

## 第 2 屆大專校院綠色化學創意競賽 成果報告書

組 別： [ ]大專組； [v]研究組

隊伍名稱：生態毒理學專長小隊

主 題：藉由電腦預測模式及斑馬魚胚胎發展生態毒理替代測試策略

# 目錄

---

---

摘要.....	2
壹、動機.....	3
貳、目的.....	3
參、設備及器材.....	3
肆、過程或方法.....	6
伍、結果.....	7
陸、討論.....	12
柒、結論.....	15
捌、參考資料及其他.....	16

## 摘要

---

歐洲聯盟的《關於化學品註冊、評估、許可和限制法案》及我國的《新化學物質及既有化學物質資料登錄辦法》，皆提出在市場經常出現的化學品必須提供完整的物質資訊，例如：物化特性、毒理學及生態毒理學測試終點。相較於傳統毒理學而言，生態毒理學的物質資訊完整性，是較為匱乏，並且具有化學品資料填補的迫切性。然而傳統毒理及生態毒理學往往是藉由動物進行化學品的毒性測試，而這樣的研究往往花費大量金錢及時間，並且是不符合動物福祉的。因此 21 世紀的毒理學，推廣能增進效率及符合減量、替代及精緻化 3Rs 精神的替代測試方法和電腦預測模式來進行毒理和生態毒理的測試。

針對電腦預測模式來說，定量結構活性關係 (Quantitative structure – activity relationship, QSAR) 模型是一項具有潛力的研究方向，QSAR 的定義為任何物質的分子結構和本身帶來的生物活性之間具有量化關係，除此之外，根據 OECD 公告的第 236 號測試規範 (OECD TG236) 也認為斑馬魚胚胎是一項能夠替代傳統魚類急毒性的良好替代模式。2019 年，開始有學術研究試著實施整合多項替代模式或電腦模式的整合型策略將能夠有效的減少使用動物 (Ahlers, Nendza et al. 2019)，因此本研究之目的為驗證與發展結合電腦模式及斑馬魚胚胎替代模式方法提供魚類急毒性測試終點的整合型測試策略。將使用的預測毒理學電腦軟體為 OECD QSAR Toolbox，實驗上操作斑馬魚胚胎急毒性試驗推估成魚急毒性，最後再以成魚急毒性試驗之實驗值驗證前兩者預測及推估魚類急毒性測試終點之準確性。

首先，我們藉由國際公開資料庫收集斑馬魚的魚類急毒性試驗值和斑馬魚胚胎急毒性試驗值，總共各 30 種化學物質。接著將 30 種化學物質都使用 QSAR Toolbox 建立 QSAR 模型後，預測魚類急毒性。斑馬魚胚胎急毒性試驗值，藉由成魚及胚胎毒性轉換公式推估魚類急毒性試驗。在 QSAR 模型的電腦預測和胚胎的替代測試中，對於成魚急毒性分別有良好的預測及推估能力，而分辨率分別為 73.3% 和 76.6%。最後我們提出了結合兩種替代方法的整合型測試策略，並發現對物質毒性的分辨率提高至 93.3%。本研究的結果顯示整合型測試策略能夠減少動物實驗，並以替代測試方法提供生態毒理資訊的魚類急毒性測試終點，也能夠有效率的分類物質的魚類急毒性。

關鍵字：魚類急毒性、替代測試、預測毒理學、斑馬魚、定量結構活性關係 (QSAR)

## 壹、動機

---

直至今日，化學物質的毒性研究依然是重要議題，國際組織、國際公約和國際化學品貿易的相關規範中都有提到化學品交易中需盡可能檢附完整的毒性資訊，相較於傳統毒理學而言，生態毒理學的物質資訊完整性，是較為匱乏，並且具有化學品資料填補的迫切性。而這些化學品的毒理資訊大多來自於動物實驗。有別於使用傳統動物實驗來研究物質的毒性及生態毒性，在 21 世紀，國際上已推行「21 世紀的毒理學計畫」，目標是盡可能的減量動物實驗，發展合適的替代測試。於近十年來，毒理學和生態毒理學家發現有些不需要使用動物的實驗方法，可以獲得和動物實驗相同的毒性趨勢，也因此目前認為有足夠的證據顯示，非動物方法將有機會可以做為動物實驗的替代方法，減少實驗動物的使用。

因此本研究希望藉由非動物方法的應用，減少過多的資源浪費，並且減少動物的犧牲，進而達成綠色化學其一的目標。此外，本研究也致力於研發具有高效率及能應用於法規毒理學的生態毒理學在法規毒理學替代測試方法：整合型測試策略 (Integrated Testing Strategy, ITS)。

## 貳、目的

---

傳統的魚類急毒性試驗會使用大量的動物進行試驗，因此本研究將著重於驗證電腦預測模式以及斑馬魚胚胎兩種替代測試方法，並且為提升替代方法的效率，本研究將結合兩種替代方法，發展並驗證整合型策略。

