

美歐日植物病毒疫苗之商品登記案例研析

梁瑩如¹、黃莉欣^{1*}

摘要

梁瑩如、黃莉欣。2021。美歐日植物病毒疫苗之商品登記案例研析。臺灣農藥科學 10 : 49-76。

微生物製劑 (microbial biological control agents, MBCAs) 是指含有微生物的生物農藥，該類藥劑具有控制病蟲害的潛力。隨著我們對微生物防治功效與機制之瞭解，對於微生物製劑的應用層面也隨之擴展，應用輕症病毒株對作物進行交互保護 (cross protection) 即為一例。本文藉收集整理與探討美國、歐洲、日本已登記之輕症病毒株案例之理化性試驗項目，整理並歸納各國規定，提供我國未來對植物病毒輕症病毒株登記管理之參考。

關鍵詞：植物病毒疫苗、登記、法規、歐盟、美國、日本

緒言

由於社會和環境趨勢，對於低度使用或不使用合成化學藥劑來防治植物病蟲害已成為趨勢，各國在栽培技術方面也應用整合防治策略 (Integrated Pest Management, IPM) 來生產及降低化學合成藥劑的使用。植物病毒種類繁多，其傳播方式主要藉由媒介昆蟲傳播及機械性傳播，植物一旦受植物病毒感染，輕症者對作物生長影響不大，重症者則使植株衰弱，甚或死亡。為降低田間植物病毒的感染，主要防

治措施為選用健康種苗或清除罹病株以降低田間感染源，必要時須配合使用殺蟲劑控制蟲媒的田間密度，降低傳播速率。故此，增加殺蟲劑的使用量與頻度，不僅有破壞生態環境之疑慮、更有提高農藥殘留之風險，也增加媒介昆蟲產生抗藥性的機率。因此，輕症植物病毒疫苗的運用，將會是控制植物病毒嚴重發生的重要防治策略之一。

交互保護 (mild strain cross-protection, MSCP) 的概念是由 McKinney⁽²⁰⁾ 在 1929 年首次提出，截至目前為止已有多種可能的模式或作用機制被討論。由於植物與病

接受日期：2021 年 8 月 17 日

* 通訊作者。E-mail: lhhuang@tactri.gov.tw

¹ 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

毒交互作用和基因靜默 (gene-silencing) 等機制之研究日漸精進，使得應用前述機制達到植物保護目的，及相關技術產品逐漸具有實質應用的價值。實務上，目前主要以自然發生的輕症病毒株與作物進行交互保護，其優點是，微生物未經基因修飾 (genetic modification) 或基因編輯 (gene editing)，因此不會產生基改的問題，而需進一步與社會溝通及評估社會接受度等考量。然而，對於應用新穎的植保產品而言，製造商仍應確保農民的使用效果，並承擔社會責任，因此，輕症病毒株對於作物保護作用的持久性 (durability)、該病毒株對作物和其他寄主植物的影響、安全性等試驗研究，仍應以嚴謹的方式進行探討⁽²⁸⁾。

本文主要重點在收集與研析目前已核准之植物病毒疫苗產品的各國登記案例，特別著重於理化性登記文件資料與田間應用方式，以利未來我國相關產品之登記審查作業，及評估我國發展新穎產品之利基。

交互保護的原理

輕症植物病毒疫苗是藉由輕症株作交互保護對植物進行的預免疫，又稱為獲得性免疫現象 (acquired immunity phenomenon)，用以防止作物被重症病毒株感染，而能應用作物生產鏈與配合 IPM 管理策略，以保護植物免受由同一病毒的重症分離株所引起的經濟損害。全世界已有許多

地區，已使用輕症株交互保護策略來控制部分病毒病害。

已知多種輕症病毒株的成功應用範例，包括使用矮南瓜黃化嵌紋病毒 (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)、木瓜輪點病毒 (papaya ringspot virus)、可可腫枝病毒 (cocoa swollen shoot virus)、柑橘萎縮病毒 (又稱柑橘南美立枯病毒，citrus tristeza virus, CTV) 等⁽²³⁾。香瓜茄嵌紋病毒 (pepino mosaic virus, PepMV) 的輕症病毒株為歐盟最新核准之有效成分，已登錄在微生物農藥活性成分核准清單中之病毒株^(10, 11)。1970 年代南美洲首度發現 PepMV 後，1999 年於荷蘭的溫室番茄中發生⁽²⁸⁾，進而變成歐洲番茄生產國的流行病害。由於該病毒株易由機械傳播，因此很快擴散到其他國家，病徵為使番茄產生斑紋 (marbled) 而喪失商品價值，造成農民重大的經濟損失。PepMV 病毒目前至少有 5 種不同遺傳型⁽⁵⁾，病毒遺傳型和地理分佈有關，當不同遺傳型發生混合感染，將導致多種難以防治的病徵。2010 年植物病毒學家在 PepMV 輕症病毒株 (現命名為 CH2 品系 1906 分離株) 試驗中，發現輕症病毒 1906 分離株可對強致病力的 PepMV-CH2 群病毒所引起的病害提供交互保護效果，但是在另一輕症病毒株 LP 群之試驗結果中，則顯示預接種 LP 群病毒株使番茄的病徵更加嚴重⁽¹⁶⁾。因此不同病毒株是否能產生預期的交互保護作用並無法從既有研究結果推導而知，對於輕症病毒株的研究利用，仍需大

量的投入，方能提供農民確切與優異的防治策略。由於目前尚未有抗 PepMV 病毒的番茄品種，因此使用輕症病毒株進行交互保護，將可為番茄農民提供不同的栽培管理策略。

除篩選天然存在的輕症病毒株外，還有其他策略產生輕症病毒株，包括 DNA 重組或是使用誘變方式產生，例如 Yeh 和 Cheng⁽²⁶⁾ 藉由刺角瓜 (*Cucumis metuliferus*) 作為替代寄主，來取得經亞硝酸誘變的 PRSV HA5-1 和 PRSV HA6-1 輕症病毒株；或對被感染植物進行熱處理來獲取輕症病毒株，例如 CTV 的熱減毒 (heat-attenuated) 輕症病毒株⁽⁷⁾，然而該等輕症病毒株目前尚未有商品化的產品問世。

至目前為止，雖然有許多研究嘗試解釋交互保護的機制，但對於微生物與作物之間的交互保護機制，仍然沒有完整而滿意的解釋。實際上，不同病毒的交互保護可能涉及不同作用機制，即使對同一病毒也可能因使用不同的研究方法，而有不同作用機制之闡述。由於目前對 MSCP 分子層次之機制仍不清楚，最早是在親緣非常接近的病毒株間觀察到交互保護作用，因此有學者假設認為抗病毒 RNA 靜默效應 (RNA silencing) 可能是驅動交互保護的機制⁽²⁴⁾。雖然部分研究結果顯示交互保護確實與 RNA 靜默機制有關，但仍有其他證據顯示 RNA 靜默並非導致交互保護的唯一機制。Ziebell 等學者⁽²⁷⁾ 使用 CMV (cucumber mosaic virus) 刪除型突變

株 (CMV deletion mutant)，該突變株為 RNA 靜默的 2b 病毒抑制蛋白 (2b viral suppressor) 之缺失故而無法產生 RNA 靜默作用，但該突變株卻仍然能夠防治由重症病毒株所引起之病害，保護效果可擴及與 CMV 不同亞群 (subgroup) 的病毒株，該群與突變株幾乎沒有遺傳同源性。由該報導可知，突變株不會誘導強烈的系統性靜默信號，但卻能提供交互保護作用，因此推測有其他的作用機制參與交互保護作用。目前有 6 種 MSCP 防治機制的假說^(18, 19, 24, 25)，包括：(1) 使用具有保護作用的輕症病毒株佔據致病力高之重症病毒株侵入時所需要的位點，使後續進入寄主體內的重症病毒株無法在寄主體內繁殖；(2) 輕症病毒株的外鞘蛋白抑制重症病毒株的脫殼；(3) 輕症病毒株的複製酶與重症病毒株的 RNA 結合，產生沒有複製能力的複合體；(4) 輕症病毒株抑制重症病毒株在寄主內的移動；(5) 輕症病毒株的 RNA 與重症病毒株在寄主內新生成的 RNA 形成雙股 RNA，抑制重症病毒株的複製；(6) 輕症病毒株的複製啟動寄主降解對重症病毒株靶標 RNA，亦即啟動寄主類似轉錄後基因靜默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS) 機制之 RNA 靜默 (RNA silencing) 機制。另外，科學家也發現使用 MSCP 防治經驗顯示，輕症病毒株在交互保護效果上常常具有寄主品種選擇性和地域性，因此，對於各地區所使用之輕症病毒株，仍有品系與防治效果之差異。此外，使用輕症病毒株

使作物產生 MSCP 抗性，實務上所需的時間至少為數天到一個月內。

美國與歐盟之輕症植物病毒疫苗登記要件

針對美國與歐盟對輕症植物病毒疫苗在理化性之登記要件整理如下：

一、美國

根據 40e-CFR§158.2120 至 §158.2150 規範，在美國登記微生物產品所需理化之登記資料 (表一)⁽¹³⁾。然而當該微生物農藥為轉基因微生物農藥則另須提交其他資訊供審查，包括但不限於所採用的基因工程技術、插入或缺失的基因片段的鑑定資訊 (如基因的鹼基序列或限制酶酵素圖譜)、相關基因所控制之資訊、預期表達的“新穎”特徵或特性之描述、遺傳穩定性和遺傳交換的測試評估報告及 Tier II 環境評估和毒理學評估等。

