

農藥之皮膚刺激性評估與動物替代性研究發展新趨勢

廖俊麟^{1*}、陳筱青¹、羅彥鈞¹、吳偉嘉¹、蔡韙任¹

摘要

廖俊麟、陳筱青、羅彥鈞、吳偉嘉、蔡韙任。2020。農藥之皮膚刺激性評估與動物替代性研究發展新趨勢。臺灣農藥科學 8 : 1-15。

皮膚是農民在使用農藥時最常暴露的途徑之一，可能造成接觸性皮膚炎 (contact dermatitis) 如刺激性 (irritant) 反應，出現包括潮紅 (redness) 或水腫 (edema) 等症狀，因此農藥申請登記時將視情形提供皮膚刺激性試驗報告供管理單位審查，俾利產品危害分類及標示使用 (classification and labeling)。試驗主要依循經濟合作暨發展組織 (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) 公開之白兔皮膚刺激毒性試驗指引執行，針對皮膚刺激性評估，目前國際動物替代驗證中心主要接受的體外試驗為重建人類表皮測試方式 (reconstructed human epidermis test method, RhE)，該方式為使用人類的皮膚角質形成細胞，在特定環境條件培養增殖下可分化成具有相似人類表皮的 3 維組織，試驗單位可利用相關皮膚組織衍生之商品化套組並以細胞存活試驗 (MTT assay) 方式評估皮膚刺激性。另外，在評估策略上國際趨勢強調使用試驗及評估綜合測試系統 (integrated approach to testing and assessment, IATA)，依據現有資料及證據權重 (weight of evidence) 原則給予加權及整合，並提供必要時應再執行新試驗以獲得關鍵數據的判定基準，最終結果可供監管單位進行評估及決策使用。雖然目前體外試驗相較傳統動物試驗，除符合動物福利不須使用動物外，還具備高效率及較低資源成本等優勢，但針對使用非動物試驗替代動物試驗的主要爭議點，在於是否具足夠的人體危害預測能力。目前研究顯示以 RhE 方式評估農藥皮膚刺激性，仍存在對於混合物之預測準確率可能下降及化學品分類適用性等問題點，後續仍需要科學研究釐清或修訂現行法規以對應，而無法完全替代傳統動物試驗方式，但建議仍可先導入 IATA 之評估系統作為管理決策所參考，除了可

接受日期：2020 年 6 月 10 日

* 通訊作者。E-mail: clliao@tactri.gov.tw

¹ 臺中市 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

增加預測面向之完整性，尚可減少實驗動物之使用或減輕其痛苦，符合目前國際持續追求實驗動物福祉的趨勢。

關鍵詞：農藥、皮膚刺激性、3R、重建人類表皮測試方式、試驗及評估綜合測試系統

緒言

皮膚作為人體表面積最大的器官，並且是抵抗外界物質的首要免疫防線，經常暴露於環境的化學物中也可能引起相關急性反應⁽⁶⁾。農民由於其工作需求，最常造成皮膚具暴露風險的時間點為噴灑農藥間期，其次為農藥的配製、裝載、運送或清洗容器的過程中⁽²⁶⁾。根據我國統計資料，針對環境及職業傷害造成主要的皮膚疾病為接觸性皮炎 (contact dermatitis)，在職業性接觸性皮炎患者中，又以刺激性 (irritant) (58.5%) 及過敏性 (allergic) (41.5%) 反應為主要模式類型⁽³³⁾。刺激性為皮膚直接受到化學品傷害而造成非特異性炎症反應；過敏性則與第四型過敏反應 (type IV hypersensitivity) 有關，又稱延遲性過敏反應 (delayed type hypersensitivity)，主要涉及 T 淋巴細胞的調控⁽⁶⁾。兩者之簡要區別為刺激性反應可能與單次或反覆暴露引起，從暴露到發生症狀時間短，可分為急性刺激型 (acute irritant type)、累積刺激型 (cumulative irritant type) 及延遲刺激型 (delayed irritant type) 等不同模式。累積刺激型是人類最常發生的模式，主要因反覆接觸具

輕度刺激性的物質，常發生於潮濕環境進行重複工作後⁽³⁰⁾；而過敏性一般需要反覆暴露並配合免疫機制過度反應才會發生，從暴露到發生症狀時間較長⁽⁶⁾。雖然刺激性及過敏性皮炎在致病機制有所差異，但在臨床上不容易區別，兩者造成的皮膚症狀皆相似，主要包括潮紅 (redness)、水腫 (edema)、硬節 (induration)、鱗屑 (scaling) 或水泡 (vesiculation) 等，在實際案例上也可能一併發生刺激性及過敏性反應^(6, 18)。

