

農藥登記之毒理試驗報告內容要求指引

Guidelines for Preparation of Toxicity Study Results Submitted When Applying
for Registration of Agricultural Chemicals

第一版



農業藥物毒物試驗所
中華民國 103 年 2 月

農藥登記之毒理試驗報告內容要求指引

Guidelines for Preparation of Toxicity Study Results Submitted When Applying for Registration of Agricultural Chemicals

1.	GLP 研究報告一般要求.....	1-1
2.	口服急毒性試驗.....	2-1
	固定劑量致毒性推定法 (Fixed Dose Procedure).....	2-1
	固定劑量致死推定法 (Acute Toxic Class Method).....	2-4
	定比劑量致死推定法 (Up and Down Procedure).....	2-6
3.	皮膚急毒性試驗.....	3-1
4.	呼吸急毒性試驗.....	4-1
	傳統求取 LC ₅₀ 法.....	4-1
	濃度×時間法.....	4-4
5.	眼刺激性試驗.....	5-1
6.	皮膚刺激性試驗.....	6-1
7.	皮膚過敏性試驗.....	7-1
	天竺鼠加佐劑過敏檢測法 (Guinea pig maximization test).....	7-1
	天竺鼠無佐劑過敏檢測法 (Buehler test).....	7-4
	小鼠局部淋巴結細胞增殖分析法 (Local Lymph Node Assay).....	7-6
8.	致變異性試驗.....	8-1
	細菌基因逆向變異試驗.....	8-1
	哺乳動物細胞微核試驗.....	8-3
	哺乳動物細胞染色體畸變試驗.....	8-6
	哺乳動物紅血球 (或骨髓) 細胞微核試驗.....	8-8
	哺乳動物骨髓染色體畸變試驗.....	8-10
9.	水生生物毒性試驗.....	9-1
	淡水魚類急毒性試驗.....	9-1
	淡水無脊椎生物急毒性試驗.....	9-3
10.	參考文獻.....	10-1

1. GLP 研究報告一般要求 (General requirement)

試驗報告應包含 (但不限於) 以下資訊：

1. 研究、試驗物與對照物之識別

- (1) 一個敘述性的標題；
- (2) 以代碼或名稱識別試驗物 (IUPAC、CAS 登錄號、生物參數等)；
- (3) 以名稱識別對照物；
- (4) 試驗物之特性描述，包括濃度、純度、穩定性與均質性。

2. 有關試驗委託者與試驗單位之資訊

- (1) 試驗委託者之名稱與地址；
- (2) 參與的試驗單位和試驗站之名稱與地址；
- (3) 研究主持人之名稱與地址；
- (4) 主要研究員 (如有委派) 之名稱與地址，及其被委派的試驗部分；
- (5) 對研究報告有貢獻的參與人員之名稱與地址。

3. 日期

研究 (study) 和試驗 (experiment) 的起始與完成日期。

4. 聲明

一份品保部門之聲明，應列出所做之查核的類型與日期，包括查核的試驗部分和查核結果提報給管理階層、研究主持人和適當的主要研究員之日期。此聲明亦做為確認研究報告確實反映原始數據之用。

5. 材料與試驗方法之描述

- (1) 所使用的方法與材料之描述；
- (2) 參照「OECD 試驗指引」或其它試驗指引或方法。

6. 結果

- (1) 結果之摘要；
- (2) 研究計畫書所要求之全部資料與數據；
- (3) 結果之呈現，包括統計顯著性之運算與抉擇；
- (4) 結果之評估與討論，適當的話，加做結論。

7. 貯藏處

意指儲存研究計畫書、試驗物與對照物之樣品、檢體樣本、原始數據及研究報告之所在地。

8. 特定要求

凡涉及脊椎動物試驗且試驗單位在國外者，應或得另提供動物飼育設施、動物照護證明或實驗動物照護及使用委員會 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 同意書。



2. 口服急毒性試驗 (Acute Oral Toxicity)

1. 試驗目的：

以最少動物用量，經由強迫口服投予方式給予試驗物，觀察14天內所引起小型齧齒類動物之急毒性，進而建立農業化學物安全使用方法。同時可作為後續重複暴露毒性試驗或其他試驗訂定劑量之參考。

2. 試驗方法選擇：

建議使用固定劑量致毒性推定法 (Fixed Dose Procedure)、固定劑量致死推定法 (Acute Toxic Class Method) 或定比劑量致死推定法 (Up-and-Down-Procedure)，若因為技術上或是科學上等原因無法進行上述任一試驗時，可接受其他相同目的取向的試驗來取代。

口服急毒性試驗 - 固定劑量致毒性推定法

1. 參考試驗指引：

OECD test guideline 420 (Fixed Dose Procedure)

2. 試驗動物：

- (1) 使用週齡8-12週之年輕成鼠，通常以大鼠為主，其他小型齧齒類動物亦可。
- (2) 一般來說，使用雌鼠進行試驗，除非有證據顯示雄鼠較敏感，則可使用雄鼠進行試驗。雌鼠應為無懷孕及無生產過 (nulliparous)的狀態。
- (3) 於起始劑量選定試驗 (sighting study) 每個劑量使用1隻動物；主試驗 (main study) 則為每個劑量使用5隻動物，然而亦可使用4隻動物加上起始劑量選定試驗的1隻動物 (共5隻)。

3. 測試劑量：

- (1) 起始劑量選定試驗

參考試驗物毒性相關資料，由5、50、300、2,000 mg/kg 4個固定劑量中擇一作為試驗之起始劑量，如無可參考資料建議以300 mg/kg作為起始劑量。

(2) 主試驗

由起始劑量選定試驗所得到的劑量作為主試驗的起始劑量，並依存亡情形進行劑量之增減(劑量同起始劑量選定試驗)。

4. 給藥方法：

(1) 胃管單一投藥或24小時內分次投藥，若需要可以水或適當媒介物或溶劑調配。

(2) 試驗物投予前，動物應禁食，如大鼠需禁食隔夜以上，小鼠需3-4小時。

(3) 試驗物投予大鼠後3-4小時再餵食飼料，小鼠則1-2小時後再餵食。

5. 測試方法：

(1) 起始劑量選定試驗：

a. 選定起始劑量後，先投予1隻動物，最少觀察24小時。

b. 配合試驗指引之附錄流程圖進行，並依動物存亡和中毒情形進行下一步驟，最終獲得主試驗的起始劑量。

c. 以最低劑量 (5 mg/kg) 進行試驗時，若有動物死亡，則可直接判定該試驗物 $LD_{50} \leq 5$ mg/kg，並立即停止試驗且不需進行主試驗。然而，若想要進一步確認結果，可額外再依參考指引流程進行試驗。

(2) 主試驗：

a. 由起始劑量選定試驗所得到的劑量作為主試驗的起始劑量，投予5隻動物。

b. 劑量投予的時間間隔，可視投予動物後產生中毒症狀的時間、持續時間或嚴重程度等，進而增加或減少。

c. 配合試驗指引之附錄流程圖進行，並依動物存亡與出現明顯中毒症狀的隻數進行下一步驟，最終得到該試驗物的GSH毒性分類。

(3) 限量試驗 (limit test)：

以2,000 mg/kg投予1隻動物無死亡後，再以2,000 mg/kg進行主試驗投予4隻動物，最終1隻動物死亡或全存活時，不需再進行2,000 mg/kg以上劑量投藥。

6. 觀察：
至少投藥後30分鐘、4小時觀察一次，之後每天觀察，至少14天。
7. 結果評估：
動物投藥次序配合試驗指引之附錄流程圖進行，最後得到化學品全球分類和標示認同制度 (Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals, GHS) 之毒性分類。
8. 數據呈現 (至少需包括，但不限於下面項目)：
- (1) 個別動物體重紀錄 (試驗前及每週體重)。
 - (2) 個別動物臨床症狀觀察紀錄 (包括死亡時間)。
 - (3) 個別動物剖檢紀錄。
 - (4) GHS分類等級。



口服急毒性試驗-固定劑量致死推定法

1. 參考試驗指引：
OECD test guideline 423 (Acute Toxic Class Method)
2. 試驗動物：
 - (1) 使用週齡8-12週之年輕成鼠，通常以大鼠為主，其他小型齧齒類動物亦可。
 - (2) 一般來說，使用雌鼠進行試驗，除非有證據顯示雄鼠較敏感，則可使用雄鼠進行試驗。雌鼠應為無懷孕及無生產過 (nulliparous)的狀態。
 - (3) 每步驟劑量使用3隻動物。
3. 測試劑量：
由5、50、300、2,000 mg/kg 4個固定劑量中擇一作為試驗之起始劑量時，可參考試驗物毒性相關資料，選擇可能造成部分動物死亡之劑量作為其投藥劑量；如無可參考資料則以300 mg/kg為起始劑量。
4. 給藥方法：
 - (1) 胃管單一投藥或24小時內分次投藥，若需要可以水或適當媒介物或溶劑調配。
 - (2) 試驗物投予前，動物應禁食，如大鼠需禁食隔夜以上，小鼠需3-4小時。
 - (3) 試驗物投予大鼠後3-4小時再餵食飼料，小鼠則1-2小時後再餵食。
5. 測試方法：
 - (1) 選定起始劑量投予3隻動物，觀察至動物確定存亡後(至少48小時)，依存亡情形進行下一步驟。
 - (2) 若3隻動物中死亡 >1 隻，則降低一個劑量投藥，反之若3隻中死亡 ≤ 1 隻，則再以相同劑量投予另3隻動物，亦觀察至確定動物存亡後，若3隻中死亡 >1 隻，則降低一個劑量投藥，反之若3隻中死亡 ≤ 1 隻，則再進行更高劑量投藥。
 - (3) 若以2,000 mg/kg投予3隻動物後，1隻動物死亡或全存活時，需再以2,000 mg/kg進行3隻動物投藥，最後若第二次投藥造成1隻動物死亡或全

