

案號：110A012

行政院環境保護署
毒物及化學物質局委託研究

整合化學品動物替代測試檢驗量能及
發展新興替代測試應用支援計畫

成果報告

受託單位：瑞昶科技股份有限公司

計畫執行期間：110 年 2 月 23 日至 110 年 11 月 30 日

行政院環境保護署毒物及化學物質局編印

中華民國 110 年 11 月印製

案號：110A012

行政院環境保護署
毒物及化學物質局委託研究

整合化學品動物替代測試檢驗量能及
發展新興替代測試應用支援計畫

成果報告

受託單位：瑞昶科技股份有限公司

計畫執行期間：110 年 2 月 23 日至 110 年 11 月 30 日

計畫經費：4,245 仟元

計畫主持人／協同主持人：陳柏霖／王應然、侯文哲

計畫執行人員：陳姿羽、曾家琪、陳慎德、蔡昀達、
洪偉毅、史育璇、陳怡靜、林俐君、
李子寧、張庭皓、卓秋敏

行政院環境保護署毒物及化學物質局編印

中華民國 110 年 11 月印製

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試
應用支援計畫」成果報告基本資料表

委辦單位	行政院環境保護署毒物及化學物質局		
執行單位	瑞昶科技股份有限公司		
參與計畫人員姓名	陳柏霖、王應然、侯文哲、陳姿羽、曾家琪、 陳慎德、蔡昀達、洪偉毅、史育璇、陳怡靜、 林俐君、李子寧、張庭皓、卓秋敏		
年 度	110	計畫編號	110A012
研究性質	☐ 基礎研究 ☒ 應用研究 ☐ 技術發展		
研究領域	環境科學		
計畫屬性	☒ 科技類 ☐ 非科技類		
全程期間	110 年 2 月～110 年 11 月		
本期期間	110 年 2 月～110 年 11 月		
本期經費	4,245 千元		
	資本支出		經常支出
	土地建築____千元		人事費 2,648 千元
	儀器設備____千元		業務費 1,597 千元
	其 他____千元		材料費____千元
			其 他____千元
摘要關鍵詞（中英文各三則）			
取代、減量及精緻化（優化） (Replacement, Reduction and Refinement, 3Rs)			
替代測試方法(Alternative test methods, Alternatives)			
整合型測試評估方法 (Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA)			

行政院環境保護署毒物及化學物質局計畫成果中英文摘要 (簡要版)

一、中文計畫名稱：

整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試應用支援計畫

二、英文計畫名稱：

The Project for Integrating the Capacity of Alternatives to Animal Testing and Supporting Development of New Alternative Methods for Chemical Safety Assessment

三、計畫編號：

110A012

四、計畫執行單位：

瑞昶科技股份有限公司

五、計畫主持人(包括共同主持人)：

陳柏霖、王應然、侯文哲

六、執行開始時間：

110/2/23

七、執行結束時間：

110/11/30

八、報告完成日期：

110/11/30

九、報告總頁數：

報告內文(第一章至第七章) 268 頁

十、使用語文：

中文、英文

十一、報告電子檔名稱：

整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試應用支援計畫.pdf

十二、報告電子檔格式：

PDF 9.0

十三、中文摘要關鍵字：

取代、減量及精緻化(優化)、替代測試方法、整合型測試評估方法

十四、英文摘要關鍵字：

Replacement, Reduction and Refinement (3Rs), Alternative test methods

(Alternatives), Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA)

十五、中文摘要

本年度蒐集國際組織認可之替代測試方法、奈米物質化學品登錄資訊及替代測試方法之最新進展，建立 1 式優先採納替代測試方法清單，包含 3 式建議優先納入的替代測試方法，並提出化學物質登錄指引替代測試方法之修正建議。為達到以替代測試方法完備我國化學物質登錄所需毒理及生態毒理資訊之目標，以 14 種化學物質（7 種新及 7 種既有化學物質）及不同定量結構活性關係(Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR)模式等替代測試方法，試行毒理及生態毒理項目資料推估。在毒理方面，皮膚過敏性及基因毒性皆具有良好的表現；在生態毒理方面，毒性預測軟體工具(Toxicity Estimation Software Tool, T.E.S.T.)之群體貢獻方法(Group contribution method)及生態結構活性關係(Ecological Structure Activity Relationships, ECOSAR)對既有化學物質魚類水生急毒性預測能力表現良好，故建議規劃為整合型測試評估方法(Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA)之基礎模型。體外測試(*in vitro* assay)部分，本年度完成 7 種化學物質的體外魚類胚胎試驗，並加入其他 13 種已知數據的物質，試行結合定量結構活性關係及體外試驗之整合型測試策略，結果顯示分級準確率可達 85%。另檢視及評析化學品全球調和制度(Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals, GHS)第 8 版與中華民國國家標準(Chinese National Standards, CNS) 15030 關於替代測試的差異，並提出替代測試方法於化學物質危害分級分類之適用性建議。

十六、英文摘要

In this year, the information about alternative test methods accepted by international organizations, nano-substance registration, and the recent development for alternative test methods was collected and analyzed. According to the information, we established the priority adoption lists of alternative test methods, including 3 recommended protocols. Furthermore, we provided suggestions for revising the guidelines of chemical substances registration. To strengthen the uses of alternative methods in toxicological and eco-toxicological test required by chemical substances registration, quantitative structure-activity relationship (QSAR) models were used to predict the health and environmental hazards of 14 substances (7 new and 7 existing chemical substances). The prediction of all QSAR models we

choose for skin sensitization and genotoxicity had good performances. Toxicity estimation software tool (T.E.S.T.) Group contribution method and Ecological structure activity relationships (ECOSAR) models also offered well predictions on classification of acute fish toxicity. In this year, we also confirmed the acute toxicity of 7 substances using Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. To further improve the accuracy of fish acute toxicity prediction, we try to establish the integrated approaches to testing and assessment (IATA) combining the data from the two QSAR models (T.E.S.T. Group contribution method and ECOSAR) with *in vitro* data. The accuracy rate of IATA could reach 85% in selected 20 substances. We also analyzed the difference related with alternative test methods between Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS): 8th Revised Edition and Chinese National Standard (CNS) 15030. The suggestions for applying results of alternative test methods on hazard classification were also provided in this report.

整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興 替代測試應用支援計畫

成果報告

目 錄

頁次

期末報告基本資料表

行政院環境保護署毒物及化學物質局計畫成果中英文摘要（簡要版）

目 錄

圖目錄

表目錄

中英文名詞對照與縮寫表

報告大綱

行政院環境保護署毒物及化學物質局計畫成果中英文摘要（詳細版）

第一章	前言	1-1
1.1	計畫緣起	1-1
1.2	計畫目標	1-4
1.3	工作項目與內容	1-4
1.4	工作執行流程與方法	1-5
1.5	工作組織與計畫分工	1-7
1.6	工作執行進度	1-9
1.7	執行成果摘要	1-14
第二章	計畫相關背景資料	2-1
2.1	動物替代測試發展及國際現況	2-1
2.1.1	動物替代測試發展簡介	2-1
2.1.2	動物替代測試國際現況	2-5
2.2	國內各部會減少動物試驗的實際做法與替代測試的發展現況 ...	2-12
2.2.1	我國各部會相關法規中替代測試的應用現況	2-12

	頁次
2.2.2 替代測試在我國化學物質管理扮演的角色.....	2-13
2.2.3 以動物減量為目的所設計的登錄資訊繳交邏輯.....	2-14
2.3 國際奈米物質管理現況.....	2-18
2.3.1 歐盟以 REACH 法規為核心的奈米安全管理	2-18
2.3.2 國際組織對奈米安全性評估及標準化的現況摘要.....	2-34
第三章 導入國際化學品新興替代測試方法.....	3-1
3.1 國際化學物質毒理及生態毒理替代測試發展.....	3-1
3.1.1 替代測試方法的國際趨勢.....	3-1
3.1.2 國際多元化資料繳交策略用以減少不必要的動物實驗...	3-4
3.1.3 生態毒理資訊及其替代測試發展之現況.....	3-6
3.2 優先採納替代測試清單與化學物質登錄指引調修建議.....	3-22
3.2.1 國際認可之替代測試方法清單.....	3-22
3.2.2 我國採納之替代測試方法.....	3-22
3.2.3 以我國採納之替代測試方法研析適用範疇.....	3-28
3.2.4 優先採納之替代測試方法清單.....	3-83
3.2.5 替代測試相關之指引修正建議研析.....	3-88
3.3 奈米物質毒理及生態毒理替代測試發展.....	3-90
3.3.1 奈米物質毒理替代測試方法發展現況.....	3-90
3.3.2 奈米物質生態毒理替代測試方法發展現況.....	3-97
3.4 我國各部會共同推動替代測試方法.....	3-98
3.4.1 預擬的替代測試發展藍圖與跨部會合作的前期規劃.....	3-98
3.4.2 各部會對於毒理資料繳交之法源依據及設計.....	3-100
3.4.3 不同制度所需的毒理資料與接軌策略.....	3-103
3.4.4 不同部會對於替代測試的研發現況.....	3-111
3.4.5 未來發展跨部會替代合作的建議.....	3-115
第四章 替代測試方法完備我國化學物質登錄所需之毒理及生態毒理資訊	4-1
4.1 電腦模擬模式簡介.....	4-1
4.1.1 定量結構活性關係（QSAR）的發展沿革.....	4-1

4.1.2	QSAR 模型及可使用範圍簡介	4-4
4.1.3	OECD 驗證 QSAR 模型的 5 大原則	4-13
4.2	電腦模擬模式試行毒理及生態毒理項目資料推估	4-16
4.2.1	進行電腦模擬及體外測試的化學物質選定	4-16
4.2.2	測試終點與模式選擇	4-20
4.2.3	毒理電腦模擬方法之執行方法及驗證流程	4-22
4.2.4	毒理項目電腦模擬結果研析	4-30
4.2.5	生態毒理項目電腦模擬之執行方法及驗證流程	4-36
4.2.6	生態毒理項目電腦模擬之結果研析	4-39
4.3	QSAR 模型之驗證所需資訊及範本	4-45
4.4	體外試驗結合定量結構活性關係篩選預測生態毒性之效能 評估	4-49
第五章	評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性	5-1
5.1	替代測試方法應用於化學品分類及標示全球調和制度	5-1
5.1.1	化學品分類及標示全球調和制度（GHS）概況	5-1
5.1.2	國際將替代測試方法應用於化學品全球調和制度	5-3
5.1.3	替代測試方法應用於化學品分類及標示全球調和制度 ...	5-5
5.1.4	化學品全球調和制度關於奈米物質分級分類的發展	5-12
5.2	中華民國國家標準（CNS）分類	5-13
5.2.1	國家標準分類簡介	5-13
5.2.2	我國標準分類和國際標準分類的異同	5-15
5.2.3	研析我國國家標準分類應用替代方法之適用性	5-15
5.3	化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性	5-16
5.4	替代測試方法應用於危害分級分類之適用性建議	5-17
第六章	計畫經濟效益分析	6-1
第七章	結論與建議	7-1
7.1	結論	7-1
7.2	建議	7-2