## 參、設備及器材

---

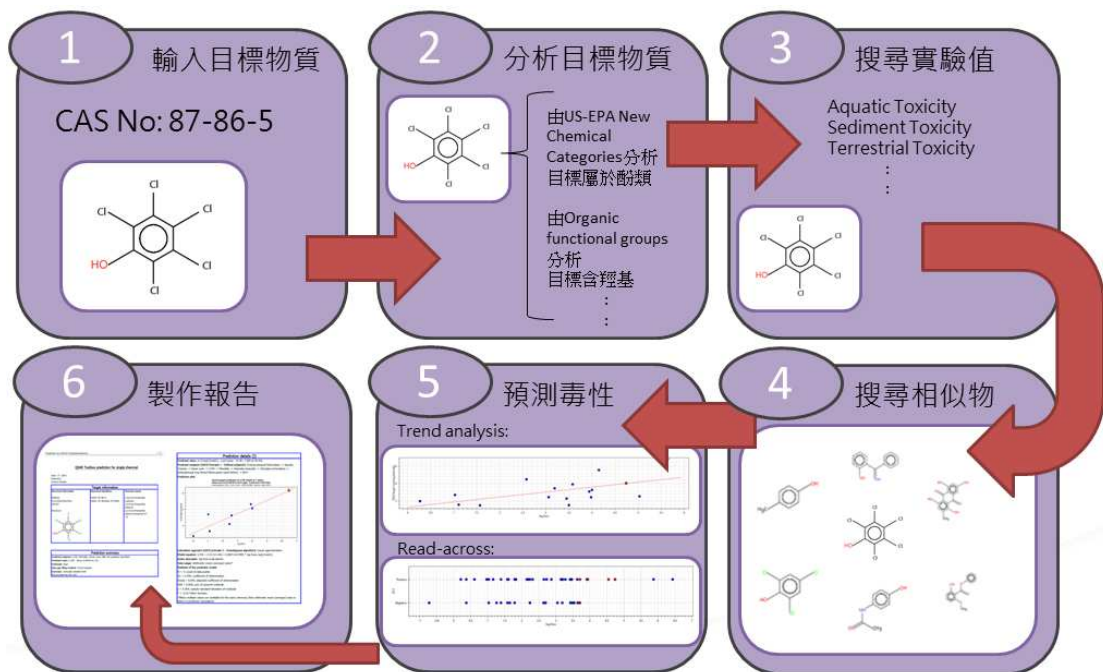
### 一、資料庫：驗證整合型測試策略之 30 種化學物質

本研究應用於驗證整合型測試策略的數據，是來自 Pubchem (US)、ECOTOX (US)、ECHA dossier (EU) 和 SCI 經過同儕審閱的 SCI 期刊文獻。蒐集到的物質毒性資料，如 Table. 1. 所示 (Groth, Schreeb et al. 1993, Lammer, Carr et al. 2009, Nendza, Muller et al. 2017)。

## 二、預測軟體：OECD QSAR Toolbox 毒理學預測軟體用於預測物質的魚類急毒性

根據 QSAR 模型的原理，QSAR Toolbox 在預測魚類急毒性試驗時，在概念上可以分成六大步驟。

- (一)、步驟一：輸入目標物質。
- (二)、步驟二：分析目標物質之分子結構或毒性作用模式。
- (三)、步驟三：搜尋目標物質是否有實驗值，QSAR Toolbox 內含有巨量的物質毒性資料庫。
- (四)、步驟四：搜尋目標物質大量的結構相似物或毒性作用模式相似物。
- (五)、步驟五：建立 QSAR 模型，預測測試終點。驗證建立之 QSAR 模型，使用統計學指標，對建立的 QSAR 模型進行預測結果的驗證。如果建立的 QSAR 模型理論上預測準確，則會以藍色對話方塊提示使用者此預測可被接受。
- (六)、步驟六：製作目標化學物質的毒性報告，可應用於法規毒理學。

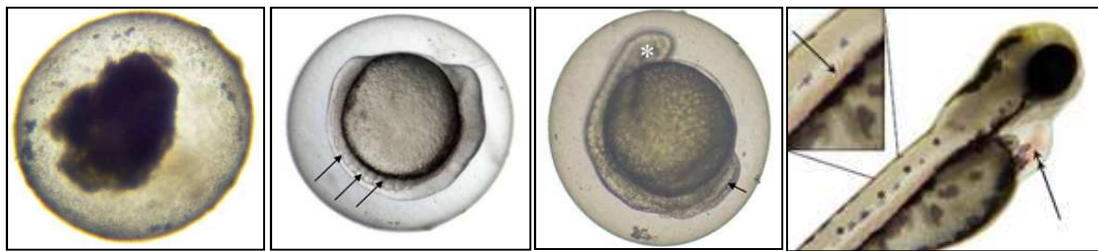


圖一、QSAR Toolbox 之運作原理與操作流程

### 三、實驗材料及器材：斑馬魚胚胎急毒性試驗

在 2013 年，OECD 公告斑馬魚的胚胎可以做為魚類急毒性試驗的替代測試方法 (OECD 2013)。因斑馬魚胚胎其痛覺和知覺器官尚未發育完全，並且在受精後五天內不被認為具有感知能力，所以這些利用體外受精魚卵進行生態毒性試驗被歸類為體外測試，較無道德上的議題。