存活時，不需再進行2,000 mg/kg以上劑量投藥。

(4) 最後結果則須配合試驗指引之附錄流程圖，視最終試驗劑量處理之存亡情形，進行GSH毒性分類及LD₅₀界限值推斷。

6. 觀察：

至少投藥後30分鐘、4小時觀察一次，之後每天觀察，至少14天。

7. 結果評估：

動物投藥次序配合試驗指引之附錄流程圖進行，最後得到GSH毒性分類及LD₅₀界限值(cut-off)。

8. 數據呈現 (至少需包括，但不限於下面項目)：

- (1) 個別動物體重紀錄 (試驗前及每週體重)。
- (2) 個別動物臨床症狀觀察紀錄 (包括死亡時間)。
- (3) 個別動物剖檢紀錄。
- (4) GSH毒性分類及LD₅₀界限值(cut-off)。



口服急毒性試驗- 定比劑量致死推定法

1. 參考試驗指引：
OECD test guideline 425 (Up and Down Procedure)
US EPA OCSPP (formerly OPPTS) 870.1100
2. 試驗動物：
 - (1) 使用週齡8-12週之年輕成鼠，通常以大鼠為主，其他小型齧齒類動物亦可。
 - (2) 一般來說，使用雌鼠進行試驗，除非有證據顯示雄鼠較敏感，則可使用雄鼠進行試驗。雌鼠應為無懷孕及無生產過 (nulliparous)的狀態。
 - (3) 動物數目：
每次使用1隻動物，配合AOT425程式，進行多隻動物投藥。
3. 測試劑量：
 - (1) 參考試驗物毒性相關資料，由1.75、5.5、17.5、55、175、550、2,000或1.75、5.5、17.5、55、175、550、1,750、5,000 mg/kg等劑量範圍，選擇推測為最接近且小於試驗物LD₅₀之值作為動物投藥的起始劑量；如無可參考資料則以175 mg/kg為起始劑量。
 - (2) 劑量數據範圍可由AOT425程式中的sigma值 (致死劑量標準偏差最佳估計值) 更改，而得到不同的劑量數值範圍。
 - (3) 當推測毒性較低時，可以單一劑量2,000或5,000 mg/kg做為最高測試劑量，依序投予多隻動物 (最多共5隻)。
4. 給藥方法：
 - (1) 胃管單一投藥或24小時內分次投藥，若需要可以水或適當媒介物或溶劑調配。
 - (2) 試驗物投予前，動物應禁食，如大鼠需禁食隔夜以上，小鼠需3-4小時。
 - (3) 試驗物投予大鼠後3-4小時再餵食飼料，小鼠則1-2小時後再餵食。
5. 測試方法：
 - (1) 當選定起始劑量投予1隻動物後，以其至少48小時後存活或死亡的結果決定第2隻動物之投予劑量，當動物存活時，選擇較高之劑量，死亡則選擇

較低之劑量投藥 (然間隔時間可依實際毒性症狀情形調整)。

- (2) 同時可配合AOT425程式，輸入第一筆存亡結果，則可自動顯示下個劑量建議值，以此類推，至出現試驗終止字樣後，方停止投藥。

6. 觀察：

至少投藥後30分鐘、4小時觀察一次，之後每天觀察，至少14天。

7. 結果評估：

動物投藥次序配合AOT425程式，至顯示終止條件時停止投藥，最後得到LD₅₀值及95%信賴界限。

8. 數據呈現 (至少需包括，但不限於下面項目)：

- (1) 個別動物體重紀錄 (試驗前及每週體重)。
- (2) 個別動物臨床症狀觀察紀錄 (包括死亡時間)。
- (3) 個別動物剖檢紀錄。
- (4) LD₅₀值及95%可信賴界限。



3. 皮膚急毒性試驗 (Acute Dermal Toxicity)

1. 試驗目的：

藉由強迫貼覆試驗物於試驗動物皮膚24小時後，觀察14天內所引起的急性毒性，並估算其導致半數動物死亡之劑量 (LD₅₀值)，進而建立農藥使用之安全方法。

2. 參考試驗指引：

OECD test guideline 402

US EPA OCSPP (formerly OPPTS) 870.1200

3. 試驗動物：

- (1) 使用年輕成熟的哺乳類動物，如：大鼠、兔或天竺鼠，亦可使用其他動物但必須要有正當理由。
- (2) 雌性動物應為無懷孕及無生產的狀態。
- (3) 每個劑量組動物應為5雄5雌，若有實驗數據、文獻或歷史數據證明其一性別較敏感，可只選用較敏感性別進行實驗。

4. 測試劑量：

- (1) 至少要有三個測試劑量，每個劑量間要有適當間隔。
- (2) 當推測毒性較低時，可以單一劑量2,000 mg/kg做為最高測試劑量 (動物應使用5雄5雌進行實驗)。

5. 測試方法：

- (1) 塗抹試驗物前24小時，動物背部需剃毛。
- (2) 試驗物塗抹在動物剃毛皮膚的面積至少10%體表面積，且塗抹後需有適當的包覆。若試驗物為劇毒，塗抹面積應縮小。
- (3) 塗抹24小時後，移除殘留試驗物 (可使用水或適當的溶劑或媒介物清除)。

6. 觀察：

投藥第一天需頻繁地觀察，之後每天至少觀察一次，至少持續14天。

7. 結果評估：

- (1) 每一劑量的死亡率。
- (2) 如單一測試劑量組動物死亡未超過一半，則LD₅₀值允許以大於單一測試劑量表之。
- (3) 如進行3個以上測試劑量，則於劑量與死亡率之間，以統計分析方法得到適當的劑量反應關係曲線，估算動物之LD₅₀值及95%信賴界限。

8. 數據呈現（至少需包括，但不限於下面項目）：

- (1) 個別動物體重紀錄（試驗前及每週體重）。
- (2) 個別動物臨床症狀觀察紀錄（包括死亡時間）。
- (3) 個別動物剖檢紀錄。
- (4) 死亡率、LD₅₀值及95%可信賴界限。



4. 呼吸急毒性試驗 (Acute Inhalation Toxicity)

1. 試驗目的：

藉由單次的呼吸暴露得到試驗物對健康危害之科學資訊，以建構農業化學物安全使用方法。

2. 試驗方法選擇：

(1) 傳統求取LC₅₀法 (Traditional LC₅₀ protocol)：

以固定4小時的暴露時間下，暴露一個（稱為限量試驗 (limit test)) 或多個濃度求出試驗物的半致死濃度 (median lethal concentration, LC₅₀)。

(2) 濃度×時間法 (Concentration × Time, Cxt protocol)：

動物進行一個（為限量試驗）或多個濃度且多時間點的暴露試驗。一般為當有特定管理或是科學要求時採用。

呼吸急毒性試驗 - 傳統求取LC₅₀法

1. 參考試驗指引：

OECD test guideline 403

US EPA OCSPP (formerly OPPTS) 870.1300

2. 試驗動物：

(1) 可選用大鼠為試驗動物，亦可使用其他動物但必須要有正當理由。

(2) 以大鼠做為試驗動物時，應在8至12週齡間進行呼吸暴露，雌鼠應為無懷孕及無生產的狀態。

(3) 若有起始劑量選定試驗 (sighting study) 則每個暴露濃度最多使用雌雄動物各3隻；主試驗則應使用雌雄動物各5隻進行至少3個濃度的測試，或是以雌雄動物各3隻進行限量試驗 (limit test)；在有相關試驗（包括前試驗）或文獻顯示某一性別較敏感時，主試驗亦可使用單一性別動物進行。

3. 暴露艙選擇：

優先選用頭鼻/鼻式呼吸暴露艙，亦可使用全身型呼吸暴露艙但必須說明理由。全身型呼吸暴露時，動物總體積不可超過呼吸暴露艙的5%。

4. 測試濃度：

- (1) 在決定測試濃度前，建議進行前試驗或蒐集文獻來評估試驗物的物化性質與溶解度，及依試驗物一般使用狀態決定採用氣體 (gas)、蒸氣 (vapour)、粉塵 (dust aerosol) 或液體氣膠 (liquid aerosol) 進行呼吸暴露試驗。
- (2) 試驗物為氣體時濃度以ppm表示，為蒸氣、粉塵或液體氣膠時以mg/L表示。
- (3) 測試濃度需以直接自呼吸暴露艙內採樣所得的實際濃度 (actual concentration) 呈現，亦可列出由使用試驗物量與進氣量計算出的理論濃度 (nominal concentration) 供參考。
- (4) 試驗物毒性低時，可以儀器可達最高濃度 (maximum attainable concentration) 作為起始濃度，或是基於動物福利考量採用限量濃度 (limit concentration) (當儀器可達最高濃度在氣體濃度 $\geq 20,000$ ppm、蒸氣 ≥ 20 mg/L、粉塵或液體氣膠 ≥ 5 mg/L時，則分別以20,000 ppm、20 mg/L及5 mg/L作為起始濃度)。
- (5) 在決定粉塵或液體氣膠的測試濃度時，應優先考慮試驗物的動態氣流粒徑分佈，動態氣流粒徑質量中位數值 (mass median aerodynamic diameter, MMAD) 應介於1-4 μm 。建議以2 mg/L的濃度進行測試，在MMAD滿足此條件時才考慮提高測試濃度。

5. 對照組：

- (1) 不需設置空氣對照組。
- (2) 若使用水以外的媒介物，在無法取得該媒介物的呼吸毒性時可設置媒介物對照組。

6. 測試方法：

- (1) 起始劑量選定試驗 (Sighting study)：
一個或多個濃度的4小時呼吸暴露試驗，主要用於評估試驗物的強度 (potency) 和動物性別敏感性，以協助主試驗暴露濃度的設計。
- (2) 限量試驗 (Limit test)：
試驗物已知或預期毒性低時，可採用限量濃度或是儀器可達最高濃度進行單一濃度的4小時呼吸暴露試驗，當動物死亡未超過半數時其LC₅₀結果