參考文獻

附 件

附件一 歷次審查會議紀錄

附件二 歷次審查意見答覆說明

圖目錄

	頁次
圖 1.4-1 計畫執行流程.....	1-6
圖 2.1-1 國際 3Rs 中心分布圖.....	2-9
圖 2.2-1 新及既有化學物質標準登錄資料繳交類型.....	2-15
圖 2.3-1 奈米材料與奈米型態定義上之差異.....	2-30
圖 3.1-1 美國策略計畫的三個核心組成.....	3-3
圖 3.1-2 ECVAM 在替代、減量及精緻化（優化）魚類水生毒性試驗與 生物蓄積試驗的策略.....	3-12
圖 3.1-3 ECVAM 策略時間表，其假設所有利益相關者齊心協力，且有 足夠的資源可供使用.....	3-12
圖 3.1-4 如何使用體外測定的肝清除率預測 BCF 值.....	3-21
圖 3.2-1 以 EPiTRI [®] 體外試驗方式測試皮膚刺激性流程.....	3-40
圖 3.3-1 替代或減少在奈米毒性評估中使用實驗動物的替代測試方法.....	3-93
圖 3.3-2 用於評估化學替代品和預測其毒性的 QSAR 模型示意圖.....	3-96
圖 3.4-1 預擬我國化學物質登錄替代測試發展策略.....	3-98
圖 3.4-2 跨部會替代測試合作的前期規畫與研析.....	3-99
圖 3.4-3 各領域替代測試發展與動物福祉 3Rs 精神之對應.....	3-108
圖 3.4-4 化學物質、健康食品、化粧品與醫療器材替代測試接受情形.....	3-110
圖 3.4-5 化學物質登錄制度所蒐集資訊可廣泛應用於不同領域.....	3-111
圖 4.1-1 定量結構活性關係示意圖.....	4-2
圖 4.2-1 國內優先指定登錄 106 個化學物質之物質分類結果示意圖.....	4-19
圖 4.2-2 最終 7 個測試化學物質篩選流程.....	4-19
圖 4.2-3 毒理電腦模擬替代測試方法之驗證流程.....	4-21
圖 4.2-4 生態毒理電腦模擬替代測試方法之驗證流程.....	4-21
圖 4.2-5 利用電腦模擬與體外模式建立判斷流程.....	4-22
圖 4.2-6 毒理資訊之 QSAR 模型驗證方法流程架構.....	4-22
圖 4.2-7 大鼠口服急毒性之分級準確率及有效樣本數.....	4-32
圖 4.2-8 皮膚刺激腐蝕性準確率及有效樣本數.....	4-33

	頁次
圖 4.2-9 皮膚過敏性之分級準確率及有效樣本數	4-33
圖 4.2-10 基因毒性之分級準確率及有效樣本數	4-34
圖 4.2-11 眼睛刺激性之分級準確率及有效樣本數	4-35
圖 4.2-12 生態毒理之 QSAR 模型驗證方法流程架構	4-37
圖 4.2-13 藻類水生急毒性之分級準確率及有效樣本數	4-42
圖 4.2-14 水蚤水生急毒性之分級準確率及有效樣本數	4-43
圖 4.2-15 魚類水生急毒性之分級準確率及有效樣本數	4-44
圖 4.4-1 整合型測試評估方法 (IATA) 的概念與基本框架	4-51
圖 4.4-2 水生毒性之替代測試 IATA 架構	4-54
圖 4.4-3 水生毒性之替代測試 IATA 測試策略圖	4-57

表 目 錄

	頁次
表 1.5-1 主要參與人員學經歷一覽表.....	1-8
表 1.6-1 計畫工作期程.....	1-10
表 1.6-2 實際進度及查核重點說明.....	1-12
表 1.7-1 執行成果摘要.....	1-15
表 2.1-1 國際 3Rs 中心列表.....	2-6
表 2.2-1 各級標準登錄所需物化、毒理及生態毒理資料項目.....	2-16
表 2.2-2 我國化學物質登錄指引中建議繳交的替代測試樣態.....	2-17
表 2.3-1 與奈米物質相關的歐盟法規內容.....	2-20
表 2.3-2 REACH 註冊的奈米物質資料.....	2-21
表 2.3-3 OECD 針對奈米物質安全性測試完成的規範與更新.....	2-35
表 2.3-4 OECD 於 2021 年發布之測試指引文件.....	2-37
表 2.3-5 OECD 關於測試和評估的出版物.....	2-38
表 2.3-6 OECD 關於人造奈米物質安全性系列的出版物.....	2-38
表 2.3-7 已發佈之奈米物質 ISO 標準.....	2-44
表 2.3-8 正在開發制定中的測試標準.....	2-50
表 2.3-9 國際奈米技術標準系列.....	2-52
表 3.1-1 歐盟有關魚類毒性和生物蓄積性的法規訊息要求.....	3-7
表 3.1-2 水環境之危害物質級別（急毒性）.....	3-9
表 3.2-1 國際認可之毒理資料項目替代測試方法.....	3-23
表 3.2-2 國際認可之生態毒理資料項目替代測試方法.....	3-25
表 3.2-3 我國登錄資料接受之毒理資料項目替代測試方法.....	3-26
表 3.2-4 我國登錄資料接受之生態毒理資料項目替代測試方法.....	3-27
表 3.2-5 吞食急毒性之替代方法比較.....	3-29
表 3.2-6 傳統急毒性吸入之替代方法.....	3-33
表 3.2-7 RhE 測試方法其陰性對照組可接受之 OD 值範圍.....	3-38
表 3.2-8 EpiSkin 預測模型腐蝕性結果判定.....	3-38
表 3.2-9 Corrositex® 預測模型結果判定.....	3-39

	頁次
表 3.2-10 皮膚刺激性 / 腐蝕性的標準測試方法與替代測試方法	3-41
表 3.2-11 眼部病變評分表	3-43
表 3.2-12 眼睛刺激危害級別	3-44
表 3.2-13 用於辨別導致嚴重眼部損傷和不需要分類為眼部刺激或嚴重 眼部損傷的測試化學品之預測模型	3-46
表 3.2-14 角膜混濁評分標準	3-46
表 3.2-15 螢光素滯留評分標準	3-46
表 3.2-16 角膜腫脹之 ICE 分類標準	3-47
表 3.2-17 混濁度之 ICE 分類標準	3-47
表 3.2-18 平均螢光素滯留之 ICE 分類標準	3-47
表 3.2-19 化學品整體測試分類	3-47
表 3.2-20 螢光素滲漏之分級分類方法標準	3-48
表 3.2-21 體外短時間暴露測試方法的預測模型	3-49
表 3.2-22 重建的人類角膜上皮模型之測試參數與數據分析	3-51
表 3.2-23 眼睛刺激性之替代方法	3-51
表 3.2-24 半胱氨酸 1 : 10 / 離氨酸 1 : 50 預測模型結果分類等級	3-57
表 3.2-25 皮膚過敏性之體內替代方法	3-60
表 3.2-26 基因毒性資訊繳交規範	3-62
表 3.2-27 基因毒性三項試驗比較	3-62
表 3.2-28 基因毒性替代測試方法	3-74
表 3.2-29 國際認可之毒理資訊項目替代測試方法總表	3-84
表 3.2-30 國際認可之生態毒理項目替代測試方法總表	3-87
表 3.3-1 各國對於奈米物質定義之比較	3-90
表 3.3-2 2D 細胞培養與 3D 細胞培養之比較	3-95
表 3.4-1 我國各部會毒理資訊繳交之法源依據	3-101
表 3.4-2 針對評估醫療器材生物相容性之範例	3-106
表 3.4-3 不同部會近十年對於替代測試的研究	3-112
表 4.1-1 與 REACH 定義之測試終點相關的 QSAR 模型	4-5
表 4.2-1 最終挑選 7 個溶解度較高之化學物質	4-18

表 4.2-2	急毒性危害分級和定義.....	4-25
表 4.2-3	皮膚腐蝕性與刺激性潛力之階層式測試和評估.....	4-26
表 4.2-4	嚴重眼睛損傷和眼睛刺激之測試和評估政策.....	4-28
表 4.2-5	皮膚過敏性物質的危害級別與次級別.....	4-29
表 4.2-6	生殖細胞致突變性物質危害級別分類標準.....	4-30
表 4.2-7	待預測化學物質在各 QSAR 模型適用範圍內之數量.....	4-31
表 4.2-8	水生急毒性分級標準.....	4-39
表 4.2-9	待預測化學物質在各生態毒理終點預測模型的適用範圍中的數量.....	4-41
表 4.3-1	QSAR 模型驗證範本.....	4-46
表 4.4-1	整合型測試評估方法 (IATA) 的可能元素.....	4-52
表 4.4-2	胚胎毒性試驗與魚類急毒性試驗之簡單線性迴歸與統計值.....	4-55
表 4.4-3	20 個化學物質分別在 QSAR 模式、胚胎毒性試驗及魚類 急毒性試驗之 LC ₅₀	4-56
表 4.4-4	水生毒性之替代測試 IATA 與 AFT 試驗分級結果.....	4-59
表 5.1-1	GHS 利用分層方式在皮膚腐蝕或刺激危害分類上對化學品 進行分類.....	5-7
表 5.1-2	嚴重眼損傷 (類別 1) / 對眼的不可逆影響.....	5-9
表 5.1-3	對眼睛類別的可逆影響.....	5-10
表 5.1-4	嚴重眼損傷 / 眼刺激的分層評估.....	5-11
表 5.2-1	中華民國國家標準分類項目.....	5-14
表 6-1	急毒性：吞食之替代測試方法評估.....	6-2
表 6-2	急毒性：吸入之替代測試方法評估.....	6-2
表 6-3	皮膚刺激性 / 腐蝕性之替代測試方法評估.....	6-2
表 6-4	眼睛刺激性之替代測試方法評估.....	6-3
表 6-5	皮膚過敏性之替代測試方法評估.....	6-3
表 6-6	基因毒性之替代測試方法評估.....	6-4
表 6-7	非脊椎動物之短期毒性之替代測試方法評估.....	6-4
表 6-8	對水生藻類及藍綠藻的毒性之替代測試方法評估.....	6-5
表 6-9	非脊椎動物之長期毒性之替代測試方法評估.....	6-5
表 6-10	非脊椎動物之長期毒性之替代測試方法評估.....	6-5

