

# 本土輕症矮南瓜黃化嵌紋病毒對哺乳類動物之安全性研究

張敬宜<sup>1\*</sup>、簡肇均<sup>1</sup>、楊予霈<sup>1</sup>、吳偉嘉<sup>1</sup>、蔡韙任<sup>1</sup>

## 摘要

張敬宜、簡肇均、楊予霈、吳偉嘉、蔡韙任。2021。本土輕症矮南瓜黃化嵌紋病毒對哺乳類動物之安全性研究。臺灣農藥科學 11 : 81-103。

高安全性的生物農藥防治植物病蟲害是農藥管理趨勢，而研發具疫苗特性的病毒類微生物製劑是交互保護防治之策略。其中矮南瓜黃化嵌紋病毒 (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV) 是經濟上影響瓜類作物最重要的病毒之一，針對此病毒防治國內已開發且近成熟的輕症型突變株 (ZYMV AC, ZAC)，可誘導植物產生對強毒力病毒株之抗性，也就是可對野生型病毒提供良好的交互保護效果。本研究主要參考國際上對病毒類微生物製劑安全評估所需的關鍵性毒理試驗，進行 ZAC 病毒對大小鼠、兔子等哺乳類動物及對猴腎細胞是否具急毒性、致病性或過敏性及感染性。結果大鼠口服與肺急毒性／致病性試驗中，發現動物均無異常臨床症狀或死亡情形發生，大體肉眼檢查亦均屬正常，且在投予病毒 1 天後動物體內已無檢出病毒，顯示 ZAC 病毒對大鼠不具口服與肺急毒性、感染性及致病性；由體外細胞培養測試亦顯示 ZAC 病毒對哺乳類動物細胞確實不具潛在毒性及感染性。另進行大鼠皮膚急毒性、白兔眼刺激性及小鼠皮膚過敏性試驗，顯示 ZAC 病毒之皮膚急毒性 LD<sub>50</sub> 為 >5,000 mg/kg bw (屬於低毒等級)、不具眼刺激性及不具皮膚過敏性；同時針對案例探討國際間對此性質之病毒類微生物製劑毒理試驗登記管理要求。綜合以上研究，在不同暴露途徑下，顯示 ZAC 病毒對人畜相對安全，與人類健康風險相關實驗資料結果，可支援開發成為符合國際要求之病毒類微生物製劑商品化佐證資料，並提供主管機關對此類微生物製劑安全管理之參考。

**關鍵詞：**矮南瓜黃化嵌紋病毒、交互保護、病毒類微生物製劑、毒理試驗資料要求、農藥登記

---

接受日期：2022 年 1 月 3 日

\* 通訊作者。E-mail: jinyi@tactri.gov.tw

<sup>1</sup> 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

## 緒言

隨著食品安全與環保意識的抬頭，高安全性的生物農藥防治植物病蟲害是農藥管理趨勢，可減少及取代部份化學農藥的使用，進而降低病蟲害對化學農藥抗藥性的產生及環境之污染，並減少對非目標生物的衝擊和生態平衡之破壞等問題<sup>(8)</sup>。依據我國農藥管理法之「農藥理化性及毒理試驗準則」<sup>(5)</sup>，生物農藥依其性質與來源可區分為天然素材 (natural products)、微生物製劑 (microbial formulations) 及生化製劑 (biochemical formulations) 三類，所需的毒理試驗項目要件不同。

矮南瓜黃化嵌紋病毒 (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)，於 1973 年在義大利首次分離出，並於 1981 年首次命名，臺灣也於 1985 年發表分離與鑑定報告，是經濟上影響瓜類作物最重要的病毒之一<sup>(10, 15, 23)</sup>；ZYMV 為 *Potyviridae* 科 *potyvirus* 屬，主要透過蚜蟲以非持續性方式傳播，造成瓜類作物葉面出現黃色斑紋、捲葉，並隨著植株包含果實的大小皺縮，而影響 ZYMV 病毒之致病性與鞘蛋白 (coat protein, CP) 及協同性蛋白 (helper component-protease, HC-Pro) 息息相關<sup>(10, 15)</sup>，且參與透過蚜蟲傳播的交互作用<sup>(9, 21, 33)</sup>。

中興大學葉錫東教授團隊於 2000 年發表以異質結合性移動分析法 (heteroduplex mobility assay, HMA)，比較

臺灣 ZYMV 的 5 株分離株與國外不同地理區於基因序列上的差異及親緣關係<sup>(25)</sup>，並篩選其中的強毒力病毒 TW-TN3 作為主要研究株，將其 cDNA 片段置入質體中，透過接種至矮南瓜與奎藜上，可使之產生相對應之病症，設計出一個具感染力之病毒質體<sup>(26)</sup>，之後進一步以定點突變方式將 ZYMV TW-TN3 分離株之 HC-Pro 基因上與強毒力病毒相關的 2 個關鍵胺基酸改變，產生了在矮南瓜葉片上表現輕微嵌紋病徵之輕症病毒系統 (ZYMV AC, ZAC)，可在矮南瓜植株上提供高度交互保護作用 (cross-protection)，也就是以病毒賦予宿主的保護，來防止強毒力病毒的侵害<sup>(27)</sup>，並於後續的蚜蟲傳播病毒能力試驗中，證實輕症病毒 ZAC 本身因 HC-Pro 基因定點突變的影響，同時喪失透過蚜蟲傳播的能力<sup>(13)</sup>。而交互保護的概念由 McKinney 學者於 1929 年提出<sup>(29)</sup>，主要防治菸草嵌紋病毒 (tobacco mosaic virus, TMV)，內容指出當宿主植物被病毒感染時，其對第二個相關的病毒株之感染具有抗性反應。換言之就是接種輕症病毒株誘導植物產生對強毒力病毒株之抗性。此技術在 1972 年開始已廣泛應用在防治 TMV 病毒<sup>(35)</sup> 外，之後也陸續應用在柑橘萎縮病毒 (citrus tristeza virus, CTV)<sup>(30)</sup>、木瓜輪點病毒 (papaya ringspot virus, PRSV)<sup>(44)</sup>、以及 ZYMV 病毒<sup>(22, 24)</sup>。因此，本研究對象主要以定點突變 ZYMV TW-TN3 本土分離株之 HC-Pro 基因所獲得的輕症型突變株 ZAC，可對野生型病毒提供良好

的交互保護效果，且於溫室條件下試驗多年具有長期的穩定性。此外，ZAC 病毒之寄主範圍狹窄，具宿主專一性，僅侷限於葫蘆科植物，同時其蚜蟲傳播能力已被移除，不會有病毒擴散之風險<sup>(13)</sup>。綜合上述這些特性皆顯示 ZAC 病毒適合做為開發瓜類病毒疫苗之潛力。

另一方面，此類病毒疫苗屬於我國農藥管理法中微生物製劑之範疇，未來若要商品化登記上市，其所需的毒理資料須符合我國「農藥理化性及毒理試驗準則」附表三與優良實驗室操作規範 (Good Laboratory Practice, GLP) 要求，以釐清研發產品是否對人體健康有潛在危害及對環境非目標生物造成之衝擊影響，其中由於 ZAC 屬於植物病毒具宿主專一性，無法離開宿主存活，主要於育苗期使用與用量極少，且使用時需藉由機械式接種傳播無法自行感染植物細胞，亦無法由蚜蟲傳播至環境，對非目標生物及環境暴露風險極低。因此，本研究主要參考國際上對具疫苗特性的病毒類微生物製劑安全評估所需的關鍵性毒理試驗項目，用以評估 ZAC 病毒對大小鼠、兔子等哺乳類動物及對猴腎細胞是否具急毒性、致病性或過敏性及感染性、並探討國際間對具疫苗特性的病毒類微生物製劑之管理，一方面可同時建立較完整與符合國際要求之病毒類微生物製劑產品對溫血動物之安全評估報告，以提供主管機關對此類微生物製劑安全管理之參考，並可加速較安全的植物保護資材的商品化登記。