以目前聯合國所推廣的全球化學品統一分類和標籤制度 (Globally Harmonized System (GHS) of classification and labelling of chemicals) 可將皮膚刺激性依嚴重到輕微程度分類為 Category 1A/1B/1C、2、3 及無分類 (no category)。Category 1 指出物質具有腐蝕性 (corrosion)，並根據不同的暴露時間即可引發毒性反應或者反應持續時間的長短依強度高至低而有 A~C 的子分類 (subcategory)；Category 2 指出物質具有刺激性；Category 3 指出物質具有輕微 (mild) 刺激性；無分類則為以現行試驗方式無法證明物質具有潛在刺激性風險⁽³¹⁾。

根據我國農藥管理法之理化性及毒理試驗準則⁽²⁾，針對最常使用之有機化學製

劑申請要件，包括新有效成分或新劑型皆應視情形繳交皮膚刺激性試驗報告。傳統上針對農藥等化學品於皮膚刺激性的評估為使用活體白兔進行試驗⁽²⁰⁾，相關試驗除皮膚刺激性外還可評估是否具皮膚腐蝕性。

雖然實驗動物的使用對於人類的農業、化學及醫藥科學研究有著極大貢獻，但無論是新藥開發的功效性試驗或進行安全性評估的毒理試驗皆需使用大量的實驗動物。隨著人類科技進步及價值觀改變，關心的面向也越來越完整，除了從人類個體本身也逐漸擴大到對於動物及生態環境的重視，其中動物替代及減量研究更為現今各國發展農藥等化學品安全或功效性研究之朝向趨勢，以減少實驗動物的使用與減輕動物的痛苦。歐盟已於 2009 年禁用化妝品於動物皮膚刺激或過敏試驗的使用^(1,16)，我國也於 2019 年修正訂定「化粧品衛生管理條例」部分條文⁽³⁾，業者於國內進行化粧品成品或成分之安全性評估時，均不得以動物作為檢測對象，除該成分強烈顯示具有損害人體健康之評估資料等特殊原因者例外。因此現今針對化學品皮膚刺激性或腐蝕性評估上，國際已開發不須動物使用的替代性試驗指引^(22, 23)，主要以使用仿生人類皮膚組織方式進行毒性評估，且逐漸受到各國國際動物替代驗證研究中心所接受。另外目前更強調以階層式系統研究 (tiered system) 或者綜合測試系統 (integrated testing system, ITS) 評估化學品之皮膚刺激性或其他長短期等毒性^(20,21)。

本文將針對農藥等化學品於皮膚刺激性評估，先簡要回顧傳統使用實驗動物之研究方法，再到現今國際推廣的動物替代性研究，比較不同試驗方式特點，尤其針對評估結果之驗證能力與應用於危害標示適用性進行說明，最後再切入如何導入試驗及評估綜合測試系統 (integrated approach to testing and assessment, IATA) 進行判定，以期促使國人對於農藥之皮膚刺激性評估有更深入瞭解，並以此科學探討作為未來我國修訂農藥法規之毒理試驗準則的參考依據，有利接軌國際並符合動物福祉的精神。

皮膚刺激性評估之相關試驗簡介

一、白兔皮膚刺激性試驗

以實驗動物進行皮膚刺激試驗之歷史而言，最早可追溯至 1944 年由美國食品藥品管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 的毒理學家 Draize 等人針對化妝品之皮膚或眼刺激性所設計開發的急性毒性試驗⁽²⁹⁾，故此試驗也被稱為 Draize test。雖然也有其他物種動物使用的報告，但以目前經濟合作暨發展組織 (OECD) 之皮膚刺激性試驗指引 (編號: OECD Test Guideline 404) 建議測試的對象仍以兔子為主⁽¹⁹⁾。試驗為使用年輕的白兔，測試前約 24 小時會剃除實驗動物軀幹的背部毛髮，再將待測物質施用於約 6 平方公分

的皮膚上，並用紗布覆蓋，暴露期通常為 4 小時，過程中應確保藥物均勻地與皮膚接觸。投藥後觀察期的時間長度應能充分評估化學物造成的影響及可逆性，應至少包括投藥後的第 1、24、48 及 72 小時，必要時也可能連續觀察到 14 天之久，除非動物在期間中持續出現劇烈疼痛或嚴重反應時，而需經人道安樂死提前終止試驗。試驗中主要觀察實驗動物的皮膚紅斑與水腫情形，以及其可逆性與否並根據指引建議的判定標準進行分級與評分⁽¹⁹⁾，最終結果可判定藥劑是否具刺激性或腐蝕性。刺激性主要為對皮膚造成可逆性的反應⁽⁶⁾，常見組織病理變化為造成皮膚表皮層有炎症細胞浸潤伴隨水腫液形成、表皮角化過度 (hyperkeratosis) 或角質形成細胞增生 (keratinocytes hyperplasia) 等病變。腐蝕性主要為對皮膚造成不可逆性的反應，通常於臨床上除刺激性症狀外，還會出現潰瘍 (ulcer) 到出血 (hemorrhage) 等嚴重反應，組織學也可能顯示有多量上皮細胞壞死等病變⁽¹⁷⁾。試驗結果出現腐蝕性症狀會判定物質 GHS 分類為 Category 1；刺激性綜合評分為 $\geq 2.3 \leq 4.0$ 時分類為 Category 2；刺激性綜合評分為 $\geq 1.5 < 2.3$ 時則分類為 Category 3⁽³¹⁾。