以「 LC_{50} >該濃度」表示，無需進行其他試驗；否則應進行主試驗。

(3) 主試驗：

進行至少3個濃度的4小時呼吸暴露試驗，之後以統計分析求得半數致死濃度 (LC_{50})。

7. 暴露濃度監控：

(1) 呼吸暴露進行時，4小時間應至少進行2次的濃度採樣，在濃度變動大時，由下一測試濃度起應至少進行4次的濃度採樣。

(2) 呼吸暴露進行時，4小時間應至少進行2次以分段撞擊式粒徑分析器 (cascade impactor) 或其他具證明可供量測動態氣流粒徑之分析器對試驗物的動態氣流粒徑分佈進行測量。

8. 觀察：

於呼吸暴露當天需進行至少2次的觀察，之後至少每天觀察一次至第14天。

9. 結果評估：

(1) 採樣所得實際濃度的波動，在氣體或蒸氣的呼吸暴露時應<10%，粉塵或液體氣膠時應<20%。

(2) 以大鼠做為試驗動物時，試驗中採樣分析的MMAD與粒徑幾何標準偏差值 (geometric standard deviation, GSD) 宜分別介於1-4 μm 及1.5-3的範圍，未符合則應於結果中對試驗物的性質進行說明，或就試驗物的吸入風險進行評估。

10. 數據呈現 (至少需包括，但不限於下面項目)：

(1) 呼吸暴露進行時，自呼吸暴露艙中採樣所得的實際濃度、動態氣流粒徑分佈及溫濕度之原始數據，與經計算所得的測試濃度、MMAD與GSD值，以平均值±標準偏差表示。

(2) 觀察期間個別動物的臨床症狀，與經計算所得的死亡率及 LC_{50} 。

(3) 個別動物的體重紀錄，包括呼吸暴露當天進行試驗前、暴露後1、3和7天、之後每週、發生死亡或剖檢當天。

(4) 個別動物的剖檢結果。

呼吸急毒性試驗 - 濃度×時間法

1. 參考試驗指引：
OECD test guideline 403
2. 試驗動物：
 - (1) 可選用大鼠為試驗動物，亦可使用其他動物但必須要有正當理由。
 - (2) 以大鼠做為試驗動物時，應在8至12週齡間進行呼吸暴露，雌鼠應為無懷孕及無生產的狀態。
 - (3) 若有起始劑量選定試驗 (sighting study) 則每個暴露濃度最多使用雌雄動物各3隻；進行限量試驗 (limit test) 或主試驗時，每個濃度和每個時間點以雌雄動物各1隻 (或較敏感性別2隻) 進行，若暴露濃度或時間點不足時則以每組雌雄動物各2隻進行，以獲得統計上足夠的數據。
3. 暴露艙選擇：
頭鼻/鼻式呼吸暴露艙。
4. 測試濃度：
 - (1) 在決定測試濃度前，建議進行前試驗或蒐集文獻來評估試驗物的物化性質與溶解度，及依試驗物一般使用狀態決定採用氣體 (gas)、蒸氣 (vapour)、粉塵 (dust aerosol) 或液體氣膠 (liquid aerosol) 進行呼吸暴露試驗。
 - (2) 試驗物為氣體時濃度以ppm表示，為蒸氣、粉塵或液體氣膠時以mg/L表示。
 - (3) 測試濃度需以直接自呼吸暴露艙內採樣所得的實際濃度 (actual concentration) 呈現，亦可列出由使用試驗物量與進氣量計算出的理論濃度 (nominal concentration) 供參考。
 - (4) 根據起始劑量選定試驗結果、儀器可達最高濃度，或是基於動物福利考量採用限量濃度 (當儀器可達最高濃度在氣體濃度 $\geq 20,000$ ppm、蒸氣 ≥ 20 mg/L、粉塵或液體氣膠 ≥ 5 mg/L時，則分別以20,000 ppm、20 mg/L 及 5 mg/L作為起始濃度) 作為起始濃度。
 - (5) 在決定粉塵或液體氣膠的測試濃度時，應優先考慮試驗物的動態氣流粒徑分佈，動態氣流粒徑質量中位數值 (mass median aerodynamic diameter, MMAD) 應介於1-4 μm ，建議以2 mg/L的濃度進行測試，在MMAD滿足

此條件時才考慮提高測試濃度。

5. 對照組：

- (1) 不需設置空氣對照組。
- (2) 若使用水以外的媒介物，在無法取得該媒介物的呼吸毒性時可設置媒介物對照組。

6. 測試方法：

(1) 起始劑量選定試驗 (Sighting study)：

一個或多個濃度的4小時呼吸暴露試驗，主要用於評估試驗物的強度 (potency) 和動物性別敏感性，以協助主試驗暴露濃度的設計。

(2) 限量試驗 (Limit test)：

根據起始劑量選定試驗結果、限量濃度或是儀器可達最高濃度進行單一濃度多時間點 (例如：15、30、60、120或240分鐘) 的呼吸暴露試驗，當動物死亡未超過半數時其 LC_{50} 結果以「 $LC_{50}>$ 該濃度」表示，無需進行其他試驗；否則應進行主試驗，而該限量試驗結果則做為主試驗第一暴露期 (exposure session I) 結果。

(3) 主試驗：

主試驗包括至少4個濃度和分別5個時間點的呼吸暴露試驗。起始濃度選擇方式同限量試驗，接續的暴露濃度和5個暴露時間長度，則根據前次濃度的最低致死劑量 (minimal lethal dose level)(時間 \times 濃度) 結果做調整。詳細試驗流程和結果分析可參照試驗指引之附錄內容進行。

7. 暴露濃度監控：

- (1) 每個暴露時間點的暴露艙濃度應經常測量，以決定時間加權平均濃度 (time-weighted average concentration)。
- (2) 呼吸暴露長達4小時應至少進行2次的濃度採樣，並以分段撞擊式粒徑分析器 (cascade impactor) 或其他具證明可供量測動態氣流粒徑之分析器對試驗物的動態氣流粒徑分佈進行測量。

8. 觀察：

於呼吸暴露當天需進行至少2次的觀察，之後至少每天觀察一次至第14天。

9. 結果評估：

- (1) 採樣所得實際濃度的波動，在氣體或蒸氣的呼吸暴露時應 $<10\%$ ，粉塵或液體氣膠時應 $<20\%$ 。
- (2) 以大鼠做為試驗動物時，試驗中採樣分析的MMAD與粒徑幾何標準偏差值 (geometric standard deviation, GSD) 宜分別介於 $1-4\ \mu\text{m}$ 及 $1.5-3$ 的範圍，未符合則應於結果中對試驗物的性質進行說明，或就試驗物的吸入風險進行評估。

10. 數據呈現 (至少需包括，但不限於下面項目)：

- (1) 呼吸暴露進行時，自呼吸暴露艙中採樣所得的實際濃度、動態氣流粒徑分佈及溫濕度之原始數據，與經計算所得的測試濃度、MMAD與GSD值，以平均值 \pm 標準偏差表示。
- (2) 觀察期間個別動物的臨床症狀，與經計算所得的死亡率及 LC_{50} 。
- (3) 個別動物的體重紀錄，包括呼吸暴露當天進行試驗前、暴露後1、3和7天、之後每週、發生死亡或剖檢當天。
- (4) 個別動物的剖檢結果。



5. 眼刺激性試驗 (Acute Eye Irritation)

1. 試驗目的

藉由得到試驗物對眼及眼睛黏膜刺激特性及腐蝕性之科學資訊，建構農業化學物安全使用方法。

2. 參考試驗指引：

OECD test guideline 405

US EPA OCSPP(formerly OPPTS) 870.2400

3. 試驗動物

- (1) 一般為白兔 (albino rabbit)，如使用白兔以外之動物應詳述原因。
- (2) 試驗動物應於投藥前24小時檢查其健康情形並確保眼睛功能和結構正常。
- (3) 原則上共需三隻動物。強烈建議先以單一隻動物進行試驗，待能確定試驗物對眼睛刺激的嚴重程度和可恢復性後，再根據該結果判定是否依序進行後面兩隻動物的試驗。

4. 試驗物特性和測試劑量

- (1) 應根據試驗物特性或文獻資料評估進行本試驗的合理性。
- (2) 應於試驗過程使用局部麻醉劑及系統性止痛劑。
- (3) 如懷疑試驗物具腐蝕性，則先以1隻動物進行前試驗。
- (4) 試驗物如為固體則應磨成細粉，給予劑量為0.1 g/隻。
- (5) 試驗物如為液體，則可毋須稀釋直接給予，給予劑量為0.1 mL/隻。
- (6) 如試驗物為氣膠狀 (aerosols) 或噴霧狀 (pump sprays) 應該先收集後再投予眼睛。但若試驗物是在加壓氣膠容器中而無法先收集，投藥時應將眼睛打開後，以距離10 cm處噴灑試驗物1秒鐘。

5. 測試方法

- (1) 給藥方式為溫柔的將一側眼睛之下眼瞼拉開，將試驗物置於結膜囊後使上下眼瞼合閉1秒鐘，另一側眼睛則為對照組。
- (2) 投予藥劑後24小時內不可清洗眼睛，但如果試驗物為固體，於投藥1小時後未因生理機制使藥劑流出眼睛，則可以生理食鹽水或蒸餾水稍微潤濕

