

農藥之皮膚過敏性評估與動物替代新穎策略

廖俊麟^{1*}、羅彥鈞¹、李懿庭¹、蔡建任¹

摘要

廖俊麟、羅彥鈞、李懿庭、蔡建任。2022。農藥之皮膚過敏性評估與動物替代新穎策略。臺灣農藥科學 13 : 79-106。

由於農民在從事農業行為中，可能暴露到農藥進而引起皮膚過敏的可能性，各國的農藥監管機構為保護對相關族群的健康，須要評估農藥產品對於皮膚過敏性的危害分類資訊，以作為制定相關登記產品警告標示及建議之個人防護裝備使用。傳統上評估農藥皮膚過敏性會進行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 (Buchler test, BT) 或小鼠局部淋巴結細胞增殖分析法 (local lymph node assay, LLNA) 等體內試驗，為考量實驗動物福祉等緣由，包括美國或歐盟等國際相關化學品評估機關皆在精進並期望發展能完全取代動物試驗的新穎技術。在眾多農藥毒理學測試的評估指標中，皮膚過敏性為導入健康危害途徑概念 (adverse outcome pathway, AOP) 作為評估策略的代表範例，針對相關因果關聯事件 (key events, KE)，經濟合作暨發展組織 (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) 已分別公開對應評估技術之測試指引，尤其包括化學測試及體外試驗等動物替代技術 (alternative methods)，惟目前相關的替代試驗方法，考量預測能力等因素，建議整合多項替代試驗資訊，使用綜合測試與評估方式 (integrated approach to testing and assessment, IATA) 中的定義方法 (defined approach, DA) 進行評估，以取代動物試驗。雖然目前相關替代試驗仍有對於混合物預測能力有限等疑慮，但以一般單一物質化學品而言，以定義方法等評估策略不僅可有效預測動物試驗結果，甚至與實際人體暴露結果相比，其準確率更高於動物試驗。目前美國、日本等國家農藥主管機關已陸續修訂相關規範而開始接受動物替代試驗，因此透過此文回顧已被國際組織完成驗證的皮膚過敏性動物替代研究技術及新穎評估策略，並建議未來應將相關策略導入國內現行之農藥登記規範，以減少實驗動物之使用，並同時符合管理上對於風險評估的要求。

接受日期：2022年8月8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

關鍵詞：農藥、皮膚過敏性、動物替代技術、健康危害途徑、綜合測試與評估方式、定義方法

緒言

依全球化學品統一分類和標籤制度 (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS) 定義，皮膚致敏物 (skin sensitizer) 為與皮膚接觸後會引起過敏反應的單一物質或混合物^(11, 63)，在 GHS 分類中，傳統上會根據動物試驗或人體暴露研究所得到的證據分成皮膚致敏物質 (GHS category 1) 或無法分類的非致敏物質 (no category)，而 category 1 又可因應過敏性效力 (potency) 證據的強弱分為 1A 及 1B 等子類別 (subcategory)⁽⁶³⁾。部分農藥成品由於有效成份 (active ingredients, AI) 或佐劑等其他成分的影響而對人體具潛在皮膚過敏性，根據早期對於我國 122 位果農調查統計，30% 以上農民曾有過手部及臉部發生過敏性皮膚炎經驗⁽²⁸⁾，雖然農民普遍瞭解須依農藥成品標示規定，穿著適合的個人防護設備 (personal protective equipment, PPE)，但過去對於臺灣果樹農民施用農藥狀況及認知調查結果顯示⁽⁶⁹⁾，受限於臺灣炎熱潮濕的氣候，農民可能在未穿著適合 PPE 下，從事農藥的噴灑或者其他暴露到農藥行為，進而導致皮膚過敏反應發生，除造成皮膚潮紅、水腫、伴有丘疹及搔癢等急性症狀外，長期可能

還出現增厚、色素沉著等慢性炎症反應^(11, 30, 39, 59, 63)。另外研究顯示部分農藥並同時具備潛在光毒性，在長時間陽光照射下會提高對於皮膚細胞傷害程度⁽⁷⁰⁾，此機制亦與農民行為模式相關連，並可能加劇了相關過敏反應。因此包括我國農藥管理法理化毒理試驗準則或者其他先進國家普遍對於農藥申請規定，針對新有效成分或申請新劑性成品，考量農民或相關農藥產品生產工廠的操作人員安全，要求繳交皮膚過敏性試驗，以利於評估其過敏性危害辨識 (hazard identification) 分級依據，並作為相關登記產品外觀警告標示及建議對應之防護裝備使用^(3, 20, 24)。

過去評估農藥皮膚過敏性以動物體內試驗 (*in vivo*) 為主，最常使用天竺鼠加佐劑最大化試驗 (guinea pig maximization test, GPMT) 或天竺鼠無佐劑過敏檢測法 (Buehler test) 等動物試驗^(3, 50)，而自小鼠局部淋巴結細胞增殖分析法 (local lymph node assay, LLNA) 開發後，國際普遍鼓勵優先使用 LLNA 方式評估皮膚過敏性^(7, 24, 26, 33)，目前為止國際已發展了包括放射線標定、其他以三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 量化或溴化去氧尿苷 (bromodeoxyuridine, BrdU) 標定的非放射線等 LLNA 試驗規範^(40, 41, 46)，相較傳統使用天竺鼠方式，使用 LLNA 方式具有判讀上較為客觀、試驗期程較短、減少試驗

操作時動物之疼痛與緊迫程度及減少動物使用量等優點^(5, 20, 26, 33)，但仍需使用動物並可能造成動物不適。國際相關農藥等化學品評估或法規管理機關皆投入大量資源在精進取代 (replacement)、減量 (reduction) 及精緻化 (refinement) 的「3R」相關研究，期望發展能完全取代動物試驗的毒理技術 (alternative methods)^(1, 31, 62, 65)。本文將針對農藥等化學品於皮膚過敏性評估上，介紹如何導入健康危害途徑 (adverse outcome pathway, AOP) 概念到國際已推廣的新穎動物替代性試驗研究，比較不同試驗方式的特點及應用性，尤其針對如何整合相關試驗結果，以綜合測試與評估方式 (integrated approach to testing and assessment, IATA) 中的定義方法 (defined approach, DA) 進行評估，並作為判定危害分級的評估策略進行說明，以期促使國人對於農藥等化學品之皮膚過敏性的動物替代新穎技術評估有更深入之瞭解，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。

導入健康危害途徑評估策略 (AOP) 釐清皮膚過敏性機制

以評估化學品引起動物體危害影響而言，AOP 作為評估策略，可供於描述從化學物質特性對於體內分子或蛋白交互作用、細胞反應、器官反應到個體反應等不同層次，自分子起始事件 (molecular

initiating events, MIE) 探討到最終導致不利健康毒理學影響結果 (adverse outcome, AO) 中間的一系列因果關聯事件 (key events, KE)，AOP 是目前國際瞭解毒理學知識框架的核心要素，可作為支持基於機制 (mode of action, MOA) 推理的化學風險評估方式^(23, 45)。一般化學品引起的皮膚過敏又可稱為過敏型接觸性皮膚炎 (allergic contact dermatitis, ACD)，ACD 是一種延遲性 (T 細胞媒介) 的過敏反應⁽¹¹⁾，在哺乳動物體引起的作用機制 (圖一)，依序包括^(30, 34, 36, 42)：

關鍵事件一、蛋白質結合作用 (KE 1/MIE, protein-binding reactions)：ACD 起源於化學半抗原 (chemical hapten) 先穿透過皮膚表皮層及脂質屏障，並與皮膚載體蛋白產生共價鍵結合的作用。

關鍵事件二、角質形成細胞反應 (KE 2, keratinocyte activation responses)：半抗原與載體蛋白結合後，會激活皮膚表皮角質形成細胞中的炎症反應途徑，包括誘導釋放促炎症細胞因子如介白素-18 (IL-18) 和腫瘤壞死因子 (TNF- α) 等，另外也會導致細胞保護反應發生，主要透過抗氧化／親電子反應的誘導元素 (ARE/EpRE) 表現之依賴途徑進行。

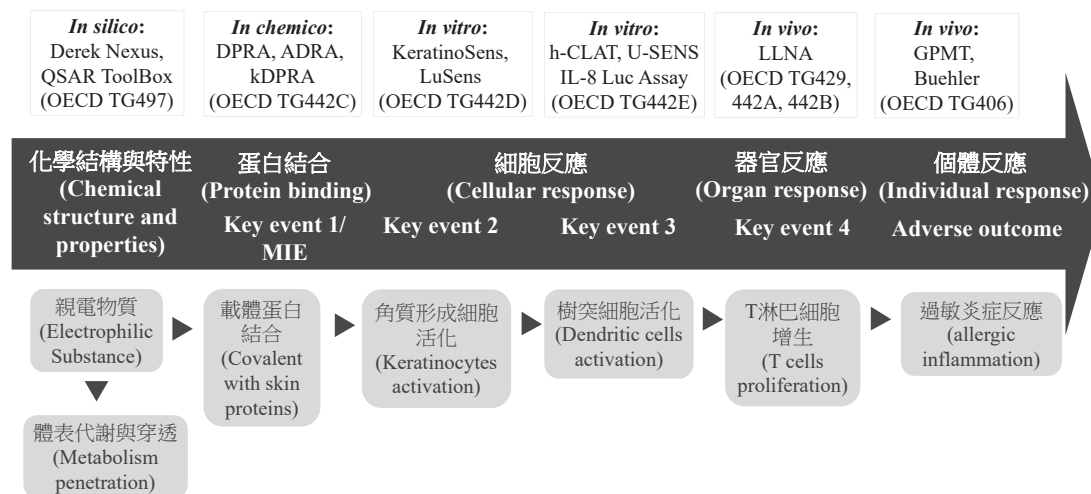
關鍵事件三、樹突細胞反應 (KE 3, dendritic activation responses)：皮膚表皮層以及真皮層的樹突細胞在識別半抗原後，會作為抗原呈現細胞 (antigen presenting cell, APC)，可將抗原及載體蛋白藉由第二型主要組織相容性複合體