二、歐洲

基於歐盟法規 (EC) 第 1107/2009 號規定所制定之文件中指出用於鑑定原體有效成分為微生物品系或分離株⁽²²⁾，則是以核准之微生物原體為品系階層 (strain level)，目前的作法是根據每一新品系或分離株的優點來進行登記。由於各類鑑定和分析方法發展快速，因此登記時申請人

可能會被要求重新確認微生物之鑑定和分類學地位。所需之登記資料需滿足歐盟法規 (EU) 283/2013 和 284/2013 之要求。目前所需資料包括 (A) 微生物鑑定：包括申請人和地址、分類學名稱、品系／分離株、製造商號碼、寄存編號和 CIPAC 號碼、品系特徵 (strain characterization)、製程、成分、相關代謝物／毒素之鑑定、產製物質和汙染物鑑定、批次分析報告和 (B) 分析方法。另外，也包括微生物等同性評估、對人類健康與環境之影響、綜合結論等。歐盟已核准之輕症病毒株有效成分最為豐富，後續段落將針對不同有效成分案例進行說明。

國外商品化之輕症病毒株登記所需文件及案例研析

目前已有 5 種輕症病毒株登記為有效成分 (表二)，包括商品名 Agroguard™ Z⁽¹²⁾ 和 Curbit® (有效成分 ZYMV-WK PV-593)⁽⁸⁾、PMV®-01 (有效成分 PepMV CH2 品系 1906 分離株；PepMV strain CH2 isolate 1906)⁽⁹⁾、商品名 V10 (有效成分包含輕症香瓜茄嵌紋病毒 VC1 分離株；Mild PepMV isolate VC1 和輕症香瓜茄嵌紋病毒 VX1 分離株；Mild PepMV isolate VX1)^(10, 11) 及日本京都微研のキュービオ Z Y-0 2 (有效成分 ZYMV-WK-2002)⁽²⁾ 等。以下針對已登記產品在各國之登記要件進行案例研析。

表一、美國微生物農藥產品登記所需之資料需求

Table 1. Data requirements of biopesticides registration in the USA

Test guideline No. 適用準則	Data requirement 資料需求	All use patterns 必要性	Test substance ²⁾ 測試標的		Test notes ³⁾ 備註
			MP ¹⁾	EP	
Product Chemistry and Composition 產品化學和組成					
885.1100	Product identity 產品鑑別	R ²⁾	MP	EP	
885.1200	Manufacturing process 製程	R	TGAI 與 MP	TGAI 與 EP	
885.1250	Deposition of a sample in a nationally recognized culture collection 菌種保存中心寄存	R	TGAI	TGAI	1
885.1300	Discussion of formation of unintentional ingredients 對非目標成分來源之討論	R	TGAI 與 MP	TGAI 與 EP	
Analysis and Certified Limits 分析和限值證明					
885.1400	Analysis of samples 樣品分析	R	TGAI 與 MP	TGAI 與 MP	2
885.1500	Certification of limits 限值證明	R	MP	EP	
Physical and Chemical Characteristics 理化性試驗項目					
830.6302	Color 顏色	R	TGAI	TGAI	
830.6303	Physical state 物理狀態	R	TGAI	TGAI	
830.6304	Odor 氣味	R	TGAI	TGAI	
830.6313	Stability to normal and elevated temperatures, metals, and metal ions 在常溫和高溫、金屬和金屬鹽的穩定性	R	TGAI	TGAI	
830.6317	Storage stability 儲存安定性	R	TGAI 與 MP	TGAI 與 MP	
830.6319	Miscibility 混合性 (或稱溶混性)	R	MP	EP	3
830.6320	Corrosion characteristics 腐蝕性	R	MP	EP	4
830.7000	pH	R	TGAI	TGAI	
830.7100	Viscosity 黏度	R	MP	EP	5
830.7300	Density/relative density/bulk density (specific gravity) 密度/相對密度/容積密度 (比重)	R	TGAI	TGAI	

¹⁾ MP = 製造用之產品 (Manufacturing-use product)、EP = 最終用途產品 (End-use product)、TEP = 一般最終用途產品 (Typical end-use product)、TGAI = 原體 (Technical grade of the active ingredient)、All = 上述全部類型

²⁾ R = 需要

³⁾ 1. 每個微生物農藥分離株都必須提交。各分離株均需寄存並簽署協議書 (agreement)，以確保在登記期間樣品被保存且不會被丟棄

2. 登記各類製造用途之產品和最終用途產品均必須提交。該分析報告必須在生產過程中執行，否則無法評估潛在的微生物污染或微生物再生長的可能性。對於完整註冊程序而言，一般會根據產製之頻率，要求一段時間內的各批次樣品彙整分析報告

3. 僅在乳劑劑型的微生物農藥才須提交

4. 當微生物農藥包裝於金屬、塑膠或紙類容器時須提交

5. 僅液體劑型的微生物農藥須提交

表二、國外商品化之輕症病毒株登記的有效成分種類

Table 1. Active substances of attenuated virus strains worldwide

Trade name 商品名	Attenuated virus strains 輕症病毒種類	Registered number 登記字號	Registered Country 國家	Host plants applied 適用作物	Approved 核准日期	Application site 施用地點	GMO (Y/N)
Agroguard™Z	ZYMV-WK PV-593 矮南瓜黃化嵌紋病毒－ 輕症病毒 PV-593	EPA Reg. No. 82706-R	USA 美國	<i>Cucurbitaceae</i> 葫蘆科	2007	Greenhouse, before transplanting to the field with the 4th true leaf appearance 溫室、移植到田 間前及第 4 片真 葉出現前至少 5 天施用	N
Curbit®		Active substance ID: 2020	EU 歐盟		2013	Greenhouse, before transplanting to the field with the 4th true leaf appearance 溫室、移植到田 間前及第 4 片真 葉出現前至少 5 天施用	N
京都微研™キ ュービオ Z Y-0 2	ZYMV-WK-2002 矮南瓜黃化嵌紋病毒－ 輕症病毒-2022	農林水産省 登録第 22152 号	JP 日本	<i>Cucurbitaceae</i> 葫蘆科	2008	Greenhouse, before transplanting to field 溫室、移植到田 間前	N
PMV®-01	Pepino mosaic virus, strain CH2, isolate 1906 香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 1906 分離株	EPA Reg. No. 92554-1 Reg. (EU) 2015/1176, Reg. (EU) No 540/2011 RD2018- 19(PRD2018 -12)	USA 美國 EU 歐盟 CA 加拿大	<i>Solanaceae</i> 番茄	2018 2015 2018	Greenhouse 溫室 Greenhouse 溫室 Greenhouse 溫室	N
V10	Mild pepino mosaic virus strain CH2, isolate VC 1 輕症香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 VC1 分離株	Reg. (EU) 2017/408	EU 歐盟	<i>Solanaceae</i> 番茄	2017	Greenhouse 溫室	N
	Mild pepino mosaic virus, strain LP, isolate VX 1 輕症香瓜茄嵌紋病毒 LP 品系 VX1 分離株	Reg. (EU) 2017/406	EU 歐盟	<i>Solanaceae</i> 番茄	2017	Greenhouse 溫室	N

一、有效成分矮南瓜黃化嵌紋病毒－輕症病毒株 ZYMV-WK 核准產品之案例研析

(一) 生物特性

有效成分矮南瓜黃化嵌紋病毒－輕症病毒株 ATCC PV593 (此稱 ZYMV-WK PV-593)，是矮南瓜黃化嵌紋病毒 (ZYMV) 的自然突變株，該病毒株最初是 1986 年於法國被感染之香瓜 (*Cucurbita pepo*) 中分離出來的，該病毒株表現出 ZYMV 病徵減弱的症狀。由感染的葫蘆科植物葉片搗碎均質過濾的汁液製成，至少含有 ZYMV-WK PV-593 輕症病毒顆粒 0.05 mg/L。使用方法包括藉由噴射注射 (jet injection) 在櫛瓜、絲瓜 (marrow)、黃瓜、矮南瓜、西瓜、美濃瓜和南瓜等葫蘆科作物苗期 2~4 片真葉上⁽¹²⁾，或在 BBCH 11⁽²¹⁾ 的幼苗階段作為誘導原，藉以對重症 ZYMV 病毒侵染提供保護作用。

ZYMV-WK PV-593 輕症病毒株的作用機制是刺激植物細胞產生後轉錄基因靜默之 RNA 靜默，以對可引起嚴重病徵的 ZYMV 病毒株反應而達到交互保護的功效。ZYMV-WK PV-593 可在感病葫蘆科作物中複製，但不會產生明顯的病徵，並且蚜蟲對 ZYMV-WK PV-593 病毒株的傳播力極弱。當在苗期葉片接種 ZYMV-WK PV-593 病毒株時，僅在葉子上出現輕度病徵，例如局部葉斑駁、葉片嵌紋，且不會產生果實畸形。ZYMV-WK PV-593 交

互保護的實例已在幾個歐盟國家、英國、以色列和臺灣得到證明，同時在加州田間試驗也證實對哈密瓜有良好的保護效果⁽¹²⁾，在嚴重感染 ZYMV 病毒之病田試驗，使用 ZYMV-WK PV-593 進行交互保護後，將使可銷售之果實產量維持在 75%⁽¹²⁾。目前 ZYMV-WK PV-593 病毒株在歐盟也已登記為生物農藥，在以色列 (1997 年登記)、英國 (2006 年登記) 和歐盟是以商品名 Curbit™ 進行登記。美國登記案例之產品總覽臚列如下 (表三)⁽¹²⁾。