在本研究中提出的 ITS 會用到斑馬魚胚胎急毒性試驗，所有使用的斑馬魚的品系為野生種 (Wild type AB line)，並且遵循 OECD TG236，收集及挑出健康且受精後 3 個小時的斑馬魚胚胎進行試驗，實驗器材及設備有暴露孔盤、燈光定時器和恆溫箱，實驗設計包含陽性控制組 (Positive control)：3,4-二氯苯胺、陰性控制組 (Negative control)：養殖水及五個暴露濃度。在每次實驗中，陰性控制組的總存活率需大於 90%，陽性控制組的死亡率至少達 30%，若不符合以上條件，則該批實驗結果不可接受。化學品暴露後，分別在 24、48、72 和 96 小時觀察並記錄魚胚胎死亡的數量，使用解剖顯微鏡觀察斑馬魚胚胎，斑馬魚胚胎的死亡定義有四個，符合任何一項，即為死亡，(1)卵黃囊凝結 (2)體節未生成 (3)尾部未從卵黃囊剝離 (4)缺乏心跳或血液流動。實驗完成後，使用 Microsoft Office Excel，以 96 小時的死亡率計算 LC<sub>50</sub>。



圖二、判斷斑馬魚胚胎死亡的四個主要指標，由左到右依序為 (1)卵黃囊凝結 (2)體節未生成 (3)尾部未從卵黃囊脫離 (4)缺乏心跳或血液流動。(OECD 2013)

### 四、電腦軟體：Microsoft Office 文書軟體

(一)使用 logit model regression 估算測試終點：參考自 OECD 規範的生態毒理學研究，使用 Microsoft office Excel 對 LC<sub>50</sub> 進行估算方法 (OECD 2011, Belanger, Rawlings et al. 2018)。

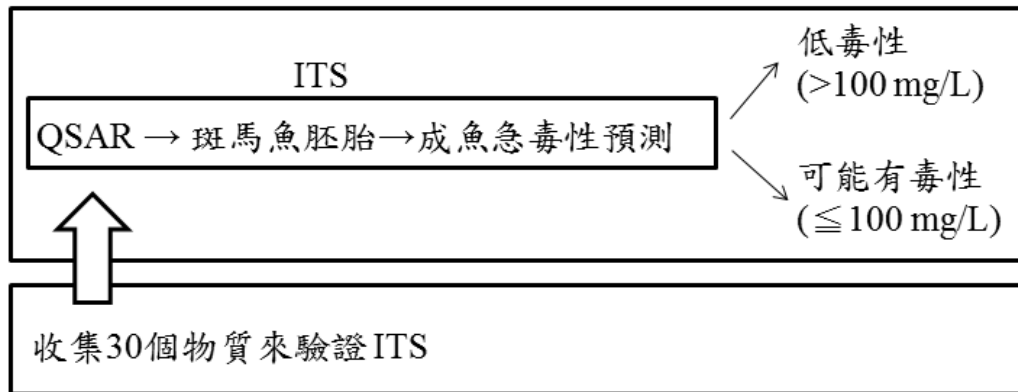
$$\text{估算公式 } P(\text{lethality}) = 1 / (1 + \exp(b * (a - LC_{50})))$$

P(lethality)為死亡率；exp(x)為自然數指數；a 為實驗之不同濃度，是自變數；b 為常數。

(二)數據分析：將 QSAR 模型預測結果、斑馬魚胚胎急毒性試驗結果和魚類急毒性試驗結果使用 Microsoft office Excel 進行統計學相關性分析，分別評估各自的預測能力。接著將 QSAR 預測值和斑馬魚胚胎急毒性試驗值，透過測試策略分析後，評估毒性分辨之準確能力。

## 肆、過程或方法

### ITS的建立



資料的收集源自以下參考文獻和國際公開資料庫:

*Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2009 Mar;149(2):196-209.

*Environ. Sci.: Processes Impacts*, 2017,19, 429-437; Pubchem (US), ECOTOX (US),

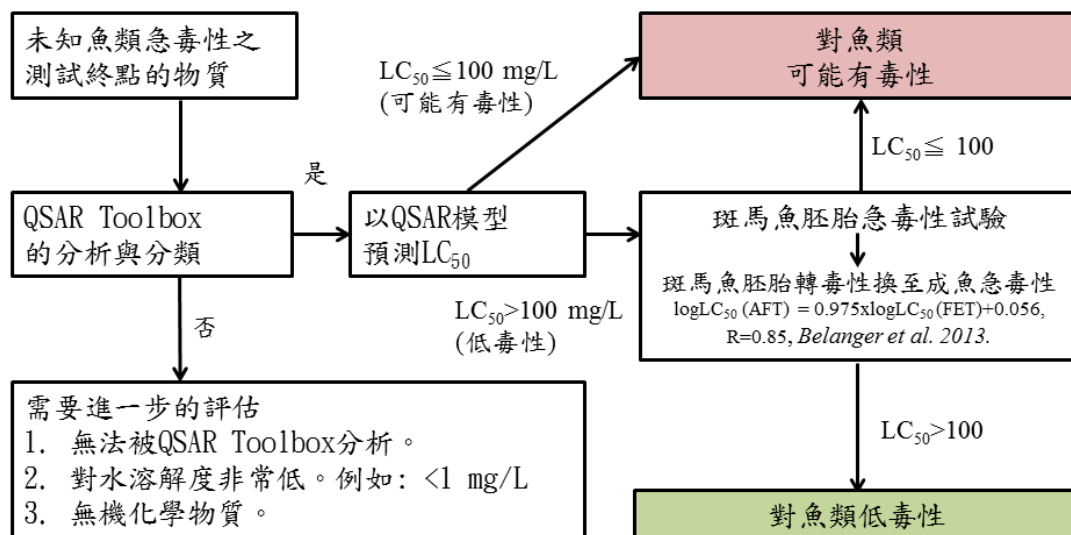
ECHA dossier (EU) and the peer reviewed SCI articles were also utilized.