中英文名詞對照與縮寫表

英文縮寫	英文全名	中文全名
3Rs	Replacement, reduction, and refinement	取代、減量及精緻化（優化）
6-TG	6-thioguanine	6-硫代鳥嘌呤
ADME	Absorption, distribution, metabolism, and excretion	吸收、分布、代謝及排泄
ANSES	The french agency for food, environmental and occupational health & safety	法國食品、環境和職業健康與安全局
AOPs	Adverse outcome pathways	健康危害途徑
ARE	Antioxidant/electrophile response element	抗氧化反應片段
ATC	Acute toxic class method	急性毒性級別法
ATE	Acute toxicity estimate	急毒性估計值
ATLA	Alternatives to laboratory animals	實驗室動物替代（期刊）
BCF	Bioconcentration factor	生物濃縮係數
BPR	Biocidal products regulation	殺生物劑產品法規
BSRC	Biological safety research center	生物安全研究中心
CAAT	Center for alternatives to animal testing	動物試驗替代中心
CAS	Chemical abstracts service	化學文摘社
CBPI	Cytokinesis block proliferation index	質分裂阻滯增生指數
CDK	The chemistry development kit	化學開發套件
CDS	Chemical detection system	化學偵測系統
CLP	Classification, labeling and packaging	分類、標示與包裝法規
CNS	Chinese national standards	中華民國國家標準
CTFA	Cosmetics, toiletry and fragrance association	化粧品、護理用品及香水協會
CYP	Cytochrome p450	細胞色素 P450
cytoB	Actin polymerization inhibitor, cytochalasin b	肌動蛋白聚合抑制劑
DA	Defined approaches	定義方法
DPRA	Direct peptide reactivity assay	直接胜肽反應性分析
EC ₅₀	50% effective concentration	半致效濃度
ECHA	European chemicals agency	歐洲化學總署
ECOSAR	Ecological structure activity relationships	生態結構活性關係
ECVAM	European centre for the validation of alternative methods	歐洲替代方法驗證中心
ENMs	Engineered nanomaterials	工程奈米物質
EPA	U.s. Environmental protection agency	美國環境保護署
EUON	European union observatory for nanomaterials	歐盟奈米材料觀察站
EURL ECVAM	European union reference laboratory european centre for the validation of alternative methods	歐盟參考實驗室-歐洲替代測試方法驗證中心
FCA	Freund's complete adjuvant	佛朗氏完全佐劑

英文縮寫	英文全名	中文全名
FDA	Food and drug administration	食品藥物管理署
FDP	Fixed dose procedure	固定劑量法
FELS	Fish early-life stage toxicity test	魚類的生命早期毒性測試
FET	Fish embryo acute toxicity	魚類胚胎急毒性
FISH	Fluorescence in situ hybridization	螢光染色體原位雜交技術
FL	Fluorescein leakage	螢光素滲漏
FRAME	The fund for the replacement of animals in medical experiments	醫學實驗動物替代基金會
GD	Guidance document	指導文件
GHS	Globally harmonized system of classification and labeling of chemicals	化學品分類及標示全球調和制度
GLP	Good laboratory practice	優良實驗室規範
GPMT	Guinea pig maximisation test	天竺鼠最大化試驗
h-CLAT	Human cell line activation test	人類細胞株活化試驗
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase	次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶
HTS	High throughput screening	高通量毒性篩選
IACUC	Institutional animal care and use committee	實驗動物照護及使用委員會
IATA	Integrated approaches to testing and assessment	整合型測試評估方法
ICAPO	International council on animal protection in oecd programmes	經濟合作暨發展組織動物保護國際理事會
ICCVAM	Interagency coordinating committee on the validation of alternative methods	替代方法驗證機構協調委員會
ICE	Isolated chicken eye	離體雞眼
IPAM	Italian platform for alternative methods	義大利替代測試方法平台
iPSC	Induced pluripotent stem cells	誘導多功能幹細胞
IR & CSA	Guidance on information requirements and chemical safety assessment	資訊需求及化學品安全評估指引
ISA	International federation of the national standardizing associations	國家標準化協會的國際聯盟
ISO	International organization for standardization	國際標準化組織
ITS	Integrated testing strategy	整合型測試策略
IUCLID	International uniform chemical information database	國際統一化學品資訊庫
IVIS	<i>In vitro</i> irritancy score	體外刺激指數
IVIVE	<i>In vitro</i> to <i>in vivo</i> extrapolation	體外到體內外推估
JaCVAM	Japanese center for the validation of alternative methods	日本替代方法驗證中心
JRC	European commission's joint research centre	歐盟聯合研究中心

英文縮寫	英文全名	中文全名
KE	Key events	關鍵事件
LC ₀₁	Non-lethal threshold concentration	無致死閾值濃度
LC ₅₀	50% lethal concentration	半致死濃度
LD ₅₀	50% lethal dose	半致死劑量
LIS	Llbo irritancy score	LLBO 刺激指數
LLBO	Laser light-based opacitometer	基於雷射光的不透光光度計
LLNA	Local lymph node assay	局部淋巴結試驗
LOAEL	Lowest observed adverse effect level	最低觀察到不良作用劑量
LOEC	Lowest observed effect concentration	最低可觀察到效應濃度
log K _{ow} /log P	Logarithm of 1-octanol water partition coefficient	辛醇-水分配係數
MAD	Mutual acceptance of data	數據相互接受
MOA	Mode of action	作用模式
MTD	Maximal tolerance dose	最大耐受劑量
NAMs	New approach methodologies	新測試方法學
NC3Rs	The national centre for the three rs	(英國) 國家 3Rs 中心
NIA	Nanotechnology industries association	奈米技術產業協會
NIC	National institute of chemistry slovenia	斯洛文尼亞國家化學研究所
NICEATM	National toxicology program interagency center for the evaluation of alternative. Toxicological methods	美國國家毒理學計畫替代毒理學方法評估中心
NIHS	National institute of health sciences	美國衛生研究院
NOAEL	No observed adverse effect level	未觀察到不良作用劑量
NOEC	No observed effect concentration	未觀察到效應濃度
NRC	National research council	美國國家科學研究委員會
NTP	National toxicology program	美國國家毒物計畫
OD	Optical density	吸光值
OECD	Organization for economic co-operation and development	經濟合作暨發展組織
OPPT	The office of pollution prevention and toxics	污染預防與毒性物質管制辦公室
PNEC	Predicted no effect concentration	推導無效應濃度
QMRF	Qsar model reporting format	定量結構活性關係模型報告格式
QSAR	Quantitative structure activity relationships	定量結構活性關係
REACH	Regulation, evaluation and authorization of chemicals	化學品註冊、評估、許可和限制法規
RhCE	Reconstructed human cornea-like epithelium	重建人類角膜樣上皮
RHE	Reconstructed human epidermis	人類重組上皮

英文縮寫	英文全名	中文全名
RTG	Relative total growth	相對總生長率
SAR	Structure-activity relationship	結構活性關係
SCCS	Scientific committee on consumer safety	歐洲消費者安全科學委員會
SDS	Safety data sheet	安全資料表
SEURAT	Safety evaluation ultimately replacing animal testing	動物實驗安全替代方案
SI	Simulation index	刺激指數
SIDS	Screening information data set	篩選資訊數據集
SNUN	Significant new use notice	重要新用途通知
SNUR	Significant new uses rule	重要新使用規則
STOT RE	Specific target organ toxicity repeated exposure	特定標的器官毒性重覆暴露
SWCNT	Single wall carbon nanotube	單壁奈米碳管
TER	Transcutaneous electrical resistance	經皮電阻
T.E.S.T.	Toxicity estimation software tool	毒性預測軟體工具
TG	Testing guidelines	測試規範
TK	Thymidine kinase	胸腺嘧啶核苷激酶
TSCA	Toxic substances control act	有毒物質控制法案
Tox 21	Toxicity testing in the 21st century: a vision and a strategy	21 世紀毒性測試願景
ToxCast	Toxicity forecaster program	毒性預測計畫
UDP	Up-and-down procedure	上下增減劑量法
UFAW	Universities federation for animal welfare	動物福利大學聯盟
UVCBs	Unknown or variable composition, complex reaction products and biological materials	成分未知或可變的物質、複雜的反應產物和生物材料
WHO	World health organization	世界衛生組織
WNT	Working group of national coordinators for the oecd test guideline program	經濟合作暨發展組織測試指引計畫國家協調員工作組
WOE	Weight of evidence	證據權重法
WPMN	Working party on manufactured nanomaterials	工程奈米工作小組
WSSD	World summit on sustainable development	永續發展世界高峰會議
XPRT	Xanthineguanine phosphoribosyl transferase	黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶

報告大綱

本報告共七章，分為前言、計畫相關背景資料、導入國際化學品新興替代測試方法、以替代測試方法完備我國化學物質登錄所需之毒理及生態毒理資訊、評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性、經濟效益分析、結論與建議等章節。

第一章為前言，說明計畫各項基本資料與計畫執行概況，包含計畫緣起、計畫目標、工作項目與內容、工作執行進度與計畫執行成果摘要。

第二章計畫為相關背景資料，首先說明動物替代測試發展之國際現況，包含動物替代、減量與精緻化（優化）的原則簡介、國際對於 3Rs 精神與實際作為的四大發展進程，以及世界各國 3Rs 中心執行目標及運作準則；其次為國內動物替代測試發展，包含各部會相關法規及應用現況、替代測試在化學物質管理扮演的角色及登錄資訊繳交原則；最後說明國際奈米物質管理現況，包含歐盟以化學品註冊、評估、許可和限制法規(Regulation, Evaluation and Authorization of Chemicals, REACH)為核心的奈米安全管理，及國際組織對奈米物質安全性評估及標準化的現況摘要。

第三章為導入國際化學品新興替代測試方法，首先說明動物替代測試發展之國際趨勢，包含國際多元化資料繳交策略、毒理及生態毒理資訊及測試指引發展現況；其次蒐羅國際認可之替代測試方法清單，及國內目前已採納之替代測試方法，研析我國替代測試方法適用範疇，提出優先採納清單並研擬化學物質登錄指引修正建議；接續蒐研奈米物質在毒理及生態毒理替代測試發展現況，並提出相關指引修正建議；最終預擬替代測試發展藍圖與跨部會合作之相關建議。

第四章為以替代測試方法完備我國化學物質登錄所需之毒理及生態毒理資訊，首先簡介電腦模擬模式，包含定量結構活性關係之發展沿革、使用範圍及國際驗證 5 大原則；其次選定化學物質、測試終點及使用模式以進行電腦模擬及體外測試，同時擬定電腦模擬驗證流程並研析毒理及生態毒理之模擬結果；最後利用模型驗證所得資訊，評估以體外試驗結合定量結構活性關係來篩選預測生態毒性之成果及效能。

第五章為評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性，首先簡介化學品分類及標示全球調和制度，包含國際將替代測試方法應用於化學品全球調和制度及奈米物質分級分類的發展；其次介紹中華民國國家標準(CNS) 15030，進一步比較我國國家標準分類與國際標準分類之差異性；最終提出替代測試方法於化學物質危害分級分類之適用性建議。

