

# 國際呼吸毒性體外試驗發展近況與農藥登記之未來運用

洪佳雯<sup>1\*</sup>、陳筱青<sup>1</sup>、蔡韙任<sup>1</sup>

## 摘要

洪佳雯、陳筱青、蔡韙任。2024。國際呼吸毒性體外試驗發展近況與農藥登記之未來運用。臺灣農藥科學 16 : 59-80。

呼吸毒性試驗是新有效成分登記農藥必繳交資料之一，具有呼吸道刺激或傷害疑慮者，依情況再進一步提交亞急或亞慢呼吸毒性試驗文件。目的在於得知物質經由吸入所引發的劑量毒性效應，與口服餵食、皮膚投予途徑的試驗相比，呼吸毒性測試存在許多實驗變因及不確定性，例如試驗中暴露濃度與粒子大小的變異、儀器性能及物質特性不同，亦常因之得到不同的試驗結果。因應許多測試物質無法順利氣膠化或產生暴露濃度太低等因素，早期替代方法為氣管內灌注投予或轉由口服試驗推估呼吸途徑毒性。現今隨著國際間動物保護觀念提高，各測試指引內容納入動物減量及人道評估終點做法，並發展許多體外測試及電腦模擬預測方法。本篇闡述呼吸毒性評估面臨的困境與其替代試驗的發展現況，並以殺菌劑農藥四氫異苯腈為案例，透過採集田間噴藥粒徑、計算流體力學、進行體外試驗，最終求得基準劑量下限值，嘗試解決僅以呼吸急性試驗推估長期呼吸毒性之資料不足，俾使貼近田間實際狀況評估，減少物種間不確定因子所造成的影響。俾日後擬針對疑似呼吸暴露風險高的物質，選擇適合的替代測試方法，提供更具體參考的危害數據，順應國際呼吸毒性體外試驗發展之趨勢。

**關鍵詞：**農藥、替代試驗、呼吸毒性

---

接受日期：2024 年 4 月 8 日

\* 通訊作者。E-mail: jppmmay@acri.gov.tw

<sup>1</sup> 臺中市 農業部農業藥物試驗所

## 前言

隨著動物保護意識提升，以動物作為研究對象之實驗機構不管在使用或技術操作上，也越來越嚴謹。早在 18 世紀時，Maehle 便已提出進行研究儘可能以較少動物數量及減少動物痛苦為目標去執行<sup>(17)</sup>。動物人道管理的 3Rs 原則為精緻化 (refinement)、減量 (reducement) 及替代 (replacement)，國際間針對上述三原則部分已行之有年或正在推行中，精緻化為人熟知的例子，為測試皮膚過敏的方法以小鼠之局部淋巴結分析 (local lymph node assay) 取代傳統天竺鼠試驗<sup>(5)</sup> (guinea pig maximisation test 或 occluded patch test)；減量則為口服毒性試驗依據經濟合作暨發展組織 (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) 採用較少動物數量之測試指引 (OECD Test Guideline 423 或 Test Guideline 425)，得到半數致死劑量數值 (lethal dose 50%, LD<sub>50</sub>)；而替代最著名的例子為近年來化粧品領域禁用兔子作為研究對象，以雞蛋尿囊膜測試 (Hen's egg test-chorion allantoic membrane, HET-CAM test)，該項測試已被德國、法國接受用以評估高刺激性物質、化粧品<sup>(31,4)</sup>。於國內的化粧品衛生安全管理法<sup>(3)</sup>也明文規定，除非有特殊需求，嚴禁以動物作為檢測對象，必須以國際上通過驗證之替代方法來評估該化粧品之安全性。實驗動物的使用長期為動

物保護團體所挑戰的議題，但不諱言地透過動物實驗帶給人類的便利性及科學應用，包括科學的進步及健康評估與疾病的後續治療等，多半來自動物進行試驗所得到的數據結果。美國環保署 (United States Environmental Protection Agency, US EPA) 更提出將在 2035 年終結以哺乳動物為試驗對象之研究<sup>(38)</sup>。

在呼吸毒性試驗中，順應動物減量及動物福祉考量，於測試指引 OECD TG433 使用較少的動物數量進行測試，並在試驗終點指標以動物具有明顯毒性取代死亡。但在呼吸毒性活體試驗中，操作往往受限於物質本身的特性及暴露設備量能，碰上難以氣膠化的物質便無法確知毒性分類，再者動物吸入的劑量，不如其他試驗容易掌握，且過程中暴露濃度及吸入粒子大小相互影響，常在暴露濃度提高時粒徑也相對增加甚至超出動物可吸入範圍，致使技術備受挑戰。為了克服這些不確定性，替代方法逐漸發展，早在 2007 年時便已開始醞釀<sup>(8)</sup>，許多學者更想嘗試以非動物模式取得呼吸毒性結果，包括難處理的物質，使用氣管內灌注技術將已知劑量物質投予至呼吸道；或常以口服試驗推估呼吸途徑毒性取代資料缺乏的窘境。直至今，體外試驗漸趨成熟，不過也因為呼吸系統是個極度複雜的組織結構，在活體可見的整體變化，在執行替代方法勢必透過多項測試方能得到較明確的結果。

本文內容將以漸層式的說明方式，陳述在臺灣現階段農藥申請其在呼吸毒理試

驗之法規規定及試驗本身的技術挑戰，面對歐盟、加拿大及美國農藥之呼吸毒理試驗減免條件，臺灣現行法規完整與否，並闡述目前國際針對農藥在危害及風險綜合考量下使用替代方法的新思維。

## 臺灣農藥相關法規現況及面臨困難

在 2012 年 US EPA 發行農藥之哺乳動物急性毒性試驗減免及毒性橋接指引的參考文件<sup>(37)</sup>，隔年，加拿大衛生部轄下害蟲管制局 (Pest Management Regulatory Agency, PMRA) 摘錄 US EPA 指引文件，並反映 PMRA 現行做法發行相關文件<sup>(29)</sup>，最後 OECD 依據 US EPA 及 PMRA 文件發行急性試驗減免毒性橋接指引<sup>(21)</sup>，彙集三份文件，呼吸急毒性試驗可減免條件說明如下：(1) 農藥產品無法在最合適之呼吸暴露設備下產生足以引發試驗動物產生毒性的暴露濃度，且該項產品確實不會有人類呼吸健康危害的疑慮。上述型態包括氣體 (gas)、蒸氣 (vapor) 或氣膠 (aerosol，指以固體或液體狀態懸浮於空氣中的小粒子)。產品申請試驗減免時應清楚描述嘗試製造可吸入濃度的產生方法及呼吸暴露設備。(2) 農藥產品為揮發性低者 (定義條件為於室內使用之農藥其原體蒸氣壓小於  $1 \times 10^{-5}$  kPa；室外使用之農藥為小於  $1 \times 10^{-4}$  kPa)，或產品在使用、處理、儲存及運送的過程中不會有氣膠化的情況發生。若產品為低揮發性物質，但經