眼睛。

6. 觀察及紀錄刺激程度

- (1) 於投藥後1小時、24小時、48小時、72小時、7天、14天和21天觀察反應並紀錄；
- (2) 於投藥後1、24、48和72小時進行眼刺激反應之計分和紀錄（依表一觀察及紀錄刺激及腐蝕程度；其他毒理反應亦應紀錄）；投藥後24小時可使用螢光染劑輔佐判斷。
- (3) 投藥後72小時如無刺激反應，則可終結試驗；如有持續性的角膜傷害或其他眼刺激反應，則應繼續觀察至症狀消失或投藥後第21天。
- (4) 投藥後如有下列反應，則應以人道方式犧牲動物，並停止試驗：
 - a. 角膜穿孔或明顯潰瘍並造成睫狀體葡萄腫 (staphyloma)；
 - b. 眼前房出血；
 - c. 程度4之角膜混濁；
 - d. 無光照反射（虹膜反應第二級）持續72小時；
 - e. 結膜潰瘍；
 - f. 第三眼瞼或結膜壞死；
 - g. 脫落分離 (sloughing)。
- (5) 投藥後如有下列反應，則應判斷為嚴重刺激性或腐蝕性，不應繼續試驗：
 - a. 嚴重深度傷害；
 - b. 眼輪結構喪失 > 50%；
 - c. 嚴重眼睛感染；
 - d. 其他如有角膜血管生成、螢光染色處未見消退、投藥後5天仍未重新上皮化等兩種症狀以上組合者。

表一、眼刺激性及腐蝕性判定標準

症狀	程度
角膜（應以最嚴重區域判斷其混濁度）*	
無潰瘍或混濁.....	0
零星散佈的混濁區域，除了光澤較黯淡外，仍可清楚看到虹膜細部構造.....	1
具有容易分辨的半透明區域，虹膜細部構造輕微模糊.....	2
珍珠樣光澤，虹膜細部構造不清楚，瞳孔大小勉強可辨	

症狀	程度
識.....	3
完全混濁，虹膜無法辨識.....	4
*角膜混濁範圍亦需紀錄。	
虹膜	
正常.....	0
皺褶變深、鬱血、腫脹、中度角膜周圍充血或出血、光照反應遲緩.....	1
出血、結構喪失、或無光照反應.....	2
結膜潮紅（包括眼瞼結膜和眼球結膜，不包括角膜和虹膜）	
正常.....	0
少許血管充血.....	1
呈瀰漫性深紅色、不易辨識個別血管.....	2
呈瀰漫性牛肉紅.....	3
結膜水腫（指眼瞼或/及第三眼瞼）	
正常.....	0
少許水腫.....	1
明顯水腫，部分眼瞼外翻.....	2
水腫，眼瞼半合.....	3
水腫，眼瞼過半閉合.....	4

7. 數據呈現（至少需包括，但不限於下面項目）：

- (1) 進行本試驗的合理性（rationale）說明。
- (2) 使用局部麻醉劑及系統性止痛劑的劑量和時機。
- (3) 動物種別、品系、性別和試驗開始和終止時體重。
- (4) 每隻動物每個觀察時間點的眼刺激性及腐蝕性反應數據和其他毒性反應的敘述。

6. 皮膚刺激性試驗 (Acute Dermal Irritation)

1. 試驗目的

藉由得到試驗物對皮膚刺激性及腐蝕性之科學資訊，建構農業化學物安全使用方法。

2. 參考試驗指引：

OECD test guideline 404

US EPA OCSPP (formerly OPPTS) 870.2500

3. 試驗動物

- (1) 一般為白兔 (albino rabbit)，如使用白兔以外之動物應詳述原因。
- (2) 健康之試驗動物應於投藥前24小時剃毛，剃毛時應小心不使其皮膚傷害。

4. 試驗物特性和測試劑量

- (1) 應根據試驗物特性或文獻資料評估進行本試驗的合理性。
- (2) 如已有足夠證據顯示試驗物具腐蝕性則毋須進行試驗。
- (3) 試驗物如為固體則應磨細，並以水或適當的溶劑濕潤，溶劑不應影響藥物滲透性；試驗物如為液體，則可毋須稀釋直接給予。
- (4) 給予劑量：固體為0.5 g/隻，液體為0.5 mL/隻。

5. 測試方法

(1) 前試驗：

強烈建議先以一隻動物進行試驗，並根據試驗物特性進行步驟如下：

- a. 如懷疑試驗物具腐蝕性，則以1隻動物分別於皮膚3處施藥，第1處於施藥後3分鐘觀察，如無嚴重之皮膚反應，則於第2處施藥1小時後觀察，如無嚴重反應則於第3處施藥4小時後觀察並紀錄反應程度，並繼續觀察14天；如有任何施藥處產生嚴重刺激反應，則應清除藥劑，立即停止試驗。
- b. 如懷疑試驗物具刺激性但不具腐蝕性，則可將試驗物於動物皮膚1處施藥，並使其接觸時間為4小時。

(2) 主試驗 (確認試驗)：

於前試驗如無腐蝕性反應，則可投予藥劑予另外2隻動物，步驟如下：

- a. 試驗物應施佈於皮膚，面積不超過6 cm³，試驗期間應以紗布覆蓋施藥之皮膚區域，並以無刺激性的膠布固定，或直接將藥物置於紗布後覆蓋皮膚。
 - b. 皮膚接觸藥物之時間應4小時，4小時後應以水或適當溶劑將藥劑清除。
- (3) 在無進行前試驗的例外情形下，可投予試驗物於2-3隻動物，單次貼附持續4小時暴露後觀察。
 - (4) 不確定的結果 (equivocal response) 應進行額外的動物試驗加以確認。

6. 觀察及紀錄刺激程度

- (1) 應至少於移除藥劑60分鐘、24、48、72小時觀察是否有紅腫或水腫反應，並記錄刺激程度，如於72小時觀察時無法確定是否有刺激或腐蝕反應，則應觀察至14天以確定其可逆性。若於14天前已可判斷反應的可逆性，則可結束試驗。
- (2) 依表一觀察及紀錄刺激及腐蝕程度；其他毒理反應亦應紀錄。

表一、皮膚刺激性及腐蝕性判定標準

紅斑 (erythema)及焦痂 (Eschar)	
無紅斑.....	0
非常輕微的紅斑 (幾乎很難察覺).....	1
明顯的紅斑區塊.....	2
中等至嚴重紅斑.....	3
嚴重紅斑 (牛肉紅) 至焦痂形成.....	4
水腫 (oedema)	
無水腫.....	0
非常的輕微水腫 (幾乎很難察覺).....	1
輕微水腫 (有明顯界限的隆起).....	2
中等水腫 (至少隆起1 mm).....	3
嚴重水腫 (隆起超過1 mm，且水腫擴散超過投藥範圍).....	4

7. 數據呈現 (至少需包括，但不限於下面項目)：

- (1) 進行本試驗的合理性說明。
- (2) 動物種別、品系、性別和試驗開始和終止時體重。

- (3) 每隻動物每個觀察時間點的皮膚刺激性及腐蝕性反應數據和其他毒性反應的敘述。



7. 皮膚過敏性試驗 (Skin Sensitization)

1. 試驗目的：

藉由取得試驗物之皮膚過敏毒性之科學資訊，建構農業化學物安全使用方法。

2. 試驗方法選擇：

建議使用天竺鼠加佐劑過敏檢測法 (Guinea pig maximization test, GPMT)、天竺鼠無佐劑過敏檢測法 (Buehler test) 或小鼠局部淋巴結細胞增殖分析法 (Local Lymph Node Assay, LLNA)。得接受其他相同目的取向的試驗來取代。

皮膚過敏性試驗-天竺鼠加佐劑過敏檢測法 (GPMT)

1. 參考試驗指引：

OECD test guideline 406 (Guinea pig maximization test and Buehler test)
US EPA OCSPP (formerly OPPTS) 870.2600

2. 試驗動物：

- (1) 使用成年年輕之天竺鼠，公母均可。
- (2) 若使用母鼠，應使用未生產過與未懷孕之母天竺鼠
- (3) 試驗前剃毛，需小心不要使皮膚受到損傷。
- (4) 動物使用量：
 - a. 試驗物之試驗組每組至少 10 隻動物，而對照組亦最少要有 5 隻動物。
 - b. 如果試驗組每組使用之動物少於20隻，對照組少於10隻動物，且其結果無法判定試驗物是否具皮膚過敏性時，應執行額外試驗使動物總數於試驗組每組至少達20隻動物，於對照組至少達10隻動物。

3. 試驗分組：

包括對照組 (溶劑或媒介物) 與試驗物處理組。

4. 試驗劑量之選擇：

- (1) 誘發 (induction) 劑量：應選擇試驗動物能忍受，且只產生輕微至中度之皮膚刺激性之劑量為最高誘發劑量。
- (2) 激發 (challenge) 劑量：應選擇對試驗動物不產生任何皮膚刺激性之最高劑量為最高激發劑量。
- (3) 可以2至3隻動物進行前試驗選取合適之試驗濃度。

5. 試驗步驟：

(1) 初次誘發 (initial induction) (第0天，皮內注射)

a. 試驗物處理組：

於剃毛皮膚背部中線之兩側採用以下3個位置點注射，每點注射0.1 mL：

注射點1：佛朗氏完全佐劑 (Freund's Complete Adjuvant ; FCA) 與水 (或生理食鹽水) 之1:1 (v/v) 混合物

注射點2：選擇之試驗物濃度溶於適當之媒介物中

注射點3：選擇之試驗物濃度溶於以1:1 (v/v) 比例混合之FCA與水 (或生理食鹽水) 中

b. 對照組 (第0天)：

採用與試驗物處理組相同3個位置之注射點注射，每次注射0.1 mL：

注射點1：FCA與水(或生理食鹽水)之1:1 (v/v) 混合物

注射點2：未稀釋之媒介物

注射點3：媒介物與FCA和水 (或生理食鹽水) 之1:1 (v/v) 混合物配製成的50% (w/v) 製劑

(2) 再誘發 (re-induction) (於初次誘發5-7天後以皮膚貼覆方式執行)