二、仿生人類皮膚組織刺激性試驗

有鑑於傳統以白兔進行試驗除需要使用動物外，尚可能在過程中造成動物明顯

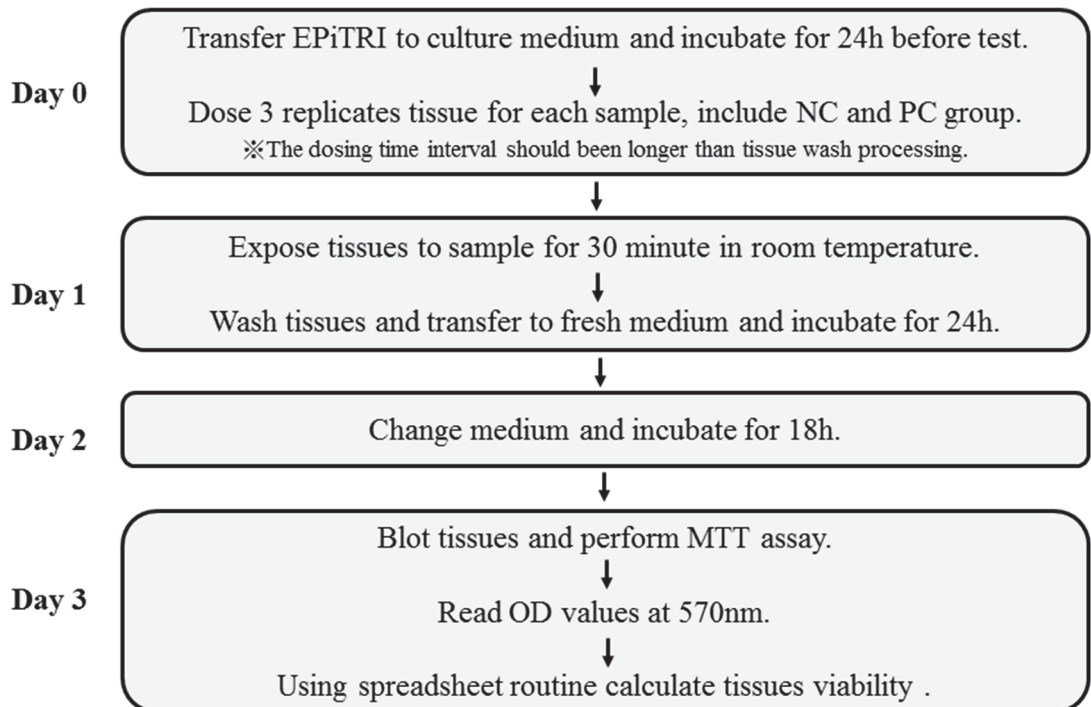
不適及痛苦，另外針對動物試驗對應實際人類之評估結果亦可能有所落差等原因，國際持續發展可替代活體動物且能精確評估與人體暴露相似結果的相關試驗⁽²⁹⁾。目前最主要被國際動物替代驗證中心所接受的為仿生人類皮膚組織刺激性試驗，又稱重建人類表皮測試方法 (Reconstructed Human Epidermis test method, RhE)，該研究方式也是目前 OECD 唯一採納的皮膚刺激毒性之體外試驗 (*in vitro*) 指引 (編號：OECD Test Guideline 439)^(22, 23)。該方法最早發展於 1990 年代，爾後先被歐洲動物替代方法確效中心 (EU Reference Laboratory for alternatives to animal testing, ECVAM) 歷經反覆的驗證流程後所接受^(8, 9)，再持續經由國際相關專家召開會議充分討論及進行方法調和⁽¹¹⁾。OECD 於 2010 年首次發佈相關指引，爾後再歷經 2 次的修正後，於 2019 年發佈最新修正之版本^(22, 23)。

目前 OECD 439 指引建議可使用 6 種仿生人類皮膚組織衍生之商品化套組進行皮膚刺激性試驗，包括 EpiSkin™、EpiDerm™ SIT (EPI-200)、SkinEthic™ RHE、LabCyte EPIMODEL24 SIT、epiCS® 及 Skin+®⁽²³⁾。我國工業技術研究院 (簡稱工研院) 也以華人的皮膚組織開發了相關商品化套組 - EPiTRI®⁽¹⁵⁾，目前已在申請成為 OECD 指引接受的試驗方法階段中。不同商品化套組為根據不同國家及企業公司所生產，每項產品其生產所使用的材料、環境條件及後續適用試驗方法