多方面評估可能具高毒性時，仍須進行急性呼吸毒性試驗。(3) 農藥產品經氣膠化後，因粒子太大而無法被吸入，或固體產品本身無法被磨碎。但須在最終所能產生之氣膠符合內容物至少有 99% 為大於  $100 \mu\text{m}$  之粒子，才適用於減免條件。依該項申請減免時應證實該大粒子顆粒物質不會因環境溫度、相對濕度及液滴懸浮於空氣中時而發生粒徑縮小，進而有機會粒子被吸入體內的情況發生。(4) 刺激性化學品因特殊需求必須測試時，應先經專家逐案判斷及做全方位評估，進行試驗時，呼吸暴露目標濃度以不增加動物之痛苦及緊迫為前提，足以將濃度反應曲線達到測試法規及科學目的水準。否則，便可針對該產品提出減免試驗之要求，以減少動物不必要之犧牲，但該項產品須加註可能對呼吸道具腐蝕危害性聲明。臺灣之農藥理化性及毒理試驗準則<sup>(2)</sup>規定，針對有機化學、無機鹽類及生化製劑農藥其新有效成分或新劑型含量 (含混合劑) 為氣態、揮發性高者 (具吸入風險者) 或粒子平均直徑小於  $10 \mu\text{m}$  可經由呼吸吸入者，應提供原體或成品呼吸急毒性試驗資料，反觀上述國際觀點，臺灣對於呼吸毒性資料的提交條件的相關規定勢必須再詳細列舉。

在農藥標示管理辦法<sup>(1)</sup>中，僅就農藥之口服、皮膚及蜜蜂急性毒性提供分類說明，而無呼吸急毒性的分類等級之公告，僅以危害防範圖式之背景帶圖例警示，也因如此，農藥配製使用者或施用者常常忽略農藥對人體的吸入性危害。且農

藥登記時對於判斷是否繳交長期呼吸試驗報告係透過急性毒性試驗結果判斷，有明顯吸入性毒性者，須再提交重複暴露呼吸試驗資料，可知急性毒性試驗著實扮演關鍵角色。呼吸急毒性試驗的重要數據除了空氣的暴露濃度外，亦包括測試物質對動物之可吸入性，在實驗室氣膠的產生，依照試驗指引要求粒子的目標「動態氣流粒徑質量中位數」(mass median aerodynamic diameter, MMAD) 應儘量落於 1-4  $\mu\text{m}$  之間，目的在於讓試驗動物大部分吸入至呼吸道。實際試驗中有時為優先滿足粒徑要求，暴露濃度無法達到預期高點，會導致毒性分類至較毒的等級；相對的，粒徑超出範圍者，分類結果說服力稍嫌不足。但作用在全身性而非專一呼吸道的物質而言，粒徑的大小似乎又顯得不是那麼重要<sup>(28)</sup>。濃度及粒徑兩者間的調整為該試驗所面臨較大的挑戰。限量試驗在呼吸毒性試驗中是指已知幾乎無毒物質以毒性分級切點最高濃度或儀器可達最高濃度進行暴露而無造成動物死亡<sup>(23)</sup>，急性半數致死濃度 (lethal concentration 50%, LC<sub>50</sub>) 以大於某值表示。在依監管需求進行呼吸毒性試驗審查時，LC<sub>50</sub> 落於低值的情況有兩種可能解讀，分別為儀器最大的極限或物質本身毒性高，在未詳閱試驗報告內容前，易讓人混淆不清使毒性分級錯誤。綜上所述，呼吸急毒性評估所面臨的困難主要在於並非所有物質都能產生符合指引目標的可吸入粒徑，衍生對於限量試驗的判斷混淆，而難以僅使用試驗所得暴

露濃度定義毒性分級，導致產品標示上的不足致使未能充分警示使用者。

延伸至管理需求面，在長期試驗中為求取無可見毒害劑量 (no observed adverse effect level, NOAEL) 值，對於具高度呼吸毒性疑慮者在呼吸重複暴露的動物試驗常面臨到無法製造穩定的極低濃度窘境，因上述動物試驗的限制性及現今非動物替代試驗的發展，研究者由不同方向嘗試克服困境，以細胞的體外試驗為例，常以最嚴重的情境設定來決定給予方式，多以直接投予物質取代氣膠化暴露，減少粒徑及暴露濃度所造成的不確定性。為了更貼近評估呼吸暴露的毒性，當轉變採替代試驗則可利用不同的方法與收集多元資料達到更精細物質風險評估的目的。

## 呼吸急毒性試驗指引進展

農藥登記所需提供之呼吸急毒性試驗資料，其測試方法大多遵循 US EPA 或 OECD 指引進行，同時也參考美國<sup>(35)</sup> (表一) 及歐盟<sup>(34)</sup> (表二) 所制定的毒性分級。舉凡動物的選擇、使用之呼吸暴露設備及暴露環境的監控等都必須符合其規定，否則便須提出無法依從的適當說明。US EPA 呼吸急毒性試驗指引 1998 年自今尚未更新，OECD 則有多個參考指引 (表三)，包括呼吸急毒性試驗 (Acute Inhalation Toxicity, OECD TG403<sup>(18)</sup>)、呼吸急毒性試驗-固定劑量致死推定法 (Acute Inhalation Toxicity-Acute Toxic Class Method, ATC, OECD

表一、美國環保署之呼吸急毒性分級標準

**Table 1.** Acute inhalation toxicity categories established by the US EPA<sup>1)</sup>

Study	Category I	Category II	Category III	Category IV
Acute inhalation (mg/liter)	≤ 0.05	> 0.05~ ≤ 0.5	> 0.5~ ≤ 2	> 2

<sup>1)</sup> US EPA: United States Environmental Protection Agency Information extracted from US EPA <sup>(35)</sup>

表二、化學品全球調和制度之呼吸急毒性分級標準

**Table 2.** Acute inhalation toxicity hazard categories established by the GHS<sup>1)</sup>

Exposure route	Category 1	Category 2	Category 3	Category 4	Category 5
Gases, ppmV	≤ 100	>100~ ≤ 500	> 500~ ≤ 2,500	> 2,500~ ≤ 20,000	- <sup>2)</sup>
Vapours, mg/l	≤ 0.5	> 0.5~ ≤ 2.0	> 2.0~ ≤ 10	> 10.0~ ≤ 20.0	- <sup>2)</sup>
Dusts and mist, mg/l	≤ 0.05	> 0.05~ ≤ 0.5	> 0.5~ ≤ 1.0	> 1.0~ ≤ 5.0	- <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> GHS: Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals Information extracted from United Nations <sup>(34)</sup>

<sup>2)</sup> The value range has not been determined. See detailed criteria in document <sup>(34)</sup>.

表三、呼吸急毒性測試指引

**Table 3.** Acute test guidelines for inhalation toxicity

Study feature	TG 403 traditional LC <sub>50</sub> study (2009)	TG 403 C × t study (2009)	TG 436 (2009)	TG 433 (2017)
Endpoint	Mortality	Mortality	Mortality	Evident toxicity
Range-finding study	≤ 3 ♂ and ≤ 3 ♀ (or ≤ 3 of the known susceptible sex) per concentration.	≤ 3 ♂ and ≤ 3 ♀ per concentration	range-finding studies are not used	1 ♂ and 1 ♀ per concentration.
Limit test	3 ♂ and 3 ♀ (or 5 of the known susceptible sex)	In case of 1 animal/sex/(C×t) point: Both sexes:10; Susceptible sex: 10 In case of 2 animals/sex/(C×t) point: Both sexes = 20; Susceptible sex = 20	3 ♂ and 3 ♀ (or 6 of the known susceptible sex)	5 ♂ (or 5 of the known susceptible sex)
Main study	5 ♂ and 5 ♀ (or 5 of the known susceptible sex) per concentration	1 or 2 animals/sex/(C×t) point (or 2 or 4 animals of the susceptible sex per (C×t) point) 5 durations per concentration)	3 ♂ and 3 ♀ (or 6 of the known susceptible sex) per concentration	5 ♂ (or 5 of the known susceptible sex) per concentration
Concentrations tested	Limit test: 1 Main study: At least 3	Limit test: 1 Main study: 4-5	1 or more	1 or more
Exposure duration	generally 4 hours	5 durations per concentration	4 hours	4 hours
Particle size (aerosols)	MMAD: 1-4 μm GSD: 1-3	MMAD: 1-4 μm GSD: 1-3	MMAD: 1-4 μm GSD: 1-3	MMAD: ≤4 μm GSD: 1-3