## 材料與方法

### 一、試驗動物

5 週齡 Sprague-Dawley (SD) 品系雌、雄大鼠、12 週齡 New Zealand White (NZW) 品系雌性白兔及 7 週齡 BALB/c 品系雌性小鼠分別購自樂斯科生物科技股份有限公司、家畜衛生試驗所及財團法人國家實驗動物中心，並飼養於藥毒所動物房觀察至少 1 週，待達投藥適當週齡取體重相近健康動物進行試驗。試驗動物除口服及肺急毒性與致病性試驗在投藥處理前隔夜禁食外，平時給予充足之飼料 (Lab Diet® 5001 Rodent diet, PMI, IN, USA) 及飲水。動物飼育室之進氣經由初級、中級及高效能濾網過濾空氣，控制溫度範圍為 19-25°C，相對溼度範圍為 40-70% 及 12 小時光/12 小時暗之光照週期。所有實驗動物之使用操作均依照「實驗動物照護及使用指引」<sup>(6)</sup> 之規範進行，且經藥毒所實驗動物照護及使用小組 (TACTRI-IACUC) 審核通過。

### 二、供試病毒

經 ZAC 感染的矮南瓜罹病葉片 (每 0.01g 的葉片帶有 6.5-8.2 ng 的 ZAC 病毒鞘蛋白)，由中興大學葉錫東教授團隊提供。試驗前將罹病葉片以每公克加 4 倍體積量之磷酸鹽緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) 並於冰上以均質機均質

(8,000 rpm 均質 20 秒，休息 10 秒，重複 3 次)，最後經 2 層紗布過濾，收取過濾後即得病毒懸浮液，後續進行動物毒理試驗與分析，而於藥毒所 GLP 實驗室利用酵素連結免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 檢測病毒罹病葉中病毒鞘蛋白含量約為 618.2-745.0 ng/g-tissue。

### 三、病毒檢測方法

病毒含量分析與動物檢體內病毒檢測方法，由中興大學葉錫東教授團隊建立及提供，主要以 ELISA 方法為主，動物檢體輔以反轉錄聚合酶連鎖反應 (reverse transcription- polymerase chain reaction, RT-PCR) 確認檢測結果。ELISA 方法利用標準品 (ZYMV-CP) 與鹼性磷酸酶抗體之呈色方法，最後以全光譜光學分析儀 (EpochT, BioTek, USA) 回推病毒含量。RT-PCR 則以市售套組 (iScript™ cDNA Synthesis Kit, Bio-Red, USA) 利用引子對 (pZCP-9350 及 mZCP-10164) 反轉錄 cDNA 後，再進行 PCR 增幅，反應條件為 94°C 30 秒，55°C 40 秒，72°C 1 分鐘為 1 循環重複 35 次，最後 72°C 10 分鐘結束，並使用 1% agarose gel 進行電泳分析。

### 四、動物毒理安全測試項目

依據測試物生物特性及使用方法，依序建立下列幾項毒理安全評估資料，每項

試驗均依循美國環境保護局 (United States Environmental Protection Agency, USEPA) (39, 40) 或經濟合作暨發展組織 (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) (32) 試驗指引操作，最後出具符合 GLP 規範之完整試驗報告。

#### (一)大鼠口服與肺急毒性／致病性試驗

參考 USEPA 885.3050 與 885.3150 試驗指引，SD 大鼠分別以 1 mL／隻與 0.1 mL／隻經由胃管 (Fine Science Tools, USA) 與氣管 (Hamilton 91072, USA) 灌注方式投予 ZAC 病毒懸浮液，於投予後第 1、3、7、14 及 21 天解剖 (每時間點雌雄各 3 隻)，對照組給予經滅菌處理之病毒，並於投予後第 21 天解剖雌、雄各 3 隻；氣管灌注方式則分別增加 1 組對照組 (雌、雄各 2 隻於第 1 天解剖) 及 2 組純葉片萃取液當負對照組 (同對照組隻數於第 1 及 21 天解剖，用於評估葉片組織萃取液本身對肺臟的影響)，各保留雌、雄各 3 隻不進行處理當空白組，並於最後 1 天一起解剖。期間觀察體重變化與臨床症狀，解剖時間點觀察臟器肉眼病變，必要時進行組織病理切片檢查 (若臟器出現明顯病變則進行組織切片)，並採集腦、心、肺、腎、脾、腸繫淋巴組織及糞尿等，以 ELISA 與 RT-PCR 偵測主要臟器及糞尿之病毒量，以瞭解病毒在動物體內的分佈與消長情形，最後評估其對大鼠急毒性、致病性及感染性。當病毒量隨投予天數增加

而減少甚至未檢出時，即可判定為無感染性或無致病性。

## (二)細胞培養測試

參考 USEPA 885.3500 試驗指引進行哺乳類動物細胞的潛在細胞毒性及感染性測試，主要將含有病毒之培養基（以 minimum essential media (MEM) 培養液稀釋病毒懸浮液 0.001 µg/mL）處理猴腎細胞 (*Cercopithecus aethiops* monkey kidney CV-1, ATCC number CCL-40) 1 小時 ( $2 \times 10^3$  cells/mL) 後，蒐集細胞經 trypan blue (sigma, USA) 染色，並以細胞計數儀 (TC20, Bio-Rad, USA) 計算其存活率，若大於 70%，則可接續進行聚落分析 (colony counting)，並於第 7、14 及 21 天以倒立顯微鏡 (CK30, Olympus, Japan) 觀察並計算聚落數，當無產生聚落現象則判定為無毒性反應；另 CV-1 細胞 ( $2 \times 10^6$  cells/flask) 經含有病毒之培養基處理 1 小時後，以 RT-PCR 方法進行病毒量之增減分析，以檢測病毒是否可於哺乳類細胞內造成感染及增殖。

## (三)大鼠皮膚急毒性試驗

參考 OECD 402 試驗指引，以我國法規最高測試劑量 (5,000 mg/kg bw)，採用強迫皮膚貼覆 24 小時方式一次塗敷 10 週齡 SD 雌性大鼠 3 隻 (先投予 1 隻動物，觀察 48 小時後未見明顯症狀，乃再投予

另 2 隻)，觀察第 0.5、2 及 4 小時及第 1-14 天之臨床症狀與存亡情形，至 14 天再進行大體解剖與臟器病變觀察，必要時進行組織病理切片檢查 (若臟器出現明顯病變則進行組織切片)，最後推估其導致半數動物死亡之劑量值 (median lethal dose, LD<sub>50</sub>)。

## (四)白兔眼刺激性試驗

參考 USEPA 870.2400 與 OECD 405 試驗指引，試驗前先給予白兔局部性麻醉及系統性止痛藥，試驗時取 0.1 mL ZAC 病毒懸浮液分別置入 3 隻白兔眼窩內 (另一眼為對照組，不加任何處理)，經處理 24 小時後，再以逆滲透水清洗眼睛，並於處理後第 1、24、48 及 72 小時以視網膜照相機 (Genesis-D, Kowa, Japan) 檢查眼睛受損情形，若在 72 小時還具刺激性，另需再 7、14 及 21 天繼續觀察，最終視結果並依照試驗指引之判定標準，紀錄刺激分數，並依刺激分數消失而開始恢復之天數判定刺激等級，若恢復天數為第 0 天判定為無刺激性，7 天內恢復為輕微刺激，21 天內為中度刺激，21 天仍具刺激分數則為嚴重刺激。

