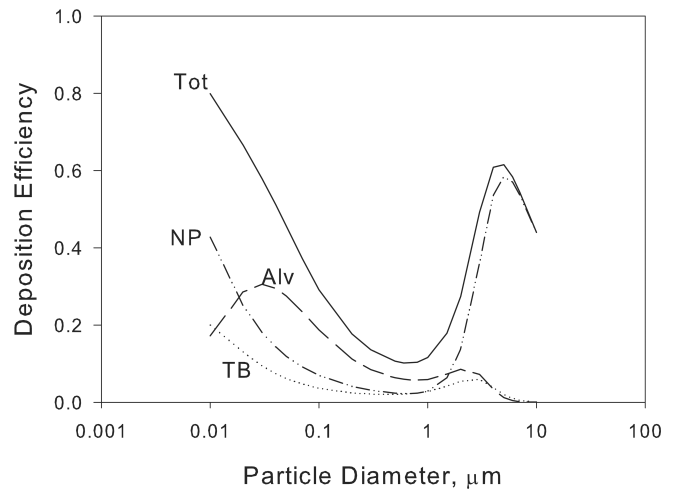


圖 2. 大鼠呼吸道沉降效率。NP：鼻咽處沉降率 (nasopharyngeal deposition)；TB：氣管及支氣管沉降率 (tracheobronchial tract deposition)；Alv：肺泡沉降率 (alveolar deposition)；Tot：總括性沉降率 (Total deposition)。

呼吸之毒理測試方法

一、呼吸毒理暴露的方式

在吸入性研究方面，實驗動物大部分仍以大鼠、小鼠及狗等物種為主。選擇的考量因素為物種本身呼吸道的型態構造、特定的微生物感染與否及呼吸道之流通特性等，另外考量其在物理、生化及生理上的試驗數據也較接近人類。在早期呼吸暴露設備尚未廣泛的被使用時，常利用氣管內灌注方式 (intratracheal instillation) 對小型實驗動物進行肺部的各項研究。此方法主要是將試驗物以液體 (完全溶解或者懸浮狀態) 的方式利用灌注管噴出氣膠而霧化進入肺部 (如圖3.)，再觀察後續對試驗動物的影響，對於開發新的藥物或測定某一試驗物，欲短時間瞭解其呼吸毒性情況不失為一快速可行的暴露方法。

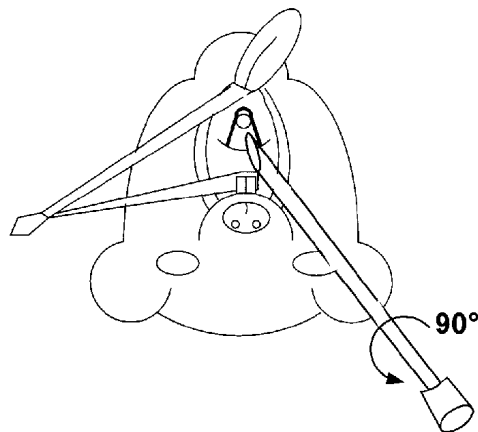


圖 3. 啮齒類動物氣管內灌注圖。氣管灌注管由兩片聲門中所圍繞之空隙進入氣管。90° 為氣管灌注管方向由右邊至中間所旋轉的角度。

常見的三種呼吸毒理試驗暴露方式(一)全身性暴露(whole body exposure)：試驗動物通常限制活動在不鏽鋼或玻璃材質的空間，以氣流攜帶試驗物，進入暴露空間，試驗動物全身暴露其中(圖4)。(二)頭部暴露(head-only exposure)：與鼻(吻)部暴露的差別在於暴露於試驗物的部位不同，但此方法該試驗物可能經口攝入，影響試驗結果(圖5)。(三)鼻(吻)部暴露(nose/mouth-only exposure)：綜合上述兩者全身性及頭部暴露，鼻(吻)部暴露是為較理想的暴露方式，目前經濟合作發展組織(Organization of Economic Cooperation and Development, OECD)對於呼吸急毒性試驗操作指引403亦建議以此為呼吸暴露的方式(圖6)。另外尚有肺部暴露(lung-only exposure)及局部肺暴露(partial lung exposure)兩種暴露方式，兩者暴露途徑原理類似氣管內灌注方法，差別在於試驗物暴露於肺部的多寡程度。各種暴露方式其優缺點描述於表1。