如果試驗物不具皮膚刺激性，則於24小時前於已剃毛之試驗位置上先塗覆0.5 mL含10%十二烷基硫酸鈉 (sodium lauryl sulphate) 之凡士林以促進再誘發作用。

(3) 再誘發 (re-induction) (於初次誘發6-8天後以皮膚貼覆方式執行)

a. 試驗物處理組

再次將測試區之毛髮剃除，將試驗物配製於合適媒介物後以濾紙或紗布完全吸取，之後再貼覆於皮膚上48小時。試驗物如為固體需先經研磨並混合於合適之媒介物中；但若試驗物為液體則不經稀釋直接使用。

b. 對照組

直接貼覆與試驗物一樣之媒介物於皮膚上48小時。

(4) 激發 (challenge) (於初次誘發20-22天後以皮膚貼覆方式執行)

將試驗組與對照組動物的體側部毛髮剃除，並固定含試驗物之貼布於體側部之一側，另一側可貼覆只含媒介物之貼布。將貼布固定於皮膚上貼覆24小時。

(5) 試驗觀察

- a. 需要時可於移除貼布21小時後將毛髮仔細剃除。
- b. 於剃毛3小時後觀察 (約於激發步驟開始48小時後) 並依下表分級標準記錄皮膚之反應。
- c. 於第1次觀察記錄後的24小時再觀察並記錄皮膚之反應。

激發貼片測試反應評估標準 (Magnusson and Kligman Grading Scale for the Evaluation of Challenge Patch Test Reactions)	
無可見之改變.....	0
散佈性並且呈斑狀之紅斑	1
中度擴散性之紅斑	2
嚴重的紅斑與水腫	3

(6) 再激發 (re-challenge)

如果需進一步的確認初次激發之結果，則可以於初次激發後1週執行第2次的激發。

6. 觀察與記錄：

於誘導期與激發期後記錄所有皮膚的反應及異常表現。

7. 數據呈現 (至少需包括，但不限於下面項目)：

- (1) 動物種別、品系、性別和試驗開始和終止時體重。
- (2) 最近使用正反應對照物進行可靠度試驗 (reliability test) 的摘要結果，需包括使用藥物名稱、濃度和媒介物等資料。
- (3) 每隻動物每個觀察時間點的皮膚反應數據和其他毒性反應的敘述。

皮膚過敏性試驗-天竺鼠無佐劑過敏檢測法 (Buehler test)

1. 參考試驗指引：
OECD test guideline 406 (Guinea pig maximization test and Buehler test)
US EPA OCSPP (formerly OPPTS) 870.2600
2. 試驗動物：
 - (1) 使用成年年輕之天竺鼠，公母均可。
 - (2) 若使用母鼠，應使用未生產過與未懷孕之母天竺鼠
 - (3) 試驗前剃毛，需小心不要使皮膚受到損傷。
 - (4) 動物使用量：
試驗物之試驗組每組至少 20 隻動物，而對照組亦最少要有 10 隻動物。
3. 試驗分組：
包括對照組 (溶劑或媒介物) 與試驗物處理組。
4. 試驗劑量之選擇：
 - (1) 誘發 (induction) 劑量：應選擇試驗動物能忍受，且只產生輕微之皮膚刺激性之劑量為最高誘發劑量。
 - (2) 激發 (challenge) 劑量：應選擇對試驗動物不產生任何皮膚刺激性之最高劑量為最高激發劑量。
 - (3) 可以2至3隻動物進行前試驗選取合適之試驗濃度。
5. 試驗步驟：
 - (1) 初次誘發 (第0天以皮膚貼覆方式執行)
 - a. 試驗物處理組
將動物體側之毛髮剃除，將試驗物配製於合適媒介物後以濾紙或紗布完全浸泡吸收，再將其固定貼覆於皮膚上6小時。
 - b. 對照組
與試驗物處理組貼覆方法相同但只貼覆媒介物。
 - (2) 再誘發 (以皮膚貼覆方式執行)
 - a. 於初次誘發後之6-8天與13-15天分別執行。
 - b. 試驗組與對照組動物以與初次誘發相同方式於動物體側執行皮膚貼

覆。

(3) 激發 (以皮膚貼覆方式執行)

- a. 於第二次再誘發後14天執行。
- b. 將試驗組與對照組動物另一體側的毛髮剃除，於該側後區貼覆含試驗物之貼布，可於同側前區貼覆只含媒介物之貼布，將貼布固定於皮膚上貼覆6小時。

(4) 試驗觀察

- a. 需要時可於移除貼布21小時後將毛髮剃除。
- b. 於剃毛3小時後觀察(約於激發貼覆開始的30小時後) 並依下表的分級標準記錄皮膚之反應。
- c. 於第1次觀察記錄後的24小時再觀察並記錄皮膚之反應。

激發貼片測試反應評估標準 (Magnusson and Kligman Grading Scale for the Evaluation of Challenge Patch Test Reactions)	
無可見之改變.....	0
散佈性並且呈斑狀之紅斑	1
中度擴散性之紅斑	2
嚴重的紅斑與水腫	3

(5) 再激發試驗

如果需進一步的確認初次激發之結果，則可以於初次激發後1週執行第2次的激發。

6. 觀察與記錄：

於誘導期與激發期後記錄所有皮膚的反應及異常表現。

7. 數據呈現 (至少需包括，但不限於下面項目)：

- (1) 動物種別、品系、性別和試驗開始和終止時體重。
- (2) 最近使用正反應對照物進行可靠度試驗 (reliability test) 的摘要結果，需包括使用藥物名稱、濃度和媒介物等資料。
- (3) 每隻動物每個觀察時間點的皮膚反應數據和其他毒性反應的敘述。

皮膚過敏性試驗-小鼠局部淋巴結細胞增殖分析法 (LLNA)

1. 參考試驗指引：
OECD test guideline 429、442A、442B (Local Lymph Node Assay)
2. 試驗方法：
依偵測細胞增生結果方式的不同而分為三種方法：(1) 放射線物質標定法；(2) 溴化去氧尿苷 (5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU) 標定法；(3) DA法 (由 Daicel Chemical Industries, Ltd. 建立，簡稱DA；偵測ATP含量法)。
3. 試驗動物：
 - (1) 應使用CBA/Ca品系或CBA/J品系之成年年輕未生產過與未懷孕之雌性小鼠，亦可使用其他性別或品系的小鼠但必須要有正當理由。
 - (2) 試驗開始時動物週齡為8-12週，體重不超過同性別全體平均值之 $\pm 20\%$ 。
 - (3) 動物數量：
 - a. 前試驗：每測試濃度以1-2隻動物進行測試。
 - b. 主試驗：每個測試濃度至少4隻動物。
4. 測試劑量：
在沒有相關毒理資料可供參考下建議先進行不同濃度之前試驗測試，在不造成小鼠過度皮膚刺激與全身急毒性之前提下，選取至少3種劑量作為主試驗之測試濃度。
5. 對照組：
包括負反應 (溶劑或媒介物) 對照組與正反應對照組。已知會引起皮膚過敏性反應之物質可使用為正反應對照組。若正反應對照藥劑和試驗物所使用的媒介物或溶劑不同，應設有不同的負反應對照組。
6. 測試方法：
 - (1) 前試驗：
 - a. 試驗物濃度選取範圍：
以原液或試驗物之最大溶解度連續稀釋做一範圍篩選，例如：100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5%及0.1%。

b. 使用放射線物質標定法或溴化去氧尿苷標定法之前試驗流程如下：

- i. 於試驗第1、2、3天分別塗抹25 μL /耳的試驗物於小鼠兩耳背部，待小鼠耳朵吸收溶液後再將小鼠移回籠內，第6天將動物犧牲。
- ii. 測量小鼠第1天（投藥前）、第3天（第一次投藥後約48小時）及第6天（試驗結束當天）的耳朵腫脹程度，並以肉眼觀察並紀錄耳朵紅斑評分如下表，其他全身性的中毒反應亦需觀察並紀錄：

無紅斑.....	0
不易辨認之輕微紅斑.....	1
易辨認之明顯紅斑.....	2
中度至重度紅斑.....	3
嚴重紅斑至形成焦痂.....	4

- iii. 結果：當試驗物之選取濃度於引起耳朵紅斑評分平均 ≥ 3 及/或於第3天或第6天的耳朵腫脹比值 $\geq 25\%$ ，顯示此濃度具有過度局部刺激不適用於主試驗。

c. 使用DA法之前試驗流程如下：

- i. 於試驗第1、2、3天和第7天分別先塗1%的十二烷基硫酸鈉 (sodium lauryl sulfate) 於小鼠兩耳背部1小時後，再分別塗抹25 μL /耳的試驗物於兩耳背部，待小鼠耳朵吸收溶液後再將小鼠移回籠內，第8天將動物犧牲。
- ii. 測量小鼠第1天（投藥前）、第3天（第一次投藥後約48小時）、第7天（試驗結束前24小時）和第8天（試驗結束當天）的耳朵腫脹程度，並以肉眼觀察並紀錄耳朵紅斑評分如下表，其他全身性的中毒反應亦需觀察並紀錄：

無紅斑.....	0
不易辨認之輕微紅斑.....	1
易辨認之明顯紅斑.....	2
中度至重度紅斑.....	3
嚴重紅斑至形成焦痂.....	4

- iii. 結果：當試驗物之選取濃度於引起耳朵紅斑評分平均 ≥ 3 及/或於第3天、第7天或第8天的耳朵腫脹比值 $\geq 25\%$ ，顯示此濃度具有過度局部刺激不適用於主試驗。