ZYMV-WK PV-593 輕症病毒株寄存在美國 ATCC (American type culture collection)，寄存編號為 PV-593，該病毒株是 1986 年於法國分離的野生型無毒株。

(二) 案例分析

1. 美國 AgroGuard™Z 產品案例

ZYMV-WK PV-593 病毒株在美國登記的商品名為 AgroGuard™Z，於 2007 年 8 月通過審核。該項產品可利用特殊設備 (例如真空壓力噴槍 Bim-GH™、Bim-Field™) 接種到幼苗上⁽¹²⁾。

在商品名 AgroGuard™Z 產品標籤上所示之 ZYM-WK PV-593 的有效成分濃度為 0.000005% (0.05 mg virion/L)，其最低病毒含量為 5×10^{13} 病毒顆粒/L。登記所需提交的產品基本資料包括 (表四) 病毒株基本資料、作用機制、劑型、施用方法、製程、非標的成分 (unintentional

ingredients)、產品分析、限值證明(certification of limits)、分析方法、理化性等。病毒株基本資料包括病毒株分類、病毒顆粒大小、寄主範圍、傳播方式、對人類或動物的毒性等。

理化性試驗則根據 OPPTS 指引 830.6302、830.6303、830.7000、830.7300、830.6320、830.6317 等規範加以說明(表五),包括顏色(深綠色)、物理狀態(溶液)、氣味(磨碎的南瓜葉味道)、

表三、有效成分 ZYMV-WK PV-593 登記案例總覽

Table 3. Product overview of ZYMV-WK PV-593

Items 項目	Descriptions 說明
Identity 產品鑑定	Zucchini yellow mosaic virus - weak strain
Culture collection 微生物寄存	ATCC PV-593
Trade name 商品名	AgroGuard™, Curbit™
OPP Chemical Code OPP 化學編號	244201
Basic Manufacturer 製造商	Bio-Oz Biotechnologies, Ltd.
Type of Pesticide 藥劑類型	Microbial pesticide, plant viruscide 微生物藥劑、植物殺病毒劑
Use Sites 使用時機	Young plants in the <i>Cucurbitaceae</i> family before transplanting in the field 葫蘆科幼苗移植本田前
Target Pests 標的害物	Protect plants against severe infections by zucchini yellow mosaic virus 抗重症矮南瓜黃化嵌紋病毒
Formulation Types 製劑類型	Liquid 液體
Method/Rate of Application 施用頻率	In greenhouse or other environments, under positive pressures, the pesticide is directly sprayed on young cucurbit seedlings at the rate of ca. 0.05 mg ZYMV-WK virions/L of product 在溫室或其他環境下以正壓,將本微生物農藥直接噴灑在葫蘆科作物幼苗,噴灑量約為0.05 mg ZYMV-WK病毒顆粒/L。

表四、ZYMV-WK PV-593 輕症病毒株鑑定和製程之資料需求⁽¹²⁾

Table 4. Data requirements pertaining to product identity and the manufacturing process for ZYMV-WK PV-593

Test item 項目	Regulation ¹⁾ 法規與 Guideline ²⁾ 準則
Product identity 產品鑑定	151-20 ¹⁾ 885.1100 ²⁾
Manufacturing process 製造方法	151-21 885.1200
Discussion of formation of unintentional ingredients 非標的成分之討論	151-22 885.1300
Analysis of samples 樣品分析	151-23 885.1400
Certification of limits 限值證明	151-25 885.1500
Enforcement analytical method 可執行的分析方法	151-25 885.1800
Physical and chemical properties 理化性	151-26

¹⁾ Microbial Pesticide Guidelines Reference No. 40 CFR 158.740

²⁾ OPPTS Microbial Pesticide Test Guidelines

表五、AgroGuard™Z (有效成分 ZYMV-WK PV-593 輕症病毒株) 之理化性要求

Table 5. Physical and chemical properties of AgroGuard™ Z containing ZYMV-WK PV-593

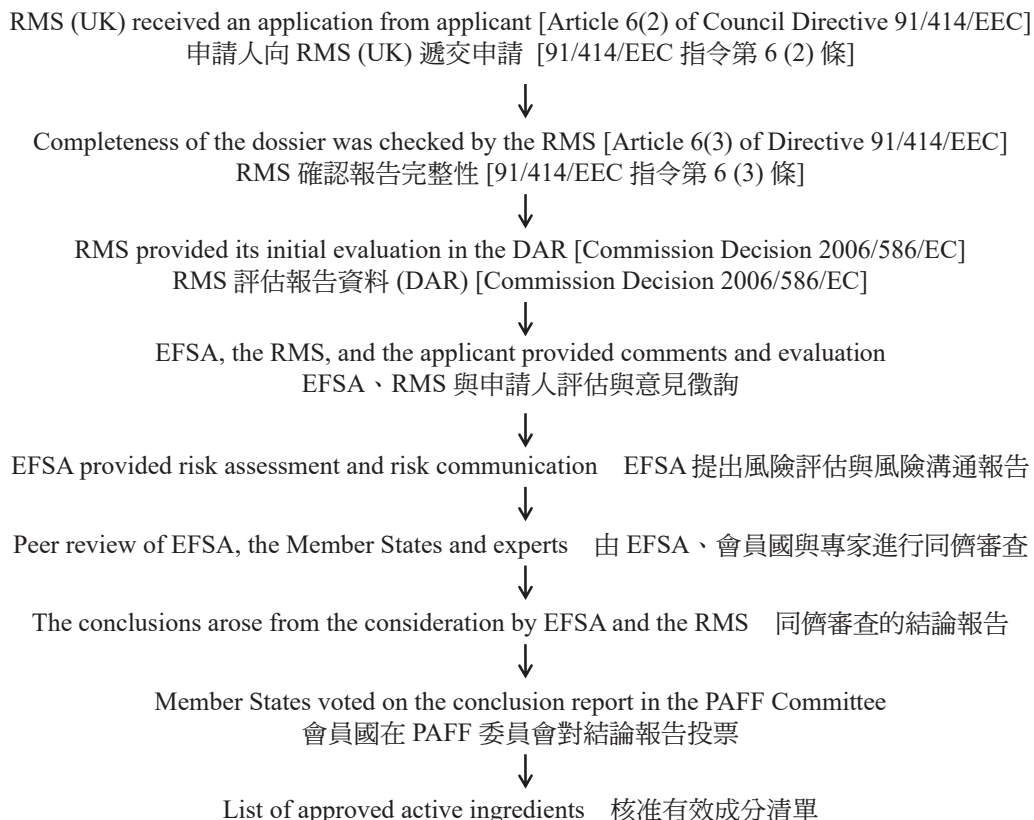
Items 項目	Test Guideline 適用準則	Description 結果描述	Test notes 適用與否
Color 顏色	830.6302	Dark green liquid 深綠色溶液	○
Physical State 物理狀態	830.6303	EP is a Fluid 最終產品為液體	○
Odor 氣味	830.6304	Aroma of crushed squash leaves 磨碎的南瓜葉片味道	○
Stability 安定性	830.6313	Product is not chemically reactive 生物性產品無化學反應性	×, Not applicable 不適用
Oxidation/Reduction 氧化性/還原性	830.6314	Product does not contain oxidizing or reducing agents 產品未含氧化或還原物質	×, Not applicable 不適用
Flammability 燃燒性	830.6315	Product does not contain combustible liquids 產品未含可燃性液體	×, Not applicable 不適用
Explosibility 爆炸性	830.6316	Product does not contain potentially explosive components 產品未含可能的爆炸物質	×, Not applicable 不適用
Storage Stability 儲存安定性	830.6317	4°C, 14天	○
Miscibility 混合(溶混)性	830.6319	Product is not emulsifiable or diluted with petroleum solvents 產品非以石化溶劑稀釋或乳化	×, Not applicable 不適用
Corrosion Characteristics 腐蝕性	830.6320	Product is not chemically reactive 生物性產品無化學反應性	×, Not applicable 不適用
Dielectric Breakdown Voltage 介電破壞電壓	830.6321	Product is not intended for use around electrical equipment 產品非使用於電子器械或高壓電場域	×, Not applicable 不適用
pH值	830.7000	6.1±0.2	○
Viscosity 黏度	830.7100	Similar to water 近似水	○
Melting Range 熔融範圍	830.7200	Product is not a solid 生物性產品非固體化學品	×, Not applicable 不適用
Boiling Range 沸騰範圍	830.7220	TGAI is a solid 原體為生物性固體	×, Not applicable 不適用
Bulk density容積密度	830.7300	8.3 lbs/gal.	○
Dissociation Constant in Water 水中解離常數	830.7370	TGAI is not ionic 原體非為離子型化合物	×, Not applicable 不適用
Partition Coefficients 分配係數	830.7550/60/70	Product is not organic or non-polar 產品非為有機或非極性化合物	×, Not applicable 不適用
Water Solubility 水溶解度	830.7840/60	Settling may occur – shake mixtures prior to use 可能有沉澱，使用前須搖晃均勻	○，須標示於標籤上 Label
Vapor Pressure 蒸氣壓	830.7950	TGAI is a biological entity and should not evaporate 原體為生物體，不會蒸發	×, Not applicable 不適用

儲存安定性 (4°C, 14 天)、pH (6.1±0.2)、黏度 (近似水)、容積密度 (8.3 lbs./gal.)、水溶性 (可能會有沉澱, 使用前搖一搖), 並說明所使用的其他成分均為無毒性之副料成分。

2. 歐洲 Curbit™ 有效成分登記案例

由於歐洲登記審查體制之故⁽¹⁾, 歐洲食品安全局 (European Food Safety Authority, EFSA) 僅對有效成分進行審查。Curbit® 有效成分為 ZYMV-WK 輕症病毒株, 其

審查由歐洲食品安全局根據書記會員國 (Rapporteur Member State, RMS) 所作之風險評估及 EFSA 的同儕審閱, 得出審查結論。在該結論中說明 ZYMV-WK 輕症病毒株可做為一種誘導原 (elicitor), 防治葫蘆科作物重症 ZYMV 病毒株之侵染。審查機構根據現有研究和文獻, 確立可用於監管風險評估之事件終點 (endpoint)。相關審查流程 表示如下 (圖一)。



圖一、有效成分為 ZYMV-WK 之申請與審查流程圖。

Fig 1. Flow chart illustrating the application and review process required to register ZYMV-WK.