雖有所差異，但一般原則皆是使用正常的人類捐贈皮膚角質形成細胞，利用特殊環境條件且單層方式進行培養增殖，再暴露於氣-液交面 (air-liquid interface) 至少 14 天後，角質形成細胞可分化成具有相似人類皮膚表皮的 3 維組織，其分層由外至內可包括角質層 (stratum corneum)、顆粒層 (stratum granulosum)、棘狀層 (stratum spinosum) 及基底層 (stratum basale)。分化後之 3 維組織會轉移到具備營養物質的瓊脂平板，並裝載於供商品化運送及試驗測試的組織套模 (tissue insert) 中⁽²⁵⁾。使

用 3 維組織相較單純以皮膚角質形成細胞進行測試可明顯增進其驗證能力^(14, 30)。

以我國工研院研發的 EPiTRI[®] 為例，其測試皮膚刺激性流程 (圖一)，主要為將受測物質施用於套模中的 3 維皮膚組織上，過程中應盡量確保物質均勻地覆蓋於組織。液狀或半固體狀物質可直接施用；固體物質會建議先以少量純水潤溼組織表面，再將固體物質磨粉後投予。暴露 30 分鐘後以無菌磷酸鹽緩衝生理鹽水沖洗組織上殘留受測物質，再將套模轉移至培養孔盤中培養約 42 小時。培養後取出組織



圖一、以 EPiTRI[®] 體外試驗方式測試皮膚刺激性流程。

Fig. 1. Flow chart which illustrates the *in vitro* EPiTRI[®] skin irritation testing procedure.

以 MTT 方式進行細胞存活率測試。當細胞存活率 $\leq 50\%$ 可視為物質具刺激性 (Category 2)；存活率 $> 50\%$ 可視為物質不具刺激性分類 (No category)。每次測試時應並行陰性對照組與陽性對照組，包括對照組及受測試驗物質組皆至少使用三重複進行測試，使用對照組原因為確認該次試驗使用套組是否具基本屏障功能和對應刺激物質之敏感性。當物質分類結果明確時，三重複的單次運行已足夠，而在分類不一致或平均存活率為 $50 \pm 5\%$ 時，需要進行第二次測試，第一次與第二次運行結果不一致時，則再進行第三次測試^(11, 15, 23)。

三、人體 4 小時貼膚試驗

執行此研究須遵守相關國際人體試驗道德指導共同原則，如赫爾辛基宣言 (Declaration of Helsinki) 或者不同國家之人體試驗的規範，尤其化妝品或其他外用藥物等化學品有直接塗抹於人體皮膚之功能需求時，較有可能執行化學品對於人體自願性皮膚刺激試驗，一般又稱為人體 4 小時貼膚試驗 (The 4 hour patch test, HPT)。因為道德問題，大多數國家目前已不執行如 HPT 的人體暴露非治療用藥的自願性試驗^(4, 24)，尤其以農藥而言，進行相關急性毒性試驗之目的，在於提供產品危害標示及建議操作者應具備的職業防護裝備之參考，多數國家法規現行只要求動物試驗故執行人體自願試驗的報告較少，但由於

HPT 仍為過去對於化學品建議之試驗之一，其結果可供後續了解白兔體內試驗及仿生人類皮膚組織體外試驗結果之驗證能力⁽⁵⁾，以下簡述 HPT 之執行方式。

HPT 試驗將受測物質先添加於塑型槽 (plain hill top chamber) 容器中，再置放於至少 30 位之受測人體皮膚上並緩慢釋放，過程中會以漸進式分階段給予，倘若每階段暴露後沒有明顯症狀再逐漸拉長時間，其不同階段包括 15、30 分鐘，1、2、3 及最終至 4 小時時間，每階段會暴露於不同皮膚區域，如果在不同階段中經測試人員判定已達到明顯刺激症狀則會直接結束試驗，過程中會依續皮膚的反應嚴重程度給予評分^(24, 32)。

在印度曾針對 30 個農民以該地區最常使用的 10 種農藥成品進行 HPT 測試，結果有 26.7% 人呈現陽性反應，雖然該研究無法鑑別成品中的有效成分或其他添加物質為引起陽性反應之原因，但評估主要引起反應的農藥成分包括蓋普丹 (captan) 及毆蟎多 (propargite)⁽²⁸⁾，其中毆蟎多原體在白兔試驗亦呈現刺激性⁽⁷⁾。

皮膚刺激性評估之體內及體外試驗特性差異及驗證結果

以下就皮膚刺激性評估之體內及體外試驗所需之資源成本、試驗時間長短、GHS 分類結果適用性、與人類暴露相關性之驗證能力及其他因素進行探討，比較結果整理 (表一)。

首先以 OECD TG 404 執行的白兔皮膚刺激性試驗而言，每次試驗須使用 1 至 3 隻白兔，並需要有符合現行實驗動物照護及使用委員會 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 所要求標準之飼育設備及具充分教育訓練之專職飼育及試驗人員。試驗期間含動物適應、投藥及觀察時間達 2~3 週。試驗結果可將物質分類成 GHS 腐蝕及刺激性等級之 Category 1-3 及無分類，但試驗的評分係經由觀察人員主觀評分，即使同樣的症狀可能依據不同實驗室的經驗及主觀判定而給予不同等級的評分結果，另外假設試驗物對於皮

