

國際毒理測試趨勢： 體外微核試驗及口服急毒性與皮膚過敏性動物減 量試驗

李彥芸¹ 張敬宜¹ 蔡建任¹ 吳偉嘉^{1*}

摘要

李彥芸、張敬宜、蔡建任、吳偉嘉。2016。國際毒理測試趨勢：體外微核試驗及口服急毒性與皮膚過敏性動物減量試驗。臺灣農藥科學 1: 195-205。

人類藉由實驗動物的使用，促進了現今醫學、生物、農業等科學領域的發展，然實驗動物本身亦是一個生命體，當其犧牲自我貢獻出科學數據的同時，其自身的生命價值亦是值得重視的。因此有了實驗動物之保護與福祉的觀念產生，自 1959 年 Russell 與 Burch 等⁽³⁶⁾ 科學家在其著作中提到 3R 觀念時，即取代 (replacement)、減量 (reduction) 及精緻化 (refinement)，此 3R 理念至今仍是動物實驗的首要圭臬與精神，進而促使國際毒理測試方法不斷更新與精進，以減少實驗動物的使用。歐洲議會更在 2010 年通過新的指令 (Directive 2010/63/EU) 規定，歐盟各國主管機關必須在同意採用動物實驗時，應評估其他研究方式的可能性進行倫理評估，如需採用動物實驗時，應盡量減少動物的痛苦，以加強動物的福祉。這也就是許多國際期刊為使動物試驗精緻化，要求投稿者必須提供實驗動物管理小組 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 核准書、麻醉及手術過程步驟的完整敘述等資料進行審核。而本所也從 2009 年開始陸續規劃與國際接軌的毒理測試趨勢，分別建立基因毒性試驗——體外哺乳動物細胞微核測試 (OECD 487)、動物減量技術口服急毒性——定比劑量致死推定法 (OECD 425 及 USEPA 870.1100) 及皮膚過敏性——小鼠局部淋巴結細胞增殖分析 (OECD 442B) 等 3 種試驗。目前國際間採用這些方法的實驗室已非常多，如美國的 Eurofins/Product Safety Labs 與 Vanta Bioscience、英國的 Harlan Laboratories 及德國的 Vivo Science GmBH 等實驗單位，適用的範圍可包含新藥開發、農藥、化學品、環衛用藥、環境污染物、醫藥品、食品、化妝品及中草藥等物質。因此，本簡報內容主要針對此 3 種測試趨勢方法進行介紹。

關鍵詞：基因毒性、體外微核、動物減量、口服急毒性、皮膚過敏性。

接受日期：2016 年 9 月 8 日

* 通訊作者。Email: wjwu@tactri.gov.tw

¹ 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所

體外微核測試趨勢

經濟合作與發展組織 (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) 於 2010 年增加細胞層次之基因毒性測試指引——OECD 487 體外哺乳動物細胞微核試驗 (*In vitro* mammalian cell micronucleus test)，簡稱體外微核試驗，並繼而在 2014 年 9 月更新，應用於檢測間期細胞內細胞質 (cytoplasm of interphase cells) 的微核 (micronuclei, MN) 發生，此微核可用來評估試驗物對細胞是否有染色體斷裂性 (clastogenicity) 及 (或) 非整倍性 (aneugenicity) 之基因毒性潛力，因微核的形成與試驗物暴露後造成無著絲點染色體斷片 (acentric chromosome fragments) 或細胞分裂後期 (anaphase) 染色體因紡錘體損傷而無法被分配到兩極所致有關。此技術的優勢有 (1) 研究人員可在間期細胞 (interphase cells)，觀察細胞是否有經過分裂階段及有多少細胞含有微核，使得在計數方面相對快速、容易辨識及可自動化，相對於 OECD 473 體外哺乳動物染色體畸變試驗 (*In vitro* mammalian chromosome aberration test)，簡稱體外染色體畸變試驗，只能於中期細胞 (metaphase cells) 計數各染色體結構的變化；(2) 同樣以顯微鏡觀測，本試驗觀測點簡易且快速可計算每個濃度達 2,000 個細胞，與體外染色體畸變試驗觀測點繁瑣且只計算每個濃度 300 個細胞，增加了試驗的精確性；(3) 本試驗可偵測結構性的染色體變異 (structural chromosomal aberrations) 與非整倍性的染色