根據 91/414/EEC 指令第 6 (2) 條，本案的 RMS 為英國⁽⁸⁾，其收到 Bio-Oz Biotechnologies Ltd. 的申請文件且確認文件符合 91/414/EEC 指令第 6 (3) 條的規定及檔案的完整性。接著 RMS 提出初步的評估報告草案 (Draft Assessment Report, DAR)，並經同儕審查後，供成員國和 Bio-Oz Biotechnologies Ltd. 進行討論協商。由於本案的 DAR 評估意見為無需進行專家諮詢，因此 EFSA 根據歐盟法規 188/2011(EC) 第 8 條，進一步確認 ZYMV-WK 輕症病毒株是否可預期達成

91/414/EEC 指令第 5 條規定的條件而做出結論。根據申請人檢具的申請資料，確認 ZYMV-WK 輕症病毒株的可作為誘導劑，對抗葫蘆類作物重度 ZYMV 病毒侵染，代表性用途的完整細節記錄在該報告內 (表六)，臚列 ZYMV-WK 輕症病毒株生物學特性。

輕症病毒株在歐洲登記時所需提交之生物學特性 (表七)⁽⁸⁾，包括 ZYMV-WK 輕症病毒株屬於馬鈴薯 Y 病毒科 (*Potyviridae*)，馬鈴薯 Y 病毒屬 (*Potyvirus*)。可使用聚合酶鏈反應 (polymerase chain

表六、ZYMV-WK 輕症病毒株之生物學鑑定資訊⁽⁸⁾ (OECD data point IIM 1)

Table 6. Identity of ZYMV-WK⁽⁶⁾ (OECD data point IIM 1)

Items 項目	Descriptions 說明
Active micro-organism 微生物名稱	zucchini yellow mosaic virus, weak strain 矮南瓜黃化嵌紋病毒輕症病毒株
Taxonomy 分類學	<i>Potyviridae</i> 科, <i>Potyvirus</i> 屬
Species, subspecies, strain 種、亞種、品系	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i> , weak strain
Identification/detection 鑑定／偵測方法	1. 使用 PCR 技術偵測 2. 使用 ELISA 方法可用於確定樣品中 ZYMV 的存在或不存在
Culture collection 寄存	ATCC 寄存編號：PV-593
Minimum and maximum concentration of the MPCA used for manufacturing of the formulated product (cfu; g/kg) 用於生產成品最低和最高濃度 (cfu ; g/kg)	最低濃度：0.05mg virion/L
Identity and content of relevant impurities, additives, contaminating organisms in the technical grade of MPCA 微生物農藥原體所含相關雜質、添加劑和污染生物的鑑定與含量	成品農藥中的 ZYMV-WK 輕症病毒株是由人工感染的櫛瓜葉片 (Maayan 栽培種) 中萃取植物濾液。在成品農藥製備過程中，可能含有天然存在的內生菌、非病原菌、葉片表面微生物的混合物。因此容許有污染性微生物存在 ¹⁾
Is the MCPA genetically modified; if so provide type of modification MCPA 是否經過基因修飾？如果是，應提供基因修飾說明	否

¹⁾ 應符合品質管制對污染微生物之要求；當超過微生物規定的閾值時，將使該批次無法使用而必須丟棄

表七、ZYMV-WK 輕症病毒株的生物學特性及分析方法 (OECD data point IIM 2、IIM 4.2.8、4.3 及 IIM 5.3)

Table 7. Biological properties of ZYMV-WK and methods used to analyze it (OECD data point IIM 2, IIM 4.2.8, 4.3 and IIM 5.3)

Items 項目	Descriptions 說明
Origin and natural occurrence 來源和自然發生狀態	起源：1986 年最初在法國分離的天然菌株。在預定施用領域，該生物是種階層 (species level) 的本土生物
Background level 背景階層	背景階層：無相關數據。無須提供，因為該病毒是 ZYMV 天然株，且作為植物保護用途的 ZYMV-WK 輕症病毒株，無人和環境暴露問題
Target organism (s) 標的生物	重症 ZYMV 品系
Mode of action 作用機制	交互保護
Host specificity 寄主專一性	一般的植物病毒，potyviruses (ZYMV-WK) 具有高度寄主專一性
Life cycle 生活史	該病毒僅能於寄主的活體內繁殖。ZYMV-WK 輕症病毒株很難藉由蚜蟲傳播，因此當寄主死亡，該病毒也會死亡。但文獻研究指出，當 ZYMV-WK 輕症病毒株與其他病毒 (即輔助病毒 helper virus) 共同感染時，蚜蟲可以傳播 ZYMV-WK 輕症病毒株 (此部分有數據缺口)
Infectivity, dispersal and colonization ability 傳染性，擴散和定殖能力	ZYMV-WK 輕症病毒株具有寄主專一性，無法感染非標的物種，其蚜蟲傳播力差且無持久性。該病毒無法在寄主活組織外生存。但文獻研究指出，當 ZYMV-WK 輕症病毒株與其他病毒 (即輔助病毒) 共同感染時，蚜蟲可以傳播 ZYMV-WK 輕症病毒株
Relationships to known plant, animal or human pathogens 與已知植物、動物或人類病原菌之關係	與動物和人類病原菌間未存在已知的關係。藉由分子層次分析可確認 ZYMV-WK 輕症病毒株與其 3 種 potyviruses 病毒不同
Genetic stability 遺傳穩定性	自 1986 年以來，並未有關於遺傳穩定性產生任何變化之報導
Information on the production of relevant metabolites (especially toxins) (特別是毒素) 之資訊	科學文獻顯示 ZYMV 不產生代謝物/毒素
Resistance/sensitivity to antibiotics/anti-microbial agents used in human or veterinary medicine 對人或獸藥中所使用之抗生素/抗微生物劑的抗藥性/敏感性	目前沒有 ZYMV 對抗生素/抗菌劑具有抗藥性或敏感性的報導
Manufactured micro-organism (principle of method) 產製微生物 (方法原理)	分為三個生產階段：初級接種源 (primary inoculum)、原種接種源 (stock inoculum) 和接種原 (stock)

reaction, PCR) 進行專一性鑑定和區分 ZYMV 菌株。此外 ZYMV-WK 輕症病毒株也可藉由 RT-PCR / RT-PCR-RFLP (reverse transcription-polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism) 鑑定。另外，可以 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 方法作為偵測極限，用於確定樣品中的 ZYMV-WK 輕症病毒株是否存在及其預估含量。

本案原體有效成分是經過濾的植物汁液，相關微生物藥劑的數據缺口 (data gap) 可由五批次數據所得，包括污染微生物含量等資訊。根據經整合後之數據評估顯示，製劑之鑑定、理化性試驗和技術特性等方面，並無特殊需關注的部分，但是應在標籤標示該製劑可在 2~4°C 存放 2 週。此外，於審查中也發現，所提交的有效成分資訊，未含有涉及毒理學、生態毒理學或環境議題的相關不純物。

3. 日本

由於交互保護的機制逐漸被瞭解與實際應用，日本也研發相關產品，針對 ZYMV 開發具有高防治效果的植物病毒疫苗株 ZYMV-2002，劑型為冷凍乾燥製成的可濕性粉劑 (商品名「キュービオ ZY-02 (CUBIO ZY-02)」)⁽²⁾，並已申請登記為許可農藥。

日本產製之 ZYMV-2002 輕症病毒株之篩獲過程⁽¹⁷⁾，主要是利用物理學方法，以冷熱處理被感染之植株葉片後獲得減毒 (attenuated) 輕症病毒株。病毒株在

寄主植物 (EBISU 品種南瓜) 維持活性和加工生產，ZYMV-2002 輕症病毒株經過 10 世代繁衍，檢測其弱病原性決定基因 HC-Pro 中 4 個基因序列並沒有產生變異，顯示該性狀具遺傳穩定性，並將該具遺傳穩定性之 ZYMV-2002 輕症病毒株接種在小黃瓜後，可產生與原株同樣有極輕微的症狀表現。由上可知，生產 ZYMV-2002 輕症病毒株作為植物疫苗，需確認所使用之寄主植物是否能有效維持與生產繁殖病毒，本案例所選擇的 EBISU 品種南瓜可以用作病毒培育之寄主植物。原體的生產主要將經接種 ZYMV-2002 輕症病毒株的南瓜葉，適時地採摘各位置上的感染葉片，並將葉片磨碎汁液以超微過濾法 (ultrafiltration) 進行濃縮及加入安定劑，以冷凍乾燥法製成可濕性粉劑 (WP)。