Information extracted from OECD guidance document No.39 <sup>(23)</sup>

TG436<sup>(19)</sup> 及呼吸急毒性試驗-固定劑量致毒性推定法 (Acute Inhalation Toxicity-Fixed Concentration Procedure, FCP, OECD TG433<sup>(24)</sup>)。OECD TG403 為最早呼吸急毒性試驗所依循的指引，隨著動物減量及法規需求，改版後內容更具彈性。除原有的傳統求取 LC<sub>50</sub> 法 (traditional LC<sub>50</sub> protocol) 外，另增加濃度 × 時間法 (concentration × time, C × t protocol)。上述方法依其適用性各有不同的選擇，唯一目標是將物質進行毒性分類及標示。以動物減量及精緻化的概念更新測試指引，減少動物數量及不同以往最終評估終點取而代之。動物死亡或瀕死非唯一最終評估方式，而是以動物觀察到明顯毒性症狀 (evident toxicity) 分類，再透過症狀判斷後續選擇較高或較低濃度繼續試驗並落實 3R 精神。然而實務上發現大部分農藥之呼吸急毒性試驗報告內容仍使用 OECD TG403 傳統方法，以求得 LC<sub>50</sub> 數值占相對優勢，較能因應各國不同法令規範進行毒性分類，雖然 OECD TG436 及 TG433 指引為從動物保護及福利的角度出發，但單次暴露 4 小時累積所衍生的人力、時間及設備成本花費都必須納入考量在實務上才能有效推動。

## 體外試驗發展的背景

### 一、健康危害途徑 (adverse outcome pathway, AOP) 之發展

在 2012 年由 OECD 啟動健康危害途徑 (adverse outcome pathway, AOP) 發展之相關計畫，就不同的標的毒理反應機制途徑，透過描述分子起始事件 (molecular initiating event, MIE)、中間關鍵事件 (key events, KEs) 及最終不良反應結果 (adverse outcome, AO) 的評估系統，集結和評估物質生物和毒理學的影響<sup>(22)</sup>。分子起始事件為測試物質與生物在分子層面直接相互作用而產生擾動的點，通常發生於危害途徑之上游端；中間關鍵事件則是危害途徑的中間事件，並非單一，有時某一中間關鍵事件也間接影響另一條危害途徑，生物的狀態可藉由觀察及測量得知變化；最終不良反應結果一般反映表現在器官層面上，於危害途徑之下游端，可依據暴露的時間、性別或物種進行定義，普遍被視為具有監管的意義。此外，可藉由資料庫如 AOP-WiKi 或 AOP-KB 查詢欲得知標的器官之危害途徑，包含由化學結構至個體反應各層面，每一危害途徑可能息息相關且互相影響。在 AOP 架構中以多層面漸進式評估，收集多項事件數據資料，由機制路徑過程之起始點或中間關鍵點進行體外試驗或搭配預測模組評估物質標的影響，非必要不建議直接以動物進行測試<sup>(20)</sup>。以 AOP 概念為基礎之綜合性測試與評估策略 (integrated approaches to testing and assessment, IATA) 或綜合性測試策略 (integrated testing strategy, ITS) 也因而被發展出，即為透過多種不同資訊來源進行物質之危害辨識及安全評估。其中殺菌劑

農藥四氯異苯腈 (chlorothalonil) 結構中因帶有四個親電氯原子，尤其是對細胞內硫醇 (thiols) 如抗氧化劑穀胱甘肽 (glutathione) 有高度作用反應，暴露於高量下的四氯異苯腈，其抗氧化系統不堪負荷，吻合細胞損傷和死亡之健康危害途徑<sup>(26)</sup>。因此使用源自人體呼吸道之體外組織求得起始劑量 (point of departure, POD)，搭配計算流體力學 (computational fluid dynamics, CFD) 3D 技術模型計算呼吸道沉積區域氣膠濃度以進行風險評估，即是 IATA 方法的實踐。

## 二、動物與人體的差異

### (一) 生理構造

不管是人類或實驗動物，依據呼吸道結構、大小及功能可分為三個區域：(1) 胸外 (extrathoracic region, ET)：鼻孔至氣管。(2) 氣管支氣管 (tracheobronchial region, TB)：氣管至末端細支氣管。(3) 肺 (pulmonary region, PU)：末端細支氣管及肺泡囊。吸入異物時視顆粒大小，透過不同的移動方式進入呼吸道各部位，包括衝擊 (impaction)、沉降 (sedimentation) 及擴散 (diffusion) 作用。不管是呼吸道上皮細胞/黏膜細胞種類、各組織結構位置分布、肺泡的大小及鼻咽的長度等皆因物種之間不同而有所差異<sup>(12)</sup>。一般來說大鼠、兔子及狗具有較人類曲折複雜的鼻甲骨 (nasal turbinate)，此構造對空氣中的

顆粒提供更好的過濾進而保護下呼吸道<sup>(11)</sup>。在大部分實驗動物的鼻部分為四個較明顯的區域，包括複層鱗狀上皮 (stratified squamous epithelium, SE)、纖毛偽複層呼吸上皮 (ciliated pseudostratified respiratory epithelium, RE)、移行上皮 (transitional epithelium, TE) 及嗅覺上皮 (olfactory epithelium, OE)，另在大鼠、靈長類擁有淋巴上皮 (lymphoepithelium, LE) 結構，其上覆蓋著聚集的淋巴組織 (nasal-associated lymphoid tissue, NALT)，在人類相關的淋巴組織則是魏氏環 (Waldeyer's ring)，包含扁桃腺及其他組織<sup>(12)</sup>，於上呼吸道扮演著抵抗吸入異物的免疫功能的角色。因此，動物在相同物種間，依品系、年紀及性別的差異，與不同物種的種間特異性，須考量選擇合適之呼吸暴露測試方法，以達到實驗數值最大的參考價值<sup>(40)</sup>。

### (二) 呼吸方式

工作場域中與健康相關的氣膠成分其粒子大小由國家標準化組織 (International Organization for Standardization, ISO)、美國工業衛生師協會 (American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH) 及歐洲標準委員會 (Comité Européen de Normalisation, CEN) 定義可分為：可吸入性粒狀物 (inspirable particulate mass, IPM)、胸腔沉著性粒狀物 (thoracic particulate mass, TPM) 及可呼吸

性粒狀物 (respirable particulate mass, RPM)。IPM 表示可由嘴巴或鼻子吸入的粒子，其動態粒徑介於 0-100  $\mu\text{m}$ ；TPM 表示可達到喉部的粒子，其動態氣流粒徑質量中位數大約為  $10 \pm 1 \mu\text{m}$ ；RPM 表示可達到肺泡的粒子，其大約為  $3.5 \pm 0.3 \mu\text{m}$  (30)。這也是明確說明最終產出或噴出的氣膠中含有 99% 為大於 100  $\mu\text{m}$  之粒子才適用呼吸急毒性試驗減免條件，雖然粒子約為 10  $\mu\text{m}$  大小才能進入喉部以下的區域，但若某些大顆粒粒子具高毒性，只要能沉降於鼻道黏膜上的機會，物質經吸收後僅需要幾秒鐘就可藉由血液循環攜帶至腦部，跳過物質經口攝入後於腸胃道系統及肝臟透過代謝及轉換降解毒性之兩道關卡，使人體暴露於毒性的風險中。另一方面，在人類及一些靈長類通常以嘴巴與鼻部共同協調呼吸；但對大部分的齧齒類動物而言，呼吸時會厭與軟顎會緊密貼合，故專一地由鼻部進行呼吸 (12)。