(major histocompatibility complex class II, MHC II) 呈現，再透過淋巴／血液循環到周圍淋巴結，促進後續淋巴細胞反應，樹突細胞在受到致敏物刺激後，會導致細胞表面標誌物 (cell surface markers) 的表現，以及增加細胞激素 (cytokine)、趨化因子 (chemokine) 分泌和趨化因子受體的功能性變化。

關鍵事件四、淋巴細胞增生反應 (KE 4, lymphocyte proliferation responses)：周圍淋巴結中的輔助 T 細胞 (T helper cell) 在接受到 MHC II 呈現的半抗原－蛋白複合體後，會促進其他 T 淋巴細胞激活成記憶 T 細胞 (T memory cell) 並開始增生，並記憶半抗原相關結構及化學訊息，倘若再次暴露於特定抗原並被識別後，相關系

統會分泌大量調節免疫反應的 cytokine、chemokine 及其他炎症相關因子，最後引起一連串 ACD 症狀。

經濟合作暨發展組織 (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) 已針對上述皮膚過敏性一系列因果關聯事件分別公開對應評估技術之測試指引 (40, 41, 46, 47, 48, 49, 50, 51)，除了 KE 4 到最後產生炎症等不良反應結果為使用小鼠及天竺鼠等動物試驗進行評估外，針對 KE1 到 KE3 為使用化學測試 (*in chemico*) 或細胞的體外試驗 (*in vitro*) 等非動物試驗，目前相關試驗皆已受到國際動物試驗替代方法參考實驗室完成驗證，均能提供客觀的皮膚過敏性評估結果，惟大部分替代試驗僅可提供過敏性



圖一、皮膚過敏性之健康危害途徑以及相關驗證方法 (36, 43, 44)

Fig. 1. Adverse outcome pathway (AOP) of skin sensitization and alternative testing methods that can be used at various stages of the pathway (36, 43, 44)

危害分級包括 GHS category 1 或 no category 的分類 (表一)，除此之外電腦模擬方式 (*in silico*) 亦是目前國際普遍採納並可作為證據權重 (weight of evidence, WoE) 判定依據的方法之一。為 (1) 有效確認測試物質過敏性的危害分級、(2) 提高對人體預測準確性及 (3) 對於不同理化性質化學品適用性 (application domain) 等考量，目前相關動物替代的試驗方法均不建議單獨使用以完全取代動物試驗，而是利用 IATA 或者 DA 等策略，可能同時使用多種方式並結合其他與試驗化學物結構資料及相關已知之毒理學數據，才可有效作為最後判定其分級的依據，並達到監管機關對於化學品風險評估及管理策略的需求^(18, 43, 49)，以下針對 KE1 到 KE3 對應之非動物試驗進行試驗原理及應用性做進一步介紹。

表一、經濟合作暨發展組織接受皮膚過敏性評估之方法危害分級差異^(23, 46, 47, 48, 50, 51)

Table 1. Hazard classifications determined by OECD-approved skin-sensitization testing methods^(23, 46, 47, 48, 50, 51)

AOP key event	Test guideline	Latest updated	Test method	GHS hazard classification
Key Event 1	TG 442C	2022	DPRA ADRA kDPRA	Category 1 or No Category Category 1A or No Category/ Category 1B
Key Event 2	TG 442D	2022	Keratinosens TM LuSens	Category 1 or No Category
Key Event 3	TG 442E	2022	U-SENS TM LuSens IL-8 Luc assay	Category 1 or No Category
Key Event 4	TG 429	2010	LLNA (radioactive)	Category 1 A or Category 1 B or No Category
	TG 442A	2010	LLNA: DA (non-radioactive)	
	TG 442B	2018	LLNA: BrdU-ELISA (non-radioactive)	
Adverse Outcome	TG 406	2022	GPMT Buehler	Category 1 A or Category 1 B or No Category
Defined Approach	TG 497	2021	2 out of 3 ITSv1/ ITSv2	Category 1 or No Category Category 1 A or Category 1 B or No Category
	GD 256	2016	STS	Category 1 A or Category 1 B or No Category

針對蛋白質共價結合的化學測試

為評估皮膚過敏性 MIE/KE 1 機制的半抗原與組織蛋白結合反應，須瞭解半抗原是否屬於親電物質 (electrophilic chemical)，並評估與皮膚蛋白中親核分子作用位點的共價結合能力，可作為識別與皮膚過敏性的相關物質化學結構的方法⁽⁴²⁾。依據 OECD 公開之「描述 AOP 事件中與蛋白質共價結合 (Assays addressing the adverse outcome pathway key event on covalent binding to proteins)」的 TG 442C 測試指引，目前已接受方式包括 (1) 直接胜肽反應試驗 (direct peptide reactivity assay, DPRA)、(2) 氨基酸衍生物反應試驗 (amino acid derivative reactivity assay, ADRA) 及 (3) 動力學直接胜肽反應試驗 (kinetic direct peptide reactivity assay, kDPRA)⁽⁵¹⁾。

DPRA 已被歐洲動物替代方法確效中心 (EU Reference Laboratory for alternatives to animal testing, ECVAM) 進行確效能力驗證，其方式主要透過將測試物質與含有半胱氨酸 (cysteine) 和離氨酸 (lysine) 的人工胜肽混合，反應 24 小時後再以高效能液相層析法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析樣品，並在 220 nm 光譜處進行檢測，如果檢測到胜肽消耗減少，顯示測試物質可與皮膚蛋白結合反應，因此具有皮膚過敏潛在可能

性；ADRA 已被日本動物替代方法確效中心 (The Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM) 進行確效能力驗證，其方式為將測試物質與半胱氨酸衍生物 (N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine, NAC) 及離氨酸衍生物 (α -N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine, NAL) 的試劑混合，同樣反應 24 小時後再通過 HPLC 分析樣品的胜肽消耗情形，差異處在於 ADRA 在 281 nm 光譜處進行檢測，並且 ADRA 相較 DPRA 可適用於較難溶的物質；kDPRA 已被美國體外試驗科學研究院 (Institute For In Vitro Sciences, IIVS) 等機關完成同業協調驗證，並為 OECD 所接受的最新化學測試方式，其概念類似於 DPRA，但差異處在於導入藥物動力學 (pharmacokinetics, PK) 概念，判定結果會考慮時間和濃度依賴性的變化關係，相較 DPRA 僅在單一濃度並於特定時間點進行檢測，而 kDPRA 須測量 5 個濃度和 6 個時間點的反應，並以螢光比例輸出 (fluorescence readout) 計算出反應的動力學速率常數和最大值的對數 ($\log K_{max}$) 以作為後續判定的結果^(23, 51, 54)。

DPRA 與 ADRA 的適用性一般只在單一物質，並且只能進行皮膚過敏性 GHS category 1 或 no category 的分類，而 kDPRA 針對已知個別成分組成的混合物亦可以進行評估，並且可以在已知 GHS category 1 類別中再進行 1A 子類別的分類，因此具有能力辨識出較嚴重的過敏物質⁽⁵¹⁾。DPRA、ADRA 及 kDPRA 等方式

由於在試驗過程中普遍未考慮皮膚的代謝因素，因此針對需要以細胞色素 P450 才能代謝活化 (metabolic activation) 的致敏物包括原半抗原 (pro-hapten) 或者須經氧化反應 (oxidation) 的前半抗原 (pre-hapten) 比如苯胺 (aniline) 不在適用性範圍 (17, 55)。另外由於目前相關蛋白質共價結合的化學測試只針對 lysine 及 / 或 cysteine，雖然這兩種蛋白質已涵蓋了絕大多數致敏物與皮膚蛋白結合的情境模式，但對於少數只與特定蛋白如組胺酸 (histidine) 結合的致敏物則可能產生偽陰性結果 (57)，另外由於 kDPRA 只使用 cysteine 進行反應，因此對於只與 lysine 反應的化學物質如醛類 (aldehyde) 則不在其適用性範圍內 (51, 54)。DPRA 較不適用致敏金屬物質於人體的反應機制，比如對於最常見的鎳 (nickel) 則可能無法辨識出其潛在過敏活性 (15)。

過去 Lee 等人針對 10 種農藥有效成份，包括免賴得 (benomyl) 等 6 種潛在致敏農藥以及固殺草 (glufosinate-ammonium) 等 4 種非致敏農藥，進行 DPRA 測試，並與相關農藥過去已知 LLNA 或 GMPT 等體內試驗結果比較，結果預測率 (accuracy) 達 100%，10 種農藥有效成分皆被正確預測 (35)。

評估角質形成細胞活化的體外試驗

為評估皮膚過敏性 KE 2 機制的角質

形成細胞對於致敏物反應，主要使用螢光偵測器 (luminescence detector) 來測量化學物質與細胞中 ARE/EpRE 依賴途徑的基因表現能力 (42)，依據 OECD 公開之「描述皮膚過敏之 AOP 事件中角質形成細胞活化反應的體外試驗 (*In vitro* skin sensitisation assays addressing the AOP key event on keratinocyte activation)」的 TG 442D 化學測試指引，目前已接受方式包括 (1) The ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSens™ 螢光酶試驗 (以下簡稱：KeratinoSens™) 及 (2) The ARE-Nrf2 luciferase LuSens 螢光酶試驗 (以下簡稱：LuSens) (48)。