所製得之製劑進一步測試最適的病毒濃度與容量，並評估 4°C 之儲存安定性，測試結果顯示在 24 個月內仍能保有病毒活性。病毒的感染性指標是以生物檢定法算出 50% 感染率 ($\log ID_{50}/0.3\text{mL}$)。製劑可使用自來水、磷酸鹽緩衝液、蒸餾水加以稀釋。登記所需相關之物理化學性質，則依日本農藥管理法所規範進行。此外，ZYMV-2002 輕症病毒株之微生物農藥登記，應檢附「微生物農藥的安全性評估基準相關規定之文件，包括「環境流佈影響」及「人體安全性試驗」。

環境流佈影響是農藥登記的必要項目⁽²⁾，如果能夠提出確切的根據，明確顯示不會對環境有不良影響的話，其試驗數據

結果可以不列入評估。申請人自 ZYMV-2002 輕症病毒株從小黃瓜及南瓜根部的分泌或游離量、水體或土壤中的生物殘留性，藉以評估對淡水魚、淡水無脊椎動物與土壤微生物等，是否可能造成不良影響。另外，也進行蚜蟲的傳播性試驗與各種葫蘆科作物的接種試驗，來評估對植物的影響。結果顯示，從受感染小黃瓜及南瓜之根部並未發現游離之感染性病毒，從採收後小黃瓜的殘根無法偵測到病毒，同時在自然條件下，土壤與農業排水中的病毒活性將迅速喪失，試驗結果顯示不會產生以水為媒介而發生根部交互傳染的現象，會以蚜蟲為傳播媒介的可能性亦極低。從以上試驗結果可知，ZYMV-2002 病毒在生態系中的擴散、殘留之可能性極低、且不會對淡水魚等環境生物造成影響

(表八)。更進一步來說，從製劑的使用方法與生物學特性推論，此製劑對鳥類、防治對象以外的昆蟲如蜜蜂、家蠶 (*Bombyx mori*) 等有益昆蟲的影響性微乎其微。

目前日本的成品藥劑有三種規格：2 mL (稀釋溶液體積 50 mL，接種株數 166 株)，6 mL (150 mL，500 株) 和 12 mL (300 mL，1,000 株)。使用方式為立即用水溶解藥瓶中的所有內容物，且由於溶解後之藥品無法保存，因此應計算好所需接種量。適用之作物為葫蘆科作物，特別是小黃瓜，將藥品稀釋後在子葉和第一真葉上進行接種。目前京都微研公司除出售輕症病毒產品外，也可根據客戶選定之葫蘆科作物品種代為接種或出售幼苗，以避免客戶因自行配製製劑和接種幼苗的成功率低，而導致防治效果不穩定。

表八、ZYMV-2002 之環境流佈評估

Table 8. Fate and behavior of ZYMV-2002 in the environment

Items	試驗項目	Descriptions of ZYMV-2002	ZYMV-2002 的性狀
Root exudates	根部的游離物	Infectious virus not detected	感染性病毒未檢出
Residue roots after harvest	採收後的殘根	Loss of activity rapidly	快速失去活性
Soil, surface water	土壤，地表水	Loss of activity rapidly	快速失去活性
Infectivity through water	以水為介質的傳染性	No	無
Transmission via aphids	蚜蟲的傳播性	No or extremely trace amount	無或極其微量
Genetic stability	重症病毒株的恢復變異性／遺傳穩定性	Nothing found after 10 generations of reproduction	經 10 世代繁殖亦無發現
Symptoms on other Cucurbitaceae crops	其他葫蘆科作物的病徵	No or trace amount	無或極輕微

二、有效成分香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 1906 分離株 PepMV strain CH2, isolate 1906⁽⁹⁾ 核准產品之案例研析

(一) 生物學特性

香瓜茄嵌紋病毒 (pepino mosaic virus, PepMV) 最早在祕魯香瓜茄植物 (pepino) (*Solanum muricatum*) 上發現，為一種植物病毒，屬 *Potexvirus* 屬 *Alphaflexiviridae* 科⁽¹⁵⁾。該病毒無法在植物細胞外複製，也沒有任何細胞結構或獨立的代謝系統。當病毒接管植物的代謝機制以進行病毒複製時，會產生病害症狀，例如嵌紋。香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 1906 分離株的作用機制為透過轉錄後基因靜默作用 (PTGS)，使作物對後續病毒感染產生抗性，以有效地阻止後續的病毒複製。PepMV 病毒與植物病原 narcissus mosaic virus (NMV)、scallion virus X (SVX)、cymbidium mosaic virus (CymMV) 和 potato aucuba mosaic virus (PAMV) 親源相近，對人類或動物無致病性^(9, 10, 11)。

PepMV 經由被感染的植物汁液經機械傳播到其他茄科作物，易發生在高密度栽培且生長溫度適合的溫室。PepMV CH2 品系 1906 分離株⁽⁹⁾ 是從比利時溫室番茄中所分離的輕症病毒，寄存在 GenBank，寄存編號為 JN835466，茄科作物是已知寄主植物。在美國目前已核准的

成品農藥商品名為 PMV[®]-01，有效成分為 PepMV CH2 品系 1906 分離株，為一種水懸劑 (SC)，是由均質過濾的番茄葉片汁液所製，每 μL 含有至少 5×10^5 病毒基因組數 (viral genome copies)。施用方法是藉由低容量 (low-volume) 噴灑方式施用，在番茄幼苗以作為誘導源，可作為防治 PepMV 的接種疫苗，最晚為番茄植株第 4 片真葉出現前接種，以避免高致病力的 PepMV 造成溫室番茄的損害和產量損失。

(二) 案例分析

1. 美國 PMV[®]-01 產品案例

在美國登記之 PepMV CH2 品系 1906 分離株，其商品名為 PMV[®]-01 產品登記總覽 (表九) 如下^(11, 12, 14)。

理化性試驗則根據 OPPTS 指引 830.6302、830.6303、830.7000、830.7300、830.6320、830.6317 等規範加以說明，其中顏色為深綠色至褐色、儲存安定性為在 4°C 下保存 21 天、無須提交自燃溫度 (autoignition temperature)、pH 值為 5.4~6.6、黏度為 3~6 cP、密度為 1.001~1.005、水溶性 (可能會有沉澱，建議使用時每隔 15 分鐘搖晃均勻)、產品無燃燒性和爆炸性等，故不適用相關指引。

2. 歐洲 PMV[®]-01 有效成分登記案例

有效成分香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 1906 分離株之申請案⁽⁹⁾，申請流程依循圖一所示，再經確認申請案的完整性與同儕審查後，所得整合評估之內容包括使用

PepMV CH2 品系 1906 分離株的風險評估結果、應用該病毒株在溫室番茄的交互保護效果等，及過程中所有的觀察與紀錄。

PepMV 可使用 TaqMan 即時定量聚合酶連鎖反應 (TaqMan real-time quantitative reverse transcription PCR, RT-qPCR) 區分 PepMV strain CH2 isolate 1906 輕症病毒株

與重症病毒株，該方法也可用於定量。在其他的資料評估及代表性製劑的微生物鑑定、生物學特性、理化特性等，並沒有需要列入關注的議題，但標籤上應標示該製劑最多可在 4°C 下保存 3 週。相關微生物學鑑定與理化性試驗資料如下 (表十) 和 (表十一)。

表九、PMV®-01 產品 (有效成分 PepMV CH2 品系 1906 分離株) 登記案例總覽

Table 9. Product overview of PMV®-01 (which contains pepino mosaic virus strain CH2 isolate 1906 as an active ingredient)

Items 項目	Descriptions 說明
Identity 產品鑑定	香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 1906 分離株 pepino mosaic virus, strain CH2, isolate 1906
Contain 含量	Minimum of 5×10^{11} virus particles per qt 每 946.35 mL 中 (原標籤為美式夸脫 (qt.)) 至少含有 5×10^{11} 病毒顆粒
Trade name 商品名	PMV®-01
Basic manufacturer 製造商	De Ceuster Meststoffen nv
Type of pesticide 藥劑類型	Microbial pesticide, plant viruscide 微生物藥劑、植物殺病毒劑
Use sites 使用地點	Greenhouse 溫室
Target pests 標的害物	Virulent pepino mosaic virus isolates 重症香瓜茄嵌紋病毒
Formulation types 製劑類型	SC, 水懸劑
Method/Rate of application 施用方法	一般方式：946.35 mL / 0.243 ha (原標籤為 1 美式夸脫 / 0.6 英畝 (1 qt./0.6 acre)) 快速接種：946.35 mL / 0.212 ha (原標籤為 1 美式夸脫 / 0.3 英畝 (1 qt./0.3 acre)) 總噴霧量取決於施藥設備和處理時間 種植後施用：每 0.4ha 使用 68.2~136.4L (原標籤為每英畝使用 15 至 30 加侖) 的噴霧溶液 播種前 / 播種時：每 0.4ha 使用 9.1~31.8 L (原標籤為每英畝使用 2 至 7 加侖) 的噴霧溶液 建議在使用產品之前先用水進行噴霧測試。噴霧溶液的溫度必須保持在低於 15°C (60°F) 以下

表十、香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 1906 分離株 (PepMV strain CH2 isolate 1906) 之微生物學鑑定資訊 (OECD data point IIM 1)