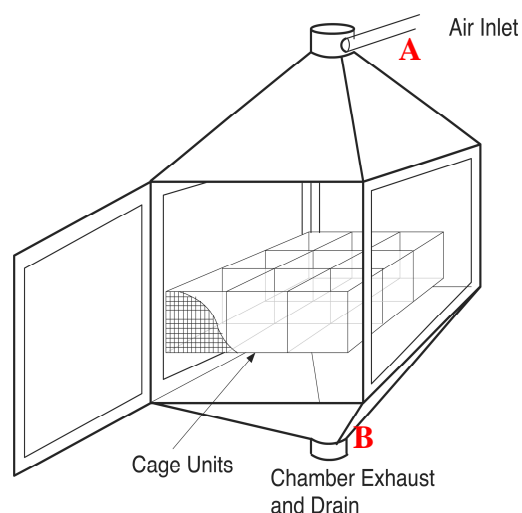


圖 4. 全身性暴露艙模式(包含空氣進氣之 A 處及排氣位置之 B 處)。

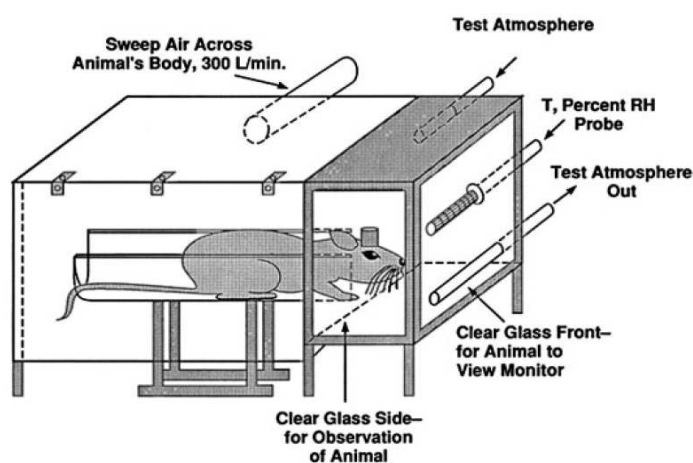


圖 5. 頭部暴露艙模式。設備包括進氣(攜帶試驗物, test atmosphere)、排氣(test atmosphere out)及溫濕度探頭偵測暴露空間狀態(T, Percent RH Probe)。

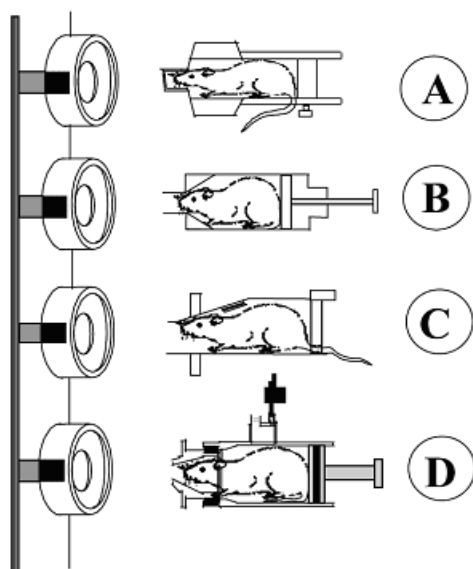


圖 6. 頭/鼻部暴露艙模式。大鼠之固定暴露管又可分為多種類型(A)標準固定暴露管(B)密封式固定暴露管(C)砲管式固定暴露管(D)固定暴露管。本模式裝有位移體積變化記錄器及壓差變送器。