KeratinoSens™ 與 LuSens 皆已被 ECVAM 進行確效能力驗證，首先 KeratinoSens™ 使用與抗氧化反應相關之人類 AKR1C2 基因上游 ARE-Nrf2 冷光酶報導系統穩定轉染 (stable transfection) 之人源角質形成細胞株 (human keratinocyte cell line, HaCaT)，此基因已知會在致敏物刺激下提升表現，因此可用於辨別皮膚過敏性化學品，本方式主要透過將細胞株與溶於適當介質的測試物質共培養 48 小時後，測試其螢光酶提升活性，一般原則為計算其綜合最高提升倍數 (overall maximal fold induction, I_{max})，倘若 I_{max} 相較對照組達 1.5 倍以上，並且另經細胞存活試驗 (MTT assay) 確認在達到該倍數的最低濃度細胞存活率仍大於 70% 前提下，則可判定具過敏性；LuSens 同樣使用經由 ARE-Nrf2 螢光酶轉染的 HaCaT 細胞株，差異在於使用大鼠源的 NQO1 基因轉

染，該基因同樣在致敏物刺激下會提升表現，其他試驗流程及判讀基準皆與 KeratinoSens™ 類似^(22, 48, 58)。

目前 KeratinoSens™ 與 LuSens 皆只能進行皮膚過敏性 GHS category 1 或 no category 的分類，無法辨別 GHS category 1A 或 1B 的子分類，且目前其適用性皆在單一物質，對於混合物驗證能力目前相關證據仍有限，主要適用於可溶於介質或在介質中形成穩定分散體的化學品⁽²³⁾，針對辛醇-水分配係數 (Log Kow) 大於 7 的物質因普遍難溶於介質，一般不建議以此方式測試，除非已確認能達到足夠溶解濃度，對於難溶物質倘若測試後為陽性結果仍可判定具過敏性，但為陰性結果則可能判定為不確定，而需要再進行其他試驗加以確認⁽⁴⁸⁾；2 項體外試驗對於需要代謝活化或氧化反應才能引起致敏的原/前半抗原，考量細胞有限的代謝能力，亦可能產生偽陰性結果⁽³⁸⁾；壓力化學物質 (chemical stressors) 如咪唑烷基脲 (imidazolidinyl urea) 可能因具有嚴重潛在刺激性，進而引起垂死細胞發出訊號而可能產生偽陽性結果^(20, 27)，另外已知會干擾螢光酶的化學品可能會混淆細胞檢測螢光酶的活性，因此也不適用於相關試驗⁽⁴⁸⁾。

過去 Settivari 等人針對 8 種農藥有效成分，包括三氯比 (triclopyr) 等 3 種潛在致敏農藥，以及滅芬諾 (methoxyfenozide) 等 5 種非致敏農藥的有效成分及衍生成品，皆以 KeratinoSens™ 方式進行測試，並與相關農藥過去已知 LLNA 或 GMPT 等

體內試驗結果比較，結果有效成分的預測率 (accuracy) 達 100%，8 種農藥有效成分的致敏潛力皆被正確預測。針對成品考量成分組成複雜，因此難以控制在統一濃度進行試驗，因此該研究設計兩種試驗方式，方式 1 為將劑量選擇只基於有效成分的分子量及濃度，忽略相關佐劑成分，該方式可符合 KeratinoSens™ 方法指引針對單一物質的試驗流程，但會導致較高的成品佐劑劑量，鑑於特定佐劑可能具有潛在細胞毒性，故高濃度劑量可能產生非特異性壓力反應以致對成品農藥的錯誤預測；方式 2 為將劑量選擇基於整體成品，將整個成品視為單一物質而不考慮個別成分組成及濃度，此方法可將濃度控制於指引建議劑量範圍內進行測試，並預期可降低高劑量佐劑濃度產生非特異性壓力疑慮。結果顯示方式 1 正確預測 4 項致敏成品中的 2 項以及非致敏成品 4 項中的 3 項，其分類錯誤原因評估為使用過高濃度劑量；而方式 2 正確預測 3 項致敏成品以及所有 4 項非致敏成品，因此方式 2 應為更好的預測策略⁽⁵⁸⁾。

評估樹突細胞活化的體外試驗

為評估皮膚過敏性 KE 3 機制的樹突細胞反應，會針對細胞在暴露致敏物後細胞表面標誌物 (例如 CD54、CD86) 或者分泌 cytokine 如介白素-8 (IL-8) 的表現進行量化⁽⁴²⁾，依據 OECD 公開之「描述皮膚過敏之 AOP 事件中樹突細胞活化反應

的體外試驗 (*In vitro* skin sensitisation assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitisation)」的 TG 442E 化學測試指引，目前主要包括 (1) 人類細胞株激活測試 (human cell line activation test, h-CLAT)、(2) U937 細胞株激活測試 (U937 cell line activation test, U-SENS™) 及 (3) IL-8 報導基因分析 (interleukin-8 reporter gene assay, IL-8 Luc Assay) 等方式⁽⁴⁷⁾。

h-CLAT 及 U-SENS™ 皆已被 ECVAM 進行確效能力驗證，而 IL-8 Luc Assay 則已被 JaCVAM 進行確效能力驗證。h-CLAT 使用人類單核白血病細胞株 (human monocytic leukaemia cell line, THP-1)，該細胞可模擬樹突細胞在致敏物刺激下反應，細胞經培養後先進行劑量分析試驗 (dose finding assay) 以確認測試物質對 THP-1 細胞存活率影響，再以流式細胞儀 (flow cytometer) 測定出細胞存活率達 75% (75% cell viability, CV75) 的化學濃度，並以此濃度作為基準計算後續反應試驗中試驗物質需使用的濃度。反應試驗先將測定物質添加於細胞後共培養 24 小時，並以螢光標記之抗體進行染色，後續再計算細胞存活率及 CD54/CD86 等標誌物表現分析。U-SENS™ 使用人類組織細胞性淋巴瘤細胞株 (human histiocytic lymphoma cell line, U937)，其方法為將細胞暴露測試物 45 小時後，以異硫氰酸螢光標記的抗體 (fluorescein isothiocyanate

labelled antibodies, FITC) 進行螢光標記染色，再檢測 CD86 表現變化，在過程中同 h-CLAT 亦須進行細胞存活率測定，最後計算 CD86 在亞細胞毒性 (sub-cytotoxic) 濃度下與對照組相比的刺激指數 (stimulation index, S. I.) 作為結果判定依據；IL-8 Luc Assay 使用 THP-1 細胞衍生的 IL-8 報導細胞株 (THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8)，相較 h-CLAT 及 U-SENS™ 皆為檢測細胞表面標誌物表現，IL-8 Luc Assay 為將細胞暴露測試物 16 小時後，檢測 IL-8 及 3-磷酸甘油醛脫氫酶 (GAPDH) 等啟動子之螢光酶活性變化作為結果判定依據^(47, 56)。

目前 h-CLAT、U-SENS™ 或 IL-8 Luc Assay 等 3 項體外試驗皆只能進行皮膚過敏性 GHS category 1 或 no category 的分類，無法辨別 GHS category 1A 或 1B 的子分類⁽²³⁾，且目前其適用性類似於評估角質形成細胞活化的體外試驗，皆在單一物質，對於混合物驗證能力相關證據同樣有限；3 項體外試驗對於需要代謝活化或氧化反應才能引起致敏的原/前半抗原比如異丁香酚 (isoeugenol) 或松香酸 (abietic acid)，考量細胞有限的代謝能力，亦可能產生偽陰性結果^(16, 25)；h-CLAT 對於 Log Kow 大於 3.5 的物質可能產生偽陰性結果，因此陰性結果會判定為無法確定，但如果為陽性結果仍可以採用⁽⁶¹⁾；干擾螢光酶的化學品可能會混淆細胞檢測螢光酶的活性，因此也不適用於 3 項體外試驗⁽¹⁶⁾；高細胞毒性的物質會影響結果的判

定，因此通常也不在適用性範圍內；IL-8 Luc Assay 對於界面活性劑可能產生偽陽性結果，而對於酸酐 (anhydrides) 類物質可能產生偽陰性結果^(9, 47)。

綜合測試與評估方式 (IATA) 及定義方法 (DA)

IATA 可同時整合多種包括理化特性、電腦模擬、化學測試、體外試驗、體內試驗或人體暴露資料等結果，依據現有資料再以 WoE 原則給予加權及整合相關數據，最後可作為危害辨識及危害特徵描述方法，相較使用單一試驗而言，IATA 運用方式更加靈活，可解決單一試驗常出現的適用性問題，並且在動物替代技術研究中為最常推廣之策略之一^(43, 44)。過去 OECD 已針對皮膚過敏性評估提供了 IATA 的測試原則指南，但針對實際應用於評估策略上，如何歸納不同試驗資料及決定相關證據的權重需要依賴具經驗專家的主觀判定，並且化學品種類繁多且依據不同申請用途會牽涉到不同主管機關，配合不同情境狀況及管理模式較難進行評估標準化，因此又以 IATA 為基礎原則發展出了 DA⁽⁴⁴⁾。OECD 於 2021 年首次公開了「皮膚過敏性評估之定義方法 (Guideline on defined approaches for skin sensitisation)」的 TG 497 化學測試指引⁽⁴⁹⁾，雖然過去已有眾多皮膚過敏性評估的 DA 被建立並收錄於早期 OECD 公開的 IATA 評估指南中⁽⁴⁴⁾，但 TG 497 為 OECD