體變異等兩種變異性，而體外染色體畸變試驗不易偵測非整倍性的染色體變異^(33, 34)。然而體外細胞微核試驗也有其缺點，包含微核的產生需透過細胞分裂方式及試驗的過程若添加細胞鬆弛素 B (cytochalasin B, cytoB)，可能會干擾其他胞質分裂抑制劑 (inhibitors of cytokinesis) 及非整倍誘發劑 (aneugens) 之作用或因 cytoB 本身的毒性使部分細胞株產生變化 (如複製率降低等)。因此，在 2012 年已有報告指出，不建議使用 L5178Y 細胞時添加 cytoB，顯示會造成細胞毒性而使細胞複製率降低，故在選用試驗體系時需多方考量後再行之^(12, 14)。

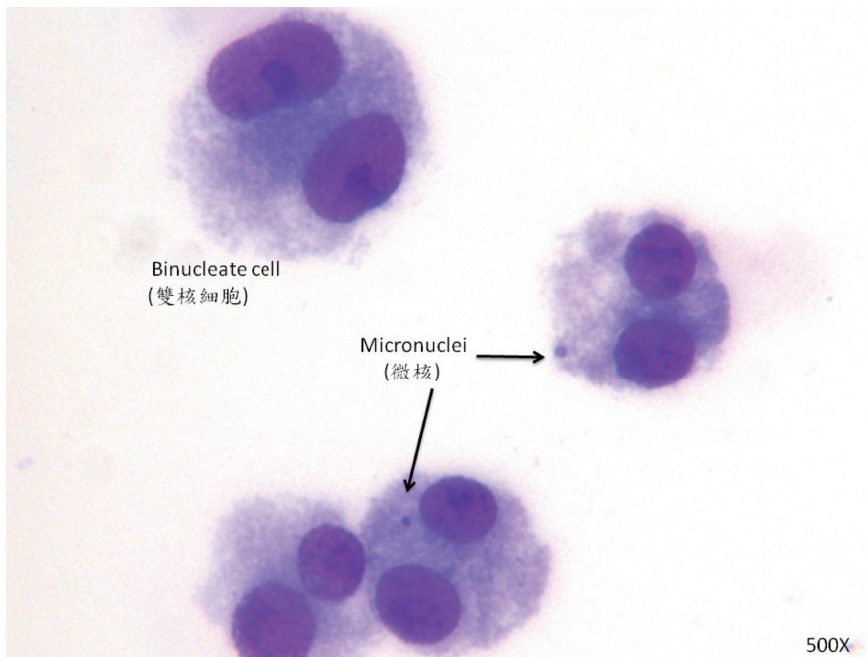
目前體外微核試驗的分析技術方法種類多，包含可添加細胞鬆弛素 B (cytochalasin B, cytoB) 之胞質分裂阻斷微核法 (cytokinesis-block micronucleus assay, CBMN) (圖一)、不添加 cytoB 之細胞微核法、著絲點免疫化學標定法 (immunochemical labelling of kinetochores)、著絲粒/端粒探針雜合法 [hybridization with centromeric/telomeric, 如運用螢光原位雜合技術 (fluorescence in situ hybridization, FISH)]、微盤 (microwell) 分析法或流式細胞儀 (flow cytometry) 等 6 種分析法^(1, 9, 19)。截至目前於國家生技資訊中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 搜尋體外微核試驗之相關文獻已超過兩千多篇以上，應用的範圍涵蓋很廣，如農藥、人體健康評估、醫藥、化學品、奈米物質、煙草、食品、化妝品、重金屬及中草藥等。許多國家及國際組織已完成體外微核試驗相關驗證並將之納入