## (五)小鼠皮膚過敏性試驗

參考 OECD 442B 試驗指引，主要以小鼠局部淋巴結分析 (local lymph node assay, LLNA) 方法，分析淋巴結細胞增生

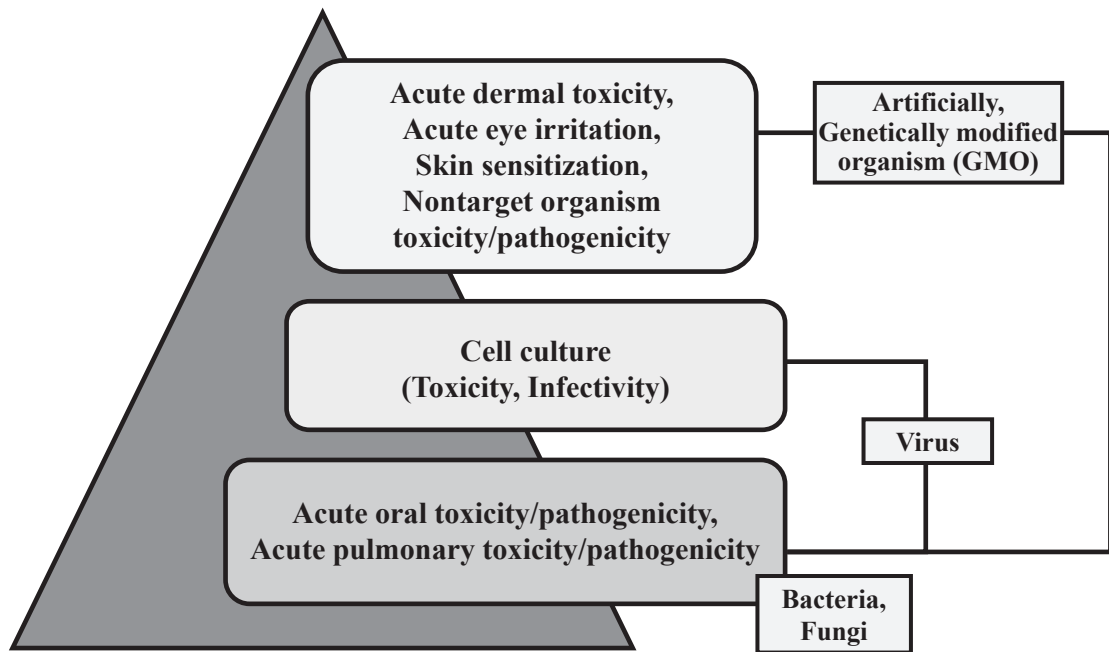
程度之刺激指數 (stimulation index, SI)，並以 DNCB (2,4-dinitro-1-chlorobenzene, CAS Number 97-00-7) 作為陽性對照物，試驗時連續 3 天各取 25  $\mu$ L 的試驗物 (處理組 100%、50%、25%) 塗抹於 11 週齡 BALB/c 品系雌性小鼠兩耳背部後 (每組 5 隻)，第 5 天每隻腹腔注射 5 mg 溴化去氧尿苷 (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)，第 6 天解剖採集耳下淋巴結並利用商業套組 (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Germany) 分析試驗物引發淋巴結細胞之增生程度，最後以全光譜光學分析儀 (EpochT, BioTek, USA) 檢測各樣品在發射波長 (emission wavelength, em) 370 nm 與參考波長 (reference wavelength, ref) 492 nm 之吸光值 (absorbance, ABS) 表現情形，再經由公式計算 BrdU 標定指數  $[(ABS_{em} - ABS_{blank_{em}}) - (ABS_{ref} - ABS_{blank_{ref}})]$ ，並求出各處理組之 SI 值 (處理組 BrdU 標定指數 / 溶劑對照組 BrdU 標定指數)，當 SI 值  $\geq 1.6$  時，表示具潛在皮膚過敏性反應。

## 結果

本研究乃依據我國農藥管理法之「農藥理化性及毒理試驗準則」<sup>(5)</sup>，針對國內自行開發之本土性微生物農藥產品登記上市所需之動物毒理資料要件，進行必備的動物安全性試驗。微生物種類可包括細菌、真菌、病毒及原生動物等，一般由自然界分離所得，亦可再經人為誘變、汰選或遺傳基因改造等人工品系改良。而微生

物農藥跟其他化學農藥不一樣的測試重點，在於須證明微生物對哺乳動物不具感染性與致病性，進而推估對人類健康風險低。因此，我國針對微生物製劑的毒理試驗項目明文規定「微生物自國內自然環境分離，且未經人為誘變或遺傳基因改造者，針對原體其毒理試驗項目為口服急毒性 / 致病性及肺急毒性 / 致病性」，其緣由是因既已存於自然環境中，可先經與既有文獻瞭解生物特性，對哺乳類動物及非目標生物不具致病性與不良反應的案例發生，顯示其對環境的友善度與人畜安全性較高，以致可豁免原體刺激性與過敏性以及原體非目標生物毒性資料。而微生物成品製劑原則上須繳交口服與皮膚急毒性、眼與皮膚刺激性、皮膚過敏性，應用在水生作物需再繳交成品水生物毒性，使用在蜜源或粉源作物則繳交蜜蜂成蟲接觸急毒性試驗，然而從其他成分的物质安全資料表，如為已知且對哺乳類動物或蜜蜂造成之毒性低者，得可豁免提供成品毒理試驗資料。

依據微生物種類可進一步區分本土微生物製劑原體毒理試驗項目要件層級上之差異如 (圖一) 所示，主要在歷史文獻背景資料佐證下未見不良影響前提下，則細菌與真菌類僅要求原體對大鼠口服急毒性 / 致病性與大鼠肺急毒性 / 致病性等 2 項試驗<sup>(7)</sup>，而病毒類需增加細胞培養測試，若為人為誘變、汰選或遺傳基因改造微生物者，得依個案需要增加皮膚急毒性、眼刺激性、皮膚過敏性及非目標生物急毒



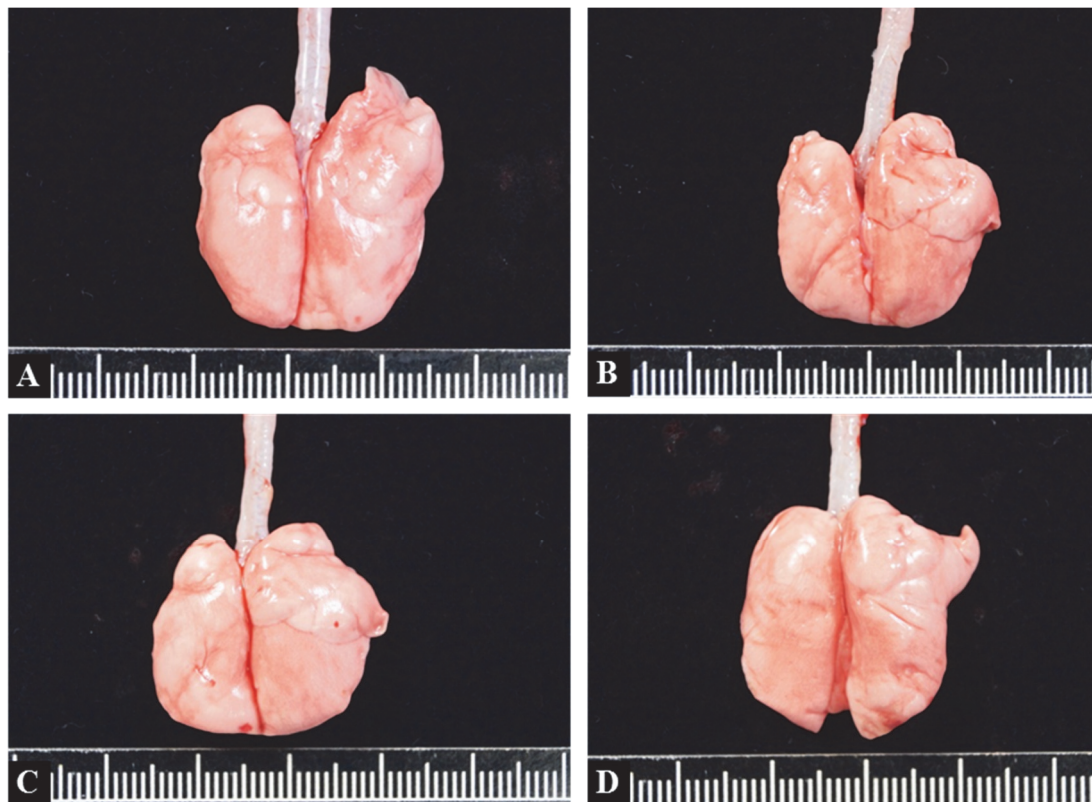
圖一、本土微生物農藥原體之毒理試驗登記要件。

**Fig. 1.** Toxicological data requirements for registration of indigenous microbial pesticides (technical grade).

性等。本研究評估對象顯示 ZAC 病毒是經基因編輯的產品，經上述要件評估原則，需繳交圖一所列全套毒性試驗，而本研究主要探討對哺乳類動物之安全性，依序進行前述材料與方法之 6 項動物毒性試驗。

首先在大鼠口服與肺急毒性／致病性試驗中，ZAC 病毒懸浮液分別以 154.6 ng CP／隻與 18.6 ng CP／隻經胃管或氣管投予供試大鼠，於 21 天觀察期間均無發現異常的體重變化、臨床症狀及死亡現象，且所有鼠隻臟器均未發現明顯肉眼病變（圖二，僅列出氣管灌注試驗之肺臟外觀