針對化學品皮膚過敏性或甚至在眾多毒理評估技術中所公開的第一個 DA 測試指引，對於動物替代技術推動上為一關鍵的里程碑。該 DA 使用相較單純且規則化 (rule based) 的數據判讀程序 (data interpretation procedure, DIP) 等明確定義資訊以獲得關鍵數據，並提供標準化的決策步驟及危害分級量化基準，與過去的 IATA 方式相比，在 DA 中不同試驗結果的權重是固定且明確的，因此不會有主觀判定標準不一的疑慮，透過使用 DA 可以促使執行單位完成化學品過敏性危害辨識的預測，並符合監管單位對於風險管理的需求^(34, 49)。

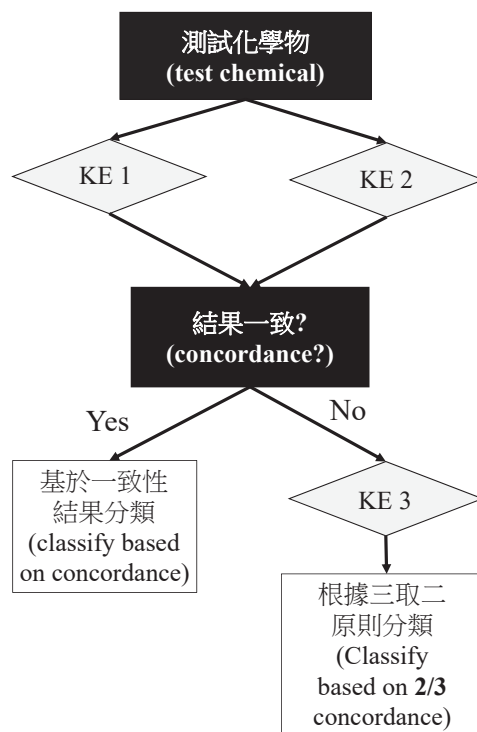
目前 TG 497 建議 DA 包括三取二 ("2 out of 3", 2o3) 以及綜合測試策略 (integrated testing strategy, ITS) 等 2 種方式，除上述方式外，過去常被國際組織採納的還包括 KE 3/1 順序檢定策略 (KE 3/1 sequential testing strategy, STS)，針對上述 3 項 DA 策略，雖然在目前已公開指引／指南主要建議應用 KE 1-3 最早接受的試驗，包括 DPRA、KeratinoSens™ 及 h-CLAT，但對於後續相同編號 OECD 更新指引所增列其他的替代技術，執行單位亦都可以視情形進行替換，以下針對 3 種皮膚過敏性評估的動物替代 DA 進行個別簡介、應用能力比較及驗證能力說明^(12, 49)：

2o3 方式由巴斯夫公司 (BASF) 開發，該方式囊括皮膚過敏性 AOP 的 KE 1-3 所對應之 3 項動物替代技術，其判定原則 (圖二)，一般會先針對 KE 1-2 進行測

試，如果兩項測試具一致結果，且其結果明確，數據並沒有落在模稜兩可的邊緣區間 (borderline range)，則可針對該物質分類為 category 1 (皆陽性) 或 no category (皆陰性)；如果兩項測試結果不一致，則針對 KE 3 再進行測試，總體會基於 KE 1-3 中兩個一致結果進行分類 (18, 34, 44, 49)。

ITS 方式由花王公司 (Kao) 開發，又根據使用電腦模擬工具不同而分成 ITSv1 及 ITSv2，相關方式囊括皮膚過敏性 AOP 的 KE 1/3 所對應之 2 項動物替代技術，並再增加 1 項電腦模擬試驗，為 Derek Nexus (ITSv1) 或 OECD QSAR Toolbox (ITSv2)。過去已有眾多電腦模擬工具可用於探討農藥等化合物皮膚過敏性，相較其它替代試驗比如體外試驗及化學測試，電腦模擬試驗具有較低執行成本及低耗時等優勢，並可以同時預測多種化學物質 (14)，相關電腦模擬工具皆為基於知識庫之專業軟體，藉由人工智慧與大數據分析學習能力，瞭解化學結構與毒性反應關係，可提供快速辨識多種毒性反應終點能力，其操作一般為輸入繪製化學結構圖、簡化分子線性輸入規範 (simplified molecular input line entry specification, SMILES) 或提供可用的國際純化學和應用化學聯合會命名 (international union of pure and applied chemistry chemical nomenclature, IUPAC) 等資訊後，並設定運算相關所需基本參數即可運行，考量即使相同化學物仍可能有立體化學結構 (stereochemical) 的差異或不同的鹽類型態，因此評估關鍵

在於提供精準的結構資訊以及相關測試物質是否於電腦模擬工具數據庫的適用性範圍內。以對於皮膚過敏性而言，Derek Nexus 會以基於結構特徵提出警訊 (structural alerts)，尤其針對半抗原對皮膚蛋白質直接或經代謝／氧化後產生親電性結合的潛在風險；OECD QSAR Toolbox 同樣針對測試物質的化學結構進行蛋白質結合警訊分析，如在該化學物的來源物質或其衍生的代謝／氧化物質出現警訊，將



圖二、皮膚過敏性評估定義方法：三取二方法 (43, 49)

Fig. 2. Defined approach for skin sensitization assessment: The 2 out of 3 method (43, 49)

檢索其同功異構物 (analogue) 的皮膚過敏性數據，若未發現蛋白質結合警訊，則以該結構檢索其他的同功異構物資料，若仍無合適資訊，最終使用交叉參照 (read across) 方式填補數據缺口 (18, 21, 32, 49)。ITS 分析的個別試驗給分標準 (表二)，最後再加總 3 項試驗並根據指引針對不同情境下危害分級的評分基準作為 DA 預測依據，相關判定流程及原則 (圖三)，會因應於適用性範圍內的試驗種類分成不同情

境，理想狀況是 3 項試驗都在化學品適用性範圍內，並同時獲得明確的結果以供最後分類，但實際操作上考慮到化學品不一定皆能符合每項試驗適用性的要求，或者在試驗過程中無法產生有效結果數據，目前 ITS 至少要求有 2 項可用的試驗數據，才能得出分類的結論，相較 2o3 策略只能針對皮膚過敏性進行 category 1 的危害辨識分類，ITS 由於提供了量化的結果，只要滿足給分達到一定基準的條件，還可

表二、定義方法中綜合測試策略之替代試驗給分依據 (49)

Table 2. Scoring criteria for alternative test methods implemented in an integrated testing strategy (ITS) using the defined approach (DA) (49)

Score	h-CLAT MIT $\mu\text{g}/\text{mL}$ ¹⁾	DPRA mean Cysteine and Lysine% depletion ²⁾	DPRA Cysteine % depletion ³⁾	In silico (ITSv1: Derek nexus; ITSv2: OECD ToolBox) ⁴⁾
3	≤ 10	≥ 42.47	≥ 98.24	
2	> 10	≥ 22.62	≥ 23.09	
	≤ 150	< 42.47	< 98.24	
1	> 150	≥ 6.38	≥ 13.89	Positive
	≤ 5000	< 22.62	< 23.09	
0	not calculated	< 6.38	< 13.89	Negative

¹⁾ h-CLAT 試驗會依據陽性結果引起的最低誘導閾值濃度 (minimal induction threshold, MIT) 程度由高到低給予 1~3 分，陰性而無法估計則為 0 分

For h-CLAT, the cutoffs of minimum induction threshold (MIT) based on the positive result is converted to a score from 1 to 3, and a score of 0 for a negative result that cannot be estimated

²⁾ DPRA 試驗會依據反應層級閾值，將 cysteine 和 lysine 的平均消耗率由低到高給予 0-3 分

For DPRA, the mean percent depletion for the cysteine and lysine peptides is converted to a score from 0 to 3 based on the threshold values associated with reactivity classes

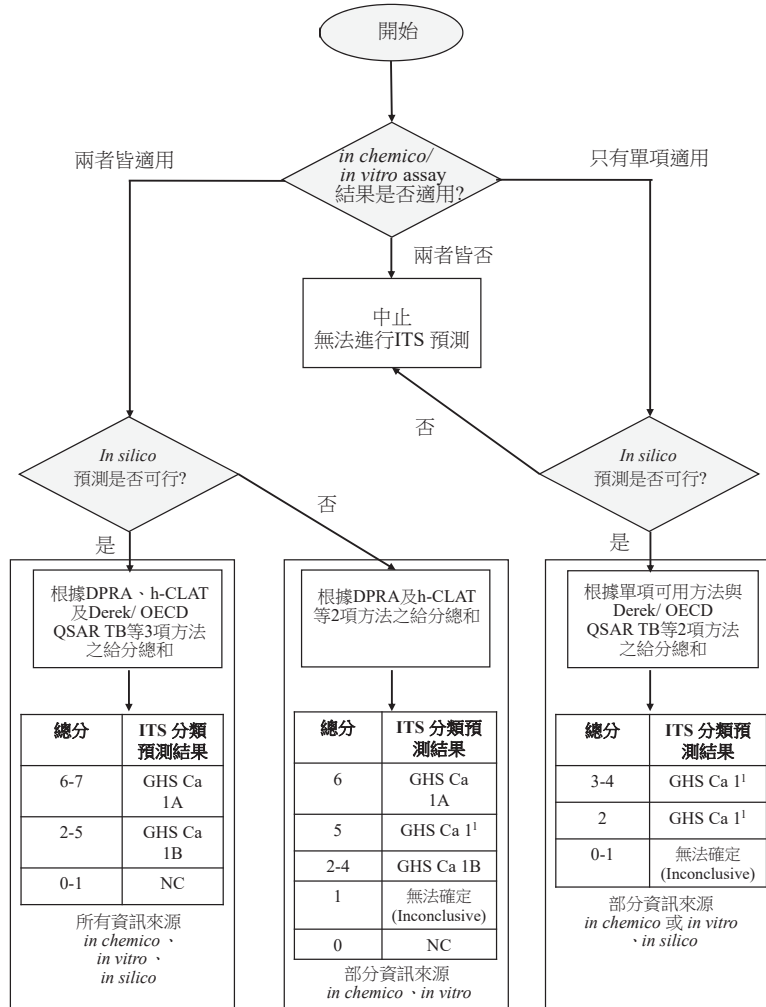
³⁾ 若 DPRA 試驗中的 lysine 發生共析 (co-elution) 現象，在只採用 cysteine 數據時，則依 cysteine 殘基消耗比例由低到高給予 0-3 分