### (三) 呼吸反射 (respiratory reflexes)

齧齒類動物所擁有的呼吸反射機制，可明顯減少異物的吸入而進入到可逆性及類休眠的狀態，針對外來刺激物不同屬性，產生包括反射性呼吸暫停 (reflex bradypnea, RB, 亦可稱 Kratschmer reflex) 及 Paintal reflex 兩類型。引發 reflex bradypnea 的傷害性刺激物主要為水溶性物質，因刺激上呼吸道 (upper respiratory tract, URT) 及眼睛黏膜之三叉神經

(trigeminal nerves) 而造成呼吸反射，使刺激物停留在上呼吸道，但假設過量的濃度是會造成上呼吸道清除能力不足，仍有機會導致下呼吸道暴露於刺激物中。反射性呼吸暫停立即表現的生理反應，包含呼吸頻率及代謝速率下降、氧氣的需求及二氧化碳產生下降、體溫下降、心率下降、血壓下降、活動下降及血中 pH 值上升 (23)。文獻中以除蟲菊酯 (pyrethroid) 類化學品進行呼吸暴露試驗，結果暴露後造成大鼠明顯體溫下降，而人類自願受試者並無相關臨床表現，其原因推測包括除蟲菊酯具有刺激人類上呼吸道三叉神經末梢的特性，而所引起體溫下降為齧齒類吸入後特异性肺臟防禦機制，必須將其與主要毒性效分開探討 (27)；另一則反射則為 Paintal reflex，由水溶性較低之傷害性刺激物引起反應，藉由刺激下呼吸道之迷走神經 C 纖維接受器 (C-fibre receptor, 亦可稱 J 接受器)，造成呼吸暫停。上述兩項呼吸反射雖然其呈現症狀相似，Paintal reflex 會伴隨較快速及淺的呼吸。

### (四) 綜合比較

由齧齒類及人類不同的呼吸方式及組織結構來看，異物進入人類呼吸系統不僅藉由鼻道，還包含口腔的部分，比起齧齒類動物單一以鼻部吸入的暴露風險還高，且在齧齒類動物鼻腔更有別於人類不同的生理構造，推斷以兩物種分別暴露於相同物質中，其最終會仍有不同的數據結果呈

現。就上述觀點延伸討論，實驗室使用動物進行之呼吸暴露相關試驗，在人力及環境等各種可控因子調整出儀器設備進行的最大效能，盡可能製造產生出能可讓動物吸入之暴露濃度，並觀察後續對動物的影響，以最大的呼吸毒性評估該測試物質，但在田間施作時，除了顆粒物以拋施或撒施的方式進行外，常見的情況大部份並不會直接使用濃度高之成品藥液或粉狀物，通常都是再經過加水配製或藥液再稀釋，該溶液與原本藥劑/藥粉可能已相差千倍的濃度，自然實驗室與田間所產出的分子顆粒大小與產生的毒性便不同。實驗室數據為盡可能模擬至最大呼吸暴露量及在無防護裝備下之致毒情況，試驗對象為動物，僅能觀察活體所產生的臨床症狀，間接推測人類暴露後也有類似情況發生。綜上所述，以實驗動物進行呼吸暴露試驗後要推估出對人類產生的毒性效應，在儘可能地控制產生氣膠粒徑介於 1-4  $\mu\text{m}$  前提下，仍有很多變因造成後續風險評估時的限制，因此衍生出各類呼吸毒性體外試驗的需求與發展。

## 呼吸毒性體外試驗

### 一、氣-液界面暴露系統 (air-liquid interface, ALI)

細胞培養於插入式細胞培養皿 (transwell insert) 中，經由不同材質之通透膜下緣與細胞培養液接觸生長，使細胞

頂層暴露於物質中，模擬人體的生理狀態。眾多文獻上也發表以該系統為基礎架構之不同組織，常見器官組織包括呼吸系統、肝臟、皮膚及腸道等，四氯異苯腈之再評估報告案例便是以呼吸系統作為試驗體系。此系統還可不同組合的延伸應用，所使用細胞種類可為一般傳統之細胞株、原代細胞 (primary cell)、重建細胞 (reconstructed cell)，甚至器官組織離體切片皆可供選擇。以呼吸系統為例，原代細胞及器官組織離體切片之檢體來源可由罹病患者提供，較能呈現原始疾病模式如慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、肺纖維化 (pulmonary fibrosis) 及氣喘 (asthma) 之實際生理狀況等。對於呼吸道系統而言，物質究竟是否會對生物體產生毒性，在於該物質是否被吸入、吸入粒子大小及吸入至體內的劑量，甚至粒子接觸哪些細胞，所以在氣-液界面暴露系統中物質粒子如何被製造成氣膠噴出、流動、粒子接觸到細胞的範圍及選擇細胞種類便顯得非常重要。而粒子通常藉由自身的重力、撞擊或不同濃度梯度擴散等作用力，但最終沉降往往容易受到周圍環境影響而達不到預期結果，現今技術可運用靜電力及熱力的方式提高沉降率<sup>(16)</sup>，此須考量外加的作用力可能會致使粒子的物化特性及穩定性產生變化而與原先狀態不同。由鼻部暴露外來物質至最終可能進入肺泡，整個途徑會接觸到許多組織，除了支氣管以下之肺部腔室，另還有鼻腔、咽喉及淋巴，細分所

囊括之細胞類型至少 45 種之多<sup>(8)</sup>，複雜程度可想而知。以氣-液界面暴露系統來評估毒性，受限於只能監測局部特定區域細胞的反應，如針對肺泡與血管內皮細胞或單純僅培養氣管上皮細胞，上述兩區域暴露於物質的後續反應可能不同，若要與動物表現的毒性相驗證，應當需要多筆細胞資料再進行綜合評估考量。

## 二、離體肺切片 (*ex vivo lung slices*)

有鑑於減少對實驗動物的使用趨勢，及體外進行的試驗往往無法真正呈現實際活體中各類型細胞間之聯結及相互影響，離體切片技術可填補活體及體外試驗的不足，在 1994 年便有應用人類肺臟離體切片之先例<sup>(9)</sup>。該項技術大部分是用於病毒或細菌病原之研究。首先須收集肺臟組織，來源包括人類 (捐贈者)、豬隻或是小型齧齒類動物等，視所需大小將組織取下，灌注含適當比例之瓊脂培養液至臟器內部，避免組織壞死，將其放置於冰涼緩衝液中使瓊脂固化並於 4°C 環境儲存培養，最後使用震動切片機將組織切片，依試驗目的調整切片厚度，若要以培養盤培養，須再以檢體穿孔器 (biopsy punches) 製作成孔洞大小規格，即可進行後續試驗。但此方法有時受限於動物安樂死的方法及時間不同，造成數據結果無法達到一致性<sup>(39)</sup>。對於慢性感染的研究，延長組織切片保存也是必須克服的問題。2016

年 Hess 等人使用雌性 Wistar 品系大鼠肺臟離體切片預測物質之呼吸毒性，使用 20 個標的化學品，經吸入後對肺部影響極大之農藥巴拉刈也包括其中，由 3 個實驗室同步測試多項毒性評估終點，使整個系統得到最適當評估，並初步驗證動物呼吸急毒性及肺臟離體切片結果一致性及實驗室之間數據相關性<sup>(13)</sup>。