圖）；處理後第 1 天之肝、腎、脾、肺、心臟、腦、腸繫膜淋巴結、血液、糞便、尿液等檢體，經由 ELISA 與 RT-PCR 分析均未檢出 ZAC 病毒（表一、圖三），確認無法在動物體內複製增殖，以上結果顯示 ZAC 病毒對大鼠不具口服與肺急毒性、感染性及致病性。為進一步證明病毒確實不具毒性與感染性，進行體外細胞培養測試細胞毒性與感染性，其中在細胞毒性測試方面，CV-1 細胞在 ZAC 病毒 0.001 µg/mL 處理下，細胞之存活率約 87.4%，因此後續毒性試驗及感染性試驗病毒之攻毒劑量皆為病毒萃取液稀釋 1,000 倍，而攻毒後



圖二、大鼠氣管灌注 ZAC 病毒懸浮液後肺臟之肉眼檢查。

(A) 空白組動物肺臟第 21 天無明顯病變 (編號 26)，(B) 對照組動物肺臟第 1 天無明顯病變 (編號 45)，(C) 負對照組動物肺臟第 1 天無明顯病變 (編號 21)，(D) 處理組動物肺臟第 1 天無明顯病變 (編號 02)。(空白組：無投予任何物質，對照組：投予經高壓滅菌之 ZAC 病毒，處理組：投予 ZAC 病毒，負對照組：投予植物宿主萃取液)。

**Fig. 2.** Gross lung pathology following intratracheal administration of the ZAC virus in rats. (A) The blank group showed no gross lesions on day 21 (No. 26). (B) The control group showed no gross lesions on day 1 (No. 45). (C) The negative control group showed no gross lesions on day 1 (No. 21). (D) The treated group showed no gross lesions on day 1 (No. 02). (Blank: without dosing, Control: dosing with autoclaved ZAC virus, Treated: dosing with ZAC virus, Negative control: dosing with host extract).

表一、大鼠口服或氣管灌注 ZAC 病毒懸浮液後檢體之病毒 ELISA 檢測情形

**Table 1.** ELISA detection of specimens following oral or intratracheal administration of the ZAC virus in rats

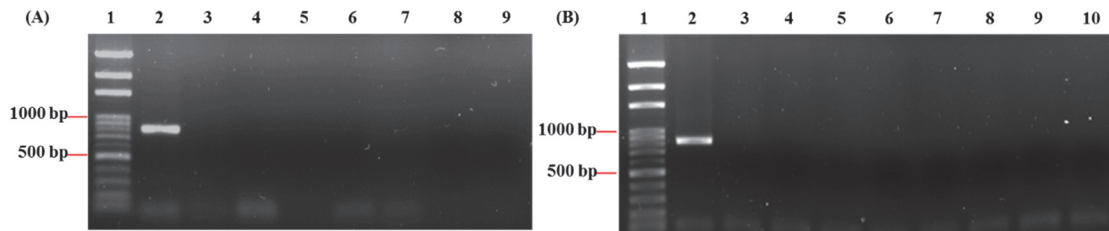
Specimens	No. of animal with tissue, feces and urine detected on different sacrificed days										
	1		3		7		14		21		
	Oral	IT <sup>1)</sup>	Oral	IT	Oral	IT	Oral	IT	Oral	IT	
Liver	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Kidney	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Spleen	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Lung	0/6	0/6	— <sup>4)</sup>	—	—	—	—	—	—	—	—
Heart	0/6	0/6	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Brain	0/6	0/6	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MLN <sup>2)</sup>	0/6	0/6	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Blood <sup>3)</sup>	0/6	0/6	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Feces	0/6	0/6	—	—	—	—	—	—	0/6	0/6	0/6
Urine	0/6	0/6	—	—	—	—	—	—	0/6	0/6	0/6

<sup>1)</sup> IT refers to intratracheal administration.

<sup>2)</sup> MLN refers to the mesenteric lymph node.

<sup>3)</sup> Sampled directly from the aorta artery.

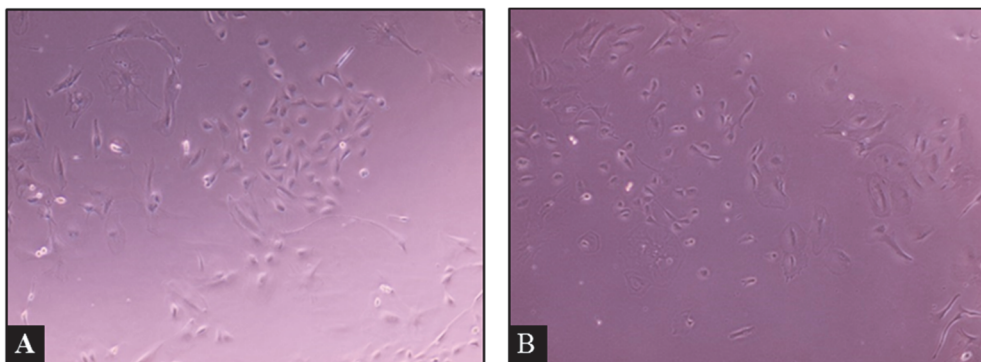
<sup>4)</sup> “—” indicates that the test had already been no detection on day 1; thus, no data were collected.



**圖三、**大鼠口服與氣管灌注 ZAC 病毒懸浮液後檢體之病毒 RT-PCR 檢測。(A) 為口服處理試驗，欄 1 為分子量標準液，欄 2 為正對照，欄 3 為肝臟檢體，欄 4 為腎臟檢體，欄 5 為脾臟檢體，欄 6 為血液檢體，欄 7 為糞便檢體，欄 8 為尿液檢體，欄 9 為負對照組。(B) 為氣管處理試驗，欄 1 為分子量標準液，欄 2 為正對照，欄 3 為腎臟檢體，欄 4 為肝臟檢體，欄 5 為肺臟檢體，欄 6 為脾臟檢體，欄 7 為血液檢體，欄 8 為糞便檢體，欄 9 為尿液檢體，欄 10 為負對照組。

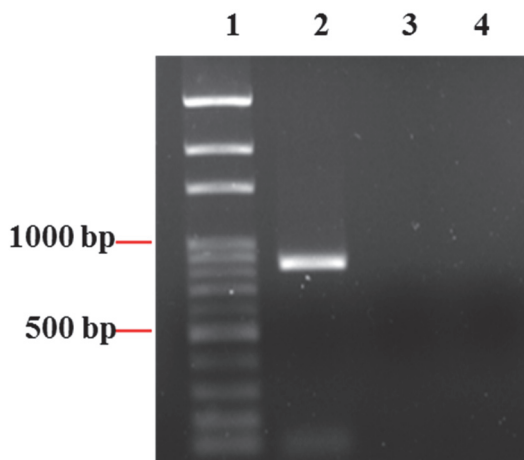
**Fig. 3.** RT-PCR detection of specimens following oral or intratracheal administration of the ZAC virus in rats. (A) Oral treatment: lane 1, marker; lane 2, positive control; lane 3, liver; lane 4, kidney; lane 5, spleen; lane 6, blood; lane 7, feces; lane 8, urine; lane 9, negative control. (B) Intratracheal treatment: lane 1, marker; lane 2, positive control; lane 3, kidney; lane 4, liver; lane 5, lung; lane 6, spleen; lane 7, blood; lane 8, feces; lane 9, urine; lane 10, negative control.

於第 14 天觀察時，不論處理組及對照組細胞皆無產生聚落現象 (圖四)；而在感染性測試方面，病毒攻毒 1 天後，經 RT-PCR 檢測病毒量，在 ZAC 病毒 0.001  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理下，經電泳顯示皆無 DNA 複製情形，顯現病毒於 CV-1 細胞內並不會增殖 (圖五)，因此 ZAC 病毒對哺乳類動物細胞不具潛在毒性及感染性。



圖四、ZAC 病毒對 CV-1 細胞之細胞毒性測試。為未經病毒處理 (100X)，(B) 為經病毒 0.001  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理 (100X)。

Fig. 4. Toxicity test of the ZAC virus in CV-1 cells. (A) Without treatment (100X), (B) Treatment with 0.001  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ZAC virus (100X).