圖三、研究過程與整合型測試策略的建立流程

根據水生毒性之整合型測試策略 (ITS) 設計合適的驗證流程，亦參考生態毒理所定義的水生毒性範圍劃分毒性區間。統計學上定義至少要 30 個樣本，才較有統計意義，所以最後再收集 30 個化學物質之魚類急毒性試驗值和斑馬魚胚胎急毒性試驗值，以及將 30 個化學物質都透過 QSAR Toolbox 預測魚類急毒性，用以評估 ITS 預測及分類魚類急毒性，且全程不需使用動物實驗。

## 伍、結果

### 一、魚類急毒性試驗的替代方法，整合型測試策略圖示



圖四、整合型測試策略替代方法之研究流程

如圖四所示，建立的整合型測試策略經由以下流程預測化學物質的魚類急毒性：(1)無魚類急毒性試驗的化學物質或新化學物質，(2)使用 QSAR Toolbox 對物質結構進行分析，(3)對於能識別出的化學結構或毒性機制的物質進行預測，而少數無法被 QSAR Toolbox 分辨的物質需要以其他方法進一步的評估，(4)當物質被 QSAR 模型預測為可能對魚類有急毒性 ( $LC_{50} \leq 100$  mg/L)，則被歸類為「可能對魚類有毒性的物質」；若預測為可能對魚類低毒性 ( $LC_{50} > 100$  mg/L)，則需要進入下一個評估階段，(5)被電腦模式 (QSAR 模型) 預測為低毒性的物質，需要操作斑馬魚胚胎急毒性試驗，並根據胚胎和成魚毒性轉換公式： $\log LC_{50}(AFT) = 0.975 \times \log LC_{50}(FET) + 0.056$ ,  $R = 0.85$  (Belanger, Rawlings et al. 2013)，推估成魚急毒性。如果測試結果  $LC_{50} \leq 100$  mg/L，則被歸類為「可能對魚類有毒性的物質」；若  $LC_{50} > 100$  mg/L，則會被歸類為「對魚類低毒性的物質」。