表1. 各種呼吸暴露方式優缺點比較

暴露方式	優點	缺點
全身性暴露	<ol style="list-style-type: none"> 1.能夠多種或大量動物進行暴露。 2.適合進行慢性毒性呼吸試驗。 3.產生相對穩定的試驗物濃度。 	<ol style="list-style-type: none"> 1.動物暴露於試驗物會呈現混亂狀態。 2.試驗物會經由皮膚、嘴及眼睛進入至動物中，動物排泄物、毛屑皆會存在暴露環境中。 3.動物為避免暴露於試驗物環境中會縮成一團，或者會將鼻子埋藏於皮毛或籠子角落。 4.需要大量試驗物。 5.不易清楚掌握每隻動物生理狀態。
頭部暴露	<ol style="list-style-type: none"> 1.減少試驗物在皮毛上的沾黏污染。 2.試驗物在劑量的給予及控制更有效率。 	可能會造成動物的緊迫，在未經麻醉的動物，可能需藉由適當固定其脖子的部份。
鼻(吻)部暴露	<ol style="list-style-type: none"> 1.不會有試驗物在皮毛上沾黏污染 2.減少經口的暴露。 3.使用較少量的試驗物及其暴露濃度可隨時應試驗需求做改變。 4.暴露試驗可隨時暫停中止。 	可能會造成動物緊迫。

表1. 各種呼吸暴露方式優缺點比較(續表1.)

暴露方式	優點	缺點
肺部暴露	1.給予較精確的劑量。 2.較單一的暴露途徑。 3.使用較少量的試驗物。 4.可中途暫停暴露試驗。	1.技術上較困難。 2.暴露過程需麻醉或以氣管造口術的方式給予試驗物。 3.試驗物量受限制。
局部肺暴露	1.試驗物投予的劑量會更精確。 2.以器官局部表示劑量多寡。 3.可到達的局部劑量較高。	1.需麻醉。 2.技術上較困難。 3.可能會使局部組織受傷。

二、呼吸毒暴露試驗系統介紹

基於試驗人員的安全考量，呼吸暴露試驗前應著裝安全防護設備(圖7.)。待確認試驗物的物化性質後，選擇決定採用氣體(gas)或蒸氣(vapour)、粉塵(dust aerosol)、液體氣膠(liquid aerosol)進行呼吸暴露試驗，連接進氣系統、氣膠產生設備與呼吸暴露艙，便完成呼吸暴露系統的安裝(圖8.及圖9.)。呼吸暴露的過程中，試驗物於暴露艙中的濃度並非固定不變值，可藉由採樣得知當時氣膠的實際濃度(actual concentration)，並依據所考量的條件來做適當調整。其中試驗物經氣膠產生器製造產生出來的物質，其顆粒粒子大小參差不齊，尤其在成品農藥更為顯著，而影響粒子大小因子，包括試驗物前處理、儀器設備穩定狀態及週遭環境等。因此呼吸暴露常以動態氣流粒徑質量中位數(Mass median aerodynamic diameter, MMAD)來表示粒子的實際分佈情形，一般試驗物經由粉塵產生器或液體氣膠產生器產生氣膠並噴入呼吸暴露艙後，其粒子的動態氣流粒徑大小會因試驗物特性而有不同的分佈範圍(圖10.)，使用分段撞擊式粒徑分析器採樣，並以統計分析求出動態氣流粒徑質量之中位數值，此為一非常重要的指標數據。

動態氣流粒徑質量中位數其計算原理主要是利用分段撞擊式粒徑分析器採樣後，再取下其每層粒子衝擊收集盤上之金屬收集片秤重，以「各截層的粒徑自然對數值」與採得樣品的「累積質量比(cumulative mass, %)」進行Probit analysis的方法分析，求得動態氣流粒徑質量中位數值，並以 84.1 % 累積質量比之徑度除以 50% 累積質量比之徑度計算粒子之幾何標準偏差(geometric standard deviation, GSD)，來評估試驗物氣膠之可吸入性。