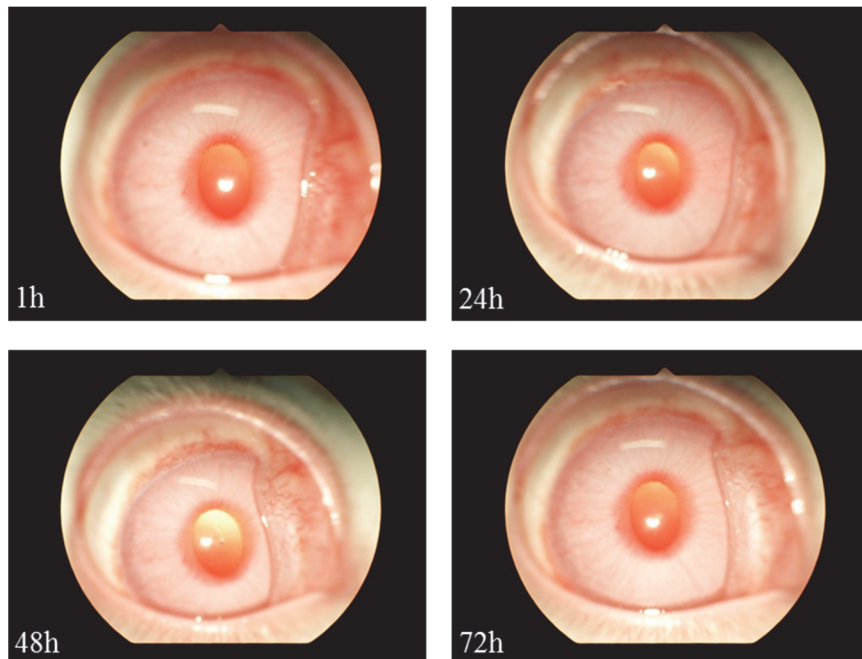


圖五、ZAC 病毒對 CV-1 細胞之感染性測試。欄 1 為分子量標準液、欄 2 為正對照組、欄 3 為負對照組及欄 4 為處理組。

Fig. 5. Infectivity test of the ZAC virus in CV-1 cells. Lane 1, marker; lane 2, positive control; lane 3, negative control; lane 4, treated group.

大鼠皮膚急毒性試驗，以最高測試劑量 5,000 mg/kg bw 塗抹 1 隻雌大鼠背部皮膚 24 小時，並觀察 48 小時發現並無死亡情形，乃再以相同劑量投予另 2 隻雌大鼠，所有試驗動物連續觀察 14 天。結果顯示雌鼠處理組之體重與體重增重均為正常增長之情形，且整個觀察期間均未出現明顯中毒症狀或死亡，動物死亡率為 0%。另試驗最後 1 天所有存活鼠隻經大體解剖肉眼觀察臟器亦無明顯的外觀病變。因此 ZAC 病毒對雌大鼠皮膚急毒性 LD<sub>50</sub> 值為大於 5,000 mg/kg bw，毒性分類屬於低毒等級。白兔眼刺激性試驗，主要取 0.1 mL ZAC 病毒懸浮液置入 3 隻白兔眼窩

下竇，經 24 小時後再以逆滲透水清洗眼睛，觀察投予後第 1、24、48 及 72 小時的動物眼刺激程度。結果所有兔隻於觀察期間無出現明顯眼睛刺激症狀（圖六），因此判斷 ZAC 病毒對兔隻不具眼刺激性。另外，小鼠皮膚過敏性試驗中，以小鼠耳朵經 ZAC 病毒塗抹後，皮膚過敏性試驗結果發現各處理組（25%、50% 及 100% 試驗物）之 SI 值分別為『1.04、1.18 及 0.44』，陽性對照組之 SI 值為 4.12，處理組淋巴結細胞增生比值均未達 1.6 倍以上，顯示 ZAC 病毒對小鼠不具潛在皮膚過敏性。



圖六、兔隻（編號 403）眼睛滴入 ZAC 病毒懸浮液後不同時間之眼刺激程度情形。

**Fig. 6.** Results of acute eye irritation tests in rabbits (No. 403) at different time points following treatment with the ZAC virus.

綜合以上，完成 ZAC 病毒之 6 項哺乳類動物毒理登記資料製備，彙整試驗結果與綜合性安全評估如 (表二) 所示，顯示 ZAC 病毒對大鼠不具口服與肺急毒性、感染性及致病性，急毒性分類屬於低毒等級；且體外細胞培養測試亦顯示 ZAC 病毒對哺乳類動物細胞不具細胞毒性及感染性。另皮膚急毒性 LD<sub>50</sub> 為 >5,000 mg/kg bw (屬於低毒等級)、不具眼刺激性及不具皮膚過敏性。其中靜脈注射試驗由本研究不同暴露途徑試驗顯示均未發現不良影響及在動物體內複製增殖之現象，加上植物病毒具宿主專一性的特性，顯示具感染細胞的風險低，應可免此項試驗，而皮膚刺激性試驗由於皮膚急毒性與眼刺激性試驗已顯示不具刺激性，可免此項試驗。因此，在任何暴露途徑下，ZAC 病毒對人畜相對安全，使用上無需特別加註刺激性或

過敏性之標示警語，與人類健康風險相關實驗資料結果可支援開發成為一微生物製劑商品化農藥之佐證資料。若未來進一步開發成具有製劑配方之商品，不管是如國際上已登記類似之粉劑或水懸劑，若其他成分安全性高，則可豁免提供成品毒理試驗資料。

## 討論

本研究主要依據我國現行農藥法規進行微生物農藥 ZAC 病毒登記上市所需之動物毒理試驗，而微生物農藥毒理試驗要求國際間相近卻不盡相同如 (表三) 所示 (4, 7, 11, 20, 34, 37, 38, 42)，其中微生物農藥申請種類明定可包括基因改造微生物者，有美國、加拿大、澳洲及我國等。毒理試驗要求項目美國、日本及我國最為相近，加拿

表二、ZAC 病毒之哺乳類動物毒理試驗結果與綜合安全評估

Table 2. Results of mammalian toxicity tests and overall safety evaluation of the ZAC virus

Test item	Test result	Overall evaluation
● Acute oral toxicity/pathogenicity	● No toxicity, infectivity and pathogenicity (Practically non-toxic)	Low risk of harm to mammals
● Acute pulmonary toxicity/pathogenicity	● No toxicity, infectivity and pathogenicity	
● Acute intravenous infectivity	● Waived (Non-infectious in different exposure routes)	
● Acute dermal toxicity	● LD <sub>50</sub> > 5,000 mg/kg bw (Practically non-toxic)	
● Eye irritation	● Non-irritating	
● Dermal irritation	● Waived (Non-irritating in eye irritation and acute dermal toxicity)	
● Skin sensitization	● Non-sensitizing	
● Cell culture	● Non-toxic and non-infectious	

表三、各國法規對微生物農藥毒理安全資料要求之比較<sup>1)</sup>**Table 3.** Comparison of toxicological data requirements for the registration of microbial pesticides in Taiwan and other countries<sup>1)</sup>

Item	Taiwan (2018)	USA (2007)	EU (2013)	FAO & WHO (2017) <sup>2)</sup>	Canada (2001)	Japan (2019)	Australia (2018)
Acute oral toxicity/pathogenicity	○	○	○	○	○	○	○
Acute dermal toxicity (pathogenicity)	○	○	○	○	○	○	○
Acute pulmonary toxicity/pathogenicity (Acute inhalation toxicity)	○	○	○	○	○	○	○
I.V., I.P. injection	△	○ (not virus)	○	△	○	○	○
Eye irritation	○	○	○	○	○	○	○
Dermal irritation	△	○	○	○	○	○	○
Skin sensitization	△	×	○	×	×	○	×
Hypersensitivity incidents	×	○	×	△ (operator and bystander)	○	△ (producer and operator)	○
Cell culture	△ (only virus)	○ (only virus)	△ <sup>⊗</sup>	△ <sup>⊗</sup>	○ (only virus)	○ (only virus)	×
Genotoxicity	×	×	○*	△*	△*	×	○*
Avian toxicity <sup>3)</sup>	○	○	○	○	○	○	△
Aquatic toxicity and bee toxicity <sup>3)</sup>	△	○	○	○	○	○	△
Other nontarget organism toxicity	△	△	△	△	△	△	△
Toxicity studies on metabolites (especially toxins)	×	×	△	△	△ (genotoxicity)	×	△
Environmental fate (in soil, water, air) <sup>3)</sup>	×	△	○	○	△	△	△
Other	△	△	△	△	△	△	△

<sup>1)</sup> ○: Required; △: Conditionally required; ×: Not required; ⊗: Required for viruses and viroids or specific bacteria and protozoa with intracellular replication; \*: Required for fungi and actinomycetes; ※: Required for certain extracts.