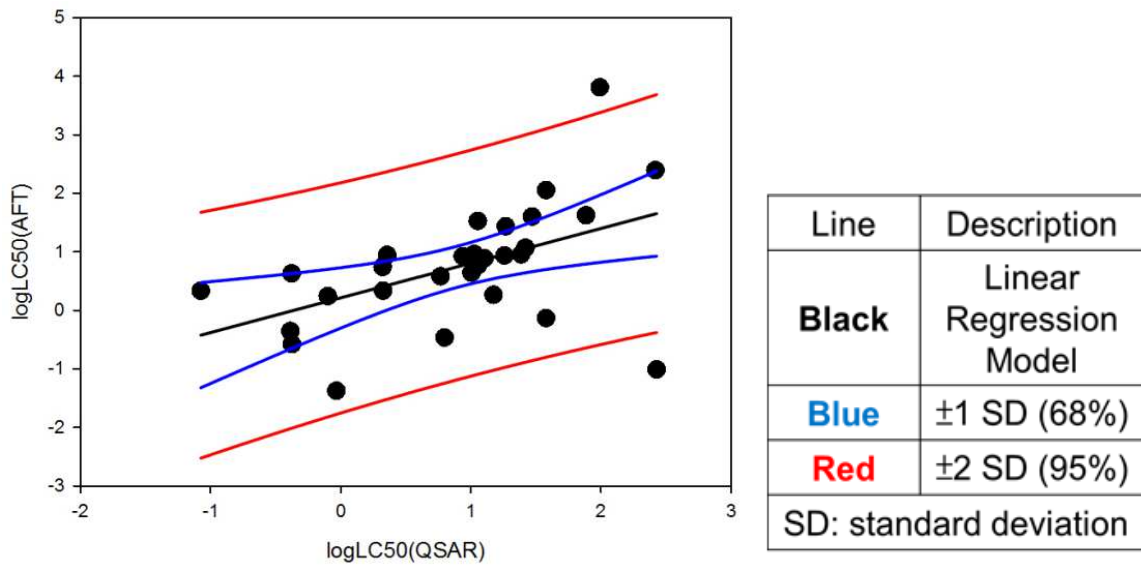
## 二、30 個收集的化學物質之生態毒性

表一、30 個收集的化學物質之生態毒理學的預測毒性、斑馬魚胚胎毒性和魚類急毒性。

CAS No	Chemical Name	QSAR [mg/L]	FET [mg/L]	Reference	AFT [mg/L]	Reference
27176-87-0	Dodecyl linear alkyl benzene sulfonate	0.084	3.100	Belanger et al., 2013	2.200	Belanger et al., 2013
87-86-5	Pentachlorophenol	0.409	0.570	Stangl, 1991	0.450	Wellens H., 1982
3380-34-5	Triclosan	0.421	0.178	Belanger et al., 2013	0.270	Belanger et al., 2013
79-94-7	Tetrabromobisphenol-A	0.793	1.090	Belanger et al., 2013	1.780	Belanger et al., 2013
101-20-2	Triclocarban	0.924	0.039	Belanger et al., 2013	0.043	Belanger et al., 2013
56-38-2	Parathion-ethyl	2.090	3.540	Belanger et al., 2013	5.640	Belanger et al., 2013
84-74-2	Di-n-butylorthophthalate	2.110	2.063	Belanger et al., 2013	2.200	Belanger et al., 2013
80-05-7	Bisphenol-A	2.270	8.600	Belanger et al., 2013	9.060	Belanger et al., 2013
120-83-2	2,4-Dichlorophenol	5.840	4.180	Belanger et al., 2013	3.900	Belanger et al., 2013
24938-91-8	Tridecyl mono-octyl ether	6.280	0.990	Belanger et al., 2013	0.350	Belanger et al., 2013
95-76-1	3,4-Dichloroaniline	8.650	2.517	Belanger et al., 2013	8.587	Belanger et al., 2013
95-50-1	1,2-Dichlorobenzene	10.100	8.190	Belanger et al., 2013	4.500	Belanger et al., 2013
626-43-7	3,5-Dichloroaniline	10.600	12.340	Belanger et al., 2013	9.380	Belanger et al., 2013
106-48-9	4-Chlorophenol	11.300	34.600	Stangl, 1991	6.000	ECHA registered-dossier
106-47-8	4-Chloroaniline	11.300	12.340	Belanger et al., 2013	34.444	Belanger et al., 2013
151-21-3	Dodecyl sulfate	12.700	5.224	Belanger et al., 2013	7.970	Belanger et al., 2013
534-52-1	4,6-Dinitro-o-cresol	14.900	0.431	Belanger et al., 2013	1.871	Belanger et al., 2013
100-02-7	4-Nitrophenol	18.100	8.774	Belanger et al., 2013	8.823	Belanger et al., 2013
108-95-2	Phenol	18.500	68.120	Belanger et al., 2013	27.800	Belanger et al., 2013
63-25-2	Carbaryl	24.300	14.460	Pandey Manish Raj et al., 2015	9.256	Belanger et al., 2013
108-95-2	Phenol	26.200	210.000	Lammer et al., 2009	12.000	ECHA registered-dossier
50-00-0	Formaldehyde	29.500	12.700	Shaukat Ali et al., 2011	41.000	Nendza et al., 2017
62-53-3	Aniline	37.800	139.760	Belanger et al., 2013	0.750	Belanger et al., 2013
298-46-4	Carbamazepine	76.500	136.000	Belanger et al., 2013	43.000	Belanger et al., 2013
110-93-0	6-Methyl-5-hepten-2-one	85.500	243.000	Busquet et al., 2014	85.700	Busquet et al., 2014
75-12-7	Formamide	97.700	9143.120	Groth et al., 1994	6562.000	ECHA registered-dossier
112-27-6	Triethylene glycol	120.000	54800.000	Busquet et al., 2014	71251.000	Busquet et al., 2014
75-09-2	Dichloromethane	261.000	883.900	Belanger et al., 2013	254.000	Belanger et al., 2013
26062-79-3	Merquat 100	267.000	0.245	Belanger et al., 2013	0.100	Belanger et al., 2013
78-93-3	2-butanone	2110.000	2627.800	Sebastian Heger et al., 2018	3200.000	Pedersen and Petersen, 1996

如表一所示，此 30 個物質同時具有斑馬魚成魚急毒性試驗值，以及斑馬魚胚胎急毒性試驗值。兩者的實驗條件中，時間皆為 96 個小時。另外，此 30 個物質都有使用 QSAR Toolbox 預測斑馬魚成魚急毒性試驗的預測值。表格中包含了物質的 CAS 編碼、英文名稱和實驗值的資料來源。QSAR 模型預測結果顯示，有 26 個物質被歸類為「可能對魚類有毒性的物質」，有 4 個物質被預測為「對魚類低毒性的物質」。