第六章為計畫經濟效益分析，說明本年度工作執行成果產生之經濟效益。

第七章為結論與建議，說明本年度工作執行成果並研析歸納重要結論與建議。

行政院環境保護署毒物及化學物質局計畫成果中英文摘要 (詳細版)

計畫名稱：整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試應用支援計畫

計畫編號：110A012

計畫執行單位：瑞昶科技股份有限公司

計畫主持人（包括共同主持人）：陳柏霖、王應然、侯文哲

計畫期程：110 年 2 月 23 日起 110 年 11 月 30 日止

計畫經費：肆佰貳拾肆萬伍仟元整

摘要

本年度蒐集國際組織認可之替代測試方法、奈米物質化學品登錄資訊及替代測試方法之最新進展，建立 1 式優先採納替代測試方法清單，包含 3 式建議優先納入的替代測試方法，並提出化學物質登錄指引替代測試方法之修正建議。為達到以替代測試方法完備我國化學物質登錄所需毒理及生態毒理資訊之目標，以 14 種化學物質（7 種新及 7 種既有化學物質）及不同定量結構活性關係(Quantitative Structure-Activity Relationship, QSAR)模式等替代測試方法，試行毒理及生態毒理項目資料推估。在毒理方面，皮膚過敏性及基因毒性皆具有良好的表現；在生態毒理方面，毒性預測軟體工具(Toxicity Estimation Software Tool, T.E.S.T.)之群體貢獻方法(Group contribution method)及生態結構活性關係(Ecological Structure Activity Relationships, ECOSAR)對既有化學物質魚類水生急毒性預測能力表現良好，故建議規劃為整合型測試評估方法(Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA)之基礎模型。體外測試(*in vitro* assay)部分，本年度完成 7 種化學物質的體外魚類胚胎試驗，並加入其他 13 種已知數據的物質，試行

結合定量結構活性關係及體外試驗之整合型測試策略，結果顯示分級準確率可達 85%。另檢視及評析化學品全球調和制度(Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals, GHS)第 8 版與中華民國國家標準(Chinese National Standards, CNS) 15030 關於替代測試的差異，並提出替代測試方法於化學物質危害分級分類之適用性建議。

In this year, the information about alternative test methods accepted by international organizations, nano-substance registration, and the recent development for alternative test methods was collected and analyzed. According to the information, we established the priority adoption lists of alternative test methods, including 3 recommended protocols. Furthermore, we provided suggestions for revising the guidelines of chemical substances registration. To strengthen the uses of alternative methods in toxicological and eco-toxicological test required by chemical substances registration, quantitative structure-activity relationship (QSAR) models were used to predict the health and environmental hazards of 14 substances (7 new and 7 existing chemical substances). The prediction of all QSAR models we choose for skin sensitization and genotoxicity had good performances. Toxicity estimation software tool (T.E.S.T.) Group contribution method and Ecological structure activity relationships (ECOSAR) models also offered well predictions on classification of acute fish toxicity. In this year, we also confirmed the acute toxicity of 7 substances using Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. To further improve the accuracy of fish acute toxicity prediction, we try to establish the integrated approaches to testing and assessment (IATA) combining the data from the two QSAR models (T.E.S.T. Group contribution method and ECOSAR) with *in vitro* data. The accuracy rate of IATA could reach 85% in selected 20 substances. We also analyzed the difference related with alternative test methods between Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS): 8th Revised Edition and Chinese National Standard (CNS) 15030. The suggestions for applying results of alternative test methods on hazard classification were also provided in this report.

前言

實驗動物應用於科學研究可追溯自 19 世紀末至 20 世紀初，藉由動物試驗取得毒理及生態毒理學數據資訊，可促進生命科學、醫學、農業等領域的進步與發展，進而造福人類與其他生物的健康與福祉。動物試驗在人類科技發展的過程中扮演極為重要的角色並提供巨大的貢獻，但動物試驗之道德爭議及相關議題卻與日俱增。1959 年，William Russell 和 Rex Burch 發表與動物試驗相關之 3Rs 原則，3Rs 分別為取代(Replacement)、減量(Reduction)及精緻化（優化）(Refinement)，自此，世界各國及組織團體逐步接受 3Rs 原則，並依此發展動物替代測試方法，取代不符合 3Rs 原則的傳統動物試驗。

動物替代測試發展至今，實際使用範疇相當廣泛，包含生技製藥、醫療器材、化粧保養品、食品添加劑、生物製劑及農業用藥等，以重組的人類皮膚或仿生皮膚等動物替代方法作為化粧品替代測試為例，歐盟於 2013 年頒布化粧品動物試驗禁令，正式禁止所有化粧保養品使用動物試驗，若違反禁令則不得於歐盟銷售；另根據美國聯邦食品、藥品及化粧品法的規定，雖未全面禁止動物測試，但仍建議使用經科學驗證之替代測試方法。而我國則是第 1 個禁止化粧品使用動物試驗的亞洲國家，根據化粧品衛生安全管理法規定，自 2019 年 11 月 9 日起，化粧品或化粧品成分之安全性評估，不得使用動物作為測試對象。

迄今許多化學物質之毒理學及生態毒理學數據仍須仰賴動物試驗才能取得，為解決道德及動物福祉等爭議議題，使用符合 3Rs 原則之替代測試方法取代傳統動物試驗，不但可克服動物試驗相關的缺點外，也可避免與排除不符合道德或具有爭議的實驗過程。

執行方法

一、導入國際化學品新興替代測試方法

- (一) 蒐羅先進國家組織，如歐洲化學總署(European Chemicals Agency, ECHA)、歐盟替代方法驗證中心、美國環保署認可之化學品及奈米物質毒理和生態毒理登錄資訊新興替代測試方法應用現況。

- (二) 評估替代測試方法之適用性，據以研析替代測試方法與化學物質毒理及生態毒理資料之相容性，研擬我國優先採納替代測試方法清單，並提出我國化學物質登錄指引替代測試方法之修正建議。

二、以替代測試方法完備我國化學物質登錄所需之毒理及生態毒理資訊

- (一) 使用生態毒理學常用之物質分類方法篩選目標化學物質，以定量結構活性關係模型進行毒理及生態毒理預測，推估毒理和生態毒理性質。
- (二) 透過結合體外試驗和定量結構活性關係，整合成整合型測試評估方法，推估生態毒理項目之毒性，再藉由斑馬魚胚胎急毒性試驗進一步驗證，藉以篩選預測生態毒性。
- (三) 據此建立替代測試 QSAR 模型評估工具及整合型測試評估方法之作業範例，提出以體外試驗結合定量結構活性關係篩選預測生態毒性之效能評估。

三、評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性

研析第 8 版 GHS 及我國現行 CNS 15030 化學品分類及標示之相關發展，研討 GHS 與中華民國國家標準分類於替代測試方法之差異。

結果

一、導入國際化學品新興替代測試方法

- (一) 蒐集分析先進國家或國際組織對化學品和奈米物質認可之替代測試方法，擬定優先採納方法清單，研析 3T3 中性紅細胞毒性試驗、細胞傳感器微生理計體外試驗方法、BALB/c 3T3 細胞轉化體外試驗，以強化替代測試的使用。
- (二) 蒐集更新國際奈米物質發展，包含 ECHA 註冊相關指引資訊、經濟合作暨發展組織(Organization for Economic Co-Operation and Development, OECD)與國際標準化組織(International Organization for Standardization, ISO)對於奈米物質安全性評估文件及相關技術報告。

二、以替代測試方法完備我國化學物質登錄所需之毒理及生態毒理資訊

- (一) 相較於化學物質登錄之毒理資訊，生態毒理數據較為匱乏，因此針對生態毒理進行探討，研析歐盟魚類短期及長期毒性和生物蓄積性的資訊要求及最新發展策略。
- (二) 以定量結構活性關係模式等替代測試方法，試行毒理及生態毒理項目資料推估及驗證及整合型策略替代測試方法，提出結合定量結構活性關係及體外魚類胚胎試驗之整合型測試策略及適用性建議。

三、評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性

GHS 第 8 版修訂版中強調動物替代測試在化學物質對皮膚和眼睛危害分類上的重要性，利用分層方式對化學品進行危害分類，以現有人類和動物數據構成最高層，其次是體外 / 離體數據和其他現有動物數據。

結論

- 一、3T3 中性紅細胞毒性試驗、細胞傳感器微生理計體外試驗及 BALB/c3T3 細胞轉化體外試驗方法，目前已被歐盟替代方法驗證中心及美國環保署驗證和接受。3T3 中性紅細胞毒性試驗為吞食急毒性之體外測試方法，可用於評估進行動物實驗的必要性；眼睛刺激性雖有體外測試方法，但實務上不易執行且費用昂貴，納入其他國際認證的體外測試方法可使登錄人在非動物試驗的選擇更多元，建議納入細胞傳感器微生理計體外試驗；致癌性測試需耗費大量時間、金錢及試驗動物，建議納入 BALB/c3T3 細胞轉化試驗作為評估資訊。
- 二、以不同 QSAR 模式完成 14 種選定之化學物質毒理及生態毒理效應數值推估。毒理測試終點部分，皮膚過敏性(72.73%~85.71%)及基因毒性(90.91%~100.00%)對 14 種化學物質皆有良好的預測表現。在生態毒理部分，T.E.S.T. Group contribution method 及 ECOSAR 在魚類水生急毒性中有高達 85.71%的分級準確率。

- 三、建立符合動物福祉的整合型測試評估方法(IATA)，物質危害判斷原則如下：(1) ECOSAR 及 T.E.S.T. Group contribution method 所預測的 LC_{50} 皆大於 100 mg/L 時，判斷為低毒性物質；(2) 若 2 種 QSAR 模式皆預測 LC_{50} 小於 100 mg/L 時，以 ECOSAR 分類法進行分類，屬於酚類、脂肪胺類及酯類的物質進行胚胎急毒性實驗，其他則進行傳統魚類試驗；(3) 若 2 種 QSAR 模式預測不一致時，直接使用 ECOSAR 分類法以判斷所需執行的測試種類。以此 IATA 預測 20 種化學物質的毒性，與單一成魚實驗值相比，分級吻合度為 85%。
- 四、GHS 第 8 版修訂中強調替代測試在化學品對皮膚和眼睛危害分類上的重要性，將已驗證可行之替代測試方法調整至分層更高處，若我國化學物質危害分級依循 GHS 第 8 版的分類原則，將可大幅提高替代測試的利用率。