Table 10. Identity of pepino mosaic virus strain CH2 isolate 1906 in DAR (OECD data point IIM 1)

Items 項目	Descriptions 說明
Active micro-organism 微生物名稱	<i>Pepino mosaic virus</i> strain CH2 isolate 1906 香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 1906 分離株
Taxonomy 分類	<i>Alphaflexiviridae</i> 科、 <i>potexvirus</i> 屬
Species, subspecies, strain 種、亞種、品系	PepMV CH2 isolate 1906 香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 1906 分離株
Identification/Detection 鑑定／偵測方法	完整基因組序列：由 6410 核苷酸組成、含有 5 個 ORF 的單股 RNA，包括： ORF1 編碼 164-k Da RNA dependent polymerase, ORF2-4 成 PepMV triple (gene block TGB), ORF5 編碼 25-k Da 外鞘蛋白 (coat protein, CP)。最佳的偵測、鑑定和區分基因型之方法為 TaqMan real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) 為明確地鑑定 CH2 分離株 1906 品系輕症病毒株，需確認 TGB 和 CP 區域之部分序列
Culture collection 寄存	寄存於 GenBank，寄存編號 JN835466
Minimum and maximum concentration of the MPCA used for manufacturing of the formulated product (cfu; g/kg) 用於生產成品最低和最高濃度 (cfu; g/kg)	PMV-01 成品農藥含有 $>5 \times 10^5$ genome copies / μ L
Identity and content of relevant impurities, additives, contaminating organisms in the technical grade of MPCA 微生物農藥原體所含相關不純物、添加劑和污染生物的鑑定與含量	應提供生產批次中潛在存在的大腸菌的致病性評估
Is the MCPA genetically modified; if so provide type of modification MCPA 是否經過基因修飾？如果是，應提供基因修飾說明	否。為天然存在之病毒株

表十一、香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 1906 分離株的生物學特性 (OECD data point IIM 2、IIM 4.2.8、4.3 及 IIM 5.3)

Table 11. Biological properties of pepino mosaic virus strain CH2 isolate 1906 and the methods used to analyze it (OECD data point IIM 2, IIM 4.2.8, 4.3 and IIM 5.3)

Items 項目	Descriptions 說明
Origin and natural occurrence, Background level 來源和自然發生狀態、背景階層	香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 1906 分離株 (pepino mosaic virus strain CH2 isolate 1906) 是由比利時商用番茄品種上所分離，經由交互保護作用針對所有 PepMV 病毒在溫室番茄作進一步抗性篩選而得
Target organism (s) 標的生物	所有番茄上 PepMV 病毒株
Mode of action 作用機制	交互保護
Host specificity 寄主專一性	對茄科 (<i>Solanaceae</i> species) 作物具專一性
Life cycle 生活史	病毒顆粒由表皮和細胞壁的機械傷口或氣孔進入植物細胞之細胞質，而後在細胞質中完全或部分脫下外鞘蛋白，經植物細胞轉譯產生病毒蛋白而完成病毒生命史。病毒生活史的下一步是病毒向鄰近細胞移動。病毒顆粒經由相鄰細胞間的通道運送。從最初感染至全株感染約需幾天到幾週不等，感染時間長短取決於病毒、寄主植物和環境條件。病毒從一棵植物傳播到另一棵即完成其生活史
Infectivity, dispersal and colonization ability 傳染性，擴散和定殖能力	不適用。1906 分離株會抑制其他病毒株感染作物
Relationships to known plant, animal or human pathogens 與已知植物、動物或人類病原菌之關係	PepMV 與 NMV、SVX、CymMV 和 PAMV 親緣相近。NMV 和 CymMV 具高度核酸相似性 因缺乏辨識和進入寄主細胞的專一性受體，因此與人類或動物病原菌無關聯性
Genetic stability 遺傳穩定性	1906 分離株具有高遺傳穩定性和較窄的準種 (quasispecies)
Information on the production of relevant metabolites (especially toxins) 產生相關代謝物 (特別是毒素) 之資訊	病毒本身沒有新陳代謝，因此不會產生次級代謝物。目前已解序病毒基因組全序列，得知有五個編碼典型 <i>Potexvirus</i> 之序列。這些蛋白質均顯示未與已知人類或動物毒素具同源性。因此可確定在感染植物寄主細胞後，PepMV 不產生毒素
Resistance/ sensitivity to antibiotics/ anti-microbial agents used in human or veterinary medicine 對人或獸藥中所使用之抗生素／抗微生物劑的抗藥性／敏感性	不適用於病毒。病毒沒有代謝活性，不會產生抗微生物物質，對抗生素不敏感，因此不會對前述物質產生抗藥性
Manufactured micro-organism (principle of method) 產製微生物之分析方法	經科學驗證和公告的 TaqMan RT-qPCR 測定法可量化有效成分香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 1906 分離株。測試結果可得到 C_T 值，而可估算出每 μL 產品所含基因組數 (genome copies)
Impurities and contaminations 不純物和污染微生物	該病毒不會產生次級代謝物，生產過程中實施品質管制程序，包括進行測試以排除可能對番茄生產的有害污染物品質管制階段增加對污染微生物之分析；當超過微生物規定的閾值時，將使該批次無法使用而必須丟棄

三、商品名 V10 複合病毒株商品 (有效成分：輕症香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 VC1 分離株與 VX1 分離株) 之案例研析

成品農藥為“V10”為一種水懸劑⁽¹⁰⁾，為一種含有複合病毒株的產品，包含 5-25 mg/L 的輕症香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 VC1 分離株和 5~25 mg/L 的 LP 品系 VX1 分離株，二個有效成分含量大約相當於 1.5×10^{11} (10 mg/L) 和 7.5×10^{11} 病毒顆粒/mL，含量分別為 5~25 mg/L 及 5~25 mg/L，比例約為 1:1。目前該產品限制於溫室內使用。

代表性用途包括藉由在溫室中噴灑或機械接種於作物上，防止番茄被重症香瓜茄嵌紋病毒株感染。使用時以 12~15 bar 的壓力向下噴灑施用，接種於齡期為 BBCH 13-51、約 10~30 公分高的番茄幼苗。

(一) 輕症香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 VC1 分離株之生物特性

輕症香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 VC1 分離株 (Mild pepino mosaic virus isolate VC1) 為成品農藥 V10 的有效成分之一，其微生物學鑑定如下表 (表十二)。經如同圖一所示之申請程序後，審查結果摘錄如下：輕症香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 VC1 分離株是香瓜茄嵌紋病毒秘魯株 (Peruvian strain) 的變種，在德國微生物

和細胞培養物保存中心 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ) 之寄存編號為 DSM26973。VC1 分離株為自然發生，屬本土野生型，2004 年自荷蘭 Westland 溫室的番茄上分離而得，未經基因修飾。根據 SANCO/10054/2013-rev 報告內容，顯示輕症香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 VC1 分離株具防治效果。有效成分中含有不純物為尼古丁 (nicotine)，由於該不純物有毒理學安全性考量，含量應低於 0.1 mg/L。

(二) 有效成分輕症香瓜茄嵌紋病毒 VX1 分離株之生物特性

輕症香瓜茄嵌紋病毒 LP 品系 VX1 分離株 (Mild pepino mosaic virus strain LP, isolate VX1) 為成品農藥 V10 的有效成分之一⁽¹⁰⁾，本案評估總結為，在輕症香瓜茄嵌紋病毒 LP 品系 VX1 分離株暴露下並未觀察到不利影響，因此無需建立毒理學參考值。因此，也無需提交殘留容許量數據。由申請人所提供之試驗資料，顯示輕症香瓜茄嵌紋病毒 LP 品系 VX1 分離株對人類沒有致病性或感染性，一般為自然存在，不會對環境構成明顯的風險，故輕症香瓜茄嵌紋病毒 LP 品系 VX1 分離株可根據法規 (EC)1107/2009 第 22 條視為低風險活性物質。

VX1 分離株寄存於德國微生物和細胞培養物保存中心，寄存編號 DSM 26973。輕症香瓜茄嵌紋病毒 LP 品系

表十二、輕症香瓜茄嵌紋病毒 CH2 品系 VC1 分離株之微生物學鑑定資訊

Table 12. Identity of pepino mosaic virus strain CH2 isolate VC1

Items 項目	Descriptions 說明
Active micro-organism 微生物名稱	香瓜茄嵌紋病毒 PepMV
Taxonomy 分類學	<i>Alphaflexiviridae</i> 科、 <i>Potexvirus</i> 屬
Identification/Detection 鑑定/偵測方法	ELISA qRT-PCR 生物檢定 (bioassay) (感染番茄)
Culture collection 寄存	德國微生物和細胞培養物保存中心 (DSMZ) 寄存編號: DSM26973
Minimum and maximum concentration of the MPCA used for manufacturing of the formulated product (cfu; g/kg) 用於生產成品最低和最高濃度 (cfu ; g/kg)	10-50 mg/L 1.5×10^{11} to 7.5×10^{11} 病毒顆粒/mL
Identity and content of relevant impurities, additives, contaminating organisms in the technical grade of MPCA 微生物農藥原體所含相關雜質、添加劑和污染生物的鑑定與含量	尼古丁 < 0.1 mg/L
Is the MCPA genetically modified; if so provide type of modification MCPA 是否經過基因修飾? 如果是, 應提供基因修飾說明	否