(2) 主試驗：

a. 放射線物質標定法：

- i. 第1、2、3天：分別塗抹25 μL /耳的試驗物和對照物於小鼠兩耳背部，待小鼠耳朵吸收溶液後再將小鼠移回籠內。
- ii. 第4天和第5天：不作任何處理。
- iii. 第6天：經小鼠尾靜脈注射250 μL /隻動物含放射線標定物的磷酸緩衝液後5小時將動物犧牲，取下兩耳耳下淋巴結，製備單細胞懸浮液後進行液體閃爍放射性分析。動物之淋巴球細胞增生結果以每分鐘衰變率 (disintegrations per minute, DPM) 表示。

b. 溴化去氧尿苷標定法：

- i. 第1、2、3天：分別塗抹25 μL /耳的試驗物於小鼠兩耳背部，待小鼠耳朵吸收溶液後再將小鼠移回籠內。
- ii. 第4天：不作任何處理。
- iii. 第5天：每隻小鼠腹腔注射0.5 mL BrdU (10 mg/mL) 液體。
- iv. 第6天：約於注射BrdU液體24小時後將動物犧牲，取下兩耳耳下淋巴結製備單細胞懸浮液後進行BrdU的ELISA分析測定其吸光值，動物之淋巴球細胞增生結果以BrdU標定指數 (BrdU labeling index) 表示。

c. DA法 (偵測ATP含量法)：

- i. 第1、2、3和第7天：分別先塗1%的十二烷基硫酸鈉於小鼠兩耳背部1小時後，再塗抹25 μL /耳的試驗物或對照藥劑於兩耳背部，待小鼠耳朵吸收溶液後再將小鼠移回籠內。
- ii. 第4、5和6天：不作任何處理。
- iii. 第8天：約於第7天處理後24-30小時將動物犧牲，取下兩耳耳下淋巴結製備單細胞懸浮液後以冷光試劑套組進行ATP含量分析，動物之淋巴球細胞增生結果以相對冷光單位 (Relative Luminescence Units, RLU) 表示。

7. 觀察：

除第1天、第3天及第6天 (或第7天和第8天)以肉眼觀察小鼠耳朵紅斑現象外，另於投藥後每天進行小鼠之臨床症狀觀察。

8. 結果評估：

(1) 刺激指數 (stimulation index, SI): 為處理組與負反應對照組之淋巴結細胞增生數量比值。

(2) 判定標準:

a. 放射性物質標定法:

當處理組有一或多個濃度致使小鼠耳下淋巴結細胞增生比值達3倍或3倍以上時, 亦即 $SI \geq 3$, 則表示試驗物具有潛在皮膚過敏反應。

b. 溴化去氧尿苷標定法

當處理組有一或多個濃度致使 $SI \geq 1.6$ 時, 則表示試驗物具有潛在陽性皮膚過敏反應。當SI數值在邊緣結果時 ($1.6 \leq SI \leq 1.9$) 可搭配統計分析輔助判讀。

c. DA法:

當處理組有一或多個濃度致使 $SI \geq 1.8$, 則表示試驗物具有潛在皮膚過敏反應。SI數值在邊緣結果時 ($1.8 \leq SI \leq 2.5$) 可搭配統計分析輔助判讀。

9. 數據呈現 (至少需包括, 但不限於下面項目):

(1) 動物品系、來源、性別、投藥前和犧牲前之體重變化與臨床症狀觀察紀錄。

(2) 每隻動物或每組動物之每分鐘衰變率 (DPM)/ BrdU標定指數/相對冷光單位 (RLU)。

(3) 每處理組之刺激指數 (SI)。

8. 致變異性試驗 (Mutagenicity studies)

1. 試驗目的：

這些致變性試驗的目的為檢驗試驗物是否會引起基因突變、染色體結構性畸變或是染色體數目性畸變。

2. 試驗方法選擇：

應使用細菌進行基因逆向變異試驗，使用哺乳類細胞進行染色體畸變試驗，使用啮齒類動物進行微核或染色體畸變試驗。若因為技術上或是科學上等原因無法進行上述任一試驗時，可接受其他相似目的取向的試驗來取代。此外，根據上述試驗的結果，認為需要更進一步的檢測時，應進行額外的致變異性試驗。

細菌基因逆向變異試驗 (Bacterial Gene Reverse Mutation Assay)

1. 參考試驗指引：

OECD test guideline 471

US EPA OCSPP (formerly OPPTS) 870.5100

2. 試驗體系：

由下列五種類型菌株中各挑選出一株菌株，總計以五種菌株進行試驗：

(1) *S. typhimurium* TA98，及

(2) *S. typhimurium* TA100，及

(3) *S. typhimurium* TA1535，及

(4) *S. typhimurium* TA1537 或TA97 或 TA97a，及

(5) *E. coli* WP2 uvrA 或 *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) 或 *S. typhimurium* TA102。

3. 測試劑量：

(1) 至少要有5個可分析的劑量，每個劑量間要有適當的間隔。

(2) 建議進行前試驗來決定試驗物的細菌殺傷力和溶解度。

- (3) 對於無殺傷力的試驗物設定最高測試劑量上限為5 mg/plate (或5 μ L/plate)，對於有殺傷力的試驗物最高測試劑量應具有殺傷力。當有沉澱物產生時，應選擇不影響肉眼判讀的劑量。
4. 對照組：
每個試驗不管有無添加體外代謝酵素處理均要包括負反應對照組 (溶劑或媒介物) 和正反應對照組，正反應對照組要確實產生正反應。
5. 平板數量：
每個對照組和試驗物各劑量組的平板數至少要2個以上。
6. 測試方法：
(1) 可使用前置培養法 (preincubation method) 或平板培養試驗法 (plate incorporation method)，當使用其他方法時需要有科學的依據。
(2) 不管選用何種測試方法，實驗均要包括不經體外酵素代謝和經體外酵素代謝的處理。
(3) 需選擇適當的體外代謝酵素，一般建議為S9 (post-mitochondrial fraction)。
7. 觀察：
於37°C培養48-72小時後，計算每個平板上的回復菌落數，在此同時也要紀錄是否有細菌殺傷力和沉澱物的產生。
8. 結果評估：
明確的正反應結果無需再重複試驗。
當無法明確判斷正反應或負反應時，應改變試驗條件後再進行確認。
9. 數據呈現 (至少需包括，但不限於下面項目)：
需包括每個處理 (對照組和試驗物組) 每個平板上的回復突變菌落數、每個處理的平均回復菌落數及其標準偏差值。

哺乳動物細胞微核試驗 (*In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test)

1. 參考試驗指引：
OECD test guideline 487
2. 試驗體系：
 - (1) 可使用人類週邊血液淋巴球初代細胞 (primary cell) 或齧齒動物來源的細胞株 (cell line)，例如：CHO、V79、CHL/IU或L5178Y等。
 - (2) 細胞株需檢視其染色體數目 (核型)、細胞週期和是否有黴漿菌的污染。
3. 測試劑量：
 - (1) 至少要有3個可分析的劑量，每個劑量間要有適當的間隔。
 - (2) 建議進行前試驗來決定後續主試驗劑量。
 - (3) 對於無殺傷力的試驗物設定最高測試濃度上限為5 mg/mL、5 μ L/mL或10 mM；對於有殺傷力的試驗物最高濃度需達到55 \pm 5%的細胞殺傷力。當溶解度有限，且在任何濃度下均無殺傷力時，最高試驗濃度應為有沉澱物產生的最低濃度。
4. 對照組：

每個試驗不管有無添加體外代謝酵素處理均要包括負反應對照組 (無處理對照組)、溶劑或媒介物對照組和正反應對照組。具有歷史數據或文獻證明使用的溶劑或媒介物不會引起不良或致變異性反應者可免無處理對照組。
5. 培養盤重複數：

每個對照組和試驗物各濃度組的培養盤數至少要2個以上。
6. 測試方法：
 - (1) 應使用呈指數分裂期 (growing exponentially) 的細胞進行試驗。
 - (2) 可接受添加或不添加肌動蛋白聚合抑制劑 (actin polymerization inhibitor cytochalasin B, cytoB) 的操作程序。
 - (3) 短時間暴露試驗：試驗物加與不加體外代謝酵素處理細胞3-6小時後移除試驗物更換新鮮含 (或不含) cytoB的培養液，於1.5-2個細胞週期時間收取細胞；

- (4) 連續暴露試驗：不加體外代謝酵素處理，依以下操作程序擇一進行：
 - a. 試驗物添加 (或不添加) cytoB連續處理1.5-2個細胞週期後收取細胞。
 - b. 試驗物處理細胞1.5-2個細胞週期後，移除試驗物，更換新鮮含 (或不含) cytoB的培養液，再培養1.5-2個細胞週期後收取細胞。
- (5) 先進行短時間暴露試驗，當試驗結果為負反應或不確定結果時，應進行連續暴露試驗。
- (6) 需選擇適當的體外代謝酵素，一般建議為S9 (post-mitochondrial fraction)。
- (7) 所有試驗物處理濃度組和負反應對照組的細胞殺傷力情形亦要同時檢測。

7. 觀察：

- (1) 試驗有添加cytoB：試驗物和對照組的每個處理均需觀察和計數至少2,000個雙核細胞 (binucleated cells) (也就是每個培養盤計數至少1,000個雙核細胞，每個處理重複2個培養盤)。每個培養盤需至少計數500顆細胞以計算胞質分裂阻滯增生指數 (cytokinesis-block proliferation index, CBPI) 或複製指數 (replication index, RI) 來決定細胞增生和殺傷力情形。
- (2) 試驗無添加cytoB：試驗物和對照組的每個處理均需觀察和計數至少2,000個細胞 (也就是每個培養盤計數至少1,000個細胞，每個處理重複2個培養盤)。並計算其相對增生細胞數 (relative increase in cell counts, RICC) 或相對細胞族群倍增值 (relative population doubling, RPD) 或增生指數 (Proliferative Index, PI) 來決定細胞增生和殺傷力情形。