管理規範內，如歐洲替代方案確效中心之科學諮詢會議 (ECVAM Scientific Advisory Committee, ESAC)、國際醫藥法規協和會議 (International Conference on Harmonization, ICH)、美國的替代方案確效跨部會協調委員會 (Interagency Coordination Committee on the Validation of Alternative Methods, ICSVAM)、醫療器材生物性評估之國際標準 ISO-10993 (2013 年草案)、奈米材料風險評估 (ISO/TR 13121)、英國致突變委員會 (Committee on Mutagenicity, COM)、煙草科學研究中心 (Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco, CORESTA) 及歐洲食品安全局 (European Food Safety Au-

thority, EFSA) 等^(3, 4, 5, 10, 11, 13, 15)。而國際上使用此試驗的測試實驗室有美國的 Eurofins/Product Safety Labs 與 BioReliance by SAFC、英國的 Covance Laboratories 與 Harlan Laboratories、Cyprotex 及德國的 GenPharm Tox Bio Tech AG 等實驗單位。

口服急毒性測試趨勢

當動物實驗為無法避免且無法轉由其他方法 (如細胞實驗) 取代時，減少實驗動物使用的數量便是首要考量，藉由動物減量改善實驗設計，同時又能兼顧實驗數據的準確性，便是國際毒理測試發展追尋



圖一、胞質分裂阻斷微核法。

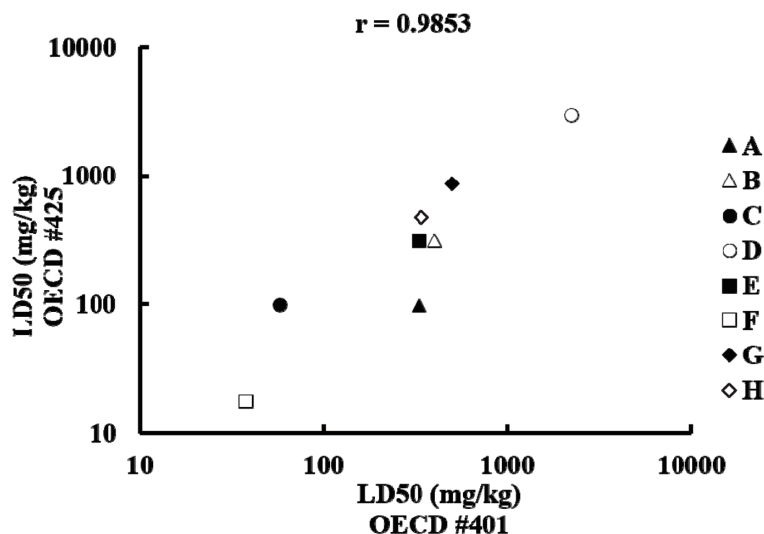
Fig. 1. Cytokinesis-block micronucleus assay.

目標之一。一般化學品進行口服急毒性試驗是毒理安全資料之首要必備項目，已往試驗主要是依循 OECD 401⁽²⁰⁾ 與美國環保署 (United States Environmental Protection Agency, USEPA) OPPTS 870.1100 (1998 版)⁽³⁷⁾ 試驗指引，需使用數量較多之動物，以至少高、中、低三個劑量組各投予雌雄各 5 隻動物，最後估算試驗物導致動物半數致死劑量 (median lethal dose, LD₅₀)。為達到動物減量之目的，OECD 基於動物福祉的考量，分別於 1992、1996 及 1998 年陸續發表編號 420 固定劑量致毒性推定法 (Fixed Dose Procedure)、423 固定劑量致死推定法 (Acute Toxic Class Method) 及 425 定比劑量致死推定法 (Up-and-Down Procedure, UDP) 等試驗指引^(21, 22, 23)，改採用較少量且單一性別 (一般用雌性) 的實驗動物進行口服急毒性試驗，並持續進行改版，以全面取代舊有的 OECD 401 方法，其中只有 OECD 425 試驗指引可估算 LD₅₀ 值。而 USEPA 亦在 2002 年更新其 OPPTS 870.1100 內容同樣使用此 UDP 方法⁽³⁸⁾，更在更新方法前進行方法驗證與確效研究⁽³⁵⁾，並同時在網站公告一套專屬的電腦化程式軟體 (AOT 425 StatPgm)⁽³⁹⁾，可供免費下載經運算後可計算出 LD₅₀ 值。此 UDP 方法，概念首度由科學家 Dixon 及 Mood 所提出^(7, 8)，在 1985 年時 Bruce⁽²⁾ 發表了利用 up-and-down 方法來進行物質急毒性試驗，經陸續改良下在 1998 年便有了 OECD 425 試驗指引的發行，其主要精神是利用單隻動物對試驗物先行測試後，再依其存活情