In cases where co-elution occurs only with the lysine peptide, the depletion for only cysteine peptides is converted to a score from 0 to 3

⁴⁾ 電腦模擬試驗的給分會依據陽性或陰性給予 1 分或 0 分

For the *in silico* prediction, a positive outcome is assigned a score of 1; a negative outcome is assigned a score of 0

以進行 category 1A 或 category 1B 的過敏效力分類，以 3 項試驗皆在適用性範圍而言，當綜合評分 (combine score) 達到 6-7 分會分類成 category 1A；2-5 會分類成 category 1B；0-1 分則分類為 no category (25, 44, 49)。



¹ GHS Ca 1 可確認是否為過敏性物質，但無法確認過敏性效力之子分類，補充GHS皮膚過敏性危害分類資訊如下：

- GHS Ca 1: category 1 (Skin sensitizer)
 - GHS Ca 1A: Sub-category 1A (High potency skin sensitizer)
 - GHS Ca 1B: Sub-category 1B (Low potency skin sensitizer)
- NC: no category (Non-skin sensitizer)

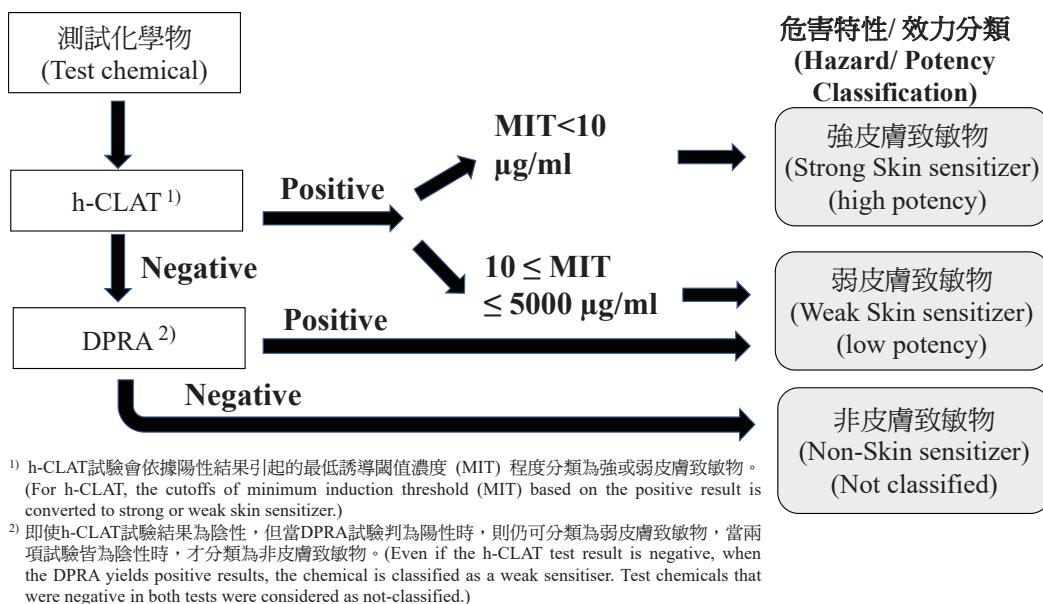
圖三、定義方法中綜合測試策略之危害分級判定流程 (49)

Fig. 3. Flow chart illustrating hazard classification using an integrated testing strategy (ITS) and defined approach (DA) (49)

STS 方式同樣由花王公司開發，作為已收錄於 OECD GD 256 接受的 DA 方式之一，它是一個簡易的決策樹模式 (decision tree)，判定原則 (圖四)，該方式囊括皮膚過敏性 AOP 的 KE 3 及 KE 1 所對應之動物替代技術，首先進行 KE3 的檢測，如果 h-CLAT 反應為陽性，則測試物質即可直接被分類為 category 1，並視陽性結果引起的 MIT 高低而可以再分類成強致敏物或弱致敏物，如果 KE3 檢測結果為陰性，則再進行 KE1 檢測，並視 KE1 陽性或陰性結果將該物質分類為弱致敏物或 no category^(44, 49)。

有關探討 OECD TG 497 接受 2 項 DA 之驗證危害分類能力，OECD 已彙整 196

種化學物已知過敏性評估結果，包含 LLNA 小鼠試驗或人體貼膚試驗 (human patch test, HPT) 等數據，其中有 168 種經 LLNA 分類，66 種經 HPT 分類，結果顯示 2o3 或 ITS 等 DA 單純在分類是否為致敏物的危害辨識上 (分辨 category 1 或 no category)，以 DA 預測 LLNA 結果的均衡準確率 (balanced accuracy, BA) 為 80-84%，敏感性 (sensitivities, Sens) 為 82-93%，特異性 (specificities, Spec) 為 67-85%，由於 ITS 還可供分辨過敏性的 potency 分類 (分辨 category 1A or 1B)，預測 potency 的準確率為 67-74%；相關 DA 預測 HPT 的 BA 為 69-88%，Sens 為 89-94%，Spec 為 44-88%，由於人體數據



圖四、皮膚過敏性評估定義方法：KE 3/1 順序檢定策略^(34, 44)。

Fig. 4. Defined approach for skin sensitization assessment: The KE 3/1 sequential testing strategy^(34, 44)

中的陰性參考化學物較少，故特异性數值低於敏感性。另外該文獻亦回顧以 LLNA 比較 HPT 的預測能力而言，LLNA 的 BA 只有 58%，Sens 為 94%，Spec 為 22%，顯示以 DA 預測到人體實際結果準確力更高於動物試驗。有關探討 STS 之 DA 之預測準確力驗證，OECD 已彙整 139 種化學物已知 LLNA 小鼠試驗過敏性評估結果，結果 STS 預測 LLNA 的準確率為 81%，Sens 為 90%，Spec 為 54%^(30, 44, 49)，顯示亦同樣可有效作為動物試驗替代的工具之一。

依據相關農藥產品的登記規範，一個有效成分可能衍生多種不同劑型或有效成分含量濃度的成品，對於每種新劑型成品皆須個別評估其皮膚過敏性，因此倘若相關動物替代技術可適用於評估成品等混合物，對於動物減量的效益會遠高於只適用原體等單一成分，但依據過去以 DA 預測皮膚過敏性相關驗證能力的探討研究，大多以單一化學物為主，而非混合物。有鑑於以動物替代技術評估農藥成品皮膚過敏性的資料較為缺乏，為探討以替代試驗及 DA 預測農藥成品於皮膚過敏性的適用性，Strickland 等人以回顧性研究 (retrospective) 探討畢克草 (clopyralid) 等 27 個農藥成品過去進行 DPRA、KeratinoSens™、h-CLAT 及 OECD QSAR Toolbox 等替代試驗測試結果，再以 2o3、STS 及 ITSv2 等 3 項最常使用 DA 進行皮膚敏感性預測，並與相關成品之 LLNA、GPMT 或 Buehler test 等動物試驗結果比

較，瞭解其驗證能力，結果在扣除部份判定為無法確定或邊緣區間的數據結果後，在相關 DA 中預測危害分類的 BA 為 56-78%，並以 2o3 最高，而另外以獨立試驗方法的 BA 則以 KeratinoSens™ 最高並達到 81%；但以 STS 及 ITSv2 等 DA 預測過敏性效力分類的正確性比例只有 43-52%⁽⁶⁰⁾。另外過去 Masinja 等人選定亞滅培 (acetamiprid) 等 10 種農藥有效成分，包括 4 種具過敏性農藥有效成分，6 種不具過敏性農藥有效成分，同樣根據 OECD 指引進行 DPRA 等替代試驗測試，再以 ITS、2o3 及 STS 等 3 項最常使用 DA 進行皮膚敏感性預測。另外針對 10 種有效成分衍生成品包括 6 項具過敏性農藥成品，4 項不具過敏性農藥成品，同樣進行替代試驗測試並以 2o3 的 DA 進行皮膚敏感性預測，預測結果最後與相關農藥過去已知動物體內試驗結果比較。以有效成分而言，10 種農藥皆在 ITS 評估的適用性範圍，而 2o3 及 STS 分別有 8 種及 7 種農藥在適用性範圍內，其他農藥則因測試數據未符合指引要求條件，最後結果判為無法確定而無法採用。以 ITS 預測動物試驗的結果共有 5 種農藥正確分類，4 種農藥偽陽性分類，1 種農藥偽陰性分類；以 2o3 預測動物試驗的結果共有 4 種農藥正確分類，4 種農藥偽陽性分類；以 STS 預測動物試驗的結果共有 4 種農藥正確分類，3 種農藥偽陽性分類，相關結果顯示，在有效成分的預測中以 ITS 的 DA 適用性範圍最廣，可知採用電腦模擬工具能對結果提