膚有高度染色性的話亦可能影響人員之判讀⁽²¹⁾。

而參考 OECD TG 439 執行 RhE 之試驗在過程中不須使用任何活體動物，執行單位只需具備有符合生物安全標準之細胞試驗操作設備及經過訓練之專職人員。試驗期間含樣品接收到完成測試時間約為 4 天。其限制點在於試驗物本身同為 MTT 還原劑時，則可能影響吸光值而造成判讀結果改變。而須特別強調的是此試驗只可將物質分類成 GHS 刺激性等級之 Category 2 及無分類結果，如果需要評估物質之腐蝕性則需要再以 OECD TG 431 等其他指

表一、皮膚刺激性評估之體內及體外試驗特性差異

Table 1. Differences between *in vivo* and *in vitro* skin-irritation tests

Characteristics	<i>in vivo</i> (OECD TG: 404)	<i>in vitro</i> (OECD TG: 439)
Applicability	wide range of chemicals (substance and mixtures)	substance mainly
Predictive capacity	high sensitivity but low specificity	high correlation and full validated for single substance but limit information for mixtures
Strengths	<ol style="list-style-type: none"> officially validated test method reversibility of effects can be observed classification of the full categories of irritation and corrosion 	<ol style="list-style-type: none"> officially validated test method without animal use several equivalent models available shorter test period lower resource requirements without subjective grading and the result can be quantitative
Weaknesses and limitations	<ol style="list-style-type: none"> need to use animals, which may potentially cause pain or distress to the animals due to the inflammatory reactions subjective grading of skin responses dyes and other coloured chemicals may impair the scoring of effects 	<ol style="list-style-type: none"> chemicals that act directly on the MTT may interfere the results can not classify chemicals to the optional GHS category 3 (mild irritants) can not provide adequate information on skin corrosion (GHS category. 1)

Information extracted from OECD⁽²¹⁾

引進行試驗，並且以目前 OECD 所發佈之體外試驗指引皆無法將物質分類成 Category 3⁽²¹⁻²³⁾。因此於 OECD TG 439 指引首段即特別強調，對於不同國家之化學品監管組織而言，可能因應其化學品分類要求，該指引適用方式不一定皆能完全替代傳統實驗動物體內試驗，而可能只得作為綜合評估策略中的階段性評估部分，在有需要確定的分級下，後續仍可能需要進行實驗動物體內試驗⁽²³⁾。

根據目前研究顯示，以白兔進行皮膚刺激試驗比較實際人類 HPT 試驗的結果，動物試驗的敏感性雖高，但特異性較低⁽¹²⁾，過去針對 25 種同時具備 HPT 試驗、白兔體內試驗及仿生人類體外試驗結果之化合物，比較其驗證能力，結果在 16 種於白兔體內試驗結果為陽性化合物中，只有 5 種於 HPT 試驗為陽性，以動物試驗預測人體結果準確率為 56%；而使用包括 EpiSkin™、EpiDerm™ 等 RhE 模組預測人體結果準確率約為 70-76%⁽¹²⁾，雖然以此看來 RhE 模組的驗證能力有達到一定程度，但目前執行 RhE 試驗之適用性仍以單一物質為主，針對多種化合物組成的混合物其預測能力的資料仍有限⁽²³⁾。Kolle 等人針對 65 種已具備白兔皮膚刺激性試驗結果之農藥成品，再以 EpiDerm™ 模組進行體外試驗，結果以 RhE 模組預測白兔體內試驗的敏感性為 44%，特異度為 60%，準確率為 54%⁽¹³⁾，顯示以目前開發之 RhE 模組預測混合物之預測能力明顯較單一物質為低。

皮膚刺激性評估之綜合測試系統

IATA 於近年來廣泛為國際毒理評估組織採納使用，它是一種綜整多種試驗及數據結果的風險評估方式，IATA 依據現有資料並依證據權重 (weight of evidence) 原則給予加權及整合，並提供必要時應再執行新試驗已獲得關鍵數據的判定基準，最終結果可供監管單位進行評估及決策使用。在進行化學品的風險評估時，理想情形是能夠獲得充分人體暴露的所有背景資料，但實際上大部分化合物可能只具有動物、體外或電腦模擬試驗的數據，使用非動物試驗替代動物試驗的主要爭議點在於是否具足夠的人體危害預測能力，包括準確性及再現性。利用 IATA 方式可透過同時結合不同的非動物試驗而增加預測能力並減少非必要動物試驗的使用⁽²⁰⁾。