## 三、仿生肺組織晶片 (*lung-on-a-chip*)

由原代細胞 (primary cell) 或幹細胞 (stem cell) 所發展出類器官 (organoids) 多細胞培養技術，較傳統二維細胞培養系統更具接近人類組織器官的真實狀況，但仍缺乏血液網絡及免疫系統等問題，研究因此受限。為了解決類器官的功能不足，近年來，以三維細胞培養技術 (即氣-液界面暴露系統) 搭配硬體微流體環境之設計，仿生組織晶片因此問世。在許多研究已可見仿生肺組織晶片應用於肺臟、腸道、心臟、腎臟、肝臟、血管、血液屏障及皮膚等組織器官。仿生肺組織晶片的組成是由多孔洞之聚二甲基矽氧烷膜 (polydimethylsiloxane, PDMS) 將整個裝置分隔出上下兩個微通道，該層膜包被細胞外基質 (extracellular matrix, ECM)，上微通道培養肺泡上皮細胞 (alveolar epithelial cell)，下微通道培養肺血管內皮細胞 (pulmonary vascular endothelium cell)，模擬人類肺泡與鄰近微血管間交換物質之呼

吸狀態，微通道兩旁另有左右側室，透過施加外來循環真空可使聚二甲基矽氧烷薄膜側壁產生週期性的機械拉展，可帶動上皮細胞屏障之滲透性<sup>(33)</sup>。仿生組織晶片對於各個器官的應用，大致上皆比照上述裝置組合而成，差別在於標的組織不同，所使用之細胞類型也不同。再結合血液傳遞之免疫細胞，使其分布在微通道的液體中，可觀察到二維環境無法呈現的連續免疫反應。該項技術常用於醫藥的開發，也可應用於物質毒性測試，依照不同需求，做出不同的晶片設計。晶片關鍵在於聚二甲基矽氧烷膜上之細胞外基質組成、細胞種類數量及氣體的流動，關係著細胞通透附著、細胞之間引發反應及細胞暴露物質的程度，另也須考慮到後續標準化的製程，才能達到可重複性的結果<sup>(7)</sup>。

## 呼吸毒性替代試驗之運用

在 2007 年歐盟 REACH (Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals) 法規生效，使得化學品的註冊、評估、授權及限制有了明定規範，管理化學品對人類健康及周遭環境的危害，緊接而來需要大量毒理及相關科學數據證明化學品的安全性，對於測試須使用動物活體、耗費時間等高成本已造成龐大負擔，同年聯邦風險評估研究所 (Federal Institute for Risk Assessment, BfR) 提出評估項目吸入毒理之替代測試方法的議題<sup>(8)</sup>。以下敘述兩個近期較具規模的呼吸毒

性替代試驗之運用。

### 一、呼吸道替代驗證試驗

Jackson 等人<sup>(14)</sup>使用商品化之 EpiAirway 組織搭配氣-液界面暴露系統模擬人體呼吸道的替代試驗。該組織具有偽分層上皮之細胞樣態，包含杯狀細胞 (goblet cell)、纖毛細胞 (ciliated cell)、基底細胞 (basal cell) 及棒狀細胞 (club cell)，另外也擁有細胞間緊密連接 (tight junction) 及屏障 (barrier) 功能。總共 59 種化學品以體外測試方法驗證活體動物呼吸急毒性試驗，其中也包含農藥的品項巴拉刈。暴露時間為 3 小時，以組織的存活率作為最終評估指標，利用活細胞粒線體中之琥珀酸去氫酶 (succinate dehydrogenase)，促使二甲基硫醇二苯基四唑溴 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) 中四唑 (tetrazolium) 結構轉換成具紫色的產物 MTT formazan，再以特定溶劑將其溶解出使溶液呈色並讀取吸光值分析細胞存活率。首先將一待測化學品先進行初步篩選，製備 10、50、250 及 500 mg/mL 的濃度，會得到粗略的 IC<sub>75</sub> (75% inhibitory concentration values，組織存活率被物質抑制達 75% 之濃度) 數值落點，接下來再縮小範圍進行四點濃度 IC<sub>75</sub> 確認。將體外試驗結果比對呼吸急毒性在 GHS、US EPA 及 GHS 特定標定器官系統毒性物質之單一暴露 (specific target organ toxicity-

single exposure, STOT-SE) 的毒性分類，發現化學品當中動物毒性分類在 Category 1-2 (或I-II) 之體外試驗求得之 IC<sub>75</sub> 值皆小於 150 mg/mL 濃度，因此以 150 mg/mL 作為 Category 1-2 (或I-II) 及 Category 3 (或III) 以上分類等級之切點，該試驗結果之靈敏度 (sensitivity) 特異性 (specificity) 如表四，靈敏度皆可達 75% 以上，偽陰性率介於 0-25% 之間，偽陽性率介於 43-57% 之間，顯示些許物質出現不同的分類等級，體外試驗整體來看，以偽陽性比例可知替代試驗得到物質之呼吸毒性比起動物試驗分類是有被高估的情形 (即較為保守)，在不使用活體進行試驗的替代狀況下，能夠了解並警示對呼吸系統危害較高物質以保護使用者的健康安全。值得關注的是，針對呼吸暴露導致健康危害性較高的農藥如巴拉刈，研究者經由開發離體肺切片直到現今較盛行之氣-液界面暴露系統等技術，持續尋找合適之替代方法進

行而真正瞭解其毒性，而不再以活體試驗作為首選。綜合上述試驗，體外呼吸毒性結果應使用多項評估綜合考量，包括細胞存活率、氧化壓力、發炎基因表現、代謝及細胞凋亡等，若僅利用細胞存活率單一項評估指標仍難以代表活體動物整體毒性表現，依其他途徑之替代試驗驗證程序，驗證樣本數可能須達到百個以上才能讓數據更具代表性。

## 二、四氯異苯腈呼吸危害及風險替代試驗案例

農藥四氯異苯腈 (chlorothalonil) 在國際上僅有呼吸急毒性試驗的分類等級，現有之最低可見毒害劑量 (lowest observed adverse effect level, LOAEL) 是由呼吸急毒性試驗結果推估而得<sup>(15)</sup>，並沒有完整的 90 天動物重複呼吸暴露資料，無法真正確實評估對施藥者暴露的影響。

表四、體外試驗 EpiAirway IC<sub>75</sub> 與動物體內試驗依 GHS、USEPA 及 STOT-SE 分類之交互比較表<sup>(14)</sup>

Table 4. Cross tabulation of EpiAirway IC<sub>75</sub> data in vitro compared with GHS, USEPA and STOT-SE categories in vivo<sup>(14)</sup>

EpiAirway IC <sub>75</sub>	GHS 呼吸急毒性分類		US EPA 呼吸急毒性分類		STOT-SE 分類	
	Category 1-2	>Category 3	Category I-II	>Category III	Category 1-2	>Category 1
≤150 mg/mL	8/8 (100% <sup>1)</sup> )	29/51	8/8 (100% <sup>1)</sup> )	20/40	27/36 (75.0% <sup>1)</sup> )	10/23
>150 mg/mL	0/8	22/51 (43.14% <sup>2)</sup> )	0/8	20/40 (50.0% <sup>2)</sup> )	9/36	13/23 (56.5% <sup>2)</sup> )