供額外的信賴度。另外以農藥成品而言，首先在 DPRA 測試中，10 項成品中只有 2 項產生可用數據，其他 8 項成品有 6 項因溶解度問題而無法進行測試，另 2 項雖可進行測試，但由於測試中顯示出明顯對肽消耗測定的干擾情形，因此結果無法採用；在 KeratinoSens™ 測試中，10 項成品中只有 4 項成品產生可用數據；在 h-CLAT 測試中，10 項成品中皆產生可用數據，最後綜合以 DA 進行預測，10 項成品只有 3 項成品因同時具有 3 項試驗結果或 2 項一致試驗結果而可適用於一般 2o3 預測方式，其中包括 2 項成品正確分類及 1 項成品偽陽性分類⁽³⁷⁾。

依據上述搜集資料結果顯示，考量農藥的種類或衍生的劑型繁多，目前相關動物替代技術對於農藥有效成分或成品預測的資料仍相當有限，而以相關已公開皮膚過敏性的 DA 策略中，大多 DA 普遍具有辨識出潛在具皮膚過敏性農藥有效成分或成品之能力，但目前 DA 在預測過敏性效力分類的的能力較差，但考量過去文獻相關數據為比對動物試驗而非實際人體結果，根據過去已知相關動物與人類生理及機制差異性，因此目前仍須要持續累積更多資料才可能有進一步推論。在相關的 DA 中對於成品預測能力雖然以 2o3 預測能力最高，但這是只納入在結果符合適用性範圍數據前提下，評估過程中考量替代試驗於化學品的適用性可能有多項數據會判定為無法確定，另外以獨立試驗方法探討而言，則以 KeratinoSens™ 預測到動物的準

確率最高，其他 h-CLAT 及 OECD QSAR Toolbox 等方法的 Sens 雖然更高，但 Spec 皆較低，顯示有過度敏感的可能性，以 h-CLAT 而言，推測與農藥成品因常使用界面活性劑等其他成分並可能含有脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 等天然物質有關，主要因應 LPS 會引起 h-CLAT 試驗中 CD86 和 CD54 等細胞標誌物過度刺激而可能提高偽陽性的疑慮^(37, 60)。

國際農藥等化學品登記主管組織對於皮膚過敏性評估接受試驗及推動策略

美國的農藥登記須符合美國環保署 (U.S. Environmental Protection Agency, USEPA) 之農藥註冊辦公室 (Office of Pesticide Programs, OPP) 評估原則及相關規範⁽⁶⁶⁾，OPP 於 2007 年起逐步開發農藥毒性評估相關替代技術，以減少或替代農藥登記所需的動物試驗測試，USEPA 於 2016 年修訂毒性物質管理法 (Toxic Substances Control Act, TSCA)，承諾將亟力推展於化學品測試中，合理地替代與減少脊椎動物的使用，並於 2018 年公告「臨時科學政策及公開評估指南：使用皮膚過敏性替代方法取代實驗動物試驗 (Interim science policy: Use of alternative approaches for skin sensitization as a replacement for laboratory animal testing)」，該評估指南還包括美國替代方法驗證機構間協調委員會 (Interagency Coordinating

Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) 與美國國家毒物計畫團隊 (National Toxicology Program, NTP) 等單位共同擬定，強調將導入 AOP 概念，除接受動物試驗外，並開始接受當時 OECD 已公告相關皮膚過敏性評估替代技術及策略，針對農藥產品之原體，申請廠商可提交 2o3 及 STS 等 DA 之評估報告，但對於成品尚未接受，表示仍需要執行進一步研究及累積搜集更多數據⁽⁶⁴⁾。

依據歐盟 (European Commission, EC) 及歐洲食品安全局 (European Food Safety Authority, EFSA) 針對農藥等植物保護產品管理法規，在最後於 2013 年公開版本，針對皮膚過敏性評估仍只載明應提交動物試驗數據，尚未說明是否接受動物替代試驗^(19, 24, 29)，並建議先執行 LLNA 試驗，除非提出其他說明緣由才得執行 GPMT 或 Buehler 等天竺鼠試驗⁽²⁴⁾。歐洲化學品管理局 (European Chemicals Agency, ECHA) 於 2016 年起通過修訂歐盟化學品註冊、評估、授權及禁限用法案 (Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals, REACH)，針對個別化學品之皮膚過敏性評估已接受申請者繳交依據 OECD 已公開的動物替代試驗及 DA 指引等產出報告，並且強調必須從化學測試或體外試驗開始，除非執行單位已確認物質皆不在相關替代試驗的適用性範圍內，或無法利用替代試驗分辨出危害等級的詳細分類等符合監管機構管理的要求，後續才得進行動物試驗^(10, 23)。

依據日本農林水產省消費安全技術中心 (Food and Agricultural Materials Inspection Center, FAMIC)⁽²⁾ 及韓國農林畜產食品部 (Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, MAFRA) 公告農藥產品登記最新申請要件⁽⁶⁾，兩國皆於 2019 年起修訂法規，除接受動物試驗外，針對皮膚過敏性評估，已接受 OECD 公開之動物替代試驗及 2o3 及 STS 等 DA 之評估報告，但只限於原體等個別農藥有效成分。

加拿大衛生部轄下害物管制局 (Pest Management Regulatory Agency, PMRA) 管理該國農藥產品登記規範，於 2012 年起發布了農藥綜合測試專家小組的報告，重點為將新興動物替代技術整合到農藥安全評估中，針對皮膚過敏性評估目前已接受申請者提交 OECD 所接受之動物替代試驗指引產出報告^(12, 52, 53)；根據目前搜集到澳洲農藥及動物用藥管理局 (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, APVMA) 農藥產品申請登記資料顯示，強調為考量動物福祉，建議申請者繳交相關毒理試驗報告應依據 OECD 指引中推薦的最少動物數量進行，並鼓勵申請者依據 OECD 已接受符合 3R 原則的動物替代試驗方法提交相關數據⁽⁸⁾。

結論

由於人體對於一般化學品的皮膚過敏性致病機制已廣泛被探討且釐清⁽¹⁸⁾，因此在眾多毒理學的評估指標 (endpoint)

裡，皮膚過敏性試驗為目前發展相較成熟且應用廣泛的動物替代技術之一，尤其為導入 AOP 評估策略作為基礎架構的代表範例⁽⁴⁴⁾。雖然過去相關皮膚過敏性動物替代技術的限制性已知有化學品適用性、針對混合物無法有效預測或無法進行詳細危害分級等疑慮，但隨著更新穎的替代技術被發展或者使用 DA 等 IATA 策略，已經逐漸解決部分的限制性疑慮⁽³⁶⁾，除了體外試驗以外，尤其目前國內外已發展多個導入 AOP 概念進行皮膚過敏性評估的人工智慧電腦模擬平台，比如 PRED-SKIN 及 SkinSensDB 等^(13,68)，亦都是未來可納入評估策略的有利工具。以 DA 等動物替代技術之評估策略而言，不僅可有效預測 LLNA 等動物試驗結果，甚至與 HPT 試驗等實際人體皮膚過敏性結果相比，也具有高一致性。除了 3R 考量以外，動物試驗是否可以用來完全預測人類對化學品的反應始終是個有爭議的問題，根據資料顯示，由於供進行皮膚過敏性評估常見的實驗動物其皮膚滲透能力普遍高於人體，動物試驗常用的載體可能額外加劇了過敏性反應，相關動物試驗的投藥流程與人體實際暴露情境具差異等緣由，大多動物試驗比對人體實際暴露結果具高偽陽性⁽⁷⁾。透過使用 AOP 概念的 DA 方法等動物替代試驗評估策略，統計相關預測到人體影響的準確率，甚至更高於傳統動物試驗^(49,67)，但考量化學品繁雜，而人體的數據通常有限，因此相關推論要被完全證實仍需要持續累積更多證據資料，因

此主管機關普遍會尋求較保守的評估方式。為保護對農民等操作者、消費者及環境生態等不同族群之健康影響，農藥的安全評估始終為嚴格縝密的方式，傳統上大部分的毒理評估技術以動物試驗為主，也因此過去相關法規普遍只接受申請者繳交動物試驗數據，但同時也使用並犧牲了為數眾多的實驗動物。目前包括美國、歐盟等國際農藥化學品登記主管機關普遍將符合 3R 的毒理評估模式視為核心發展新替代方式 (new approach methodologies, NAMs)，並由於全球化的結果，更鼓勵其他國家應同樣倡議相關動物替代策略的科學政策，才能有效達到動物減量的目標⁽⁶⁵⁾。以對人體進行風險評估而言，在導入相關動物替代技術於現行申請登記法規時，應仔細考量因素包括 (1) 相關替代技術是否具備對人體毒理評估驗證能力，並被 OECD 等國際組織接受，其再現性應提供不低於動物試驗水準以及 (2) 試驗產出評估結果是否符合目前國內管理需求比如適用毒性分類等所須數據⁽¹²⁾。針對皮膚過敏性評估而言，雖然國內包括行政院環境保護署毒物及化學物質局針對化學物質登錄已接受動物替代試驗⁽⁴⁾，但以申請農藥產品登記而言，現行國內相關規範仍只接受動物試驗⁽³⁾，藉此文獻回顧可瞭解到目前已有眾多動物替代試驗或評估策略通過國際動物試驗替代方法參考實驗室完成驗證，並且其他國家農藥或其他化學品主管機關已陸續修訂相關規範及精進登記策略，而開始採納動物替代試驗，因而

建議本國未來可同樣導入 DA 等動物替代研究新穎策略，並作為農藥毒理試驗準則等規範修訂之參考，除了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。