根據最新公佈之 OECD TG 404 指引，在執行白兔的皮膚刺激性試驗前，為兼顧科學性與動物福利，應先使用 IATA 方式評估現有的資訊及試驗結果⁽²³⁾，如有需要才得進行動物試驗。使用 IATA 對於化學品之皮膚刺激性評估目的在於分類及標示 (classification and labeling, C&L)，過程包括 3 大部分，評估步驟詳見 OECD 出版之以 IATA 評估皮膚刺激性指引 13 頁⁽²¹⁾。第 1 部分為利用現有資料庫或文獻等方式搜集是否具數據資料，並依權重高低分成模組 (Module) 1：現存的人類資料，

包括非制式試驗的危害資料如醫院臨床病例報告等及制式試驗如 HPT 試驗；Module 2：根據 OECD 指引執行的動物體內試驗資料；Module 3：根據 OECD 指引執行的體外皮膚腐蝕性試驗資料；Module 4：根據 OECD 指引執行的體外皮膚刺激性試驗資料；Module 5：非根據 OECD 指引執行的體內或體外相關試驗資料；Module 6：理化性質如酸鹼值等資料，如果已知化學物為強酸或強鹼，就不用繼續搜集其他模組資料而直接判定物質具腐蝕性；Module 7：非一般試驗方式（如電腦模擬之定量構效關係方法 (Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR) 或交叉比對 (read-across) 之結果)。第 2 部分為針對第 1 部分的試驗資料進行證據權重分析。如果針對現行所搜集到資料已可充分供評估物質之分類結果則可直接進行危害標示；如果仍無法明確判定則進行第 3 部分再視情形執行其他試驗。第 3 部分為先根據現有資料評估物質為具刺激／腐蝕性或無刺激性之潛在性，針對具潛在刺激／腐蝕性會以由上至下 (Top-down) 方式，建議依序執行體外皮膚腐蝕及刺激性試驗；針對無刺激潛在性則以由下至上 (Bottom-up) 方式，建議依序執行體外皮膚刺激及腐蝕性試驗。最後才依據不同國家法規之化學品分類需求而可能再執行實驗動物體內試驗⁽²¹⁾。以 IATA 評估而言，由於在前期已針對具明確刺激或腐蝕性化學品可直接進行分類標示，一般到最後還無法釐清分類結果而仍需要進行動物試驗

者多為具輕微或無刺激性物質，故即使無法減少動物使用，但可減少動物試驗過程之痛苦，仍符合 3R 原則之精緻化精神。

結論

對於農藥於皮膚刺激性之評估，以白兔進行試驗是我國及國際現行最廣泛可接受的適用方式。但針對實驗動物動物福利議題，自 1959 年英國科學家 Russell, W. M. S 開始提出「替代 (Replacement)、減量 (Reduction) 及精緻化 (Refinement)」的「3R」觀念後⁽¹⁾，至今已成為全球執行動物實驗科學界的基礎精神及研究方向，目前國際持續在研發及推廣可取代活體動物使用的替代性試驗。美國環保署 (United States Environmental Protection Agency, US EPA) 已於 2019 年宣告將於 2035 年前修正法規以移除現行農藥等化學品需進行哺乳動物試驗的法規項目，未來哺乳動物試驗之執行不再是標準要件而是視個案決定是否須要提交⁽²⁷⁾，有如皮膚刺激性於 IATA 之評估方式，動物試驗為最終在現有證據皆無法作為風險決策的判定依據時才需要執行⁽²¹⁾。以目前我國農藥管理法規之準則項目要求，仍尚未接受申請廠商繳交如 RhE 方式之皮膚刺激性體外試驗報告⁽³⁾，但如有修訂準則要求需要時，要有充分的科學證據及驗證資料支持，才可提供管理機關在決策及風險評估時所採納。根據目前研究顯示，以 RhE 方式評估皮膚刺激性仍存有包括化學品分類適用性及對

於混合物之預測準確率可能下降等待解決問題，而無法完全替代傳統動物試驗方式，但建議未來可先導入 IATA 之評估概念，並視我國實際情形決定可適用之策略，以作為目前管理決策所參考，除了可增加預測面向之完整性，尚可減少實驗動物之使用或減輕其痛苦，符合目前國際持續追求實驗動物福祉之趨勢。