圖 7. 呼吸毒理試驗需著穿之防護設備。

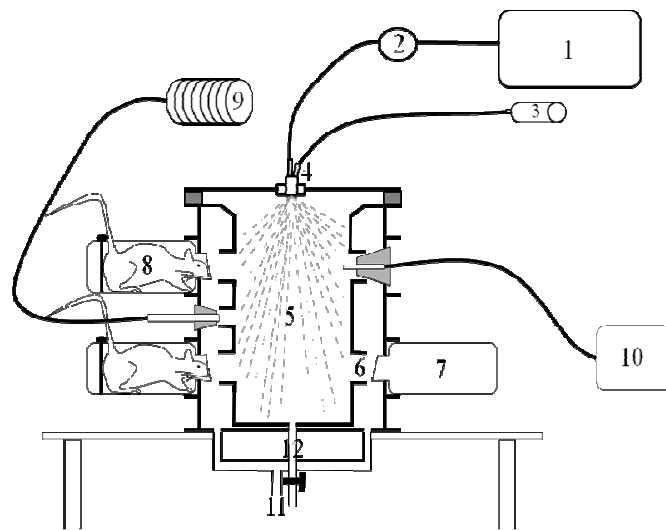


圖 8. 呼吸暴露艙示意圖(適用於液體氣膠物質)。

圖示說明：

- | | |
|-------------|---------------|
| 1. 空氣壓縮機 | 7. 呼吸暴露管 |
| 2. HEPA 過濾膜 | 8. 試驗動物 |
| 3. 定量給藥幫浦 | 9. 採樣器(濃度或粒徑) |
| 4. 氣膠噴嘴 | 10. 溫濕度紀錄器 |
| 5. 呼吸暴露艙 | 11. 排氣孔 |
| 6. 暴露孔 | 12. 排藥孔 |

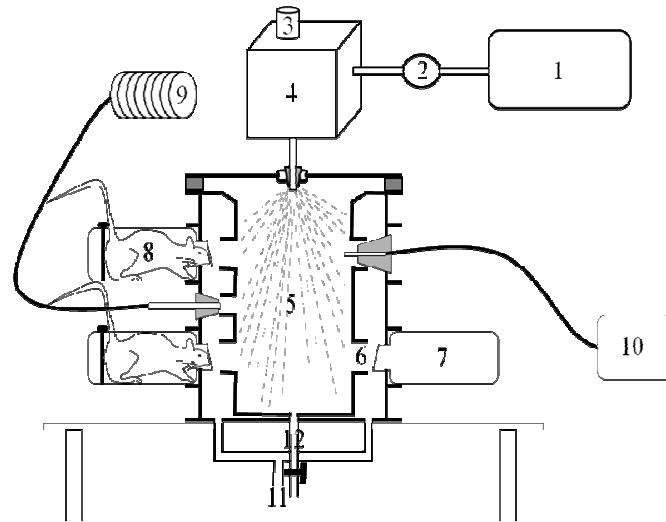


圖 9. 呼吸暴露艙示意圖(適用於粉塵物質)。

圖示說明：

- | | |
|-------------|---------------|
| 1. 空氣壓縮機 | 7. 呼吸暴露管 |
| 2. HEPA 過濾膜 | 8. 試驗動物 |
| 3. 盛藥盒 | 9. 採樣器(濃度或粒徑) |
| 4. 粉塵產生器 | 10. 溫濕度紀錄器 |
| 5. 呼吸暴露艙 | 11. 排氣孔 |
| 6. 暴露孔 | 12. 排藥孔 |