謝辭

感謝行政院農業委員會補助本研究計畫-111 農科-13.1.1-藥-P1，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。144 頁。
2. 日本農林水產省消費安全技術中心 (Food and Agricultural Materials Inspection Center, FAMIC)。2019。農藥の登録申請において提出すべき資料について。Retrieved from <https://www.acis.famic.go.jp/shinsei/> (Apr. 27, 2022)
3. 行政院農業委員會。2018。農藥理化性及毒理試驗準則。行政院農業委員會農防字第 1071488885 號令修正發布第 3 條附件二。
4. 行政院環境保護署毒物及化學物質局。2020。既有化學物質標準登錄資料撰寫指引第一版。行政院環保署。臺北。106 頁。
5. 李彥芸、張敬宜、蔡騷任、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。
6. 韓國農林畜產食品部 (Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, MAFRA)。농약 및 원제의 등록기준。2021。Retrieved from <https://www.law.go.kr/행정규칙/농약및원제의등록기준/> (Apr. 27, 2022)
7. Anderson, S. E., Siegel, P. D., and Meade, B. J. 2011. The LLNA: a brief review of recent advances and limitations. J. Allergy (Cairo). 2011: e104659
8. Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA). 2022. Agricultural data guidelines. Toxicology (Part 3). Retrieved from <https://apvma.gov.au/node/1036> (Apr. 27, 2022)
9. Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J. C., Certa, H., Eigler, D., Emter, R., Faulhammer, F., Garcia, C., Graham, C., Haux, C., N. Kolle, S., Kreiling, R., Natsch A., and Mehling, A. 2011. Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60: 389-400.
10. Barentsen, H. M., Jonis, S. U., Pelgrom, S. M. G. J., Rijk, J. C. W., Westerink, W. M. A., and Paulussen, J. J. C. 2019. REACH alternative testing strategy for skin

- sensitization in practice: Fact or fiction?. Regul. Toxicol. Pharmacol. 106: 292-302.
11. Belsito, D. V. 2019. Toxic responses of the skin, pp. 953-976. *In*: C. D. Klaassen [ed.], Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons, 9th ed. McGraw-Hill Education. New York, USA. 1639 pp.
 12. Bhuller, Y., Ramsingh, D., Beal, M., Kulkarni, S., Gagne, M., and Barton-Maclaren, T. S. 2021. Canadian regulatory perspective on next generation risk assessments for pest control products and industrial chemicals. *Front Toxicol.* 2021: e748406.
 13. Borba, J. V. B., Braga, R. C., Alves, V. M., Muratov, E. N., Kleinstreuer, N., Tropsha, A., and Andrade, C. H. 2020. Pred-skin: a web portal for accurate prediction of human skin sensitizers. *Chem. Res. Toxicol.* 34: 258-267.
 14. Braeuning, C., Braeuning, A., Mielke, H., Holzwarth, A., and Peiser, M. 2018. Evaluation and improvement of QSAR predictions of skin sensitization for pesticides. *SAR QSAR Environ. Res.* 29: 823-846.
 15. Casati, S., Claudius, G., and Whelan, M. 2013. EURL ECVAM recommendation on the direct peptide reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Publications Office of the European Union, Luxembourg. 38 pp.
 16. Casati, S., and Whelan, M. 2015. EURL ECVAM Recommendation on the human cell line activation test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Publications Office of the European Union, Luxembourg. 44 pp.
 17. Casati, S., Aschberger, K., Asturiol, D., Basketter, D., Dimitrov, S., Dumont, C., Karlberg, A. T., Lepoittevin, J. P., Patlewicz, G., Roberts, D. W., and Worth, A. 2016. Ability of non-animal methods for skin sensitisation to detect pre- and pro-haptens: Report and recommendations of an EURL ECVAM expert meeting. 1st ed. Publications Office of the European Union, Luxembourg. 30 pp.
 18. Casati, S., Aschberger, K., Barroso, J., Casey, W., Delgado, I., Kim, T. S., Kleinstreuer, N., Kojima, H., Lee, J. K., Lowit, A., Park, H. K., Régimbald-Krnel, M. J., Strickland, J., Whelan, M., Yang, Y., and Zuang, V. 2018. Standardisation of defined approaches for skin sensitisation testing to support regulatory use and international adoption: position of the International Cooperation on Alternative Test Methods. *Arch. Toxicol.* 92: 611-617.
 19. Daniel, A. B., Strickland, J., Allen, D., Casati, S., Zuang, V., Barroso, J., Whelan, M., Régimbald-Krnel, M., Kojima, H., Nishikawa, A., Park, H. K., Lee, J. K., Kim, T. S., Delgado, I., Rios, L., Yang, Y., Wang, G., and Kleinstreuer, N. 2018. International

- regulatory requirements for skin sensitization testing. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 95: 52-65.
20. De Ávila, R. I., Lindstedt, M., and Valadares, M. C., 2019. The 21st Century movement within the area of skin sensitization assessment: From the animal context towards current human-relevant *in vitro* solutions. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 108: e104445.
 21. Dimitrov, S. D., Diderich, R., Sobanski, T., Pavlov, T. S., Chankov, G. V., Chapkanov, A. S., Karakolev, Y. H., Temelkov, S. G., Vasilev, R. A., Gerova, K. D., Kuseva, C. D., Todorova, N. D., Mehmed, A. M., Rasenberg, M., and Mekenyan, O. G. 2016. QSAR toolbox- workflow and major functionalities. *SAR QSAR Environ. Res.* 27: 203-219.
 22. Emter, R., Ellis, G., and Natsch, A. 2010. Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245: 281-290.
 23. European Chemicals Agency (ECHA). 2021. Skin sensitisation. Retrieved from https://echa.europa.eu/documents/10162/1128894/oced_test_guidelines_skin_sensitisation_en.pdf/40baa98d-fc4b-4bae-a26a-49f2b0d0cf63?t=1633687729588 (Apr. 27, 2022)
 24. European Commission (EC). 2013. Setting out the data requirements for active substances, in accordance with regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market. Document number 32013R0283. Commission regulation (EU) No 283/2013 of 1 March 2013.
 25. Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., and Landsiedel, R. 2013. Xenobiotic metabolizing enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87: 1683-1696.
 26. Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kern, P. S., Schlatter, H., Dearman, R. J., Kimber, I., Patlewicz, G. Y., and Basketter, D. A. 2005. Compilation of historical local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods. *Dermatitis* 16: 157-202.
 27. Griesinger, C., Casati, S., Worth, A., and Whelan, M. 2014. EURL ECVAM Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing. Publications Office of the European Union, Luxembourg. 39 pp.
 28. Guo, Y. L., Wang, B. J., Lee, C. C., and Wang, J. D. 1996. Prevalence of dermatoses and skin sensitisation associated with use of pesticides in fruit farmers of southern Taiwan. *Occup. Environ. Med.* 53: 427-

- 431.
29. Suto, H., Higaki, T., Kitano, S., Okuda, Y., Horie, N., and Yamaguchi, T. 2019. Perspectives on the current state of evaluation of skin sensitization. R&D Report, "SUMITOMO KAGAKU" 2019: 24-36.
30. Hoffmann, S., Kleinstreuer, N., Alépée, N., Allen, D., Api, A. M., Ashikaga, T., Clouet, E., Cluzel, M., Desprez, B., Gellatly, N., Goebel, C., Kern, P. S., Klaric, M., Kühnl, J., Lalko, J. F., Martinozzi-Teissier, S., Mewes, K., Miyazawa, M., Parakhia, R., van Vliet, E., Zang, Q., and Petersohn, D. 2018. Non-animal methods to predict skin sensitization (I): the Cosmetics Europe database. *Crit. Rev. Toxicol.* 48: 344-358.
31. Jang, Y., Kim, J. E., Jeong, S. H., and Cho, M. H. 2014. Towards a strategic approaches in alternative tests for pesticide safety. *Toxicol. Res.* 30: 159-168.
32. Johnson, C., Ahlberg, E., Anger, L. T., Beilke, L., Benigni, R., Bercu, J., Bobst, S., Bower, D., Brigo, A., Campbell, S., Cronin, M. T. D., Crooks, I., Cross, K. P., Doktorova, T., Exner, T., Faulkner, D., Fearon, I. M., Fehr, M., Gad, S. C., Gervais, V., Giddings, A., Glowienke, S., Hardy, B., Hasselgren, C., Hillegass, J., Jolly, R., Krupp, E., Lomnitski, L., Magby, J., Mestres, J., Milchak, L., Miller, S., Muster, W., Neilson, L., Parakhia, R., Parenty, A., Parris, P., Paulino, A., Paulino, A. T., Roberts, D. W., Schlecker, H., Stidl, R., Suarez-Rodriguez, D., Szabo, D. T., Tice, R. R., Urbisch, D., Vuorinen, A., Wall, B., Weiler, T., White, A. T., Whritenour, J., Wichard, J., Woolley, D., Zwickl, C., and Myatt, G. J. 2020. Skin sensitization in silico protocol. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 116: e104688.
33. Kimber, I., Basketter, D. A., Berthold, K., Butler, M., Garrigue, J. L., Lea, L., Newsome, C., Roggeband, R., Steiling, W., Stropp, G., Waterman, S., and Wiemann, C. 2001. Skin sensitization testing in potency and risk assessment. *Toxicol. Sci.* 59: 198-208.
34. Kleinstreuer, N. C., Hoffmann, S., Alépée, N., Allen, D., Ashikaga, T., Casey, W., Clouet, E., Cluzel, M., Desprez, B., Gellatly, N., Göbel, C., Kern, P. S., Klaric, M., Kühnl, J., Martinozzi-Teissier, S., Mewes, K., Miyazawa, M., Strickland, J., van Vliet, E., Zang, Q., and Petersohn, D. 2018. Non-animal methods to predict skin sensitization (II): an assessment of defined approaches. *Crit. Rev. Toxicol.* 48: 359-374.
35. Lee, M. J., Lee, S., Ham, S. N., Park, Y. K., Oh, J. A., and Shin, J. Y. 2020. Assessment of pesticides using in chemico direct peptide reactivity assay for skin sensitization. *Korean J. Pestic. Sci.* 24: 286-295.