況或應等動物完全反應毒性症狀後，再進行下一階段試驗選擇向上調升或向下調降試驗物劑量的試驗，之後歷經 2001、2006 及 2008 年等 3 次之改版更新^(26, 27, 28, 29)，及改版時加入 USEPA 建立之 AOT 425 StatPgm 軟體，使該方法更趨於完備。此 UDP 方法不僅可達到動物減量達 70% 以上 (與 OECD 401 相較)，亦是一個可快速、簡便又可減少人為誤差、增加數據準確性的技術。基於此，本所在 2009 年轉換口服急毒性測試技術方法時，為完善此技術，進行了 OECD 401 與 OECD 425 (UDP) 兩種方法 LD₅₀ 值之驗證與確效實驗，結果由 8 種農藥化學品 (部分為混合劑成品農藥) 測試顯示兩種方法具有高度相關性 (correlation coefficient 達 0.99) (圖二)，顯示利用 UDP 的測試方法，並不會影響到急毒性 LD₅₀ 數據與毒性等級分類，而影響管理的措施。然而使用 UDP 方法對於某些物質並不適用，如試驗的物質會引起延遲性死亡，則須採用口服急毒性其他技術方法如 OECD 420 或 OECD 423 方法^(24, 25)。目前國際上採用 UDP 方法的實驗室很多，如美國的 Stillmeadow Inc.、Eurofins/Product Safety Labs、DuPont Haskell Global Centers、Charles River Laboratories 及英國的 Harlan Laboratories、SafePharm Laboratories 等實驗單位。

皮膚過敏性測試趨勢

皮膚過敏反應常為日常生活當中易忽略低暴露量而產生之風險，如過敏性接觸



圖二、OECD #425 與 OECD #401 二種方法之相關性。

Fig. 2. Correlation between the two OECD methods (OECD #425 & OECD #401). A: Chlorpyrifos 97.3% TC, B: Esbiothrin 96.9% TC, C: Fipronil 95.7% TC, D: Prothiofos 50% EW, E: (Chlorpyrifos + Cypermethrin) 25% EW, F: Ethion 46.8% EW, G: (Chlorfenapyr + Lambda-cyhalothrin) 7.8% EC, H: (Fenitrothion + Cypermethrin) 10% EC.

性皮膚炎 (allergic contact dermatitis, ACD)，主要是經由過敏原在接觸皮膚後引起細胞性免疫反應，利用抗原呈現細胞 (langerhans cells) 將具抗原性之胜肽 (peptides) 呈現給第一型輔助性 T 細胞 (T helper type I cells)，刺激細胞分泌介白素 (interleukin) 及使其增生，進而引發皮膚發炎，所造成的皮膚直接損害及所形成的特異性過敏症狀，即為一種遲發型過敏反應⁽¹⁷⁾。因此，為有效偵測危害人體之過敏原，國際上公認之遲發型過敏反應相關之動物模式主要以天竺鼠加佐劑最大化試驗 (guinea pig maximization test, GPMT)、天竺鼠無佐劑過敏檢測法 (Buehler test)、小鼠耳朵腫脹檢測法 (mouse

ear swelling test, MEST) 及小鼠局部淋巴結細胞增殖分析法 (local lymph node assay, LLNA) 為主。GPMT 與 Buehler test 為早期常用來偵測皮膚過敏反應之動物模式，其主要以天竺鼠為試驗動物，雖為敏感度較高之測試方法，但無法區分反應的強弱，並且技術上較為複雜，試驗期程較長 (4 wk 以上)。近年來為因應國際上動物減量與技術研發之趨勢，本所在皮膚過敏試驗設計上參考國際試驗指引之測試方法，採小鼠局部淋巴結細胞增殖分析技術⁽⁶⁾以取代天竺鼠之動物模式，主要為分析試驗物對耳下淋巴結局部致敏情形，並透過淋巴結細胞增生的程度判斷試驗物之潛在致敏能力，其陽