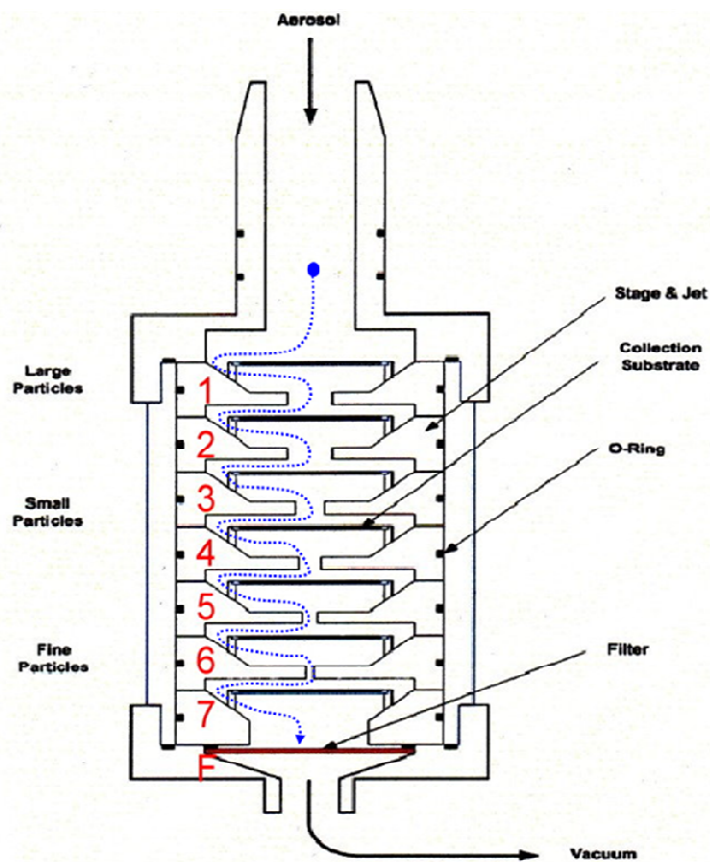


圖 10. 分段撞擊式粒徑分析器分層示意圖。分段撞擊式粒徑分析器總共分為七層，及濾紙層(F, filter)，藍色虛線代表試驗物粒子於動態氣流下撞擊粒徑分析器的金屬收集片之碰撞途徑。

三、氣膠的產生

於呼吸急毒性試驗中，常根據試驗物的物化性質來決定以特定狀態進行暴露，其中試驗物以粉塵或液體氣膠產生的方式最常見。粉塵是以固體狀態懸浮於空氣中的粒子；液體氣膠則是以液體狀態懸浮於空氣中的粒子稱之。試驗物一開始進入呼吸暴露艙後，濃度會由低慢慢達到穩定狀態，當呼吸暴露艙內試驗物氣膠達到95 %動態平衡時，則此段時間稱為 t_{95} ，若期待試驗物濃度達到更高比例動態平衡，則需花費較長的時間，其求得所需時間如下：

$$t_{95}(\text{min}) = K_{95} \times A/B$$

A為暴露艙體積 (L)

B為空氣流速 (L/min)

K_{99} 為常數4.605，表示試驗物氣膠達到99 %動態平衡

K_{95} 為常數2.996，表示試驗物氣膠達到95 %動態平衡

K_{80} 為常數1.609，表示試驗物氣膠達到80 %動態平衡

待 t_{95} 的時間達到後，試驗動物可置入適當大小之呼吸暴露管中固定並裝入呼吸暴露艙的暴露孔後，依照所選定的濃度開始進行單次連續4小時呼吸暴露試驗，圖11.為實際試驗粉塵產生器連接至呼吸暴露艙的情況。



圖 11. 試驗動物以粉塵產生器連接暴露艙的情形。

四、試驗物採樣濃度及 LC_{50} 定義

當試驗物達到95 %動態平衡後，試驗所要求之實際濃度經由採樣確認到達

後，將試驗動物於此濃度呼吸暴露4小時，在為期14天內觀察動物之臨床症狀及死亡率情形，以求得動物之半數致死濃度(median lethal concentration, LC₅₀，單位為mg/L)，LC₅₀是以統計的方法估算該試驗物造成50%試驗動物的死亡濃度值。當待測試驗物毒性低時，常以儀器可達最高濃度(maximum attainable concentration)作為起始濃度，或是基於動物福祉考量(試驗物暴露濃度太高會使動物窒息死亡)而選擇採用限量濃度(limit concentration)。若在主試驗中，試驗動物呼吸暴露結果死亡率小於50%，其半數致死濃度(LC₅₀)則以大於該暴露濃度表示，並結束此試驗。否則須進行三組試驗動物死亡率介於0~100%之暴露濃度，求得LC₅₀值。在決定粉塵或液體氣膠的測試濃度時，應優先考慮試驗物的動態氣流粒徑分佈，其MMAD宜介於1~4 μm範圍內。