8. 結果評估：

- (1) 當試驗物處理組的微核發生率有統計顯著性的增加或呈劑量正相關性增加時可判定為正反應結果。
- (2) 無符合上述條件時可判定為負反應結果。
- (3) 明確的正反應或負反應結果無需進行額外實驗再驗證；當無法明確判斷正反應或負反應時，每個重複應再額外計數1,000顆細胞；若仍無法明確判定結果，應改變實驗條件後再進行試驗確認。

9. 數據呈現 (至少需包括，但不限於下面項目)：

所有觀察的原始數據及其平均值、各試驗物處理濃度組和對照組的細胞殺傷

力及試驗物是否產生沉澱物情形。



哺乳動物細胞染色體畸變試驗 (*In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test)

1. 參考試驗指引：
OECD test guideline 473
US EPA OCSPP (formerly OPPTS) 870.5375
2. 試驗體系：
 - (1) 可使用初代細胞 (primary cell)、培養細胞 (culture cell)、繼代細胞 (subculture cell) 或細胞株，包括人類來源細胞。例如：中國倉鼠纖維母細胞株 (Chinese hamster fibroblast cell line) 或人類週邊血淋巴球細胞 (human peripheral blood lymphocyte) 等。
 - (2) 實驗中使用的細胞需檢視其染色體數目 (核型)、細胞週期和是否有黴漿菌的污染。
3. 測試劑量：
 - (1) 至少要有3個可分析的劑量，每個劑量間要有適當的間隔。
 - (2) 建議進行前試驗來決定後續主試驗劑量。
 - (3) 對於無殺傷力的試驗物設定最高測試濃度上限為5 mg/mL、5 μ L/mL或10 mM；對於有殺傷力的試驗物最高濃度需要能減少生長密度、細胞數或降低有絲分裂指數至少50%。溶解度低的試驗物，在任何濃度下均無殺傷力時，最高試驗濃度應高於溶解極限。當有沉澱物產生時，應選擇不影響肉眼判讀的濃度。
4. 對照組：

每個試驗不管有無添加體外代謝酵素處理均要包括負反應對照組 (溶劑或媒介物) 和正反應對照組。正反應對照組要選擇染色體誘裂劑 (clastogen)，其暴露濃度要確實能引起正反應。
5. 培養盤重複數：

每個對照組和試驗物各濃度組的培養盤數至少要2個以上。
6. 測試方法：

- (1) 應使用增生期 (proliferative phase) 的細胞。
- (2) 先進行試驗物加與不加體外代謝酵素處理細胞3-6小時後更換培養液，於1.5 細胞週期時間 (自處理起始時間點算) 收取細胞的短時間暴露試驗；
- (3) 當短時間暴露試驗加與不加體外代謝酵素處理結果均為負反應時，應進行不加體外代謝酵素而以試驗物連續處理1.5細胞週期的連續處理試驗。
- (4) 需選擇適當的體外代謝酵素，一般建議為S9 (post-mitochondrial fraction)。
- (5) 所有試驗物處理濃度組和負反應對照組的細胞殺傷力情形亦要同時檢測。

7. 觀察：

- (1) 試驗物和對照組的每個處理均需觀察和計數200個中期細胞 (也就是每個培養盤計數100個中期細胞)，並記錄發生染色體結構性畸變 (structural chromosome aberration) 的細胞數和頻率。其中，亦要包括染色體結構性畸變的不同分型、發生數目和發生頻率。
- (2) 缺口 (gaps) 的頻率需要紀錄且呈現於報告，但不列入總染色體畸變頻率的計算中，有出現多倍體 (polyploidy) 和內生性複製 (endoreduplication) 時亦要分別紀錄其數目和發生率。

8. 結果評估：

- (1) 當試驗物處理組的染色體畸變發生率與負反應對照組相比有顯著的增加，且具有劑量反應關係時可判定為正反應結果。
- (2) 無符合上述條件時可判定為負反應結果。
- (3) 當無法明確判斷正反應或負反應時，應改變實驗條件後再進行確認。

9. 數據呈現 (至少需包括，但不限於下面項目)：

所有觀察的原始數據及其平均值、各試驗物處理濃度組和負反應對照組的細胞殺傷力及試驗物是否產生沉澱物情形。

哺乳動物紅血球 (或骨髓) 細胞微核試驗 (*In vivo* mammalian erythrocyte /bone marrow micronucleus test)

1. 參考試驗指引：
OECD test guideline 474
US EPA OCSPP (formerly OPPTS) 870.5395
2. 試驗體系：
 - (1) 以骨髓細胞為標的時可選用小鼠或大鼠為試驗動物；當以週邊血為標的時則使用小鼠為試驗動物。亦可使用其他動物但必須要有正當理由。
 - (2) 當可證明試驗物對動物的作用沒有性別差異時，可選用單一性別進行試驗，通常以雄性為優先選擇。
 - (3) 每個測試劑量組和對照組所使用的動物數量為每個性別至少5隻。
3. 投藥途徑：

口服給予或是腹腔內注射給予。使用其他給藥途徑時需要有正當的理由。
4. 投藥次數：

單次投予或多次投予。
5. 測試劑量：
 - (1) 至少要有三個測試劑量，每個劑量間要有適當間隔。
 - (2) 可以 (a) 不成熟紅血球的減少 (血液毒性)、(b) 出現全身性的毒性症狀或是 (c) 預期再增加劑量會造成死亡等指標來做為最高測試劑量的選擇。
 - (3) 當毒性無法確定時，以2,000 mg/kg做為最高測試劑量的上限。
6. 對照組：

要有負反應對照組 (溶劑或媒介物) 和正反應對照組，正反應對照組要確實引起微核的產生 (正反應)。
7. 測試方法：
 - (1) 使用骨髓或週邊血的紅血球。

- (2) 單次給藥者，經過適當的間隔後需取樣兩次；多次給藥者，經過適當的間隔後取樣一次。
- (3) 單次給藥者若能證明哪一個時間點的敏感性是最高時，可只採樣一次。

8. 觀察：

- (1) 每隻動物需觀察至少2,000顆不成熟紅血球，並紀錄微核的發生率。
- (2) 以骨髓細胞為觀察標的時每隻動物至少計數200顆紅血球；以週邊血為觀察標的時每隻動物至少計數1,000顆紅血球，並記錄紅血球內不成熟紅血球的數量和比率。

9. 結果評估：

- (1) 具微核的細胞有劑量反應性的增加，或是任一處理劑量下有顯著的增加時判定為正反應結果。
- (2) 當出現不確定結果 (equivocal results) 時，需改變實驗條件再進行試驗確認。

10. 數據呈現 (至少需包括，但不限於下面項目)：

- (1) 每隻動物所計數的不成熟紅血球數目、具有微核的不成熟紅血球數目以及計數的成熟紅血球內不成熟紅血球的數量均需分別表列出來。
- (2) 每隻動物紅血球內的不成熟紅血球比例和不成熟紅血球內微核發生率均需分別表列出來。
- (3) 每組處理不成熟紅血球微核發生率的平均值和標準偏差值。

哺乳動物骨髓染色體畸變試驗 (Mammalian Bone Marrow Chromosome aberration)

1. 參考試驗指引：
OECD test guideline 475
US EPA OCSPP (formerly OPPTS) 870.5385
2. 試驗體系：
 - (1) 一般選用大鼠、小鼠和倉鼠為試驗動物，亦可使用其他動物但必須要有正當理由。
 - (2) 當可證明試驗物對動物的作用沒有性別差異時，可選用單一性別進行試驗。
 - (3) 每個測試劑量組和對照組所使用的動物數量為每個性別至少5隻。
3. 投藥途徑：
口服給予或是腹腔內注射給予。使用其他給藥途徑時需要有正當的理由。
4. 投藥次數：
單次投予或一日內多次投予。
5. 測試劑量：
 - (1) 至少要有三個測試劑量，每個劑量間要有適當間隔。
 - (2) 可以 (a)出現骨髓毒性或是 (b) 預期再增加劑量會造成死亡等指標來做為最高測試劑量的選擇。
 - (3) 當毒性無法確定時，以2,000 mg/kg做為最高測試劑量的上限。
 - (4) 限量試驗 (limit test)：若試驗物於 $\geq 2,000$ mg/kg劑量不會造成任何中毒症狀且有結構相關化合物 (structurally related compounds) 的資料顯示不具基因毒性時，可採用單一劑量的限量試驗。
6. 對照組：
要有空白對照組、負反應對照組 (溶劑或媒介物) 和正反應對照組，正反應對照組要確實引起染色體結構性畸變。具有歷史數據或文獻證明使用的溶劑或媒介物不會引起不良或致變異性反應者可免空白對照組。

7. 測試方法：

(1) 給藥後應於兩個時間點採樣：

單次給藥者，處理經過約1.5細胞週期（約12-18小時）後採樣第一次，24小時後採樣第二次；多次給藥者，以最後一次給藥約1.5細胞週期後進行第一次的採樣，24小時後取樣第二次。

(2) 在進行採樣前約3-5小時經腹腔注射間期細胞中止劑（例如：Colcemid®或colchicine），之後將動物犧牲由骨髓收集細胞以進行染色體畸變分析。

8. 觀察：

(1) 處理組和對照組的每隻動物需觀察至少1,000顆細胞計算細胞分裂指數（mitotic index）以評估細胞殺傷力。

(2) 處理組和對照組的每隻動物至少觀察100顆間期細胞，若畸變比率高時可降低計數量。每隻動物需記錄計算的細胞數量、每個細胞的畸變數目和發生結構性畸變的細胞比率。並根據染色體結構性畸變的分型表列出發生數目和發生頻率。