### 三、QSAR 預測和魚類急毒性之相關性分析結果

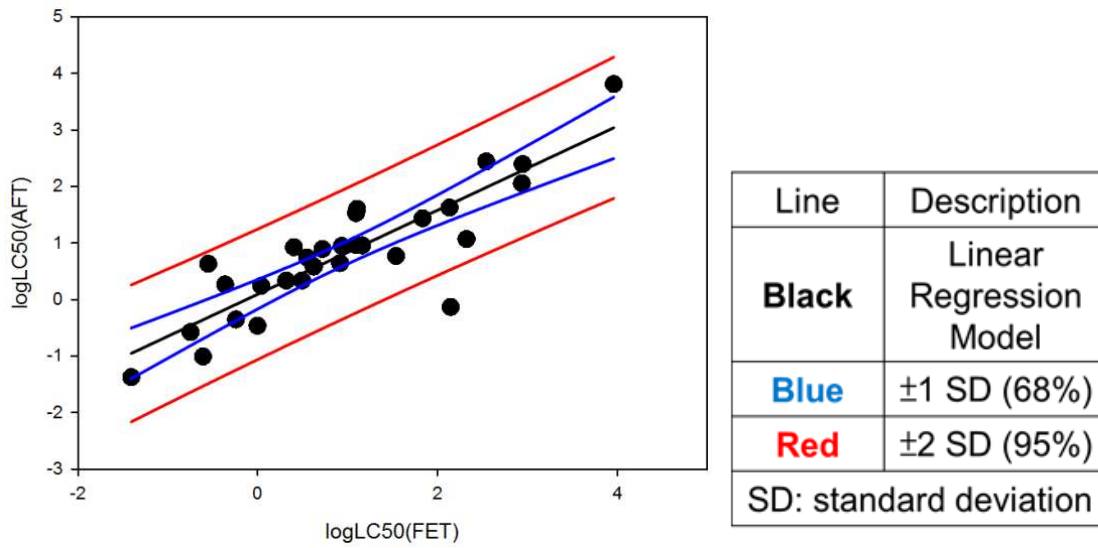


圖五、QSAR 預測值和 AFT 實驗值之間的相關性分析

30 個 QSAR 模型預測值和 30 個斑馬魚成魚急毒性試驗動物實驗值，如圖五所示，以相關性分析後，R 值為 0.61，屬於中度相關(0.70 > R > 0.30)。

QSAR 預測值和 AFT 實驗值之間的相關性分析線性回歸方程式為  $\log LC_{50}(AFT) = 0.8748(\pm 0.2129) \times \log LC_{50}(QSAR) + 0.0433(\pm 0.3032)$ ,  $R = 0.6134$ 。有兩個物質超出 95% 信賴區間，分別是 Merquat 100 (CAS No: 26062-79-3) 和 Triethylene glycol (CAS No: 112-27-6)。

#### 四、斑馬魚胚胎急毒性試驗和魚類急毒性之相關性分析結果



圖六、FET 實驗值和 AFT 實驗值之間的相關性分析

30 個斑馬魚胚胎急毒性試驗值和 30 個斑馬魚成魚急毒性試驗動物實驗值，如圖六所示，以相關性分析後，R 值為 0.92，屬於高度相關( $R > 0.70$ )。

FET 實驗值和 AFT 實驗值之間的相關性分析線性回歸方程式為  $\log LC_{50}(AFT) = 0.8794(\pm 0.0724) \times \log LC_{50}(FET) - 0.0215(\pm 0.1301)$ ,  $R = 0.9167$ 。有一個物質超出 95% 信賴區間，Aniline (CAS No: 62-53-3)

## 五、測試策略之分析結果

表二、各種替代測試方法之預測準確性比較表

預測方法	毒性分類之正確率
斑馬魚胚胎推估法	22/30 =73.3%
QSAR 模型預測法	23/30 =76.6%
整合型測試策略 (ITS)	28/30 =93.3%

為了進一步驗證 ITS 的預測能力，同樣使用收集的 30 個化學物質做為大樣本的驗證資料集，30 種物質的魚類急毒性、斑馬魚胚胎急毒性和 QSAR 模型預測值，經 ITS 之後的預測準確性有所提升。

只有使用斑馬魚胚胎急毒性試驗推估的準確率為 73.3%；只有使用 QSAR 模型預測的準確率為 76.6%；整合兩種替代方法的 ITS 預測的準確率為 93.3%。因此，ITS 能夠提升預測物質對魚類急毒性為「可能有毒」或「低毒性」的測試終點。因此由結果證實，兩種模式結合後的 ITS 能互補各自無法準確預測的物質類型。

## 陸、討論

### 一、動物實驗、替代測試和預測毒理學的比較

生態毒理學使用成年魚類進行動物實驗，本研究使用斑馬魚，其飼養時間大約 2-3 個月才會達到可用於實驗的階段 (Nagel 2002)，如果使用其他魚種可能會需要更長的時間。期間有飼料成本、時間成本、照顧動物的人力成本和維持實驗室的管理費，並且在實驗器材的暴露魚缸會占用相對較多的空間。

斑馬魚胚胎毒性的替代測試，可以減少飼養的斑馬魚成年魚數量，由於斑馬魚胚胎在受精後 5 天內，在法規上因感官尚未發育完全，較無感知痛苦的疑慮、無動物實驗的道德議題以及魚卵的可得數量龐大，樣本隨機性較高 (Lammer, Carr et al. 2009)。和魚類急毒性試驗比較起來占用的實驗空間較小。

考量到實驗室的操作，推薦使用斑馬魚的原因如下。因為斑馬魚在醫學和生物科技上，已是成熟的動物模型，也具有科學研究價值，因此供應量是穩定的，其次斑馬魚的飼養及實驗技術已有大量學術發表，能佐證斑馬魚做為動物模型是被科學社群認可的。斑馬魚也是生態毒理學中魚類急毒性試驗推薦使用的物種。而斑馬魚胚胎毒性試驗也擁有大量學術發表，雖然也有其他魚類應用於科學研究，但是已有文獻探討斑馬魚和其他魚類比較起來，有哪些優缺點 (Belanger, Rawlings et al. 2018)，其中最具優勢的部分在於能夠大量的產卵以及胚胎存活率高。除了上述的各項優點，斑馬魚胚胎毒性試驗也是 OECD 所公告的標準方法(OECD 2013)。