性判定標準為試驗物與媒介物處理組淋巴結細胞增生數量之比值 (ratio)，亦稱為刺激指數 (stimulation index, SI)。如達特定數值或以上時，即表示該試驗物具有潛在陽性皮膚過敏反應。依目前國際上偵測淋巴結細胞增生結果方式的不同而分為 3 種測試方法 (表一)；(1) 放射線物質標定法，為 LLNA 動物模式初期開發時之測試方法，並於試驗過程中需具備放射性檢測儀器與風險防護等特殊裝備，主要是測量淋巴結增生細胞與放射線物質，如 (^3H)-methyl thymidine 或 ^{125}I -iododeoxyuridine 之結合量，並以細胞中放射線每分鐘衰變率 (disintegrations per minute, DPM) 之比值來表示^(30,40)，其陽性判定標準為 $\text{SI} \geq 3$ ；(2) DA 法 (由 Daicel Chemical Industries, Ltd. 建立，簡稱 DA)，主要是利用冷光試劑套組 (luciferin/luciferase) 偵測增生細胞中 ATP 含量⁽³¹⁾，並以相對冷光單位 (relative luminescence

units, RLU) 之比值來表示，其陽性判定標準為 $\text{SI} \geq 1.8$ ；(3) 溴化去氧尿苷 (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU) 標定法 (OECD 442B)^(16,32)，為目前較被廣泛接受與使用之非放射線物質標定法，且試驗過程較前述 2 種方法簡單。BrdU 為一種胸腺嘧啶的類似物，普遍使用於偵測活體組織中增生的細胞量。在細胞進行分裂的過程中，BrdU 會於細胞生長週期的 S 期被攝入，與正在進行 DNA 合成的細胞核結合，取代原有的胸腺嘧啶，再利用 BrdU 的專一性抗體來辨識已標定 BrdU 的細胞，以達到測量增生細胞之目的，其陽性判定標準為 $\text{SI} \geq 1.6$ 。由於 LLNA 測試方法有測量判讀上較為客觀 (可以量化數值呈現)、試驗期程較短 (約 1 wk 即可得到結果)、減少試驗操作時動物之疼痛與緊迫程度及其使用量 (與 OECD 406 相較動物數量可減少 50% 以上) 等優點，使國際上多家實驗室如美國的 Vanta Bioscience、德國

表一、LLNA 三種淋巴結細胞增生結果之測試方法¹⁾

Table 1. Protocol and results for 3 kinds of cell proliferation tests¹⁾ for LLNA

Feature/Method	Radioactive labelling method (OECD 429)	DA method (OECD 442A)	BrdU labelling method (OECD 442B)
Use of radioactive substances	Yes	No	No
Experimental duration	6 days	8 days	6 days
Results presented	DPM values	RLU values	BrdU labelling indices
Expression of potential skin sensitizer	$\text{SI} \geq 3$	$\text{SI} \geq 1.8$	$\text{SI} \geq 1.6$

¹⁾ DA: Daicel, BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine, DPM: disintegrations per minute, RLU: relative luminescence units, SI: stimulation index.

的 Vivo Science GmbH 與 Bayer HealthCare AG 及英國的 Huntingdon Life Sciences 等採用，此方法目前更被應用於檢測基因改造作物 (genetically modified crops) 之表現蛋白質，分析是否因外來基因之轉殖作用 (transformation)，引發或增強過敏性反應⁽¹⁸⁾。