VX1 分離株的最小接種劑量為每 mL 1.5×10^{11} 病毒顆粒 (10 mg/L)。有效成分中含不純物尼古丁 (nicotine)，由於該不純物有毒理學安全性考量，含量應低於 0.1 mg/L (表十三)。此外生產過程應嚴格維護環境條件並進行品質管理，以確保符合 SANCO/12116/2012 微生物污染限值之要求。

綜合比較

由前述各國已登記之案例可知，歐洲

對於輕症病毒株疫苗之應用與發展最為完整與多樣，包括有單株輕症病毒疫苗產品，也有複合輕症病毒疫苗產品 (如商品名 V10)，其餘國家陸續也有該類產品之申請與審查，然數量上仍以歐洲為主流，顯見各國輕症病毒株在田間應用的實例與技術已經成熟，且苗期施用後展現防治效果，有助於降低苗期被相關病毒感染的風險及減少田間使用殺蟲藥頻度。另，除有效成分 ZYMV-WK PV-593 和 キュービオ Z Y - 0 2 可在接種後的幼苗移植田間外，目前核准之輕症病毒株均限定在溫室

表十三、輕症香瓜茄嵌紋病毒 LP 品系 VX1 分離株之微生物學鑑定資訊

Table 13. Identity of pepino mosaic virus strain LP isolate VX1

Items 項目	Descriptions 說明
Active micro-organism 微生物名稱	PepMV 香瓜茄嵌紋病毒
Taxonomy 分類學	<i>Alphaflexiviridae</i> 科、 <i>Potexvirus</i> 屬
Identification/Detection 鑑定／偵測方法	ELISA qRT-PCR 生物檢定 (bioassay) (感染番茄)
Culture collection 寄存	德國微生物和細胞培養物保存中心 (DSMZ) 寄存編號：DSM26974
Minimum and maximum concentration of the MPCA used for manufacturing of the formulated product (cfu; g/kg) 用於生產成品最低和最高濃度 (cfu ; g/kg)	10-50 mg/L 1.5x10 ¹¹ to 7.5x10 ¹¹ 病毒顆粒/mL
Identity and content of relevant impurities, additives, contaminating organisms in the technical grade of MPCA 微生物農藥原體所含相關雜質、添加劑和污染生物的鑑定與含量	尼古丁 < 0.1mg/L
Is the MCPA genetically modified; if so provide type of modification MCPA 是否經過基因修飾？如果是，應提供基因修飾說明	否

接種及栽培。此外，目前各國產品主要仍以自然發生的輕症病毒株為有效成分，自然發生的輕症病毒株其基因型，因經自然環境長期選汰而使該弱病毒基因型穩定存在；日本案例則為利用物理方式冷熱交替促使誘變產生輕症病毒株，因此對於該輕症病毒株則進一步評估其是否展現遺傳穩定性後而應用於田間，日本之研究結果顯示該誘變病毒株至少展現 10 代基因型穩

定。由於目前各國已篩獲的輕症病毒株，對土壤環境、地下水、地表水、空氣等均無明顯殘留性，以 PepMV CH2 品系 1906 分離株為例，該輕症病毒株在土壤的殘存能力為 20°C 時存活 31 天，4°C 時可存活 52 天，經過實際應用評估後，判斷其危害風險值低。經整合各國對目前已核准的輕症病毒株之生物學特性與理化性質登記要求之研析 (表十四) 及 (表十五)，惟日本

並未針對微生物農藥登記之理化性質要求有明確項目^(3, 4)，僅需提出製造方法與品質管理方法之文件，確保產品的均勻性與穩定性，故下表(表十五)未呈現日本之試驗項目。

實務上，仍需視各成品藥劑劑型，例

如水懸劑或可濕性粉劑等劑型，依照該劑型所規範之理化性試驗要求，提交相對應之理化性試驗報告，或是說明所申請的微生物成品農藥多大程度上符合國際農糧組織(FAO)之規範，應詳細描述與FAO規範的差異並證明其合理性。

表十四、歐洲、美國、日本及臺灣有效成分輕症病毒株登記所需之生物學資訊彙整

Table 14. Summary of data requirement to register mild virus strains in USA, EU, JP, and TW

Items 項目	USA 美國	EU 歐盟	JP 日本	TW 臺灣
Identity 微生物名稱(鑑定)	○ ¹⁾	○	○	○
Taxonomy 分類	○	○	○	○
Culture collection 寄存	○	○	○	○
Identification/detection 鑑定方法/偵測方法/分析方法	○	○	○	○
Manufacturing process 製造方法	○	○	○	○
Concentration 濃度	○	○	○	○
Identity and content of relevant impurities 不純物、汙染微生物鑑定與含量	○	○	○	○
Life cycle 生活史	○	○	○	○
Host specification 寄主範圍	○	○	○	○
Mode of action 作用機制	○	○	○	○
Infectivity, dispersal and colonization ability 傳染性、擴散性與定殖能力	○	○	○	○
Relationships to known plant, animal or human pathogens 與已知植物、動物或人類病原菌之關係	○	○	○	○
Genetic stability 遺傳穩定性	○	○	○	○
Information on the production of relevant metabolites 代謝物資訊	○	○	○	○

¹⁾ ○表應提交資料

表十五、歐洲、美國及臺灣有效成分輕症病毒株登記所需之理化性資訊彙整

Table 15. Summary of physical and chemical data requirement to register mild virus strains in the USA, EU, and TW

Items 項目	USA 美國			EU 歐盟			TW 臺灣		
Physical state 物理狀態	原體	成品	○ ¹⁾	成品 ²⁾	○	原體	成品	○	
Color 顏色	原體	成品	○	成品	○	原體	成品	○	
Odor 氣味	原體	成品	○	成品	○	原體	成品	○	
pH 酸鹼度	原體	成品	○	成品	○ ³⁾	原體	成品	○	
Melting point or boiling point 熔點或沸點	原體	成品	△ ⁴⁾	原體	成品	—	原體	×	
Density, specific gravity, bulk density 密度、比重、容積密度	原體		○	原體	成品	—	原體	成品	△
Vapor pressure 蒸氣壓	原體	成品	×	原體	成品	×	原體	×	
Solubility 溶解度		成品	△	原體	成品	—	原體	×	
Partition coefficient 分配係數	原體	成品	×	原體	成品	×	純品	×	
Dissociation constant 解離常數	原體	成品	×	原體	成品	×	純品	×	
Viscosity 黏性		成品	△ ⁵⁾	成品	○ ⁶⁾	原體	成品	○	
Stability 安定性	原體		○	成品	○ ¹³⁾	原體		×	
Flammability 燃燒性	原體	成品	×	成品	○ ⁷⁾	原體	成品	×	
Miscibility 混合性		成品	△ ⁸⁾	原體	成品	—	原體	成品	△
Explodability 爆炸性	原體	成品	×	成品	○ ⁹⁾	原體	成品	×	
Corrosive characteristics 腐蝕性		成品	○	成品	○ ¹⁰⁾	原體	成品	○	
Storage stability 貯存安定性	原體	成品	○	原體 ¹¹⁾	成品 ¹²⁾	○	原體	成品	○
Others 其他	原體	成品		成品	△ ¹³⁾	原體	成品	△	

¹⁾ ○表應提交資料

²⁾ Commission Regulation (EU) 254/2011 part B

³⁾ 酸度、鹼度或 pH 值

⁴⁾ △表示情況而定

⁵⁾ 僅液體劑型的微生物農藥才需要提供

⁶⁾ 包含黏性和表面張力，依 Commission Regulation (EU) 284/2013 part A 第 2.5 點定義進行，除非可以證明在技術上或科學上沒有必要進行此類研究

⁷⁾ 包含閃火點和燃燒性，依 Commission Regulation (EU) 284/2013 part A 第 2.3 點所定義進行，除非可以證明在技術上或科學上沒有必要進行此類研究

⁸⁾ 僅在乳劑劑型的微生物農藥才需要提供

⁹⁾ 包含爆炸性和氧化性，依 Commission Regulation (EU) 284/2013 part A 第 2.2 點的定義進行，除非可以證明在技術上或科學上沒有必要進行此類研究

¹⁰⁾ Commission Regulation (EU) 284/2013 part B 第 2.2.2 點

¹¹⁾ Commission Regulation (EU) 546/2011 part II

¹²⁾ Commission Regulation (EU) 284/2013 part B 第 2.2 點

¹³⁾ 光影響、溫度、濕度、影響安定性的因子

輕症病毒株植物疫苗在臺灣登記之管控建議

臺灣農業技術發達，亦有相關輕症病毒株植物疫苗緊鑼密鼓的發展中如矮南瓜黃化嵌紋病毒突變之輕症病毒 (ZYMVAC, ZAC)⁽⁶⁾，商品化之路指日可期。根據我國農藥管理法第五條規範，對於農藥的定義如下：(一) 農藥：指成品農藥及農藥原體。(二) 成品農藥：指下列各目之藥品或生物製劑：(1) 用於防除農林作物或其產物之有害生物者。(2) 用於調節農林作物生長或影響其生理作用者。(3) 用於調節有益昆蟲生長者。(4) 其他經中央主管機關公告，列為保護植物之用者。另，根據農藥理化性及毒理試驗準則第三條，農藥理化性及毒理試驗，依農藥性質分為下列三類：(一) 化學農藥類：包括有機化學製劑及無機鹽類製劑等。(二) 生物農藥類：包括天然素材、微生物製劑及生化製劑等。(三) 其他類農藥。其中，『微生物製劑是指利用微生物供植物保護用途之製劑。微生物種類例如細菌、真菌、病毒和原生動物等，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』。因此，植物病毒疫苗是由輕症病毒株所產製，不論是否為天然存在或經過人為誘變、選汰或基因改造等方式所產生者，應適用於微生物製劑之規範。因此，未來相關產品參考美歐日登記歸類，建議可依循我國現有微生物製劑之管理方式，登記時