謝辭

感謝行政院農業委員會補助本研究計畫 109 農科-24.1.2-藥-P2(Z)，謹此致謝。

引用文獻

1. 中華實驗動物學會。2018。產品上市前動物測試替代方法研究報告。行政院農業委員會。臺北。145 頁。
2. 行政院農業委員會。2018。農藥理化性及毒理試驗準則。農防字第 107148885 號令修正發布第 3 條附件二。
3. 衛生福利部。2019。化粧品衛生安全管理法。院臺衛字第 1080011912 號。
4. Basketter, D. A., York, M., McFadden, J. P., and Robinson, M. K. 2004. Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact Dermatitis* 51: 1-4.
5. Basketter, D., Jírova, D., and Kandárová, H. 2012. Review of skin irritation/corrosion hazards on the basis of human data: a regulatory perspective. *Interdiscip. Toxicol.* 5: 98-104.
6. Belsito, D. 2019. Toxic responses of the skin, pp. 953-976. *In: C. D. Klaassen [eds.], Casarett & Doull's toxicology: The basic science of poisons, 9th ed. McGraw-Hill Education. New York, USA. 1639 pp.*
7. British Crop Production Council (BCPC). 2020. The pesticide manual online. Retrieved from <https://www.bcpc.org/> (Mar 20, 2020)
8. European Chemicals Agency (ECHA). 2017. How to use new or revised *in vitro* test methods to address skin corrosion/irritation. Retrieved from https://echa.europa.eu/documents/10162/21650280/oecd_test_guidelines_skin_irritation_en.pdf (Mar 20, 2020)
9. Fentem, J. H., Briggs, D., Chesné, C., Elliott, G. R., Harbell, J. W., Heylings, J. R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J. J. M., and Botham, P. A. 2001. A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the management team. *Toxicol. in Vitro* 15: 57-93.
10. Groeber, F., Schober, L., Schmid, F. F., Traube, A., Kolbus-Hernandez, S., Daton, K., Hoffmann, S., Petersohn, D., Schäfer-Korting, M., Walles, H., and Mewes, K. 2016. Catch-up validation study of an *in vitro* skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase II). *Toxicol. in Vitro* 36: 254-261.

11. Industrial Technology Research Institute. 2016. Protocol of *in vitro* skin irritation testing, version 3.2. Industrial Technology Research Institute, Hsinchu, Taiwan. 35pp.
12. Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M., and Kandárová, H. 2010. Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data. *Contact Dermatitis* 62: 109-116.
13. Kolle, S. N., van Ravenzwaay, B., and Landsiedel, R. 2017. Regulatory accepted but out of domain: *in vitro* skin irritation tests for agrochemical formulations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 89: 125-130.
14. Lee, M., Hwang, J. H., and Lim, K. M. 2017. Alternatives to *in vivo* draize rabbit eye and skin irritation tests with a focus on 3D reconstructed human cornea-like epithelium and epidermis models. *Toxicol. Res.* 33: 191-203.
15. Lin, Y. C., Hsu, H. C., Lin, C. H., Wu, C. Y., Chen, W., and Lai, H. M. 2019. Testing method development and validation for *in vitro* skin irritation testing (SIT) by using reconstructed human epidermis (RhE) skin equivalent - EPiTRI®, pp 8-19. *In: H. Kojima, T. Seidle, H. Spielmann [eds.], Alternatives to animal testing, Proceedings of Asian Congress 2016.* Springer, Singapore. 128pp.
16. McNamee, P., Hibatallah, J., Costabel-Farkas, M., Goebelk, C., Araki, D., Dufour, E., Hewitt, N. J., Jones, P., Kirst, A., Le Varlet, B., Macfarlane, M., Marrec-Fairley, M., Rowland, J., Schellauf, F., and Scheel, J. 2009. A tiered approach to the use of alternatives to animal testing for the safety assessment of cosmetics: eye irritation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 54: 197-209.
17. Mecklenburg, L., Kusewitt, D., Kolly, C., Treumann, S., Adams, E. T., Diegel, K., Yamate, J., Kaufmann, W., Müller, S., Danilenko, D., and Bradley, A. 2013. Proliferative and non-proliferative lesions of the rat and mouse integument. *J. Toxicol. Pathol.* 26 (3 Suppl): 27S-57S.
18. Novak-Bilić, G., Vučić, M., Japundžić, I., Meštrović-Štefekov, J., Stanić-Duktaj, S., and Lugović-Mihić, L. 2018. Irritant and allergic contact dermatitis-skin lesion characteristics. *Acta. Clin. Croat.* 57: 713-720.
19. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2015. Test No. 404: Acute dermal irritation/corrosion, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 13 pp.
20. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2017. Guidance document on the reporting of defined approaches to be used within integrated approaches to testing and assessment, OECD series on testing and assessment, No. 255, OECD, Paris, France. 23 pp.

21. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2017. Guidance document on an integrated approach on testing and assessment (IATA) for skin corrosion and irritation, OECD series on testing and assessment, No. 203, OECD, Paris, France. 64 pp.
22. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2019. Test No. 431: *In vitro* skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method, OECD Guidelines for the testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 26 pp.
23. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2019. Test No. 439: *In vitro* skin irritation: reconstructed human epidermis test method, OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4, OECD, Paris, France. 21 pp.
24. Robinson, M. K., McFadden, J. P., and Basketter, D. A. 2001. Validity and ethics of the human 4-h patch test as an alternative method to assess acute skin irritation potential. *Contact Dermatitis* 45: 1-12.
25. Setijanti, H. B., Rusmawati, E., Fitria, R., Erlina, T., Adriany, R. and Murtiningsih. 2019. Development the technique for the preparation and characterization of reconstructed human epidermis (RHE), pp 20-32. *In: H. Kojima, T. Seidle, H. Spielmann [eds.], Alternatives to animal testing, Proceedings of Asian Congress 2016.* Springer, Singapore. 128pp.
26. Spiewak, R. 2001. Pesticides as a cause of occupational skin diseases in farmers. *Ann. Agric. Environ. Med.* 8: 1-5.
27. United States Environmental Protection Agency (US EPA). 2019. Memo directive to prioritize efforts to reduce animal testing. Retrieved from https://www.epa.gov/sites/production/files/2019-09/documents/image_2019-09-09-231249.pdf (Mar 20, 2020)
28. Verma, G., Sharma, N. L., Shanker, V., Mahajan, V. K., and Tegta, G. R. 2007. Pesticide contact dermatitis in fruit and vegetable farmers of Himachal Pradesh (India). *Contact Dermatitis* 57: 316-320.
29. Vinardell, M. and Mitjans, M. 2008. Alternative methods for eye and skin irritation tests: an overview. *J. Pharm. Sci.* 97: 46-59.
30. Welss, T., Basketter, D. A., and Schröder, K. R. 2004. *In vitro* skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol. in Vitro* 18: 231-243.
31. Winder, C., Azzi, R., and Wagner, D. 2005. The development of the globally harmonized system (GHS) of classification and labelling of hazardous chemicals. *J. Hazard. Mater.* 125: 29-44.
32. York, M., Griffiths, H. A., Whittle, E., and Basketter, D. 1996. Evaluation of a human patch test for the identification and classifi-

cation of skin irritation potential. Contact dermatitis 34: 204-212.

33. Yu, H. S., Lee, C. H., Jee, S. H., Ho, C. K., and Guo, Y. L. 2001. Environmental and occupational skin diseases in Taiwan. J. Dermatol. 28: 628-631.

Assessment of Skin Irritant Study and New Trend of Alternatives to Animal Testing on Pesticides

Chun-Lin Liao^{1*}, Hsiao-Ching Chen¹, Yen-Chun Lo¹, Wei-Jia Wu¹, Wei-Ren Tsai¹

Abstract

Liao, C. L., Chen, H. C., Lo, Y. C., Wu, W. J. and Tsai, W. R. 2020. Assessment of skin irritant study and new trend of alternatives to animal testing on pesticides. Taiwan Pestic. Sci. 8: 1-15.

The skin is one of the most common routes of exposure for farmers when using pesticides. Pesticide exposure may cause contact dermatitis and lead to irritation signs including redness and/or swelling. Therefore, to accurately classify hazards, register new products and assign pesticide labels, the regulatory unit will require test reports of skin irritation for pesticide. The skin irritation test is mainly performed using white rabbits and is in accordance with guidelines by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Currently, around the world, the scientific communities that worldwide of conducting animal experiments all giveare striving to work in better accordance with high attention to the 3R spirit (replacement, reduction and refinement). Researchers, and continue to develop and promote alternative tests that can replacefeature alternatives to the use of live animals. For the assessment of skin irritation, the *in vitro* test currently recommended by the International Center for Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods is “Reconstructed Human Epidermis Test Method (RhE)”. This method uses human skin keratinocytes which can differentiate into three-dimensional tissues with similar human epidermis under specific environmental conditions. In assessing skin irritation, the experimental unit performs an MTT assay (cell viability assay on commercial sets derived from relevant skin tissues. In addition, the international has

Accepted: June 10, 2020.

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

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

emphasized the importance of adopting Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA) approaches in evaluating strategy. IATA approaches involve the use of existing data and employ the weight of evidence (WoE) method to weight and integrate different test results. IATA approaches can also determine whether additional tests are needed to obtain critical data. Regulatory agencies can use the final result to help evaluate and make regulatory decisions about new products. In addition to not requiring the use of live animals and improving animal welfare, *in vitro* tests offer other advantages over *in vivo* tests as well, such as higher efficiency and lower costs. However, the use of *in vitro* testing remains limited due to questions about how accurately non-animal tests predict human hazards. Recent research revealed that barriers to using the RhE method in assessing skin irritation, including reduced accuracy in predicting mixtures and the applicability of chemical classification that cannot completely replace traditional animal testing methods, especially for formulation of pesticide. Therefore, additional research is needed to clarify or amend current regulations. However, it is nonetheless recommended that the IATA evaluation system be introduced as a reference for decision-making to reduce the use of experimental animals and meet the current international trend of continuously improving the welfare of experimental animals.

Key words: pesticide, skin irritation, 3R, Reconstructed Human Epidermis (RhE), Integrated Approach to Testing and Assessment (IATA)