呼吸毒理試驗的應用

呼吸毒理學的發展最早可追溯到1959年Fraser等人闡述呼吸道結構與功能，及描述呼吸毒理吸入性的試驗技術。目前呼吸毒理研究依據實驗實際需求分為急毒性、亞慢毒性及慢毒性試驗，急毒性試驗為單次連續暴露，暴露時間小於8小時(通常至少需4小時)；亞慢毒性試驗暴露時間依試驗所需為10~90天不等，每天則暴露6小時，一週5天；慢毒性試驗暴露則與亞慢毒性試驗相同的時間頻率，所需時間至少為期一年。

呼吸毒理試驗適用於農藥、化學品、環衛用藥、食品添加物、化妝品及中草藥等具吸入性風險之試驗物。舉凡試驗物之顆粒能進入呼吸道，皆有其一定的呼吸風險。由於噴藥者、農友、或農藥工廠作業人員，最有可能一次暴露到高劑量的農藥，為了避免農藥的製造、運輸、或施用時，造成這些高暴露群的意外傷害，常以農藥在動物的急毒性試驗結果，來推估農藥經由呼吸、口、或皮膚等途徑，可能造成人員傷亡的劑量。動物的呼吸暴露急性致死觀察結果，常作為毒性分類管理的參考依據，國際上將農藥的呼吸急毒性依其LC₅₀數據值分為極劇毒、劇毒、中等毒、輕毒等，並給予適當的分類或警語。表2.與表3.分別是美國環保署(United States Environmental Protection Agency, USEPA)及化學品全球調和制度(Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals,GHS)針對農藥與化學品所訂定的呼吸急毒性分類。另外最近在報章新聞中，常提及PM 2.5這個名詞，是指在空氣中的懸浮微粒尺寸小於2.5 μm的顆粒，幾乎無法用肉眼察覺，但這些

粒子卻很容易由鼻腔進入呼吸道而沉降至肺部深層，如此微小的粒子，一但進入肺部是無法咳出，如果吸入的這些微小粒子是有害的物質，將慢慢侵犯人體組織。文獻也指出，長期暴露在這些環境中的試驗動物，其血壓及血糖的調控會出現異常現象。因此，呼吸毒理測試就扮演一個絕對重要的角色，可得知一個已知或未知的物質對肺臟的危害情況。

表2. 美國環保署(USEPA)之農藥呼吸急毒性分類

等級 LC ₅₀	第 I 類	第 II 類	第 III 類	第 IV 類	第 V 類
	極劇毒	劇毒	中等毒	輕毒	幾乎無毒
mg/L	≤0.05	>0.05~≤0.5	>0.5~≤2	>2	-*

* LC₅₀表示半數致死濃度；*表未訂定。

表3. 化學品全球調和制度(GHS)之化學品呼吸急毒性分類

呼吸 (LC ₅₀)	劑型	第 I 類	第 II 類	第 III 類	第 IV 類	第 V 類
	氣體 (gas)	≤100	>100~≤500	>500~≤2500	>2500~≤5000	-*
	蒸氣(vapour)	≤0.5	>0.5~≤2	>2~≤10	>10~≤20	-*
	霧氣 (dust and mist)	≤0.05	>0.05~≤0.5	>0.5~≤1	>1~≤5	-*

* LC₅₀表示半數致死濃度；劑型氣體、蒸氣及霧氣之 LC₅₀其單位分為 ppm/V、mg/L 及 mg/L。霧氣包含粉塵及液體氣膠；*表未訂定。

結 論

近年來有機農業的逐漸盛行，飄散污染議題不斷，也有學童不慎吸入學校周遭不明氣體而引起身體不適的報導，這些事件使得呼吸危害風險評估日漸備受重視，就連在較密閉溫室中的工作者，都有可能存在呼吸暴露的風險。也因為日常生活的需求，人類不斷開發製造及使用許多不同的化學物質，面對未知的環境，我們根本無法知道自己是否已經暴露在有害物質的空間裡，而呼吸暴露之毒理測試，就可提供一項極具參考的危害數據，做為毒理安全評估的一環，也唯有透過專業人員的教育宣導，正確的做好完善的防護措施，才能保護自身及他人安全。