預測毒理學所使用的電腦軟體 QSAR Toolbox 只需要一台電腦即可操作，全程不需要動物實驗，只需要根據 QSAR 理論或其他的預測理論就能獲得預測結果(Bohlen, Jeon et al. 2019)，但是需要相似物質足夠的魚類急毒性資料。

本研究提出的 ITS 是結合斑馬魚胚胎毒性試驗的替代測試和電腦預測模式結合而成，在策略中，毒性判斷流程，如圖四所示，經 QSAR Toolbox 毒性辨識後，有被分類出來的物質，可以進行建立 QSAR 模型以預測魚類急毒性，當 QSAR Toolbox 預測後顯示「對水生生物有毒」，則不論實際上是否有毒性，一律歸類到「對水生生物有毒」，如此可以解釋為：電腦預測後，被認為相對具有魚類急毒性風險的物質。另外，這些物質在 ITS 中，也不會操作斑馬魚胚胎急毒性試驗，因此只有使用到預測毒理學。有文獻指出，近年來，EU 認為 QSAR 模型的預測結果，只要具備完整的理論根據，就可以使用在法規毒理學上 (Burden, Maynard et al. 2016)。接著，對於電腦預測認為「對水生生物低毒性」的物質才會使用斑馬魚胚胎急毒性試驗，屬於魚類急毒性的替代測試，符合減少動物實驗的目標。

替代測試和預測毒理學在本研究的驗證之下都有替代魚類急毒性試驗的能力，且在過去數篇文獻之研究結果也已證實相同的現象 (Lammer, Carr et al. 2009, Belanger, Rawlings et al. 2013, Burden, Maynard et al. 2016, Nendza, Muller et al. 2017)。

因此，當面臨大量未知魚類急毒性試驗的物質時，進行魚類急毒性評估和篩選時，動物實驗需要使用大量動物，替代測試也會使用少量動物，但預測毒理學不需使用任何動物，而本研究的 ITS 使用比替代測試更少的動物，就能有效率的篩選魚類急毒性。

## 二、為什麼本研究的 ITS 可以有良好的預測結果

建立 ITS 時，要清楚定義應用範圍。從選擇任意的物質開始進入流程，在接續的步驟必須要經由 QSAR Toolbox 能夠辨識的物質才能進入此 ITS 的預測毒性階段，無法進入 ITS 後面步驟的物質就需要再進一步的評估，例如，這些物質通常沒有明確的化學結構或是少部分的混合物質。由於 QSAR 理論是針對純物質定量計算其毒性，而混合物的毒性還要考慮毒理學上的拮抗 (antagonism)、加成 (addition) 或協同 (synergism) 等作用模式，可能會有高估或低估毒性的結果。不過，先前有研究發現混合物的毒性電腦預測的研究結果中，都顯示常常高估其實際毒性的結果 (Schmidt, Busch et al. 2016)。這些物質中，有部分還帶有對水溶解度低的特性，例如：對水溶解度  $<1$  mg/L，在生態毒理學上屬於較難研究的物質。

因此，要將最適合和最不適合使用電腦預測的物質分開研究，在 ITS 上才有節省時間和快速分類的效果 (Rovida, Alepee et al. 2015)。最適合處理的物質再分別經過電腦預測和斑馬魚胚胎毒性試驗測試後，歸類到正確的毒性之下。斑馬魚胚胎毒性試驗能夠將電腦預測中  $LC_{50}$  被高估的物質 ( $LC_{50} > 100$  mg/L)，經由斑馬魚胚胎毒性試驗後，重新導向正確的毒性分類，或是再次得到  $>100$  mg/L，「對水生生物低毒性」的結論，所以才使得 ITS 的預測正確率提高。

## 三、ITS 在「對水生生物有毒」的物質較為準確

30 個物質中，有 2 個物質不適合用 QSAR 預測 AFT 值 (超出 95% 信賴區間)，此 2 個物質可以接著透過斑馬魚胚胎毒性試驗進行第二次測試，如圖五所示。另外有 1 個物質不適合用 FET 推估 AFT 值 (超出 95% 信賴區間)，如圖六所示。如果 QSAR 沒有將這類型的物質，在第一階段就判斷正確，則會影響 ITS 的準確度。

從目前研究結果可以發現不適合 QSAR 預測的物質可能有具高分子鹽類或醇類特性。不適合 FET 推估的物質可能有具芳香族胺類或苯胺類特性。由於兩種替代模式預測不準確的為不同種類的物質，因此兩者結合後有機會補足預測不準確的部分，也因此 ITS 能夠提升預測準確度。使用 QSAR Toolbox 建立 QSAR 模型被認為可以預測任何有明確分子結構的物質 (Yordanova, Schultz et al. 2019)，但是目前 QSAR 相關研究認為無機化合物、混合物和鹽類物質，以 QSAR 來預測毒性之準確性尚有提升的空間。

大部分被預測為「對水生生物有毒」的物質 ( $LC_{50} \leq 100$  mg/L) 準確率較高，在 ITS 中，這類型的物質不需要使用斑馬魚胚胎急毒性試驗，是為了能快速區分物質毒性，目的是以電腦預測進行快速篩選，再將較有風險的物質進行第二次驗證。