本所目前已將基因毒理試驗——體外哺乳動物細胞微核測試 (OECD 487) 及動物減量技術口服急毒性——定比劑量致死推定法 (OECD 425 及 USEPA 870.1100) 與皮膚過敏性——小鼠局部淋巴結細胞增殖分析 (OECD 442B) 納入本所優良操作實驗室 (Good Laboratory Practice, GLP) 運作系統，及取得全國認證基金會 (Taiwan Accreditation Foundation, TAF) 認證，不僅可協助業界產品在國內外登記所需的必備毒理資料外，亦可提供相關單位作為安全管理之依據，符合國際毒理測試發展趨勢及落實 3R 的精神，對提升本國毒理測試技術水準及動物保護成效助益良多。

謝辭

感謝本組蔡寶隆博士及羅紹榮先生等分別協助英文修訂及資料收集，謹此致謝。

引用文獻

1. Bryce, S. M., Bemis, J. C., Avlasevich, S. L., and Dertinger, S. D. 2007. *In vitro* micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity. *Mutat. Res.* 630: 71-91.
2. Bruce, R. D. 1985. An up-and-down procedure for acute toxicity testing. *Fundam. Appl. Tox.* 5: 151-157.
3. CDRH. 2013. Use of international standard ISO-10993: biological evaluation of 2 medical devices part 1: evaluation 3 and testing (draft).
4. COM. 2011. Guidance: a strategy for testing of chemicals for genotoxicity. Available at <https://www.gov.uk/government/publications/a-strategy-for-testing-of-chemicals-for-genotoxicity>
5. CORESTA. 2002. Sub-group *in vitro* toxicity testing of tobacco smoke (IVT).
6. Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G., and Stokes, W. S. 2001. ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 34: 258-273.
7. Dixon, W. J., and Mood, A. M. 1948. A method for obtaining and analyzing sensitivity data. *J. Amer. Statist. Assoc.* 43: 109-126.
8. Dixon, W. J. 1965. The up-and-down method for small samples. *J. Amer. Statist. Assoc.* 60: 967-978.
9. Donherty, A. T. 2012. The *in vitro* micronucleus assay, pp. 121-141. *In: J. M. Parry and E. M. Parry [eds.], Genetic toxicology:*

- principles and methods. Springer Science + Business Media, London, UK.
10. ESAC. 2006. ECVAM scientific advisory committee (ESAC) peer review. Retrospective validation of the *in vitro* micronucleus test. Summary and conclusions of the peer review panel. Available at: <http://ecvam,jric.it/index.htm>
 11. EFSA. 2011. Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain.
 12. Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., and Zeiger, E. 2003. HUMAN Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 534: 65-75.
 13. ICH. 2012. S2(R1) genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. U.S. Food and Drug Administration, Silver Spring, MD, USA. 35 pp.
 14. ILSI Health and Environmental Sciences Institute. 2012. Project committee on the relevance and follow-up of positive results in *in vitro* genetic toxicity (IVGT) testing. Improving existing assays workgroup.
 15. ISO/TR 13121:2011. Nanotechnologies -- nanomaterial risk evaluation.
 16. ICCVAM. 2010. Test Method Protocol No. 10-7552: 2-Bromodeoxyuridine-ELISA Test Method (LLNA: BrdU-ELISA).
 17. Joshua, M. B. 2007. Contact Dermatitis, Allergic. Department of Dermatology, Louisiana State University Health Sciences Center School of Medicine.
 18. Ladics, G. S., Fry, J., Goodman, R., Herouet-Guicheney, C., Hoffmann-Sommergruber, K., Madsen, C. B., Penninks, A., Pomés, A., Roggen, E. L., Smit, J., and Wal, J. M. 2014. Allergic sensitization: screening methods. *Clin. Transl. Allergy.* 4: 13.
 19. Nesslany, F., and Marzin, D. 1999. A micro-method for the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis* 14: 403-410.
 20. OECD. 1987. TG 401: acute oral toxicity.
 21. OECD. 1992. TG 420: acute oral toxicity-fixed dose method.
 22. OECD. 1996. TG 423: acute oral toxicity-acute toxic class method.
 23. OECD. 1998. TG 425: acute oral toxicity-up-and-down procedure.
 24. OECD. 2001. TG 420: acute oral toxicity-fixed dose method.
 25. OECD. 2001. TG 423: acute oral toxicity-acute toxic class method.
 26. OECD. 2001. TG 425: acute oral toxicity-up-and-down procedure.
 27. OECD. 2001. Acute oral toxicity statistical programme (AOT 425 StatPgm). Version: 1.0.
 28. OECD. 2006. TG 425: acute oral toxicity-