建議事項

- 一、建議後續可將 3T3 中性紅細胞毒性試驗、細胞傳感器微生理計體外試驗方法及 BALB/c3T3 細胞轉化體外試驗納入優先採納之替代測試方法清單。
- 二、應持續積極參與我國 3R 中心建立之相關會議，滾動修正推動策略及跨部會合作機制。替代測試資訊整合方面，建議逐步盤點已繳交之既有化學物質標準登錄資訊，研析替代測試資料繳交狀況，綜整供相關部會參考。
- 三、建議規劃體外替代測試繳交方法撰寫指引，尤其著重於毒性及關注化學物質管理法規費收費標準所列之指定項目，以替代測試繳交皮膚刺激性／腐蝕性及眼睛刺激性，強化登錄人以替代測試進行繳交的意願。另建議持續關注 GHS 更新，摘錄其替代測試精神，持續增進我國替代測試的接受度。
- 四、許多替代測試方法的單一數據無法取代動物試驗，但能成為證據權重的一環，故應持續評估國際接受的整合型測試評估方法(IATA)，相關策略及精神可逐步納入指引中進一步說明，鼓勵登錄人在進行動物試驗

前，可藉由適合的判斷流程進行毒性篩選，有效提高資訊填補效率，並達到減少動物使用之目的。

- 五、T.E.S.T. Group contribution method 及 ECOSAR 對於既有化學物質的魚類水生急毒性預測能力表現良好，且經由適用性之檢驗，T.E.S.T. Group contribution method 的外部驗證參數(R_{PD}^2)為 0.686，高於標準的 0.6；ECOSAR 的外部驗證參數(R^2)介於 0.7915~0.9312 之間，高於標準的 0.7，建議可列為 IATA 之基礎模型之一。
- 六、IATA 方法經判斷適用於 ECOSAR 分類法中酚類、脂肪胺類及酯類物質，但對於苯甲醇類及醛類等類別的物質，因本年度樣本數不足而無法建立回歸關係。除中性有機物因分類邏輯不同而初步排除，應持續蒐集其他類別物質之斑馬魚成魚及胚胎的急毒性數據，以擴充 IATA 適用範圍。
- 七、奈米物質的危害分類在 GHS 尚未被明確規範，且相關的常規和替代方法仍待進一步驗證和研究，國際間並無統一的評估策略。建議可持續觀察歐盟或美國對奈米物質的標準測試和替代方法規定，逐步調整我國奈米物質的評估方法。

第一章 前言

章節摘要

本章說明各項基本資料與計畫執行概況，包含計畫緣起、計畫目標、委辦執行工作項目與內容、目前計畫執行進度概況，與計畫執行成果摘要概述。

1.1 計畫緣起

實驗動物應用於科學研究可追溯自 19 世紀末、20 世紀初，藉由動物試驗取得毒理及生態毒理學數據資訊，可促進生命科學、醫學、農業等領域的進步與發展，進而造福人類與其他生物的健康與福祉。由此窺知，動物試驗在人類科技發展的過程中扮演極為重要的角色並提供巨大的貢獻，但動物試驗之道德爭議及相關議題卻與日俱增。1959 年，William Russell 和 Rex Burch 發表與動物試驗相關之 3Rs（Replacement, Reduction, and Refinement）原則，3Rs 分別為取代（Replacement）、減量（Reduction）及精緻化（優化）（Refinement），自此，世界各國及組織團體逐步接受 3Rs 原則並依此發展動物替代測試方法來取代不符合 3Rs 原則的傳統動物試驗。

符合 3Rs 原則的動物替代測試發展至今已 60 餘年，期間經歷 4 個重要階段，分別為萌芽期、茁壯期、成熟期及轉變期，萌芽期間世界各國陸續知悉 3Rs 原則並探究其原理；茁壯期間許多國家及組織團體紛紛接受 3Rs 原則，實際執行並協助推廣替代測試理念，經濟合作暨發展組織（Organization for Economic Co-operation and Development, OECD）亦於此階段開始發布實驗室動物體內毒性試驗之測試規範（Testing Guidelines, TG）；成熟期間參與替代測試發展的國家已遍布歐洲、美洲及亞洲，於此階段共有 14 個 3Rs 中心成立，且第一屆世界生命科學替代及動物使用大會也正式召開，使動物替代測試發展遍及全球；轉變期的重要轉捩點為美國國家科學研究委員會（National Research Council, NRC）於 2007 年發表《21 世紀毒性測試：願景和策略》，該研究委員會提出極為新穎的替代測試模式，使以 3Rs 原則為基礎之動物替代試驗進入另一個嶄新的局面。

動物替代測試發展至今，實際使用範疇相當廣泛，包含生技製藥、醫療器材、化粧保養品、食品添加劑、生物製劑及農業用藥等，以重組的人類皮膚或仿生皮膚等動物替代方法作為化粧品替代測試為例，歐盟於 2013 年頒布化粧品動物試驗禁令，正式禁止所有化粧保養品使用動物試驗，若違反禁令則不得於歐盟銷售；另根據美國聯邦食品、藥品及化粧品法的規定，雖未全面禁止動物測試，但仍建議使用經科學驗證之替代測試方法；而我國則是第 1 個禁止化粧品使用動物試驗的亞洲國家，根據化粧品衛生安全管理法規定，自 2019 年 11 月 9 日起，化粧品或化粧品成分之安全性評估，不得使用動物作為測試對象。

除上述列舉各種使用範疇外，用途極為廣泛的化學物質也是替代測試所適用之對象，隨著化學工業的發展及新合成技術的開發，化學物質的合成難度下降，目前於美國化學學會轄下組織化學文摘社（Chemical Abstracts Service, CAS）所登錄之有機及無機化學物質數量多達約一億七千四百萬餘種。各種化學物質在日常生活中廣受應用，並能為人類帶來便利，但卻難以避免透過攝食、吸入或皮膚接觸等各種暴露途徑面臨化學物質所帶來的威脅。雖然許多化學物質是無害的，甚至是有益的，但其中仍有些物質會對人體健康和生態環境構成極大危害，部分長期流行病學研究已陸續證實環境因子實為造成人體健康危害或誘發產生癌症之主要原因。

鑒於生活周遭所充斥大量化學物質為環境風險危害之主要來源，因此近年來聯合國世界衛生組織與各先進國家均努力透過加強化學物質管理以減少或消弭環境中化學物質對人體健康之影響。聯合國於 2003 年完成第 1 版《化學品分類及標示全球調和制度》（Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS），主要目的是確認化學物質或混合物的本質危害，並傳遞相關危害訊息，進而保護人類健康與環境的技術性文件。化學品分類及標示全球調和制度定義化學品的物理性危害、健康危害和環境危害，建立相關危害性分類標準。使用人可藉由標準並以適當數據進行化學品危險性分類，並製作及傳遞化學品標示和安全資料，降低化學品對人體健康可能的危害。

基於化學物質的管理，許多毒理及生態毒理數據仍須仰賴動物試驗才得以取得，但為解決道德及動物福祉等爭議議題，使用符合 3Rs 原則之替代測試方法取代傳統動物試驗，不但可克服動物試驗相關的缺點外，也儘可能地避免與排除不

符合道德或具有爭議的實驗過程。歐洲化學總署（European Chemicals Agency, ECHA）於關於化學品註冊、評估、許可和限制法規（Regulation, Evaluation and Authorization of Chemicals, REACH）、歐盟殺生物劑產品法規（Biocidal Products Regulation, BPR）及物質分類、標示與包裝法規（Classification, Labelling and Packaging, CLP）中均規範脊椎動物相關試驗應當是作為最後的選擇，並應儘可能考量使用非動物方法來滿足所需要的訊息，而根據 ECHA 於 2020 年 6 月發布「REACH 法規使用替代測試方法的現況」（The use of alternatives to testing on animals for REACH），闡述業者使用替代測試方法的情況，統計 12,000 筆的登錄資料中顯示，業者已大量應用替代測試方法來進行資訊填補。此外美國環保署亦制定策略計畫（Strategic Plan）發展與實施替代測試方法，提供與脊椎動物同等或更好的科學品質數據，以評估化學物質或混合物對健康或環境造成之危害風險。

我國於 102 年起將化學物質資料登錄制度納入毒性及關注化學物質管理法（以下簡稱毒管法），並於 103 年起發布「新化學物質及既有化學物質資料登錄辦法」（以下簡稱登錄辦法），希冀透過化學物質源頭登錄管理，以避免化學物質對於環境之衝擊並確保工作者於作業環境中能夠具備適當的安全衛生設備及採取必要之防護措施。鑒於國外先進國家或管理組織均致力於發展及應用以 3Rs 原則之動物替代測試方法，我國也應跟隨世界先進國家之趨勢，將替代測試方法應用於毒理及生態毒理資訊的繳交及危害分級，以符合動物福祉的精神來評估及分類化學物質的危害層級。

雖然應用替代測試方法是目前國際趨勢，但現階段仍有許多替代測試方法正在驗證或尚未通過完整驗證，且部分替代測試方法的單一數據無法完整替代動物試驗，通常需要使用 2 種以上不同的替代測試結果來提供更完備的證據，而整合型測試策略及證據權重法則可在具備充足證據的條件下，進行更有效益的替代測試方案評估。OECD 已公告應使用體外試驗的整合型測試評估方法（Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA）指導文件，提供化學物質利用體外試驗進行化學品分類及標示全球調和制度分類或各國法規分類之規範，因此我國需因應國情選擇測試效能較佳及國內具測試量能之替代測試進行推廣及發展，並進一步將替代測試方法及整合型測試策略測試結果進行適當調適後來分類化學品危害層級，以增進國內替代測試及整合型測試策略之適宜性。

爰此，環保署規劃整合適宜我國國情之化學品動物替代測試及發展新興替代測試方法，導入國際最新化學品新興替代測試方法，並藉由驗證定量結構活性關係（Quantitative Structure Activity Relationships, QSAR）及結合定量結構活性關係和體外測試（*in vitro*）方法的整合型測試策略（IATA），發展適合我國的毒理及生態毒理替代測試方法與奈米物質測試方法，另亦透過蒐研及檢視最新版化學品分類及標示全球調和制度與中華民國國家標準（Chinese National Standards, CNS）15030 方法之差異，據以評估和調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性，以完備我國化學物質登錄所需之毒理及生態毒理資訊。希冀汲取國外先進國家或管理組織發展毒理替代測試之經驗，加速化學物質登錄替代測試方法相關作業進展，以作為我國推動替代測試方法政策之基礎。

1.2 計畫目標

1. 導入國際化學品新興替代測試方法。
2. 以替代測試方法完備我國化學物質登錄所需之毒理及生態毒理資訊。
3. 評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性。
4. 研提執行成果之經濟效益分析。

1.3 工作項目與內容

一、導入國際化學品新興替代測試方法

1. 蒐研國際化學品（含奈米物質）替代測試最新進展，建立優先採納之替代測試方法清單。
2. 提出我國化學物質登錄指引替代測試方法之修正建議。

二、以替代測試方法完備我國化學物質登錄所需之毒理及生態毒理資訊

1. 選定 5 種化學物質，以電腦模擬等替代測試方法試行毒理及生態毒理項目資料推估。
2. 以 1 項生態毒理項目為例，提出以體外試驗結合定量結構活性關係（Quantitative Structure Activity Relationships, QSAR）篩選預測生態毒性之效能評估。