36. MacKay, C., Davies, M., Summerfield, V., and Maxwell, G. 2013. From pathways to people: applying the adverse outcome pathway (AOP) for skin sensitization to risk assessment. *ALTEX* 30: 473-486.
37. Masinja, H. W. 2021. Evaluation of alternative non-animal approaches for the prediction of skin sensitisation potential of agrochemicals. Doctoral dissertation, Liverpool John Moores University, Liverpool, United Kingdom. 253 pp.
38. Natsch, A., and Haupt, T. 2013. Utility of rat liver S9 fractions to study skin-sensitizing prohapten in a modified KeratinoSens assay. *Toxicol. Sci.* 135: 356-368.
39. O'Malley, M. 2010. The regulatory evaluation of the skin effects of pesticides, pp. 701-787. *In*: R. Krieger [ed.], Hayes' Handbook of pesticide toxicology, 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. 2342 pp.
40. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2010. Test No. 429: Skin sensitisation. local lymph node assay, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 20 pp.
41. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2010. Test No. 442A: Skin sensitization, local lymph node assay: DA, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 16 pp.
42. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2014. The adverse outcome pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding to proteins, Part 1: Scientific evidence, OECD series on testing and assessment, No. 168, OECD, Paris, France. 105 pp.
43. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2017. Guidance document for the use of adverse outcome pathways in developing integrated approaches to testing and assessment (IATA), OECD series on testing and assessment, No. 260, OECD, Paris, France. 33 pp.
44. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2016. Guidance document on the reporting of defined approaches and individual information sources to be used within integrated approaches to testing and assessment (IATA) for skin sensitization, OECD series on testing and assessment, No. 256, OECD, Paris, France. 317 pp.
45. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2017. Revised guidance document on developing and assessing adverse outcome pathways, OECD series on testing and assessment, No. 184, OECD, Paris, France. 32 pp.

46. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2018. Test No. 442B: Skin sensitisation, local lymph node assay: BrdU-ELISA or -FCM, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 36 pp.
47. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2022. Test No. 442E: *In vitro* skin sensitisation, *In vitro* skin sensitization assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitization, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 91 pp.
48. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2022. Test No. 442D: *In vitro* skin sensitisation, ARE-Nrf2 Luciferase test method, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 49 pp.
49. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2021. Guideline No. 497: Defined approaches on skin sensitisation, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 54 pp.
50. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2022. Test No. 406: Skin sensitisation, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 11 pp.
51. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2022. Test No. 442C: In chemico skin sensitization, Assays addressing the adverse outcome pathway key event on covalent binding to protein, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 58 pp.
52. Pest Management Regulatory Agency (PMRA). 2021. A framework for risk assessment and risk management of pest control products, PMRA guidance document. Health Canada, Pest Management Regulatory Agency, Ontario, Canada. 24pp.
53. Pest Management Regulatory Agency (PMRA). 2022. Pesticide registration process: Health evaluation. Retrieved from <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/consumer-product-safety/pesticides-pest-management/public/protecting-your-health-environment/pesticide-registration-process/reviews/health-evaluation.html> (Apr. 27, 2022)
54. Roberts, D. W. 2021. A critical review of the kinetic direct peptide reactivity assay (kDPRA) for skin sensitizer potency assessment- taking it forward. Crit. Rev. Toxicol. 51: 805-819.
55. Roberts, D. W., Patlewicz, G., Dimitrov, S. D., Low, L. K., Aptula, A. O., Kern, P. S., Dimitrova, G. D., Comber, M. I., Phillips, R. D., Niemelä, J., Madsen, C., Wedebye,

- E. B., Bailey, P. T., and Mekenyan, O. G. 2007. TIMES-SS- A mechanistic evaluation of an external validation study using reaction chemistry principles. *Chem. Res. Toxicol.* 20: 1321-1330.
56. Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., Hirota, M., Itagaki, H., Toyoda, H., and Suzuki, H. 2006. Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines; human cell line activation test (h-CLAT) II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol. In Vitro.* 20: 774-784.
57. Schwöbel, J. A., Koleva, Y. K., Enoch, S. J., Bajot, F., Hewitt, M., Madden, J. C., Roberts, D. W., Schultz, T. W., and Cronin, M. T. 2011. Measurement and estimation of electrophilic reactivity for predictive toxicology. *Chem. Rev.* 111: 2562-2596.
58. Settivari, R. S., Gehen, S. C., Amado, R. A., Visconti, N. R., Boverhof, D. R., and Carney, E. W. 2015. Application of the KeratinoSens™ assay for assessing the skin sensitization potential of agrochemical active ingredients and formulations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 72: 350-360.
59. Spiewak, R. 2001. Pesticides as a cause of occupational skin diseases in farmers. *Ann. Agric Environ. Med.* 8: 1-5.
60. Strickland, J., Truax, J., Corvaro, M., Settivari, R., Henriquez, J., McFadden, J., Gullledge, T., Johnson, V., Gehen, S., Germolec, D., Allen, D. G., and Kleinstreuer, N. 2022. Application of defined approaches for skin sensitization to agrochemical products. *Front. Toxicol.* 4: e852856.
61. Takenouchi, O., Miyazawa, M., Saito, K., Ashikaga, T., and Sakaguchi, H. 2013. Predictive performance of the human cell line activation test (h-CLAT) for lipophilic chemicals with high octanol-water partition coefficients. *J. Toxicol. Sci.* 38: 599-609.
62. Tannenbaum, J., and Bennett, B. T. 2015. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 54: 120-132.
63. United Nations. 2021. Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS), 9th ed. United Nations, New York, U.S.A. 556 pp.
64. United States Environmental Protection Agency (US EPA). 2018. Interim science policy: Use of alternative approaches for skin sensitization as a replacement for laboratory animal testing. Document number EPA-HQ-OPP-2016-0093-0090.
65. United States Environmental Protection Agency (US EPA). 2022. EPA new approach methods work plan: reducing use of vertebrate animals in chemical testing. Retrieved from [https://www.epa.gov/chemical-research/epa-new-approach-methods-work-plan-reducing-use-vertebrate-](https://www.epa.gov/chemical-research/epa-new-approach-methods-work-plan-reducing-use-vertebrate)

- animals-chemical (Apr. 27, 2022)
66. United States Environmental Protection Agency (US EPA). 2022. Pesticide registration manual: Introduction. Retrieved from <https://www.epa.gov/pesticide-registration/pesticide-registration-manual-introduction> (Apr. 27, 2022)
67. Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P. S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., and Sakaguchi, H. 2015. Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71: 337-351.
68. Wang, C. C., Lin, Y. C., Wang, S. S., Shih, C., Lin, Y. H., and Tung, C. W. 2017. SkinSensDB: a curated database for skin sensitization assays. *J. Cheminform.* 9: 1-6.
69. Weng, C. Y., and Black, C. 2015. Taiwanese farm workers' pesticide knowledge, attitudes, behaviors and clothing practices. *Int. J. Environ. Health Res.* 25: 685-696.
70. Xu, W., Vebrosky, E. N., and Armbrust, K. L. 2018. Potential risk to human skin cells from exposure to dicloran photodegradation products in water. *Environ. Int.* 121: 861-870.

Alternative Methods for Assessing the Skin Sensitization Potential of Pesticides for Animals

Chun-Lin Liao^{1*}, Yen-Chun Lo¹, Yi-Ting Li¹, Wei-Ren Tsai¹

Abstract

Liao, C. L., Lo, Y. C., Li, Y. T., and Tsai, W. R. 2022. Alternative methods for assessing the skin sensitization potential of pesticides for animals. *Taiwan Pestic. Sci.* 13: 79-106.

Farmers and agricultural workers are at risk of pesticide exposure, which can lead to skin sensitization. State pesticide regulatory agencies are responsible for determining hazard classifications and using related information to create warning labels and recommend appropriate personal protective equipment. Traditionally, the skin sensitization potential of pesticides has been evaluated using *in vivo* tests, including the guinea pig maximization test (GPMT), Buehler test (BT), or murine local lymph node assay (LLNA). However, to improve the welfare of laboratory animals, international chemical assessment agencies such as the United States or the European Union increasingly seek new approach methodologies (NAMs) that can replace animal tests. Among the many toxicological endpoints for the testing of pesticides, skin sensitization is a representative model of introducing the concept of adverse outcome pathway (AOP) as an evaluation strategy. The Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) has published test guidelines for different key events by using AOP concept in assessment of skin sensitization. These guidelines include alternative methods to animal testing, such as *in chemico* and *in vitro* methods. To improve the predictive ability of animal-free NAMs, the OECD recommends to integrate multiple alternative tests and use the defined approach (DA) in the integrated approach to testing and assessment (IATA) to replace animal studies. Although doubts remain about the ability of animal-free NAMs to predict mixtures, for general monoconstituent substances,

Accepted: August 8, 2022.

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

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

evaluation strategies such as DA (1) can effectively predict the results of animal tests and (2) have a higher accuracy rate in assessing actual human exposure results than do animal tests. Pesticide authorities in the United States and Japan have revised relevant regulations pertaining to the pesticide certification and begun to accept alternative tests. Therefore, in this study, we reviewed animal-free skin-sensitization NAMs to identify alternative tests and novel assessment strategies that have been verified by OECD and other international validation institutes. We suggest that future domestic regulations to certify pesticides using results of animal-free NAMs and promote pesticide-testing methods that effectively assess risk while also reducing the need for laboratory animals.

Key words: pesticide, skin sensitization, animal alternative methods, adverse outcome pathway (AOP), integrated approach to testing and assessment (IATA), defined approach (DA)