不過，若是被 QSAR 預測為低毒性的物質 ( $LC_{50} > 100$  mg/L) ，再透過斑馬魚胚胎急毒性試驗測試則可以更有效的被分類。因此，本來 QSAR 預測不準確的物質，最後可再由斑馬魚胚胎試驗重新導向正確的毒性分類。

## 柒、結論

---

驗證定量結構活性關係模型的預測和斑馬魚胚胎急毒性試驗之替代測試的推估，發現各自都有能力預測魚類急毒性試驗之動物實驗值。結合兩種替代方法成為一組整合型測試策略後，發現能提升先前模式的預測準確性。對於魚類急毒性試驗動物實驗值的預測準確性提升，之後面對大量物質之毒性篩選，經由此整合型測試策略之後，有著科學理論的支持，全程不需要操作傳統動物實驗就能準確且快速區分出物質的魚類急毒性。在填補化學物質生態毒理資訊上，也能提供實用的訊息。最重要的是能夠避免動物實驗的使用，使得整體研究更貼近動物福祉的目標，符合綠色化學的目標，也有符合 21 世紀的毒理學精神。

## 捌、參考資料及其他

---

- Ahlers, J., M. Nendza and D. Schwartz (2019). "Environmental hazard and risk assessment of thiochemicals. Application of integrated testing and intelligent assessment strategies (ITS) to fulfil the REACH requirements for aquatic toxicity." Chemosphere **214**: 480-490.
- Belanger, S. E., J. M. Rawlings and G. J. Carr (2013). "Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals." Environmental Toxicology and Chemistry **32**(8): 1768-1783.
- Belanger, S. E., J. M. Rawlings and R. Stackhouse (2018). "Advances in understanding the response of fish to linear alcohols in the environment." Chemosphere **206**: 539-548.
- Bohlen, M. L., H. P. Jeon, Y. J. Kim and B. Sung (2019). "In Silico Modeling Method for Computational Aquatic Toxicology of Endocrine Disruptors: A Software-Based Approach Using QSAR Toolbox." Love-Journal of Visualized Experiments(150): 15.
- Burden, N., S. K. Maynard, L. Weltje and J. R. Wheeler (2016). "The utility of QSARs in predicting acute fish toxicity of pesticide metabolites: A retrospective validation approach." Regulatory Toxicology and Pharmacology **80**: 241-246.
- Groth, G., K. Schreeb, V. Herdt and K. J. Freundt (1993). "TOXICITY STUDIES IN FERTILIZED ZEBRAFISH EGGS TREATED WITH N-METHYLAMINE, N,N-DIMETHYLAMINE, 2-AMINOETHANOL, ISOPROPYLAMINE, ANILINE, N-METHYLANILINE, N,N-DIMETHYLANILINE, QUINONE, CHLOROACETALDEHYDE, OR CYCLOHEXANOL." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **50**(6): 878-882.
- Lammer, E., G. J. Carr, K. Wendler, J. M. Rawlings, S. E. Belanger and T. Braunbeck (2009). "Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?" Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **149**(2): 196-209.
- Nagel, R. (2002). "DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* - a general model in ecotoxicology and toxicology." Altex-Alternativen Zu Tierexperimenten **19**: 38-48.
- Nendza, M., M. Muller and A. Wenzel (2017). "Classification of baseline toxicants for QSAR predictions to replace fish acute toxicity studies." Environmental Science-Processes & Impacts **19**(3): 429-437.
- OECD (2011). "VALIDATION REPORT (PHASE 1) FOR THE ZEBRAFISH EMBRYO TOXICITY TEST PART I OECD Series on Testing and Assessment 157." The OECD observer. Organisation for Economic Co-operation and Development **157**.
- OECD (2013). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.
- Rovida, C., N. Alepee, A. M. Api, D. A. Basketter, F. Y. Bois, F. Caloni, E. Corsini, M. Daneshian, C. Eskes, J. Ezendam, H. Fuchs, P. Hayden, C. Hegele-Hartung, S. Hoffmann, B. Hubesch, M. N. Jacobs, J. Jaworska, A. Kleensang, N. Kleinstreuer, J. Lalko, R. Landsiedel, F. Lebreux, T. Luechtefeld, M. Locatelli, A. Mehling, A. Natsch, J. W. Pitchford, D. Prater, P. Prieto, A. Schepky, G. Schuurmann, L. Smirnova, C. Toole, E. van

- Vliet, D. Weisensee and T. Hartung (2015). "Integrated Testing Strategies (ITS) for Safety Assessment." Altex-Alternatives to Animal Experimentation **32**(1): 25-40.
- Schmidt, S., W. Busch, R. Altenburger and E. Kuster (2016). "Mixture toxicity of water contaminants-effect analysis using the zebrafish embryo assay (Danio rerio)." Chemosphere **152**: 503-512.
- Yordanova, D., T. W. Schultz, C. Kuseva, H. Ivanova, T. Pavlov, G. Chankov, Y. Karakolev, A. Gissi, T. Sobanski and O. G. Mekenyan (2019). "Alert performance: A new functionality in the OECD QSAR Toolbox." Computational Toxicology **10**: 26-37.