<sup>2)</sup> The FAO and WHO harmonized the latest registration guidelines issued in USA, OECD and EU regulations in 2017.

<sup>3)</sup> When exposure risk is low, data requirements may be waived, depending on the characteristics of the microorganism or use pattern. e.g., Data may not be required if the pesticide is used indoors.

大法規要求資料項目已與美國調和，其中要求需通報曾有人類過敏事件為必備的資料有美國、加拿大、日本及澳洲，且美國、日本及澳洲對於微生物農藥登記的人類健康相關毒性資料要件是依階層式方式，有安全疑慮時需進一步繳交較長期的毒性試驗等 2 階或 3 階資料，而各國對環境影響資料亦有階層式要求，有疑慮時須繳交環境流佈資料。我國考量市場規模與人力資源採趨於嚴謹考量，若在 1 階資料有明顯風險下未審核通過，則直接駁回申請。歐盟、加拿大及澳洲針對真菌類與放射菌類額外要求基因毒性試驗，並針對代謝物視情況要求進一步毒性報告。另外，非目標生物毒性要求在我國法規針對鳥類毒性是必要，水生物毒性是使用於水域作物必備，蜜蜂毒性則除對授粉昆蟲危害風險低（如室內使用等）之使用方法免提供試驗資料外，凡使用於田野環境中之蜜源植物時，須提供蜜蜂毒性資料。而各國對非目標生物毒性要求則依使用模式而有不同，當使用於陸域作物及水域作物必備，但可依使用方法推估危害風險低情形下，如室內使用，無暴露疑慮可免繳交該試驗資料。

由於各國法規不一致，聯合國糧食及農業組織（Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO）與世界衛生組織（World Health Organization, WHO）聯手調和 OECD<sup>(31)</sup>、美國<sup>(41)</sup> 及歐盟<sup>(37)</sup> 法規，並於 2017 年發行最新登記指引<sup>(20)</sup>，該指引明確指出微生物農藥登記

要求應較一般化學農藥減少，可依微生物特性或過去歷史案例以個案方式適度減免資料，甚至接受提交佐證資料。針對非目標生物毒性與環境影響之要求，指引中分為本土性與非本土性微生物兩類有不同層面考量，非本土環境中的微生物種類，由於國內的非目標生物從未暴露過，認為風險層級較高，因此，本土性微生物可依其使用量（低於自然環境背景值或相近）或環境持久性（persistence）資料（證明微生物不會持續存在）佐證下適度減免毒性資料。而對於微生物代謝物的毒性試驗不一定要依化學農藥要件要求，而是視情況需要指定（如潛在毒物物質必備），只要能釐清其是否具危害性。另外，指引提到動物過敏性試驗不適合微生物測試，應著重其他成分之安全性以及施用者與旁觀者進行暴露風險評估時，是否引起過敏事件等。

本研究目前完成 ZAC 輕症病毒之哺乳類動物毒理登記需求資料，並與國際間相同性質且已登記在美國、日本及歐盟的植物病毒產品進行繳交資料之比對如（表四），其中在美國與歐盟登記的 PV-593 (ZYMV-WK) 弱病毒株為自然環境汰選<sup>(16, 41)</sup>，使用在苗期葫蘆科作物，其毒理資料不管是人類健康相關或環境相關之資料均豁免，也由於預期不會增加對人類和環境的風險，無須訂定殘留容許量，其資料豁免理由包括 (1) 對於農民、消費者甚至研究學者常規的暴露，顯示天然存在的植物病毒並不會對哺乳動物的健康造成任

表四、ZAC 病毒與國際相同性質登記病毒繳交毒理資料要求之比較<sup>1)</sup>**Table 4.** Comparison of toxicological data requirements for the ZAC virus and other registered viruses in multiple countries<sup>1)</sup>

Item	ZYMV ZAC	ZYMV-WK PV-593	ZYMV-2002	PepMV CH2 isolate 1906	PepMV CH2 isolate VC 1	PepMV CH2 isolate VX 1
	Taiwan (Not registered)	USA(2007) EU (2013)	Japan (2008)	EU (2015) USA(2018)	EU (2017)	EU (2017)
	gene editing	natural selection	artificial mutation	natural selection	natural selection	natural selection
Acute oral toxicity/ pathogenicity	○	waived	○	○	○	○
Acute dermal toxicity (pathogenicity)	○	waived	○	○	○	○
Acute pulmonary toxicity/pathogenicity (Acute inhalation toxicity)	○	waived	○	○	○	○
I.V., I.P. injection	waived <sup>2)</sup>	waived	○	×	evidence data	evidence data
Eye irritation	○	waived	○	×	×	×
Dermal irritation	waived <sup>2)</sup>	waived	○	×	○	○
Skin sensitization	○	×	○	waived <sup>3)</sup>	waived <sup>3)</sup>	waived <sup>3)</sup>
Hypersensitivity incidents	×	waived	×	×	×	×
Cell culture	○	waived	○	○	evidence data	evidence data
Genotoxicity	×	waived	×	○ (Ames test)	○ (Ames test)	○ (Ames test)
Avian toxicity	evidence data	waived	waived	waived	waived	waived
Aquatic toxicity and other nontarget organism toxicity	evidence data	waived	waived	waived	waived	waived
Environmental fate (in soil, water)	evidence data	waived	○	○	waived	waived

<sup>1)</sup> ○: Available; ×: Not available.

<sup>2)</sup> According to completed toxicity tests and literature reviews, as long as the results show safety, the data can be excluded.

<sup>3)</sup> In the absence of a reliable sensitization test, the following warning phrase is applicable: “Microorganisms may have the potential to provoke sensitizing reactions”.

何已知的不良影響，且 ZYMV-WK 已在歐盟、以色列及夏威夷使用；(2) 依其生物特性，認為植物病毒不會感染哺乳類動物且不會在動物體內複製，也不會在昆蟲宿主內複製；(3) ZYMV-WK 無法直接感染植物細胞（需機械接種感染）；(4) 人工接種植物中 ZYMV-WK 的含量不高於自然感染強症 ZYMV 的植物中獲得的 ZYMV-WK 量。同樣 ZYMV 在日本有一件登記案 (ZYMV-2002) (1, 2, 3)，其不同於自然汰選法，是經物理性誘變強毒株所得之弱病毒株，其哺乳類動物相關毒理與環境生物影響登記資料依其國家法規要求均需提交，對哺乳動物毒理部分同我國要求之 8 項試驗，顯示未在動物體內複製與增生，而對環境生物影響部分提交環境流佈試驗 (3)，主要由接種 ZYMV-2002 之小黃瓜與南瓜採集根分泌物或游離物及水體或土壤（含小黃瓜採收後之殘根），檢測是否存在病毒，也提交蚜蟲傳播試驗，結果均無法偵測到病毒，蚜蟲傳播的可能性亦極低，顯示該病毒在自然生態中傳播、殘存之可能性極低。因此，預期在暴露風險極小情形下（使用量 0.3 mL/株），對非目標生物與環境不會造成不良影響。近年來歐盟增加核准自然環境汰選的香瓜茄嵌紋病毒 (pepino mosaic virus, PepMV) CH2 品系 1906 分離株、VC1 分離株及 VX1 分離株之微生物農藥登記，其中 PepMV CH2 品系 1906 分離株亦於 2018 年經美國與加拿大審核通過 (43)。由歐洲食品安全局 (European Food Safety Authority, EFSA) 所