<sup>1)</sup> 靈敏度 (sensitivity)：陽性樣本判定為陽性的比例

<sup>2)</sup> 特異性 (specificity)：陰性樣本判定為陰性的比例

先正達公司以綜合性測試與評估策略 (IATA) 並結合人體呼吸道商品化組織 (MucilAir™) 的體外試驗探討殺菌劑農藥四氯異苯腈之田間呼吸風險<sup>(10)</sup>。主要分為四個層面綜合評估：(1) 直接使用採樣設備採集田間噴灑之四氯異苯腈氣膠粒子顆粒大小，取得動態氣流粒徑質量中位數 (MMAD) 及幾何標準差值 (geometric standard deviation, GSD)，(2) 使用計算流體力學技術預測物質在呼吸系統特定區域粒子的每次呼吸之呼吸道表面積沉降劑量，(3) 利用體外試驗模組評估三項指標 (於後文詳述) 求得基準劑量下限值 (benchmark dose lower bound, BMDL)，(4) 以區域沉降劑量結合 BMDL 數值外推計算至人類呼吸等效濃度 (human equivalent concentration, HEC)，並針對施藥者做出最後的風險評估。

田間農藥的施作，所噴出的粒子大小取決於噴頭的類型、設備整體產出壓力及藥劑本身之物化特性等，依據施作面積大小及作物種類使用不同的噴灑設備，該篇四氯異苯腈以噴霧施撒機 (spray applicator) 施作，經採樣分析測得 MMAD 為 35  $\mu\text{m}$ ，GSD 為 1.5。依 ISO/ACGIH/CEN 標準，上述之 MMAD 數值顯示，由設備所產生噴出的氣膠由鼻腔進入至呼吸系統的位置，推測大部分落在喉部以上區域所占比例居多，只有剩餘零星的小顆粒會再往下沉降至氣管甚至到肺泡處。

在不使用活體動物的狀況下，計算流

體力學透過程式介面的設計，模擬氣體或液體之行為軌跡，經由多項參數的設定，可模擬並計算粒子在人體或大鼠呼吸系統表面面積的沉降劑量，取代活體試驗與人體物種間的差異，呈現較符合人體的真實呈現。以計算流體力學模擬結果顯示時四氯異苯腈氣膠確實大部分都沉降在喉部以上，且能預估其於呼吸道每個區域較準確的沉降量。雖然預測程式也能呈現鼻部較前方區塊-鼻前庭的每次呼吸道表面積沉降劑量，但在鼻前庭內有相似於皮膚組織之上皮細胞，具有過濾並保護組織的功能，故該部位不列入呼吸危害評估中，而以沉降劑量偏高或需特別關注區塊進行評估。

四氯異苯腈測試體系 MucilAir™源自於人體捐贈者從鼻腔氣管及支氣管所分離出之初代上皮細胞，MucilAir™分化成熟後組成包括基底細胞、纖毛細胞及黏液細胞 (mucus cell)，黏液細胞大多指的是杯狀細胞。由跨上皮電阻 (trans-epithelial electrical resistance, TEER)、乳酸去氫酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 及螢光染劑代謝 (resazurin metabolism) 試驗三項作為最終評估指標。螢光染劑代謝試驗與 MTT 細胞存活率實驗的原理相似。TEER 試驗之原理：兩細胞間基本上可構成連液體也不易穿透的緊密區域，在身體許多組織皆有此特性，離子則依賴特定之專屬通道進入至細胞內腔，正常細胞通常呈現緊密相連狀態，此時測得電阻在相對高點，但細胞經過某些原因導致受損時，內部結構遭受破壞，組織間連結鬆散，電阻因

此便會下降，可以電阻數值評斷細胞受損程度。類似的試驗方式亦應用於白兔眼刺激動物替代試驗，OECD TG494 中，係透過使用細胞株以跨上皮電阻當作評估是否造成眼損傷或刺激的指標<sup>(25)</sup>。LDH 試驗之原理：乳酸去氫酶為體內代謝醣類相關的細胞質酵素，廣泛存在於肝、心、腎、肌肉及肺中，當其他發炎反應、疾病致使細胞膜受損時，乳酸去氫酶會由胞內釋放至胞外，在活體動物當中，亦常以肺臟支氣管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 作為樣品偵測乳酸去氫酶數值，判斷對肺部的損傷程度。透過源自不同人體捐贈者之 MucilAir™ 以不同濃度待測物多重複進行上述三項評估指標之試驗，求得最後綜合之 BMDL 值。

### 三、呼吸毒性替代試驗之呼吸暴露量計算

經由吸入或經口攝入途徑而顯現毒性的劑量是不等同，透過吸入途徑之毒性評估是指一特定濃度物質可進入至呼吸系統標的組織引發反應之劑量，實際的吸入量則是否引發毒性的關鍵因素。經由呼吸途徑之物質參考濃度 (reference concentration, RfC) 是指於特定時間內對人體吸入性暴露的估計，其一生中沒有明顯不利健康的影響。RfC 可源自於分析基準劑量下限值 (BMDL)、無可見毒害劑量 (NOAEL)、可觀察到不良反應之最低劑量 (LOAEL) 或其他推估起始劑量，加上不

確定因子或可變因子 (uncertainty/variability factors, UFs) 來反映數據使用的侷限性，若資料缺乏的情況下，亦可以使用口服暴露途徑之參考劑量推算。計算時須將試驗數據同物種間代謝差異、動物與人類之敏感差異、由 LOAEL 外推 NOAEL 數值及 28 天重複毒性試驗外推 90 天重複毒性試驗結果等納入評估<sup>(32)</sup>。BMDL 計算被開發作為代替 NOAEL/LOAEL 使用已多年，受限於 NOAEL 數值僅能由活體試驗結果取得，對於一群劑量組別大多僅評估單一反應指標，且會隨實驗設計的不同、動物反應評斷及每組別動物樣品隻數多寡，致使 NOAEL 有高低值不一致的情況，一般來說，使用較少的動物數量進行試驗，統計的敏感性相對下降，導致有較高 NOAEL 數值產生。BMDL 方法則不受試驗個人主觀的影響，可同時選擇多項評估指標作綜合評估<sup>(32,36)</sup>。

以先正達公司之農藥四氯異苯腈為計算案例，綜合體外細胞試驗選定可代表毒性反應之 BMDL 值，人類等效濃度 (human equivalent concentration, mg chlorothalonil/L air)=BMDL 值 (mg chlorothalonil/cm<sup>2</sup>) ÷ 測試氣膠於標的區域表面積沉降量 (mg aerosol/cm<sup>2</sup>) × 計算流體力學預測使用之氣膠濃度 (mg aerosol/L air)。人類等效濃度依照每分鐘呼吸次數、暴露時間及暴露者體重計算出人類等效劑量 (human equivalent dose, mg/kg/day)，其可視為暴露期間物質以呼

吸方式進入人體不會產生毒性反應的最高濃度。最後再依農藥噴灑方式、施用作物、噴灑速度、施作面積、單位重量中主要成分所含重量及暴露時間等因子，算出實際在田間以呼吸途徑之暴露量。暴露限值 (margin of exposure, MOE) 則是以人類等效劑量除以田間呼吸暴露量，一般來說暴露限值通常大部分以 100 為基準，大於 100 者視為物質暴露量未達到危害程度，但暴露限值訂定源自於考量所有不確定因子而得出，故基準並非每種物質皆能固定採用 100。上述農藥四氯異苯腈之案例以計算流體力學配合體外試驗，可減低因種間差異或缺 NOAEL 數值/暴露時間所衍生出的不確定因子，並優化更具貼近人類實際使用現況之呼吸暴露安全性評估。