(3) 缺口（gaps）的頻率需要紀錄且於報告呈現，但不列入總染色體畸變頻率的計算中。

9. 結果評估：

(1) 具染色體畸變的細胞有劑量反應性的增加，或是任一採樣點、任一處理劑量下有顯著的增加時判定為正反應結果。

(2) 當出現不確定結果（equivocal results）時，需改變實驗條件再進行試驗確認。

10. 數據呈現（至少需包括，但不限於下面項目）：

(1) 每隻動物發生畸變的種類和數目。

(2) 每個處理和對照組的畸變總數及其平均值和標準偏差。

9. 水生生物毒性試驗 (Aquatic Toxicity)

1. 試驗目的：

藉由短期測試試驗物對水生生物的影響，得到具科學性的資訊以評估水生生物安全性及建構農業化學物的安全使用方法。

2. 名詞定義：

- (1) 半致死濃度 (LC₅₀)：以統計方式推估試驗物投予生物後，造成50%試驗生物死亡的濃度。
- (2) 半影響濃度 (EC₅₀)：以統計方式推估試驗物投予生物後，造成50%試驗生物受影響的濃度。
- (3) 靜止式測試法 (static test)：試驗過程中，不更換試驗液之測試方法。
- (4) 半靜止式測試法 (semi-static test)：試驗過程中，每隔一固定時間更換固定體積試驗液之測試方法。
- (5) 連續流佈式測試法 (flow-through test)：試驗過程中，試驗液保持連續更換之測試方法。
- (6) 死亡 (death)：魚隻無明顯的生命現象且以外物碰觸魚體皆不能引發反應者。
- (7) 不活動 (immobilization)：輕微搖晃試驗容器或以外物碰觸水蚤，15秒後水蚤仍無泳動之現象。

淡水魚類急毒性試驗 (Fish acute toxicity studies)

1. 參考試驗指引：

OECD test guideline 203

2. 試驗動物：

- (1) 參考使用魚種包括斑馬魚(*Danio rerio*)、鯉魚(*Cyprinus carpio*)、藍鰂魚(*Lepomis macrochirus*)、鱒魚(*Oncorhynchus mykiss*)、青鱗魚(*Oryzias latipes*)等。
- (2) 每個測試濃度至少需要7尾魚。

3. 測試方法：
可使用靜止式測試法、半靜止式測試法、或連續流佈式測試法。
4. 暴露時間：
藥物暴露96小時。
5. 測試濃度：
 - (1) 限量試驗 (Limit test): 直接使用藥物濃度為100 mg/L與一組空白對照組進行試驗。若有使用溶劑時，則需增加1組溶劑對照組。若無動物死亡，則LC₅₀可表示成>100 mg/L。若有動物死亡，則必須進行主試驗。
 - (2) 濃度範圍找尋試驗 (range-finding test): 於進行主試驗前，為推得主試驗之濃度範圍所進行之試驗過程。測試濃度可依期刊文獻、物質安全資料或其他相關數據予以評估與訂定。
 - (3) 主試驗 (main test, definitive test): 依據限度試驗或範圍找尋試驗之結果，至少包含5種不同測試濃度及1組空白對照組。若有使用溶劑時，則需增加1組溶劑對照組。
6. 環境監測：
 - (1) 光照週期：照光時間為12至16小時。
 - (2) 餵食：試驗過程中不得餵食。
 - (3) 水質監測：包括溶氧量、酸鹼值、溫度等。
 - (4) 水中藥物濃度監測：於特定時間分析水中藥物實際濃度。
7. 觀察：
於暴露後第24、48、72及96小時進行觀察，紀錄死亡數量及異常症狀。
8. 數據呈現 (至少需包括，但不限於下面項目)：
 - (1) 使用統計方式推估藥物對試驗生物之半致死濃度(LC₅₀)及95%信賴區間。
 - (2) 各處理濃度對魚造成死亡隻數及異常反應。
 - (3) 水中實際濃度與理論濃度偏差值。

淡水無脊椎生物急毒性試驗 (*Daphnia spp* acute immobilization studies)

1. 參考試驗指引：
OECD test guideline 202
2. 試驗物種：
 - (1) 使用 *Daphnia* 屬之水蚤。以出生24小時內之幼蚤進行試驗。
 - (2) 每個測試濃度至少需要20隻水蚤。
3. 測試方法：
可使用靜止式測試法、半靜止式測試法、或連續流佈式測試法。
4. 暴露時間：
藥物暴露48小時。
5. 測試濃度：
 - (1) 限量試驗 (Limit test): 直接使用藥物濃度為100 mg/L與一組空白對照組進行試驗。若有使用溶劑時，則需增加1組溶劑對照組。若無動物出現不活動現象，則EC₅₀可表示成>100 mg/L。若有10%以上動物不活動，則必須進行主試驗。
 - (2) 範圍找尋試驗 (range-finding test): 於進行主試驗前，為推得主試驗之濃度範圍所進行之試驗過程。測試濃度可依期刊文獻、物質安全資料或其他相關數據予以評估與訂定。
 - (3) 主試驗 (main test, definitive test): 依據限度試驗或範圍找尋試驗之結果，至少包含5種不同測試濃度及1組空白對照組。若有使用溶劑時，則需增加1組溶劑對照組。
6. 環境監測：
 - (1) 餵食：試驗過程中不得餵食。
 - (2) 水質監測：包括溶氧量、酸鹼值、溫度等。
 - (3) 水中藥物濃度監測：於特定時間分析水中藥物實際濃度。
 - (4) 試驗液體積：每隻水蚤至少需要5毫升試驗液。

7. 觀察：

於暴露後第24及48小時進行觀察，紀錄不活動 (immobilization) 數量及異常症狀。

8. 數據呈現 (至少需包括，但不限於下面項目)：

- (1) 使用統計方式推估藥物對試驗生物之半數反應濃度 (EC_{50}) 及95%信賴區間。
- (2) 各處理濃度水蚤出現不活動現象的隻數及不正常反應。
- (3) 水中實際濃度與理論濃度偏差值



10. 參考文獻

1. Environmental Protection Agency. 1998. Health Effects Test Guidelines OCSPP 870.5375: *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test, EPA 712-C-98-223.
2. Environmental Protection Agency. 1998. Health Effects Test Guidelines OCSPP 870.5385: Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test, EPA 712-C-98-225.
3. Environmental Protection Agency. 1998. Health Effects Test Guidelines OCSPP 870.5395: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, EPA 712-C-98-226.
4. Environmental Protection Agency. 1998. Health Effects Test Guidelines OCSPP 870.5100: Bacterial Reverse Mutation Test, EPA 712-C-98-247.
5. Environmental Protection Agency. 1998. Health Effects Test Guidelines OCSPP 870.1200: Acute Dermal Toxicity, EPA 712-C-98-192.
6. Environmental Protection Agency. 1998. Health Effects Test Guidelines OCSPP 870.1300: Acute Inhalation Toxicity, EPA 712-C-98-193.
7. Environmental Protection Agency. 1998. Health Effects Test Guidelines OCSPP 870.2400: Acute Eye Irritation, EPA 712-C-98-195.
8. Environmental Protection Agency. 1998. Health Effects Test Guidelines OCSPP 870.2500: Acute Dermal Irritation, EPA 712-C-98-196.
9. Environmental Protection Agency. 1998. Health Effects Test Guidelines OCSPP 870.5100: Bacterial Reverse Mutation Test, EPA 712-C-98-247.
10. Environmental Protection Agency. 2002. Health Effects Test Guidelines OCSPP 870.1100: Acute Oral Toxicity, EPA 712-C-02-190.
11. Environmental Protection Agency. 2003. Health Effects Test Guidelines OCSPP 870.2600: Acute Dermal Irritation, EPA 712-C-03-197.
12. Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF) Japan Agricultural Chemicals Notification (12 Nousan 8147). Guidelines for Preparation of Study Results Submitted When Applying for Registration of Agricultural Chemicals.
13. Organization for Economic Cooperation and Development. 1987. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 402: Acute Dermal Toxicity.
14. Organization for Economic Cooperation and Development. 1992. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 406: Skin Sensitization.

15. Organization for Economic Cooperation and Development. 1992. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 203: Fish, Acute Toxicity Test.
16. Organization for Economic Cooperation and Development. 1997. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 473: *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test.
17. Organization for Economic Cooperation and Development. 1997. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 475: Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test.
18. Organization for Economic Cooperation and Development. 1997. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 471: Bacterial Reverse Mutation Test.
19. Organization for Economic Cooperation and Development. 1997. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test.
20. Organization for Economic Cooperation and Development. 1998. OECD Principles on Good Laboratory Practice.
21. Organization for Economic Cooperation and Development. 2001. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 420: Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure.
22. Organization for Economic Cooperation and Development. 2001. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method.
23. Organization for Economic Cooperation and Development. 2002. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion.
24. Organization for Economic Cooperation and Development. 2004. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 202: *Daphnia sp.*, Acute Immobilization Test.
25. Organization for Economic Cooperation and Development. 2008. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 425: Acute Oral Toxicity-Up-and-Down-Procedure.
26. Organization for Economic Cooperation and Development. 2009. OECD

- Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 403: Acute Inhalation Toxicity.
27. Organization for Economic Cooperation and Development. 2010. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 429: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay.
 28. Organization for Economic Cooperation and Development. 2010. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 442A: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: DA.
 29. Organization for Economic Cooperation and Development. 2010. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 442B: Skin Sensitization: Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA.
 30. Organization for Economic Cooperation and Development. 2010. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 487: *In vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test.
 31. Organization for Economic Cooperation and Development. 2012. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 405: Acute Eye Irritation/Corrosion.