提供包括產品鑑定 (含來源說明、成分含量、產製過程)、生物及理化特性等資訊。且根據前述試驗項目之規範，當微生物為人工品系改良時，應進一步提供基因操作技術之改造計畫、改造後微生物表現型特徵、基因交換性資料，及繼代基因穩定性資料及基因改造微生物之檢測方法等。此外，對於產品產製過程應建立品質管制點，包括是否有污染性微生物、代謝物或毒質、其他不純物的限量標準、並根據不同病毒株特性思考含量的表示方式與測定方法，同時根據不同病毒株成品農藥特性，建立適當的貯存安定性試驗條件與說明該類產品的使用方式等。此外，對於植物病毒疫苗的環境流佈評估部分，在美國、歐盟與日本如表八均須提供病毒疫苗對於環境的影響，包括在土壤、水和空氣中的持久性和是否可複製繁殖等資訊，而各國審查單位也會視所提供的報告、文獻和說明的合理性來評估是否可豁免提交報告。

綜觀目前已發表期刊報告，尚未有輕症病毒株“逃脫 (escape)”至自然環境中並在非標的寄主引起嚴重的病徵⁽¹⁹⁾之報導，故此推測輕症病毒株對環境影響之風險值低。在輕症病毒株的應用上，使輕症病毒株失去保護作用的主要原因，多為感染新病毒，且新病毒具更強的毒力，使得寄主植物內的交互保護機制被破壞而失去保護能力⁽²⁰⁾。因此，對於植物病毒疫苗的應用仍賴科學家、育苗者與農民密切合作，才能確保各輕症病毒株的防治效果，

從而發揮輕症病毒株對特定作物的保護作用。此外，仍應持續鑑別引起重症病徵的病毒株 (severe strains) 與輕症病毒株之差異，而能有效應用在作物生產系統中。輕症病毒株的應用也應使生產者、消費者與大眾了解該病毒株之可能風險及其相對應的控制措施，與相關的專業訊息，以利該類產品之推廣與提高消費者與大眾對該產品的信任⁽¹⁹⁾。我國既有對病毒類微生物農藥之管理方式與國外已核准商品之管理方式相近，符合國際對於該類新穎植保產品之管理方式與規範。因此建議可儘快針對國內植物病毒疫苗類微生物農藥產品建立相關方法指引與專家團隊，以促進我國該類產品之研發與登記應用。

謝辭

感謝國立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，邀請本所共同參與科技部計畫 MOST108-2321-B-005-016，而啟動國內植物病毒疫苗登記的發想，同時張瑞璋所長對植物病毒疫苗登記法規合理性的催生，促成本文撰寫的動機。承蒙徐慈鴻副所長對文章架構的建議與指導，文成之初又蒙本所退休何明勳副所長對法規說明與斧正，謹此謝忱。

引用文獻

1. 梁瑩如、謝奉家。2020。歐盟和美國微生物農藥登記程序之比較。臺灣農藥科學 9: 21-35。
2. 京都農資セ。応用研究部。2021。弱毒ズ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。Retrieved from https://www.naro.affrc.go.jp/org/warc/research_results/h19/02_kankyo/p39/index.html (Jun. 18, 2021)
3. 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。平成9年8月29日付け9農産第5090号農林水産省農産園芸局植物防疫課長通知(改正平成31年2月26日30消安第5412号),6pp.
4. 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。平成9年8月29日付け9農産第5090号農林水産省農産園芸局植物防疫課長通知(改正平成31年3月29日30消安第6280号),31pp.
5. Blystad, D. R., van der Vlugt, R., Alfaro-Fernández, A., del Carmen Córdoba, M., Bese, G., Hristova, D., Pospieszny, H., Mehle, N., Ravnikar, M., Tomassoli, L., Varveri, C., and Nielsen, S. L. 2015. Host range and symptomatology of Pepino mosaic virus strains occurring in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 143: 43-56. DOI: doi.org/10.1007/s10658-015-0664-1.
6. Chao, C. H., Wu, H. W., Chen, K. C., Lin, S. S., and Yeh, S. D. 2010. Aphid transmissibility and cross-protection effect-

- tiveness of an attenuated mutant of zucchini yellow mosaic virus. *Plant Prot. Bull.* 52: 1-16.
7. Desjardins, P. R., Wallace, J. M., Wollman, E. S. H., and Drake, R. J. 1957. A separation of virus strains from a tristeza-seedling-yellows complex by heat treatment of infected lime seedlings. *IOCV Conf. Proc.* (1957-2010) 1: 91-95.
 8. 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.
 9. 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.
 10. EFSA. 2017a. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance Mild pepino mosaic virus isolate VX1. *EFSA J.* 15: 4650.
 11. EFSA. 2017b. Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance Mild Pepino mosaic virus isolate VC1. *EFSA J.* 15: 4651.
 12. EPA. 2007. Biopesticide registration action document for zucchini yellow mosaic virus - weak strain PV-593. Retrieved from https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/decision_PC-244201_1-Aug-07.pdf (Jun. 18, 2021)
 13. EPA. 2021. Biopesticide active ingredients. Retrieved from <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/biopesticide-active-ingredients> (May 16, 2021)
 14. EPA. 2018. Pesticide product label, PMV-01, 092554-00001-20180927. Retrieved from https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/092554-00001-20180927.pdf (May 16, 2021)
 15. EPA. 2018. Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FFDCA) safety determination for pepino mosaic virus, strain CH2, isolate 1906. Docket ID number: EPA-HQ-OPP-2017-0525.
 16. Hanssen, I. M., and Thomma, B. P. H. J. 2010. Pepino mosaic virus: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. *Mol. Plant Pathol.* 11: 179-189.
 17. Kosaka, Y., Ryang, B. S., Kobori, T., Shiomi, H., Yasuhara, H., and Kataoka, M. 2006. Effectiveness of an attenuated zucchini yellow mosaic virus isolate for cross-protecting cucumber. *Plant Dis.* 90: 67-72.
 18. Lu, B., Stubbs, G., and Culver, J. N. 1998. Coat protein interactions involved in tobacco mosaic tobamovirus cross-protection. *Virology* 248: 188-198.
 19. Matthews, R. E. F. 1991. *Plant Virology*. 3rd ed. Academic Press, 864 pp.
 20. McKinney, H. 1929. Mosaic diseases in the Canary Islands, West Africa and Gibraltar.

- J. Agric. Res. 39: 557-578.
21. Meier, U. 2001. Growth stages of mono- and dicotyledonous plants: BBCH Monograph. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry. Retrieved from <https://www.politicheagricole.it/flex/AppData/WebLive/Agrometeo/MIEPFY80/BBCHengl2001.pdf> (Jun. 24, 2021)
 22. OECD. 2018. Guidance document for the assessment of the equivalence of technical grade active ingredients for identical microbial strains and isolates, series on pesticides and biocides, No. 96, OECD Publishing, Paris, DOI: doi.org/10.1787/489def79-en.
 23. Pechinger, K., Chooi, K. M., MacDiarmid, R. M., Harper, S. J., and Ziebell, H. 2019. A New era for mild strain cross-protection. *Viruses* 11: 670.
 24. Ratcliff, F. G., MacFarlane, S. A., and Baulcombe, D. C. 1999. Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses. *The Plant Cell* 11: 1207-1215.
 25. Rezende, J. A. M., and Sherwood, J. L. 1991. Breakdown of cross protection between strains of tobacco mosaic virus due to susceptibility of dark green areas to superinfection. *Phytopathology* 81: 1490-1496.
 26. Yeh, S. D., and Cheng, Y. H. 1989. Use of resistant *Cucumis metuliferus* for selection of nitrous-acid induced attenuated strains of papaya ringspot virus. *Phytopathology* 79: 1257-1261.
 27. Ziebell, H., Payne, T., Berry, J. O., Walsh, J. A., and Carr, J. P. 2007. A cucumber mosaic virus mutant lacking the 2b counter-defence protein gene provides protection against wild-type strains. *J. Gen. Virol.* 88: 2862-2871.
 28. Ziebell, H., and MacDiarmid, R. 2017. Prospects for engineering and improvement of cross-protective virus strains. *Curr. Opin. Virol.* 26: 8-14.

Registration of Plant Virus Vaccines: Case Studies from the United States, Europe, and Japan

Ying-Ru Liang¹, Li-Hsin Huang^{1*}

Abstract

Liang, Y. R., and Huang, L. H. Registration of plant virus vaccines: Case studies from the United States, Europe, and Japan. 2021. Taiwan Pestic. Sci. 10: 49-76.

Microbial biological control agents (MBCAs) are biological pesticides which are derived from microorganisms and have the potential to control plant pests and diseases. As the understanding of MBCA efficacy and the mechanisms which underlie MBCAs has improved, the application of MBCAs has been extended. For example, mild virus strains can now be used to facilitate the cross protection of crops. This study discusses and summarizes the data that is required to register mild virus strains in the United States, Europe, and Japan. Our findings can serve as a reference for the management of mild virus strains in Taiwan.

Key words: mild virus strain, registration, regulation, European Union (EU), USA, Japan

Accepted: August 17, 2021.

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

¹ Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Taichung