三、評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性

- 檢視最新版化學品全球調和制度（Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS）與我國國家標準分類之差異，研提以替代測試方法進行危害分級分類之原則或必需資訊。

四、提出本計畫執行成果之經濟效益分析

1.4 工作執行流程與方法

計畫主要工作項目包含協助導入國際化學品新興替代測試方法、以替代測試方法完備我國化學物質登錄所需之毒理及生態毒理資訊、評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性並提出執行成果經濟效益分析。計畫執行方式與構想及執行流程如圖 1.4-1。

一、導入國際化學品新興替代測試方法

蒐羅先進國家及組織，如 ECHA、歐盟替代方法驗證中心、美國環保署，認可之化學品及奈米物質毒理和生態毒理登錄資訊新興替代測試方法應用現況，進一步評估替代測試方法之適用性，據以研析替代測試方法與化學物質毒理及生態毒理資料之相容性，並研擬我國優先採納替代測試方法清單及我國化學物質登錄指引替代測試方法之修正建議。

二、以替代測試方法完備我國化學物質登錄所需之毒理及生態毒理資訊

以定量結構活性關係（QSAR）模型進行毒理及生態毒理預測，利用常見的 QSAR 模型，如 Danish QSAR Database、生態結構活性關係(Ecological structure activity relationships, ECOSAR)、毒性預測軟體工具 (Toxicity estimation software tool, T.E.S.T.)與全球架構化學物質性質評估虛擬模型 (Virtual models for property Evaluation of chemicals within a Global Architecture, VEGA)，推估毒理和生態毒理性質，並結合體外試驗和定量結構活性關係，整合成整合型測試評估方法，以定量結構活性關係及斑馬魚胚胎急毒性試驗進一步驗證，據此建立替代測試 QSAR 模型評估工具及整合型測試評估方法之作業範例。



政策規劃建議

圖 1.4-1 計畫執行流程

三、評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性

研析最新版本 GHS 第 8 版及我國現行 CNS 15030 化學品分類及標示之差異，研提以替代測試方法進行危害分級分類之原則或必需資訊，據此評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性。

四、提出執行成果經濟效益分析

發展及應用動物替代測試方法是國際共同趨勢，因此選擇國內推動替代測試方法項目的優先順序應考量替代測試方法的確效性及測試效率為優先排序之依據。研析替代測試方法與傳統試驗之經濟效能，藉以評估替代測試方法於國內發展之合宜性，以利探討相關技術方法於國內運用採行之可行性與發展方向。

1.5 工作組織與計畫分工

依計畫訂定之工作項目，由瑞昶公司陳柏霖博士擔任計畫主持人，分別指派負責且勝任之人員執行各分項工作，團隊主要成員學經歷與專長如表 1.5-1。

一、評估替代測試方法發展組

蒐集國際及國內替代測試方法發展之現況，研析國際替代測試方法之最新資訊，分析國內替代測試發展之完整性及適宜性，綜整提出檢討及建議。

二、分級分類制度之替代測試方法組

彙整化學品全球調和制度與中華民國國家標準分類之概況，蒐集替代測試方法應用於化學品全球調和制度之國際現況，整合後提出建議及適用性。

三、替代測試方法之驗證研究組

驗證生態毒理替代測試方法之可行性，以電腦模擬、體外測試等替代方法試行生態毒理項目資料推估，據以提出替代測試方法之適用性建議，完備我國化學物質登錄所需之毒理及生態毒理資訊。

四、計畫協調及行政支援小組

處理行政作業、橫向聯繫及彙整資料等協調事項，成員分別具備毒理學、生態毒理學、環境工程、化學儀器操作及登錄資料管理相關專長及經驗。

表 1.5-1 主要參與人員學經歷一覽表

參與人員	學經歷	專業年資	計畫分工	專 長
計畫主持人、協同主持人及計畫協調				
陳柏霖	臺灣大學毒理學研究所博士 食品藥物管理署研發替代役	13	計畫主持人	● 化學物質危害性評估 ● 食品安全性評估 ● 食品有害大分子檢驗
王應然	國立臺灣大學生化學暨分子生物學研究所博士 國立成功大學工業衛生學科暨環境醫學研究所教授	26	計畫協同主持人	● 環境毒物學 ● 放射治療合併化學治療 ● 環境毒物的分子機轉 ● 癌症化學預防及治療
侯文哲	美國普渡大學土木工程博士 國立成功大學環境工程學系副教授	11	計畫協同主持人	● 環境化學 ● 新興污染物 ● 奈米細胞界面交互作用 ● 永續奈米科技
蔡昀達	臺灣師範大學化學所博士	6	計畫協調	● 有機無機物合成與純化 ● 化學儀器操作圖譜分析
瑞昶公司參與人員資歷與配置				
陳慎德	臺灣大學環境工程學研究所碩士 環境工程技師	26	計畫協調及行政支援小組	● 專案管理 ● 環境影響評估 ● 污染整治系統規劃
洪偉毅	中原大學化學系博士 中央研究院博士後研究員 中國北京大學交換學生	15	計畫協調及行政支援小組	● 有機小分子與高分子應用 ● 化學儀器圖譜分析 ● 化學物質登錄資料管理
張庭皓	國立中山大學化學系碩士	4	計畫協調及行政支援小組	● 化學檢驗儀器分析 ● 化學物質安全性評估
卓秋敏	瑞昶科技行政助理	15	行政庶務協助	● 行政工作
成功大學王應然及侯文哲教授研究室參與人員資歷與配置				
曾家琪	國立成功大學環醫所行政助理 國立成功大學台灣文學研究所碩士	8	替代測試方法專任研究助理	● 奈米研究資料蒐集分析
史育璇	國立成功大學食品安全衛生暨風險管理研究所碩士	4	替代測試方法專任研究助理	● 奈米毒理學
陳姿羽	國立成功大學工業衛生學科暨環境醫學研究所（博班生） 國立成功大學生理學科暨研究所碩士	5	替代測試方法兼任研究助理	● 生理學 ● 奈米毒理學/神經毒理學 ● 分子生物學/細胞生物學
陳怡靜	國立成功大學工業衛生學科暨環境醫學研究所（碩班生）	3	替代測試方法兼任研究助理	● 奈米毒理學 ● 生物化學
林俐君	國立成功大學工業衛生學科暨環境醫學研究所（碩班生）	3	替代測試方法兼任研究助理	● 細胞生物學 ● 毒理學
李子寧	國立成功大學工業衛生學科暨環境醫學研究所（碩班生）	2	替代測試方法兼任研究助理	● 奈米毒理學 ● QSAR 預測模型分析

1.6 工作執行進度

工作期程自 110 年 2 月 23 日起至 110 年 11 月 30 日止共計 10 個月，實際進度及查核點說明如表 1.6-1 及表 1.6-2。

另為落實執行品質與進度控管，除召開前述查核點之審查會議外，另不定期配合工作需求召開會議及定期舉辦內部團隊工作會議，藉由會議討論、溝通與協商，適時調整計畫執行方向，包含於 110 年 4 月 14 日參與「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試應用支援計畫」專家諮詢會、110 年 5 月 7 日參與「化學物質登錄之替代測試量能發展專家學者諮詢會議」、110 年 6 月 16 日參與中華動物研究學會舉辦之替代測試研討會，及 110 年 9 月 16 日參與建構生醫產業動物替代體系及開發關鍵技術期中分享會。

表 1.6-1 計畫工作期程 (1/2)

工作內容項目	月次	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	年別	110										
	月份	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
一、決標與計畫工作準備												
二、導入國際化學品新興替代測試方法												
2.1 蒐集並更新先進國家或國際組織認可之替代測試方法，並建立 1 式優先採納替代測試方法清單。												
2.2 蒐研奈米物質化學品登錄資訊及替代測試方法之最新進展												
2.3 提出化學物質（含奈米物質）登錄指引替代測試方法之修正建議												
三、以替代測試方法完備我國化學物質登錄所需之毒理及生態毒理資訊												
3.1 以定量結構活性關係模式等替代測試試行 5 種化學物質之毒理及生態毒理推估及驗證												
3.2 以 5 種化學物質，試行驗證整合型測試策略												
四、評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性												
4.1 檢視及評析最新版化學品分類及標示全球調和制度與中華民國國家標準方法之發展												
4.2 評估替代測試與現行分級分類制度之相容性並擬適用性建議												
五、本計畫執行成果經濟效益分析												
5.1 研析替代測試方法與動物試驗經濟效能差異												
六、期末報告定稿及成果報告												
七、臨時需求												
八、進度報告												
			第一次進度報告▲			期中報告▲			期末報告初稿▲		成果報告▲	
預定進度累積百分比 (%)	---	6.4	16.8	27.2	38.9	50.6	62.4	70.8	85.2	96.6	100	

表 1.6-1 計畫工作期程（2/2）

查核點	預定完成時間	查核點內容說明
第一次 進度報告	110 年 4 月 30 日	1. 蒐集並更新先進國家或國際組織認可之替代測試方法。 2. 蒐研奈米物質化學品登錄資訊及替代測試方法之最新進展。 3. 至少選定 2 種化學物質以定量結構活性關係模式等替代測試方法，試行毒理及生態毒理項目資料推估。
期中報告	110 年 7 月 31 日	1. 建立 1 式優先採納替代測試方法清單。 2. 檢視及評析最新版化學品分類及標示全球調和制度與中華民國國家標準方法之發展。 3. 至少選定 3 種（累計 5 種）化學物質以定量結構活性關係模式等替代測試方法，試行毒理及生態毒理項目資料推估及驗證。
期末報告	110 年 10 月 15 日	1. 研擬化學物質（含奈米物質）登錄指引替代測試方法之修正建議。 2. 建立整合型測試策略替代測試方法，並以 5 種化學物質至少 1 種生態毒理項目為例，提出結合定量結構活性關係及體外試驗之整合型測試策略及適用性建議。 3. 評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性，並研擬替代測試方法應用於危害分級分類之適用性建議。 4. 研析替代測試方法與傳統動物試驗之經濟效能差異。 5. 完成計畫期末報告（初稿）。
成果報告	110 年 11 月 30 日	1. 完成計畫所有工作項目。 2. 完成計畫成果報告。

表 1.6-2 實際進度及查核重點說明 (1/2)