出具的安全評估報告上 (17, 18, 19)，審核口服及呼吸急毒性試驗、皮膚急毒性、皮膚刺激性、細胞培養測試、基因逆向變異試驗，靜脈注射試驗則提供豁免理由，提出已知植物病毒不會感染人類與動物，且沒有植物病毒經靜脈注射而造成哺乳類動物感染之文獻，加上植物病毒經靜脈注射小鼠之實驗中，雖然植物病毒顆粒可分布在體內組織，但可快速消退。綜合以上總結，PepMV CH2 品系 3 個分離株均不具動物急毒性、感染性與致病性，也無潛在基因致變異性。而對於非目標生物方面也提及植物病毒具高度專一性，且未有其他生物感染的案例，然而在環境影響評估中，提及 1906 分離株在實驗室測試結果，病毒可於土壤殘存 31 天 (20°C) 與 52 天 (4°C)，但採集土壤樣本 (4°C 下第 3、7 及 14 天) 測試已無法再感染另株作物，且依使用方法實際施用溫室番茄後採集土壤也未檢出病毒顆粒，推論施用後 1 年內土壤病毒量預期恢復至背景值，另由 VC1 分離株報告中指出 PepMV 可於 20±4°C 的水中保持傳染性長達 3 週，顯示其在宿主外具有一定持久性，但考慮其主要用於溫室栽培，對非目標生物或植物的影響有限。因此，此 3 個分離株均使用在溫室，對非目標生物暴露之風險低。報告中亦提出 VC1 及 VX1 之產品含有少量尼古丁不純物，但 EFSA 於 2009 年已完成尼古丁之毒理風險評估設定毒理相關參考劑量值及可能對蜜蜂造成的風險則有明確規定使用量，最後訂定限量值 (0.1 mg/L)。

綜合國際上已登記植物病毒產品繳交的資料，顯示本研究所評估之 ZAC 病毒雖非自然選汰或人為誘變所得，但其利用基因編輯技術只是更精準的應用分子技術快速誘變（定點突變技術），不屬於基因插入或基因剷除之基因改造產品，與日本登記產品較相近。因此，本研究完成 ZAC 輕症病毒之哺乳類動物毒理登記需求資料，可提供人類健康風險相關實驗資料，但未來針對生態毒理包括非目標生物及環境流佈影響，需進一步提供科學佐證資料來確保對非目標生物及環境暴露風險低，如同與國際管理單位所需繳交資料情況，提供環境流佈（實際田間檢測病毒）或蚜蟲傳播能力已被移除的實驗數據，證明病毒在自然生態中傳播、殘存之可能性低。

植物病毒於世界各地的植物中傳播，包括蔬菜及水果。人類每天都暴露於這些病毒中，然而目前普遍認為植物病毒和脊椎動物病毒的寄主範圍和致病性有明確的界線。因此，不認為植物病毒對人類和其他哺乳類動物存在潛在致病性，不過仍有學者持續研究並探討植物病毒與人體的關聯性<sup>(12)</sup>。一些文獻指出某些植物病毒，包括番椒微斑病毒（pepper mild mottle virus, PMMoV）與 TMV 病毒，可於人類糞便中檢測到 RNA<sup>(14, 28, 45)</sup>，甚至誘發抗體反應<sup>(14, 28)</sup>，其中 PMMoV 病毒可能與一些發燒、腹痛等臨床症狀呈正相關<sup>(14)</sup>，但截至目前為止尚無證據顯示植物病毒能感染人類並於人體內複製，也無實際臨床案例證實植物病毒對人體的不良影響<sup>(12)</sup>。

總結來說，植物病毒本身具特殊生物特性，對宿主細胞具專一性，且在宿主細胞外不具生命現象等，對非宿主生物的影響及風險較低，至目前為止未發現植物病毒有感染哺乳類動物細胞並在哺乳類動物中複製增殖的案例<sup>(12, 16, 41)</sup>，而本研究所評估對象 ZAC 輕症病毒雖經基因編輯技術所得產品，惟透過哺乳類動物毒理試驗，證明其不會在哺乳類動物細胞及體內複製增殖，推估造成人體健康的危害風險可能性低，且於傳播的影響上，ZAC 輕症病毒不會經由蚜蟲傳播<sup>(13)</sup>，病毒本身也不會產生類似毒性物質或能直接破壞組織的方式，因此無法直接感染植物細胞，但可能透過種子浸染種胚而垂直傳染植株<sup>(10, 36)</sup>，惟仍無法將病毒水平傳播至其他植株，可降低 ZAC 病毒散播出去的風險。因此，植物病毒本身極具發展為植物疫苗潛力，臺灣在過去葉錫東教授團隊已利用亞硝酸誘變方式成功發展輕症病毒來防治 PRSV<sup>(44)</sup>，並至今推廣面積達二千餘公頃，為世界上大規模應用交互保護作用防治植物病毒的案例之一，只是當時的時空背景，無法凸顯其商業價值與經濟效益。另一方面，也由於 PRSV 輕症病毒應用已超過 30 多年，期間均無發現對人類或環境不良影響的事件，顯現其安全性相對高。而利用基因編輯技術取代自然汰選或人為誘變技術只是一種更精準得到產品之手段，若能公開透明的傳達相關科學佐證數據以提高人民信心，實際上可讓更多具有潛力的微生物農藥被商品化及應用。

## 謝辭

本研究承中興大學植物病理學系暨中研院院士葉錫東教授及亞洲大學醫學檢驗暨生物技術學系陳宗祺教授邀請共同爭取科技部計畫 MOST107-2321-B-005-004、MOST108-2321-B-005-016 經費補助。試驗期間承張淑滿、彭明霞、莊伊靜、林良怡、洪佳雯、林惠如小姐及羅紹榮、洪慶和、劉清標先生等協助完成各項急毒性試驗，蔡寶隆博士協助英文翻譯校對，以利順利發表，謹此致謝。

## 引用文獻

1. 小坂能尚、小堀崇、津田和久、片岡光信、塩見寛。2003。弱毒ウイルスを利用したキュウリウイルス病の防除。日植病報 69：320。
2. 小坂能尚、梁宝成、片桐伸行、安原壽雄。2006。弱毒ブッキーニ黄斑モザイクウイルスの人畜に対する安全性の検証。植物ウイルス病研究会レポート 8：39-49。
3. 小坂能尚、梁宝成、片桐伸行、安原壽雄。2010。植物ウイルス病ワクチンの製品化と普及展開。植物防疫 64：822-824。
4. 日本農林水産省。2019。微生物農薬の登録申請に係る－安全性評価に関する試験成績の取扱いについて。9 農産第 5090 号農林水産省農産園芸局長通知 (最終改正：平成 31 年 3 月 29 日)。
5. 行政院農業委員會。2018。農藥管理法－農藥理化性及毒理試驗準則。農防字第 1071488885 號令修正發布第 3 條附件二。
6. 行政院農業委員會。2018。實驗動物照護與使用指引。行政院農業委員會。臺北。92 頁。
7. 張敬宜、黃振聲、蔡躉任。2006。本土綠僵菌對大鼠急毒性與致病性之安全評估。植物保護學會會刊 48：331-340。
8. 張敬宜、莊伊靜、羅紹榮、吳偉嘉、謝再添、蔡躉任。2018。天然植物保護資材商品化研發－毒理試驗運作平臺執行成效。臺灣農藥科學 4：1-19。
9. 陳慶忠。2006。防疫檢疫重要植物病毒之媒介昆蟲與傳毒原理。植物重要防疫檢疫害蟲診斷鑑定研習會專刊 (六)，第 21-72 頁。路光暉主編。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局、國立中興大學昆蟲學系編印。臺北、臺中。
10. 鄧汀欽、蔡錦慧、林羿廷、周建銘。2017。矮南瓜黃化嵌紋病毒 (ZYMV) 經瓜類種子傳播的特性及其檢測。台灣農業研究 66：230-239。
11. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA). 2018. Guideline for the regulation of biological agricultural products. Retrieved from <https://apvma.gov.au/node/11196> (Nov. 26, 2020)
12. Balique, F., Lecoq, H., Raoult, D., and