- up-and-down procedure.
29. OECD. 2008. TG 425: acute oral toxicity-up-and-down procedure.
 30. OECD. 2010. TG 429: skin sensitization: local lymph node assay.
 31. OECD. 2010. TG 442A: skin sensitization: local lymph node assay: DA.
 32. OECD. 2010. TG 442B: skin sensitization: local lymph node assay: BrdU-ELISA.
 33. OECD. 2014. TG 487: *in vitro* mammalian cell micronucleus test.
 34. OECD. 2014. TG 473: *in vitro* mammalian chromosome aberration test.
 35. Rispin, A., Farrar, D., Margosches, E., Gupta, K., Stizel, K., Carr, G., Greene, M., Meyer, W., and McCall, D. 2002. Alternative methods for the LD50 test: the up and down procedure for acute oral toxicity. *ILAR J.* 43: 233-243.
 36. Russell, W. M. S., and Burch, R. L. 1959. *The principles of humane experimental technique.* Methuen, London, UK. 238 pp.
 37. USEPA. 1998. OPPTS 870.1100: acute oral toxicity.
 38. USEPA. 2002. OPPTS 870.1100: acute oral toxicity.
 39. USEPA. 2002. AOT425StatPgm program.
 40. USEPA. 2003. OPPTS 870.2600: skin sensitization.

International Trends in Toxicological Testing on Experimental Animals: *In Vitro* Micronucleus Test, Acute Oral Toxicity Test, and Skin Sensitization Test

Yen-Yun Lee¹, Jin-Yi Chang¹, Wei-Ren Tsai¹, Wei-Jia Wu^{1*}

Abstract

Lee, Y. Y., Chang, J. Y., Tsai, W. R., and Wu, W. J. 2016. International trends in toxicological testing on experimental animals: *in vitro* micronucleus test, acute oral toxicity test, and skin sensitization test. Taiwan Pestic. Sci. 1: 195-205.

Scientific advances in the fields of medicine, biology, and agriculture have only been possible thanks to the use of experimental animals. Although obtaining useful data can sometimes require the sacrifice of experimental animals, humans must remember that these animals are a form of life that deserve respect. As a result, concepts pertaining to the protection and welfare of experimental animals have existed as early as 1959, when Russell and Burch⁽³⁶⁾ proposed the Three Rs (i.e., 3Rs: replacement, reduction, refinement) as guiding principles for the more ethical use of animals in testing. Today, the 3Rs are accepted as standard guidelines to improve the welfare of experimental animals. To meet these guidelines, new techniques and regulations for toxicological testing have been developed. For example, in 2010, the European Union adopted Directive 2010/63/EU to regulate the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Specifically, this directive sought to reduce the pain and suffering of experimental animals, improve animal welfare, and encourage the consideration of alternative testing methods. Furthermore, a copy of the institutional IACUC approval document and complete descriptions of anesthesia and operation procedures are now required to publish an animal testing report. To meet international standards pertaining to animal care and use, in 2009, the Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute (TACTRI) adopted several modern toxicological testing methods, including the *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test (OECD 487), the Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure (OECD 425 and USEPA 870.1100), and the Local Lymph Node Assay for Skin Sensitization (OECD 442B), which are

Accepted: September 8, 2016.

* Corresponding author, Email: wjwu@tactri.gov.tw

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

applicable to the development of new drugs, pesticides, industrial chemicals, environmental contaminants, medicine, food, cosmetics, and Chinese herbs. These tests are comparable to those performed in international laboratories such as Eurofins/Product Safety Labs (USA), Harlan Laboratories (UK), Vanta Bioscience (USA), and Vivo Science GmbH (Germany). The purpose of this report is to briefly introduce these three toxicological testing methods.

Key words: genotoxicity, *in vitro* micronucleus, animal reduction, acute oral toxicity, skin sensitization.