契約書之預定進度累積百分比 (%)		100		實際執行進度 (%)				100	
工作內容項目		工作比重	實際執行情形	預計完成日期	分項進度	整體進度	是否符合	不符合原因及檢討對策	預計改善完成日期
一、導入國際化學品新興替代測試方法	1. 蒐集並更新先進國家或國際組織認可之替代測試方法，並建立 1 式優先採納替代測試方法清單。	25%	已完成蒐集並更新國際替代測試方法，並建立 1 式優先採納清單，建議 3 種替代測試可優先評估納入指引。	110.7.30	100%	25%	符合	—	—
	2. 蒐研奈米物質化學品登錄資訊及替代測試方法之最新進展。	5%	已完成蒐研奈米物質登錄資訊及替代測試方法之最新進展。	110.4.30	100%	5%	符合	—	—
	3. 提出化學物質（含奈米物質）登錄指引替代測試方法之修正建議。	5%	已提出化學物質（含奈米物質）登錄指引替代測試方法之修正建議。	110.10.15	100%	5%	符合	—	—
二、以替代測試方法完備我國化學物質登錄所需求之毒理及生態毒理資訊	1. 以定量結構活性關係模式等替代測試進行 5 種化學物質之毒理及生態毒理推估及驗證。	25%	已完成 14 種（7 種新及 7 種既有化學物質）化學物質之毒理及生態毒理推估及驗證。	110.7.30	100%	25%	符合	—	—
	2. 以 5 種化學物質，試行驗證整合型測試策略。	20%	已使用 7 種化學物質，試行驗證整合型測試策略。	110.10.15	100%	20%	符合	—	—
三、評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性	1. 檢視及評析最新版化學品分類及標示全球調和制度與中華民國國家標準方法之發展。	5%	已完成檢視及評析 GHS 第 8 版及 CNS 15030 在皮膚及眼睛刺激性替代測試的差異處。	110.9.15	100%	5%	符合	—	—
	2. 評估替代測試與現行分級分類制度之相容性並擬適用性建議。	5%	已評估替代測試與現行分級分類制度之相容性並擬適用性建議。	110.10.15	100%	5%	符合	—	—
四、本計畫執行成果經濟效益分析		3%	已完成計畫執行成果經濟效益分析	110.10.15	100%	3%	符合	—	—
五、期末報告定稿及成果報告		3%	已完成期末報告定稿及成果報告	110.11.30	100%	3%	符合		
六、臨時需求		4%	已完成臨時會議參與及其他行政業務協助	110.11.30	100%	4%	符合		

表 1.6-2 實際進度及查核重點說明 (2/2)

查核點	預定完成時間	實際完成時間	實際執行情形
第一次 進度報告	110 年 4 月 30 日	110 年 4 月 30 日	- 蒐集更新國際認可之替代測試方法表單，並蒐研奈米物質化學品登錄資訊及替代測試方法之最新進展。 - 已完成 2 種化學物質以定量結構活性關係模式等替代測試方法，試行毒理及生態毒理項目資料推估。
期中報告	110 年 7 月 31 日	110 年 7 月 31 日	- 已建立 1 式優先採納替代測試方法清單。 - 已檢視及評析 GSH 第 8 版與 CNS 15030 與替代測試相關的差異處。 - 已完成 14 種化學物質以定量結構活性關係模式等替代測試方法，試行毒理及生態毒理項目資料推估及驗證。
期末報告	110 年 10 月 15 日	110 年 10 月 15 日	- 已提出化學物質（含奈米物質）登錄指引替代測試方法之修正建議。 - 已完成整合型策略替代測試方法，以 5 種化學物質至少 1 種生態毒理項目為例，並提出結合定量結構活性關係及體外試驗之整合型測試策略及適用性建議。 - 已評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性，並提出替代測試方法應用於危害分級分類之適用性建議。 - 已完成替代測試方法與傳統動物試驗之經濟效能差異。 - 已完成計畫期末報告（初稿）。
成果報告	110 年 11 月 30 日	110 年 11 月 30 日	- 已完成計畫所有工作項目。 - 已完成計畫成果報告。

1.7 執行成果摘要

本年度工作主要係延續前期研究成果，茲摘錄前期研究成果如下：

1. 運用包括電腦模擬（EPI Suite 與 QSAR Toolbox）及體外模式（斑馬魚胚胎），驗證結果顯示上述替代測試方法皆能夠良好預測化學品之生態毒性，但針對魚類急毒性而言，目前國際趨勢認為單一的替代測試方法較難完全替代成魚急毒性，因此亦驗證由電腦模擬及斑馬魚胚胎模式所結合的整合型測試策略，證實整合型測試策略可有效提高預測的準確率。
2. 試行使用國際上近年發展之高通量篩選評估工具 ToxPi 預測化學物質之毒性，以 QSAR toolbox 與斑馬魚胚胎模式取得 13 種化學物質之斑馬魚胚胎、藻類、水蚤、魚類（成魚）之急毒性數據與 $\log K_{ow}$ 及溶解度進行生態毒性排序，並與斑馬魚成魚急毒性的實驗結果比較，結果顯示 ToxPi 與實驗值排序結果大致一致，惟有三種化學物質有些許差異，推測其可能原因為資料庫樣本數過少，導致毒性偏差或數據缺失導致毒性低估。

前期結果顯示，僅使用兩種電腦模擬可能不足以涵蓋化學物質登錄所需終點，且國際新興替代測試不斷發展，也須持續蒐集相關資訊。本年度持續導入國際化學品新興替代測試方法，蒐集並更新先進國家或國際組織認可之替代測試方法表單，並針對奈米物質的特殊性，蒐研奈米物質化學品登錄資訊及替代測試方法之最新進展，已建立 1 式優先採納替代測試方法清單，包含 3 式建議優先納入的替代測試方法，並提出化學物質登錄指引替代測試方法之修正建議。為協助以替代測試方法完備我國化學物質登錄所需之毒理及生態毒理資訊，成果報告已完成 14 種化學物質（7 種新及 7 種既有化學物質）以定量結構活性關係模式等替代測試方法，試行毒理及生態毒理項目資料推估，亦已完成包含擴充驗證共計 20 種化學物質在 ECOSAR 分類中斑馬魚胚胎急毒性轉換斑馬魚成魚急毒性的文獻資料收集與轉換公式建立，並依此建構結合定量結構活性關係及斑馬魚胚胎急毒性試驗之整合型測試策略。另已檢視及評析化學品全球調和制度（GSH 8th）第 8 版與中華民國國家標準 15030（CNS 15030）關於替代測試的差異，並評估替代測試與現行分級分類制度之相容性，成果報告研析化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性，並提出替代測試方法於化學物質危害分級分類之適用性建議。同時完成跨部會替代測試合作的前期研究，研析包含健康食品、醫療器材、化粧品、

農藥與環境用藥的替代測試運用情況，同時研析經濟部、衛生福利部及農委會近十年來關於替代測試的研究，完成研析報告一份，預擬替代測試發展藍圖與跨部會合作之前期規劃，並提出未來發展跨部會合作之相關建議。綜整各項計畫工作執行成果摘要說明請參閱表 1.7-1。

表 1.7-1 執行成果摘要

章節	章節摘要
第二章	本章主要說明計畫相關背景資料及奈米物質資訊的更新。2.1 節說明動物替代測試發展及國際現況，2.2 節說明動物替代測試國內現況，2.3 節說明國際奈米物質管理現況，並對相關技術文件或指引調整部分進行更新。
第三章	本章主要說明國際化學品新興替代測試方法。3.1 節說明國際化學物質毒理及生態毒理替代測試發展，已建立 1 式優先採納替代測試方法清單包含 3 式建議優先納入的替代測試方法，並提出化學物質登錄指引替代測試方法之修正建議，3.2 節說明奈米物質毒理及生態毒理替代測試發展，以及 3.3 節說明我國各部會共同推動替代測試方法，完成跨部會替代測試合作前期規劃，並提出建議報告 1 份。
第四章	本章主要說明替代測試方法完備我國化學物質登錄所需之毒理及生態毒理資訊。4.1 節簡介電腦模擬模式，4.2 節為電腦模擬模式試行毒理及生態毒理項目資料推估，已完成 14 種化學物質以定量結構活性關係模式等替代測試方法，試行毒理及生態毒理項目資料推估，4.3 節為 QSAR 模型之驗證所需資訊及範本，4.4 節為體外試驗結合定量結構活性關係篩選預測生態毒性之效能評估，已完成 7 種化學物質進行結合定量結構活性關係及體外試驗之整合型測試策略。
第五章	本章主要說明評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性。5.1 節為替代測試方法應用於化學品分級分類及標示全球調和制度，5.2 節為中華民國國家標準分類，5.3 節為化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性，5.4 節為替代測試方法應用於危害分級分類之適用性建議。

第二章 計畫相關背景資料

章節摘要

本章主要說明相關背景資料及奈米物質資訊的更新。2.1 節說明動物替代測試發展及國際現況，2.2 節說明動物替代測試國內現況，2.3 節說明國際奈米物質管理現況，並對相關技術文件或指引調整部分進行更新。

2.1 動物替代測試發展及國際現況

2.1.1 動物替代測試發展簡介

西元 1954 年，英國動物福利大學聯盟（Universities Federation for Animal Welfare, UFAW）為推廣動物福祉，對採用人道方式進行動物實驗的研究單位給予支持及贊助，同年 10 月，動物及心理學家 William Russell 及微生物學家 Rex Burch 被該聯盟賦予重大任務，主要負責研討並開發以道德角度為前提之動物實驗技術系統，1956 年，William Russell 和 Rex Burch 向聯盟委員會提出一份正式研究報告，隨後以該報告為重要核心價值，經彙整後於 1958 年初完成《人道實驗技術原理》（The Principles Of Human Experimental Technique），並於 1959 年正式發表與動物實驗相關之 3Rs 原則，3Rs 原則包括：

一、替代（replacement）

依據原著之定義，替代是以痛覺作為判定的基本原則，所謂替代是指使用任何無感知的素材進行科學實驗，以替代有意識、具有痛覺的活體脊椎動物。而替代又可二分為絕對（完全）替代及相對（部分）替代，絕對替代即避免使用任何生物進行實驗，實驗替代之素材包含自願受測之人類、組織、細胞、數學計算、電腦模擬或已建立之細胞資料庫，相對替代則是使用被認定為無痛覺之生物，如無脊椎動物、果蠅、線蟲、變形蟲、高等植物或未成熟的脊椎動物，但根據 1986 年英國動物（科學程序）法（Animals (Scientific Procedures) Act）所規範，頭足綱動物如章魚及魷魚也受到該法保護，哺乳動

物、鳥類以及爬蟲類的胎兒或胚胎在其妊娠或孵化期的最後三分之一期間亦受到該法保護，而魚類及兩棲類動物一旦可獨立進食即受到保護，皆不可進行任何動物實驗。

二、減量（reduction）

若無法達到替代的目標，在科學上動物實驗仍必須執行時，則儘可能減少測試所使用的動物數量。William Russell 和 Rex Burch 提供 3 種基本策略及研究方法以達到減量之目的，第 1 是在整個研究領域中必須正確執行實驗策略，第 2 是利用控制實驗中使用動物之間的變異因素，第 3 則是審慎設計實驗流程並擴大分析實驗數據。優化的實驗流程，將可以最少量的動物使用而達到相仿之實驗效率，或在等量的動物使用條件下，儘可能取得最大化的實驗資訊，如此便可減少動物使用之總量。而隨著科技及資訊技術的發展，電腦模擬、數據運算、分析統計及數據庫資源分享的條件下，避免類似的實驗重複進行，亦可達到減量之目的。