- Colson, P. 2015. Can plant viruses cross the kingdom border and be pathogenic to humans. *Viruses*. 7: 2074-2098.
13. Chao, C. H., Wu, H. W., Chen, K. C., Lin, S. S., and Yeh, S. D. 2010. Aphid transmissibility and cross-protection effectiveness of an attenuated mutant of zucchini yellow mosaic virus. *Plant Prot. Bull.* 52: 1-16.
  14. Colson, P., Richet, H., Desnues, C., Balique, F., Moal, V., Grob, J. J., Berbis, P., Lecoq, H., Harlé, J. R., Berland, Y., and Raoult, D. 2010. Pepper mild mottle virus, a plant virus associated with specific immune responses, fever, abdominal pains, and pruritus in humans. *PLoS One*. 5: e10041.
  15. Desbiez, C. and Lecoq, H. 1997. Zucchini yellow mosaic virus. *Plant pathol.* 46: 809-829.
  16. European Food Safety Authority (EFSA). 2012. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance zucchini yellow mosaic virus-Weak strain. *EFSA J.* 10: 2754.
  17. European Food Safety Authority (EFSA). 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pepino mosaic virus strain CH2 isolate 1906. *EFSA J.* 13: 3977.
  18. European Food Safety Authority (EFSA). 2017a. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance mild pepino mosaic virus isolate VX1. *EFSA J.* 15: 4650.
  19. European Food Safety Authority (EFSA). 2017b. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance mild pepino mosaic virus isolate VC1. *EFSA J.* 15: 4651.
  20. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO). 2017. Guidelines for the registration of microbial, botanical and semiochemical pest control agents for plant protection and public health uses. Retrieved from <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HTM-NTD-WHOPES-2017.05> (May 25, 2021)
  21. Gal-On, A. 2007. Zucchini yellow mosaic virus: insect transmission and pathogenicity-the tails of two proteins. *Mol. Plant Pathol.* 8: 139-150.
  22. Gonsalves, D. and Garnsey, S. M. 1989. Cross protection techniques for control of plant virus diseases in the tropics. *Plant Dis.* 73: 592-597.
  23. Hseu, S. H., Wang, H. L., and Huang, C. H. 1985. Identification of a zucchini yellow mosaic virus strain from *Cucumis sativus*. *J. Agric. Res. China.* 34: 87-95.
  24. Lecoq, H., Lemaire, J. M., and Wipf-Scheibel, C. 1991. Control of zucchini yellow mosaic virus in squash by cross

- protection. *Plant Dis.* 75: 208-211.
25. Lin, S. S., Hou, R. F., and Yeh, S. D. 2000. Heteroduplex mobility and sequence analyses for assessment of variability of zucchini yellow mosaic virus. *Phytopathology* 90: 228-235.
26. Lin, S. S., Hou, R. F., and Yeh, S. D. 2002. Construction of *in vitro* and *in vivo* infectious transcripts of a Taiwan strain of zucchini yellow mosaic virus. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 43: 261-269.
27. Lin, S. S., Wu, H. W., Jan, F. J., Hou, R. F., and Yeh, S. D. 2007. Modifications of the helper component-protease of zucchini yellow mosaic virus for generation of attenuated mutants for cross protection against severe infection. *Phytopathology*. 97: 287-296.
28. Liu, R., Vaishnav, R. A., Roberts, A. M., and Friedland, R. P. 2013. Humans have antibodies against a plant virus: evidence from tobacco mosaic virus. *PLoS One*. 8: e60621.
29. McKinney, H. H. 1929. Mosaic diseases in the Canary islands, West Africa and Gibraltar. *J. Agric. Res.* 39: 557-578.
30. Müller, G. W., and Costa, A. S. 1977. Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. *Proc. Int. Soc. Citric.* 3: 868-872.
31. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2003. OECD series on pesticides. No. 18. Guidance for registration requirements for microbial pesticides. Document number ENV/JM/MONO(2003)5 Unclassified.
32. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2021. Guidelines for the testing of chemicals, section 4: Health effects. Retrieved from [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788) (May 25, 2021)
33. Peng, Y. H., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y., and Raccach, B. 1998. Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions. *J. Gen. Virol.* 79: 897-904.
34. Pest Management Regulatory Agency, Health Canada. 2001. Guidelines for the registration of microbial pest control agents and products. Regulatory Directive DIR2001-02.
35. Rast, A. T. B. 1972. MII-16, an artificial symptomless mutant of tobacco mosaic virus for seedling inoculation of tomato crops. *Neth. J. Pl. Path.* 78: 110-112.
36. Simmons, H. E., Holmes, E. C., Gildow, F. E., Bothe-Goralczyk, M. A., and Stephenson, A. G. 2011. Experimental verification of seed transmission of zucchini yellow mosaic virus. *Plant Dis.* 95: 751-754.

37. The European Commission. 2013a. Commission Regulation (EU) No 283/2013, setting out the data requirements for active substances, in accordance with regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32013R0283> (May 25, 2021)
38. The European Commission. 2013b. Commission Regulation (EU) No 284/2013, setting out the data requirements for plant protection products, in accordance with regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market. Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32013R0284> (May 25, 2021)
39. United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1996. Test guidelines for pesticides and toxic substances, Series 885- Microbial pesticide test guidelines. Retrieved from <https://www.epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances/series-885-microbial-pesticide-test-guidelines> (May 25, 2021)
40. United States Environmental Protection Agency (USEPA). 2002. Test guidelines for pesticides and toxic substances, Series 870- Health effects test guidelines. Retrieved from <https://www.epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances/series-870-health-effects-test-guidelines> (May 25, 2021)
41. United States Environmental Protection Agency (USEPA). 2007a. Biopesticide registration action document for zucchini yellow mosaic virus- weak strain PV-593. PC code 244201.
42. United States Environmental Protection Agency (USEPA). 2007b. Rules and regulations. 40 CFR Part 158. Pesticides; data requirements for biochemical and microbial pesticides. Agency/Docket Numbers: EPA-HQ-OPP-2004-0415; FRL-8109-8. Document number: E7-20828.
43. United States Environmental Protection Agency (USEPA). 2018. Safety determination for pepino mosaic virus, strain CH2, isolate 1906. Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FFDCA), Docket ID number: EPA-HQ-OPP-2017-0525.
44. Yeh, S. D. and Gonsalves, D. 1984. Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. *Phytopathology* 74: 1086-1091.
45. Zhang, T., Breitbart, M., Lee, W. H., Run, J. Q., Wei, C. L., Soh, S. W. L., Hibberd, M. L., Liu, E. T., Rohwer, F., and Ruan, Y. 2006. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol.* 4: 108-118.

# Safety of Indigenous Mild Zucchini Yellow Mosaic Virus in Mammals

Jin-Yi Chang<sup>1\*</sup>, Chao-Chun Chien<sup>1</sup>, Yu-Pei Yang<sup>1</sup>, Wei-Jia Wu<sup>1</sup>, Wei-Ren Tsai<sup>1</sup>

## Abstract

Chang, J. Y., Chien, C. C., Yang, Y. P., Wu, W. J., and Tsai, W. R. 20xx. Safety of indigenous mild zucchini yellow mosaic virus in mammals. *Taiwan Pestic. Sci.* 11: 81-103.

Pesticide management involves controlling plant diseases and plant pests with safe biopesticides. One pest management strategy involves developing virus microbial pesticides with vaccine characteristics and cross-protection abilities. Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) is a common plant pathogen that causes severe damage in a wide range of cucurbit crops around the world. A mutant, mild ZYMV strain (ZYMV AC, ZAC) that is indigenous to Taiwan may provide cross-protection against infection severe strains of ZYMV. The purpose of this study was to evaluate the toxicity, infectivity, pathogenicity, eye irritation, and sensitization of the ZAC virus in mammals according to toxicological data requirements. In evaluations of acute oral toxicity, pulmonary toxicity, and pathogenicity, no mortality or clinical signs were observed during the test period; nothing abnormal was noted in gross findings; and no ZAC virus had been detected after one-day dosing. These results revealed that the ZAC virus is not toxic, infective, or pathogenic in mammals. Results of *in vitro* tests further confirmed that ZAC virus is not toxic or infective in mammalian cells (*Cercopithecus aethiops* monkey kidneys cell, CV-1). Moreover, we found that (1) for acute dermal toxicity, the LD<sub>50</sub> of the ZAC virus was greater than 5,000 mg/kg bw, and (2) the ZAC virus did not lead to eye irritation or skin sensitization effects. Finally, this study compared international toxicological data requirements for the registration of microbial pesticides to confirm our results. Therefore, our test results indicate that the ZAC virus is a relatively safe microbial pesticide for humans across multiple exposure routes. This study provides a useful reference

---

Accepted: January 3, 2022.

\* Corresponding author, E-mail: jinyi@tactri.gov.tw

<sup>1</sup> Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung

for regulation to manage plant diseases and plant pests using the ZAC microbial pesticide.

**Key words:** Zucchini yellow mosaic virus, Cross-protection, Virus microbial pesticide, Toxicological data requirements, Pesticide registration