參考文獻

1. 應用毒理組。2012。小型嚙齒類氣管投藥標準操作程序(05X-1101-0000)第1版。
2. 劉宗榮、翁祖輝、劉興華、郭明良、康熙洲譯。2007。基礎毒理學(Frank C. Lu、Sam Kacew 著)-原理、作用標的及相關之危害性評估第4版。藝軒圖書出版社。
3. Boyes W.K., Bercegeay M., Ali J.S., Krantz T., McGee J., Evans M., Raymer J.H., Bushnell P.J., Simmons J.E. 2003. Dose-based duration adjustments for the effects of inhaled trichloroethylene on rat visual function. *Toxicological Sciences* 76,121-130.
4. Dorato M.A. 1990. Overview of inhalation toxicology. *Environmental Health Perspectives* 85, 163-70.
5. Environmental Protection Agency, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. 1998. OPPTS 870.1300 Acute Inhalation Toxicity. In: OCSPP Harmonized Test Guidelines, Series 870 - Health Effects Test Guidelines, EPA 712-C-98-193. Washington, DC.
6. Lizio R., Westhof A., Lehr C.M., Klenner T. 2001. Oral endotracheal intubation of rats for intratracheal instillation and aerosol drug delivery, *Lab Anim* 35,257-260.
7. Organisation for Economic Co-operation and Development. 2009. Test No. 403: Acute inhalation Toxicity. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 Health Effects.
8. Pauluhn J. 2005. Overview of inhalation exposure techniques: strengths and weaknesses. *Experimental and Toxicologic Pathology* 57 Suppl 1,111-128.
9. Pauluhn J et al. 2003. Overview of testing methods used in inhalation toxicity: from facts to artifacts. *Toxicology Letters* 140-141, 183-193.
10. Phalen R.F. 2008. *Inhalation Studies Foundations and Techniques*. Second Edition.
11. Phalen R.F., Mannix R.C., Drew R.T. 1984. Inhalation exposure methodology. *Environmental Health Perspectives* 56, 23-34.
12. Phalen R.F. 1976. Inhalation exposure of animals. *Environmental Health Perspectives* 16, 17-24.
13. Wong B.A. 2007. Inhalation Exposure System: Design, Methods and Operation. *Toxicologic Pathology* 35,3-14.
14. Ying Z., Xu X., Bai Y., Zhong J., Chen M., Liang Y., Zhao J., Liu D., Morishita M., Sun Q., Spino C., Brook R.D., Harkema J.R., Rajagopalan S. 2014. Long-term exposure to concentrated ambient PM 2.5 increases mouse blood pressure through abnormal activation of the sympathetic nervous system: a role for hypothalamic inflammation. *Environmental Health Perspectives* 122, 79-86.
15. Zheng Z., Xu X., Zhang X., Wang A., Zhang C., Hüttemann M., Grossman L.I., Chen L.C., Rajagopalan S., Sun Q., Zhang K. 2013. Exposure to ambient particulate matter induces a NASH-like phenotype and impairs hepatic glucose metabolism in an animal model. *Journal of Hepatology* 58,148-54.

藥毒所專題報導

發行人：費雯綺
發行所：行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所
地址：臺中市霧峰區舊正里光明路 11 號
網址：<http://www.tactri.gov.tw>
電話：(04)23302101
總編輯：陳妙帆
編輯委員：蔡慧任 蘇文瀛 何明勳 徐慈鴻 曾經洲
蔣永正

展售書局：

1. 國家書店松江門市/臺北市松江路 209 號 1 樓 (02)25180207
網路書店/<http://www.govbooks.com.tw>
2. 五南文化廣場/臺中市中山路 6 號 (04)22260330
網路書店/<http://www.wuanbooks.com.tw>

印刷：財政部印刷廠
地址：臺中市大里區中興路一段 288 號
電話：04-24953126

中華民國 103 年 7 月出版

定價：新台幣 30 元

GPN：2007600007

ISSN：1017-9569(平裝)

著作財產權人 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所
欲利用本書全部或部份內容者，須徵求著作財產權人同意。



歡迎轉載，但請註明出處。

ISSN:1017-9569
GPN:2007600007
定價：30元