## 總結

無論是食品、化學品、農藥或其他相關衍生物，經由攝入、接觸或吸入後都可能有其危害風險，當暴露超量則使身體產生不良反應，故有參考劑量或濃度 (reference dose/concentration, RfD/RfC) 及可接受每日攝取量 (acceptable daily intake, ADI) 的標準訂定，以把關不至於對人體產生毒害的程度。這些數據大多來自於活體動物實驗，而在生理上動物與人類仍具有差異性，甚至對物質的感受敏感程度也不同。以農藥為例，登記申請所需繳交活體試驗報告的項目繁多，包含長時間動物測試，使用動物數量非常龐大，需

要的人力及時間的成本大增，而試驗中選用的動物包含多項物種與品系，其生理特徵不同，對於判定毒性結果實須要更充足的專業知識。在國際上，由於呼吸中、長期的動物暴露試驗數據取得不易，常以口服試驗外推呼吸途徑之結果數值<sup>(32)</sup>，兩途徑暴露後代謝及致毒機制不盡相同，資料的取代與施用者的呼吸安全依然備受質疑。雖然可依物質之特性提出申請減免呼吸毒理試驗，但仍須經過專家們的全盤考量評估，只要會造成呼吸暴露產生毒性反應的疑慮時，則會要求提供額外的試驗補充說明。在呼吸替代試驗未蓬勃發展前，針對呼吸暴露有風險危害疑慮者，動物之重複呼吸暴露仍是重要的參考依據，因由其他暴露途徑推估呼吸暴露風險，結果往往數據充滿許多不確定性而與現況不符。有別於口服試驗，呼吸中、長期的動物暴露試驗其所花費的人力、時間甚至於昂貴設備的成本，高於口服試驗太多，加上試驗本身會受限於設備及物質本身物化條件，是導致呼吸重複暴露試驗報告數量較少的原因之一。在吸入性的暴露評估上，許多人總是認為只要穿上防護設備就能達到對危害的阻隔，並沒有正視當卸下防護裝備那一刻，物質在吸入後對呼吸系統及其他組織的影響。現今國際動物保護意識抬頭，為遵行 3R 原則，許多國家紛紛提倡以漸進式不使用動物進行試驗為目標，以替代方法取得對產品安全無危害的保證。替代試驗的實踐長期下來確實能節省許多的成本，但綜觀國際，在呼吸暴露試

驗之替代遠遠不如其他途徑之毒性測試而停滯不前，細數其原因不外乎是因為呼吸系統之細胞組成種類繁多，且其中還包括一連串複雜度高的免疫反應現象，暴露後可能造成呼吸道或是全身之多樣性反應，再者暴露所吸入粒子顆粒大小關乎後續毒性的表現，目前雖無真正針對呼吸毒性之替代試驗被驗證並發行成正式指引，許多透過健康危害途徑結合非動物的測試逐漸發展中，可作為釐清物質呼吸暴露危害之佐證資料<sup>(26)</sup>。以臺灣目前農藥登記申請的情況，僅憑藉物質特性及粒子大小或輔以橋接方式 (data bridging) 推算毒性，有時仍無法明確判斷動物呼吸毒理試驗可否減免，評估上依然有疑慮及考量，而實際的試驗中也有大粒子高比例停留於鼻腔便造成毒性影響的案例，故非動物試驗資料的額外提交有助於精確掌握測試物質的毒性趨向，若能配合藥物動力學或計算流體力學預知物質作用於呼吸道或全身的情形，以補足物質在原先動物試驗中略過肝臟等代謝作用而影響中樞神經系統的潛能，可幫助了解後續動物實驗的設計及進行的必要性。試驗動物的取代往往需要大量資料證明替代試驗或預測資訊的可靠性，並非只憑藉單一數據便可斷然評估對人類之健康危害，可能是費時費力而最後的結果不盡理想。但動物的替代試驗及以電腦模擬預測物質 (In silico model) 之毒性危害已是現今國際趨勢<sup>(6)</sup>，亦可針對物質造成毒性的機制做更細緻的評估，持續追蹤技術發展與選擇適合的評估方法才能

反映試驗代表的毒性意義，達到保護人體健康的目的。

## 引用文獻

1. 行政院農業委員會。2019。農藥標示管理辦法。農防字第 1081489093 號。
2. 行政院農業委員會。2021。農藥理化性及毒理試驗準則。農防字第 1101490216 號。
3. 衛生福利部。2018。化粧品衛生安全管理法。華總一義字第 10700045851 號。
4. Abdelkader, H., Pierscionek, B., Carew, M., Wu, Z., and Alany, R. G. 2015. Critical appraisal of alternative irritation models: Three decades of testing ophthalmic pharmaceuticals. *Br. Med. Bull.* 113: 59-71.
5. Balls, M. and Hellsten, E. 2000. Statement on the validity of the local lymph node assay for skin sensitisation testing. ECVAM Joint Research Centre, European Commission, Ispra. *ATLA*. 28: 366-367.
6. Bassan, A., Alves, V. M., Amberg, A., Anger, L. T., Beilke, L., Bender, A., Bernal, A., Cronin, M. T. D., Hsieh, J. H., Johnson, C., Kemper, R., Mumtaz, M., Neilson, L., Pavan, M., Pointon, A., Pletz, J., Ruiz, P., Russo, D. P., Sabnis, Y., Sandhu, R., Schaefer, M., Stavitskaya, L., Szabo, D. T., Valentin, J. P., Woolley, D., Zwickl, C., and Myatt, G. J. 2021. *In silico* approaches in organ toxicity hazard assessment: Current

- status and future needs for predicting heart, kidney and lung toxicities. *Comput. Toxicol.* 20: 100188.
7. Bennet, T. J., Randhawa, A., Hua, J., and Cheung, K. C. 2021. Airway-on-a-chip: Designs and applications for lung repair and disease. *Cells.* 10: 1602.
  8. Costa, D. L. 2008. Alternative test methods in inhalation toxicology: Challenges and opportunities. *Exp. Toxicol. Pathol.* 60: 105-109.
  9. Fisher, R. L., Smith, M. S., Hasal, S. J., Hasal, K. S., Gandolfi, A. J., and Brendel, K. 1994. The use of human lung slices in toxicology. *Hum. Exp. Toxicol.* 13: 466-471.
  10. Flack, S., Hinderliter, P., Charlton, A., Parr-Dobrzanski, R., Ramanarayanan, T., Szarka, A., Wolf, D. C., and Hofstra, A. 2018. Chlorothalonil a source to outcome approach for inhalation risk assessment final report. Document number EPA-HQ-OPP-2018-0517-0007.
  11. Harkema, J. R. 1991. Comparative aspects of nasal airway anatomy: Relevance to inhalation toxicology. *Toxicol. Pathol.* 19: 321-336.
  12. Harkema, J. R., Carey, S. A., and Wagner, J. G. 2006. The nose revisited: A brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicol. Pathol.* 34: 252-269.
  13. Hess, A., Wang-Lauenstein, L., Braun, A., Kolle, S. N., Landsiedel, R., Liebsch, M., Ma-Hock, L., Pirow, R., Schneider, X., Steinfath, M., Vogel, S., Martin, C., and Sewald, K. 2016. Prevalidation of the ex-vivo model PCLS for prediction of respiratory toxicity. *Toxicol. In Vitro.* 32: 347-361.
  14. Jackson, G. R. Jr., Maione, A. G., Klausner, M., and Hayden, P. J. 2018. Prevalidation of an acute inhalation toxicity test using the EpiAirway *in vitro* human airway model. *Appl. In Vitro Toxicol.* 4: 149-158
  15. Kramer, G. F., Lowe, K. M., and Rodriguez, C. 2010. Chlorothalonil. Registration request for use on low-growing berry subgroup 13-07G; bushberry subgroup 13-07B; onion, bulb subgroup 3-07A; and onion, green subgroup 3-07B. Human-health risk assessment. Document number EPA-HQ-OPP-2018-0517-0003.
  16. Lacroix, G., Koch, W., Ritter, D., Gutleb, A. C., Larsen, S. T., Loret, T., Zanetti, F., Constant, S., Chortarea, S., Rothen-Rutishauser, B., Hiemstra, P. S., Frejafon, E., Hubert, P., Gribaldo, L., Kearns, P., Aublant, J.-M., Diabate', S., Weiss, C., de Groot, A., and Kooter, I. 2018. Air-liquid interface *in vitro* models for respiratory toxicology research: Consensus workshop and recommendations. *Appl. In Vitro*

- Toxicol. 4: 91-106.
17. Maehle, A. H. 1992. Kritik und verteidigung des tierversuchs. die anfänge der diskussion im 17. und 18. Jahrhundert, 1st ed. Franz Steiner Verlag, Stuttgart, German. 205 pp.
  18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2009. Test no. 403: Acute inhalation toxicity. OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4. OECD, Paris, France. 19 pp.
  19. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2009. Test no. 436: Acute inhalation toxicity-acute toxic class method. OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4. OECD, Paris, France. 27 pp.
  20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2012. The adverse outcome pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding to proteins. Series on testing and assessment no.168. OECD, Paris, France. 105 pp.
  21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2016. Guidance document on considerations for waiving or bridging of mammalian acute toxicity tests. Series on testing and assessment no. 237. OECD, Paris, France. 19 pp.
  22. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2017. Revised guidance document on developing and assessing adverse outcome pathways. Series on testing and assessment no. 184. OECD, Paris, France. 32 pp.
  23. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2018. Guidance document on inhalation toxicity studies. Series on testing and assessment no. 39. OECD, Paris, France. 106 pp.
  24. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2018. Test no. 433: Acute inhalation toxicity: Fixed concentration procedure. OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4. OECD, Paris, France. 21 pp.
  25. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2023. Test no. 491: Short time exposure in vitro test method for identifying i) chemicals inducing serious eye damage and ii) chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage. Section 4. OECD, Paris, France. 15 pp.
  26. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2022. Case study on the use of an integrated approach for testing and assessment (IATA) for new approach methodology (NAM) for refining inhalation risk assessment from point of contact toxicity of the pesticide, chlorothalonil. Series on testing and assessment no. 367. OECD, Paris, France.

- 69 pp.
27. Pauluhn, J., and Machemer, L. H. 1998. Assessment of pyrethroid-induced paraesthesias: comparison of animal model and human data. *Toxicol. Lett.* 96-97: 361-368.
  28. Pauluhn, J., and Mohr, U. 2000. Inhalation studies in laboratory animals-current concepts and alternatives. *Toxicol. Pathol.* 28: 734-753.
  29. Pest Management Regulatory Agency (PMRA). 2013. Guidance for waiving or bridging of mammalian acute toxicity tests for pesticides. PMRA, Ottawa, Canada. 12 pp.
  30. Phalen, R. F., Hinds, W. C., John, W., Lioy, P. J., Lippmann, M., Mccawley, M. A., Raabe, O. G., Soderholm, S. C., and Stuart, B. O. 1988. Particle size-selective sampling in the workplace: Rationale and recommended techniques. *Ann. Occup. Hyg.* Issue inhaled\_particles\_VI. 32: 403-411.
  31. Rusche, B. 2003. The 3Rs and animal welfare- Conflict or the way forward. *ALTEX* 20: 63-76.
  32. Salem, H., and Katz, S. A. 2006. *Inhalation toxicology*, 2nd ed. Taylor & Francis, Boca Raton, USA. 1034 pp.
  33. Shrestha, J., Razavi Bazaz, S., Aboulkheyr Es, H., Yaghobian Azari, D., Thierry, B., Ebrahimi Warkiani, M., and Ghadiri, M. 2020. Lung-on-a-chip: The future of respiratory disease models and pharmacological studies. *Crit. Rev. Biotechnol.* 40: 213-230.
  34. United Nations. 2023. Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS), 10th ed. United Nations, New York, USA. 592 pp.
  35. United States Environmental Protection Agency (US EPA). 2002. Health effects test guidelines OPPTS 870.1000 acute toxicity testing-background. US EPA, Washington, DC, USA. 9 pp.
  36. United States Environmental Protection Agency (US EPA). 2012. Benchmark dose technical guidance. US EPA, Washington, DC, USA. 99 pp.
  37. United States Environmental Protection Agency (US EPA). 2012. Guidance for waiving or bridging of mammalian acute toxicity tests for pesticides and pesticide products (acute oral, acute dermal, acute inhalation, primary eye, primary dermal, and dermal sensitization). US EPA, Washington, DC, USA. 17 pp.
  38. United States Environmental Protection Agency (US EPA). 2020. New approach methods work plan: Reducing use of animals in chemical testing. US EPA, Washington, DC, USA. EPA 615B2001.
  39. Viana, F., O'Kane, C. M., and Schroeder, G. N. 2021. Precision-cut lung slices: A powerful ex vivo model to investigate

- respiratory infectious diseases. *Mol. Microbiol.* 117: 578-588.
40. Witschi, H. P. and Brain, J. D. 1985. *Toxicology of inhaled materials*, 1st ed. Springer Berlin, Heidelberg, Germany. 556 pp.

# Current Status of International In Vitro Inhalation Toxicity Test Methods Used in Pesticide Registration Applications of Future

Chia-Wen Hung<sup>1\*</sup>, Hsiao-Ching Chen<sup>1</sup>, Wei-Ren Tsai<sup>1</sup>

## Abstract

Hung C. W., Chen H. C., and Tsai W. R. 2024. Current status of international In vitro inhalation toxicity test methods used in pesticide registration applications of future. *Taiwan Pestic. Sci.* 16: 59-80.

An Inhalation toxicity test is required to register a new active ingredient of pesticides. If concerns about respiratory tract irritation or injury exist, the active ingredient may need to undergo further subacute or subchronic inhalation toxicity studies. Such studies seek to determine the dose-toxic effects caused by substance inhalation. However, inhalation toxicity tests involve a higher number of experimental variables and uncertainties than oral and dermal administration tests. For example, exposure concentration and particle size must be considered in inhalation toxicity tests, and varying instrument performance as well as the physical and chemical properties of the substances themselves can lead to different result. Intratracheal instillation administration and other methods which estimate inhalation toxicity via oral tests have been adopted to overcome testing difficulties involving (1) substances that can't be aerosolized (2) low exposure concentration. More recently, many in vitro tests and in silico predict models have also been developed, driven by international concepts to animal welfare as well as various test guidelines that reduce animal to use and adopt more humane assessment endpoints. This article discusses the difficulties of assessing inhalation toxicity and the current development status of alternative tests. The fungicide pesticide chlorothalonil was used as an example to replace animal testing for inhalation toxicity assessment. The data of field particle size, computational fluid dynamics (CFD), in vitro

---

Accepted: April 8, 2024.

\* Corresponding author, E-mail: jppmmay@acri.gov.tw

<sup>1</sup> Agricultural Chemicals Research Institute, Ministry of Agriculture, Taichung

tests and the benchmark dose lower bound (BMDL) were obtained to address the research gap of acute inhalation toxicity tests replacing with long-term tests. The assessment content closely matched to actual situations in the field and reduced uncertainty between animal and human species. This approach is in line with international trend of employing suitable alternative test methods to provide hazard data for substances with suspected to have a high risk of inhalation exposure.

**Key words:** pesticides, alternative tests, inhalation toxicity