三、精緻化（優化）（refinement）

任何使受試動物更舒適的調整方式皆可稱為精緻化（優化），包括飼養照顧過程中提升其生活條件，或是優化實驗過程避免動物焦慮或呈現緊張狀態，例如使用器具移動受測試老鼠取代抓老鼠尾巴的移動方式，根據研究顯示，痛苦、緊張與焦慮會改變動物之行為、生理及免疫狀態，間接導致實驗結果的變化，使該實驗結果之可信度降低，因此精緻化（優化）不但可提升受試動物的心理及健康狀態，在減少疼痛及傷害的條件下更可獲得較高品質之實驗結果，以下列舉可達到精緻化（優化）的實驗技術或方法：非入侵式實驗技術、給予適當之麻醉以減緩痛苦及傷害、訓練動物自願進入實驗程序中、提供動物適宜且舒適之居住、照護及飲食環境。

自 William Russell 和 Rex Burch 完成《人道實驗技術原理》，並於 1959 年正式發表動物實驗之 3Rs 原則以來，已經歷 60 餘年，以 3Rs 原則為起點，逐步引領 21 世紀毒理學的發展，發展進程大致上可分為 4 大階段，萌芽期、茁壯期、成熟期及轉變期，以下將詳細介紹各時期世界各國或組織團體參與動物替代測試之時程及事蹟。

一、萌芽期（1959 年至 1979 年）

1961 年，英國成立人道研究信託基金（Humane Research Trust），該信託基金為第一個支持替代測試科學研究發展的組織，於 1969 年由 Smyth 成立醫學實驗動物替代基金會（The Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments, FRAME），其目的在於尋求更好的動物替代測試方法，首要專注於 3Rs 中的替代部分，並致力於推動相關法案催生，隨後醫學實驗動物替代基金會創建與 3Rs 相關之實驗室動物替代期刊（Alternatives To Laboratory Animals, ATLA）、毒性委員會、動物替代研究計畫及諾丁漢大學的 FRAME 動物替代實驗室。萌芽期階段，以毒理學為基礎之動物替代 3Rs 理念僅在英國被初步實踐，主要原因與當代世界各國毒理學之發展有密切關係，在 3Rs 原則被發表之際，美國（1961）及英國（1979）毒理學學會皆仍未建立，而美國第一本實驗動物護理和使用指引直至 1963 年才問世。

二、茁壯期（1980 年至 1990 年）

經濟合作暨發展組織（OECD）於 1980 年初期已開始發布實驗室動物體內毒性試驗之測試規範（TG）；美國動物試驗替代中心（Center for Alternatives to Animal Testing, CAAT）成立於 1981 年，CAAT-USA 隸屬於約翰霍普金斯大學公共衛生學院，現設有歐洲分部（CAAT-Europe），美國動物試驗替代中心（CAAT）最初由美國化粧品、護理用品及香水協會（Cosmetics, Toiletry and Fragrance Association, CTFA）贊助 100 萬美元而成立；義大利於 1984 年成立體外毒理學協調小組（Coordination Group for *In Vitro* Toxicology），旨在推廣 3Rs 的理念並改善體外毒性測試模型的機制；1986 年英國動物（科學程序）法案通過，該法案具備了 3Rs 的基礎，且醫學實驗動物替代基金會（FRAME）也成為第一屆歐洲替代方法驗證中心（European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM）負責人。

荷蘭於 1987 年成立替代測試平臺（Dutch Platform for Alternatives）；德國於 1989 年由柏林聯邦衛生研究所（Federal Health Institute）建立了動物實驗替代方法文件和評估中心（the Center for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments）為第一個國家動物替代實驗中心；在 1980 年中期，荷蘭、比利時及法國共同建立歐洲毒性測試替代研究小組

(European Research Group for Alternatives in Toxicity Testing)，該小組針對動物替代驗證和監管提出許多重要建議。

於此階段，可具體觀察到歐美各國對 3Rs 原則的關注度大幅提升，《人道實驗技術原理》的引用次數日益漸增，與 3Rs 原則相關之期刊論文也大量被發表，茁壯期 3Rs 理念已推廣至歐洲及北美州，各國政府則陸續成立替代測試相關組織及基金會，且將 3Rs 原則納入法規中，使替代測試逐漸茁壯。

三、成熟期（1990 年至 2007 年）

義大利於 1991 年成立義大利體外毒理協會 (Italian Association for *In Vitro* Toxicology, CELLTOX) 及義大利替代測試方法平臺 (Italian Platform for Alternative Methods, IPAM)，協會成員包含政府機構、學術界、工商業界及動物福利組織，並致力於推動 3Rs 理念；荷蘭國家替代測試中心 (National Centre for Alternatives) 成立於 1994 年並於 2014 年由國家替代測試委員會 (National Committee on Alternatives) 接管；比利時布魯塞爾自由大學與魯汶天主教大學於 1999 年成立替代測試方法平臺 (Belgian Platform for Alternative Methods)，並於 2017 年成立 3Rs 創新中心 (Innovation Centre 3Rs)；1999 年比利時、荷蘭和德國的國家中心宣布創立泛歐共識平臺 (pan-European Consensus Platform)，隨後其他歐洲國家也加入該平臺，並開啟知識共享及聯合研究的合作模式；1999 年西班牙替代測試方法發展網路 (Spanish Network for the Development of Alternative Methods REMA) 成立，該平臺藉由促進替代測試方法的開發、接受和應用，持續與政府管理部門、工商業界以及對於動物替代實驗有興趣之相關組織聯繫。

英國 2004 年成立國家 3Rs 中心 (The National Centre for the Three Rs, NC3Rs) 並迅速與學界及業界合作，持續發展至今；日本替代方法驗證中心 (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM) 成立於 2005 年，是美國衛生研究院 (National Institute of Health Sciences, NIHS) 生物安全研究中心 (Biological Safety Research Center, BSRC) 的分支；法國的胞培養技術十分先進，尤其以皮膚細胞及肝臟細胞模型為最，法國的細胞藥理學會及化粧品公司在此領域的開發及驗證投入相當之心力且具有顯著的成效，法國替代測試平臺 (French platform) 於 2007 年正式成立。

此階段除了與 3Rs 原則相關之期刊論文持續被大量發表之外，成熟期共有 14 個國家成立 3Rs 中心，且參與替代測試發展的國家已遍及歐盟、美洲及亞洲，驗證 3Rs 原則的機制也如火如荼地展開，更重要的是美國動物替代試驗中心(CAAT)於 1993 年召開第一屆世界生命科學替代及動物使用大會(The first World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences)，並以每 2 至 3 年的頻率召開會議持續至今，2021 年 8 至 9 月將於荷蘭召開第 11 次大會，使動物替代測試發展日益成熟。

四、轉變期（2007 年至今）

美國國家科學研究委員會（NRC）於 2007 年提出《21 世紀毒性測試：願景和策略》，為一重要轉捩點，該報告建議以高通量（high-throughput）及電腦運算模式開發檢測基本生物途徑之作用機制（Mode of action），如 DNA 或蛋白質之合成及修復，此類型生物途徑作用機制通常會導致健康危害途徑（Adverse Outcome Pathways, AOPs）產生，基於此框架，測試對象將自動物轉移至人體細胞、組織或器官，並將生物途徑作用機制作為主要觀察標的，藉由體外人體細胞之生物途徑作用機制測試，推測最終之健康危害途徑（AOPs）做為評估依據，現階段包括美國動物試驗替代中心（CAAT）、美國環保署毒性預測計畫（Toxicity Forecaster program, ToxCast）、美國國家研究委員會的 21 世紀毒性測試願景（Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy, Tox 21）及歐盟動物實驗安全替代方案（Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing, SEURAT）皆致力於此新穎技術的研究及發展。

2.1.2 動物替代測試國際現況

一、3Rs 中心

截至 2021 年 6 月，全世界 25 個國家已成立共 49 個 3Rs 中心，尤以歐洲國家為最，多達 17 個國家，相關替代測試組織與驗證中心亦遍布全球（圖 2.1-1），將其列於表 2.1-1，世界各國 3Rs 中心及相關組織與驗證中心的蓬勃發展，主要因為動物替代測試已成為毒理學之重要議題，其涵蓋範疇包含化粧品保養品、食品添加劑、生物製劑、醫療器材、化學物質、農藥、飼料或疫苗等各大領域，因此為跟上世界潮流必須深入瞭解並積極參與其中。

表 2.1-1 國際 3Rs 中心列表 (1/3)

國家	國際 3Rs 中心		
	中文名稱	英文名稱	隸屬單位及創立時間
紐西蘭 澳洲	澳大利亞、紐西蘭研究和教學動物保護委員會	Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching	澳大利亞研究和教學動物保護委員會及紐西蘭政府 阿德萊德大學
加拿大	加拿大動物替代方法中心 加拿大替代方法驗證中心	Canadian Centre for Alternatives to Animal Methods Canadian Centre for the Validation of Alternative Methods (CaCVAM)	溫莎大學 加拿大衛生部
美國	北美 3Rs 合作組織	The North American 3Rs Collaborative	美國 501(c)(3)公共慈善機構
	動物試驗替代品中心	Center for Alternatives to Animal Testing (CAAT)	約翰霍普金斯大學布隆伯格公共衛生學院 (1981)
	動物福利資訊中心	Animal Welfare Information Center	美國農業部
	國家毒理學計畫替代毒理學方法評估跨機構中心	National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM)	美國衛生與公共服務部 (1998)
	替代方法驗證機構協調委員會	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM)	國立環境健康科學研究所 (2000)
巴西	巴西替代方法驗證中心	Brazilian Centre for Validation of Alternative Methods (BraCVAM)	奧斯瓦爾多克魯茲基金會 巴西國家衛生監督局 (2013)
芬蘭	芬蘭替代方法中心	Finnish Centre for Alternative Methods	坦佩雷大學醫學與生命科學學院 (2008/12)
	芬蘭國家替代品共識平臺	Finnish National Consensus Platform for Alternatives	坦佩雷大學醫學與生命科學學院(2003)
挪威	挪威國家共識平臺	Norway's National Consensus Platform	挪威獸醫研究所 (2007/10/10)
瑞典	瑞典 3Rs 中心	Swedish 3Rs Center	瑞典農業委員會 (2017/11)
丹麥	丹麥 3Rs 中心	Danmarks 3Rs-Center	丹麥食品、農業和漁業部 (2013/6)
英國	國家動物研究 3Rs 中心	National Centre for the Three Rs of Animals in Research	英國內政部 3Rs 跨部門小組 (2004/5)
西班牙	西班牙替代方法開發網路	Spanish Network for the Development of Alternative Methods	米格爾埃爾南德斯大學 (1999)
	加泰隆尼亞醫學和生物圖像中心	Comparative Medicine and Bioimage Centre of Catalonia	德國特里亞斯大學醫院
法國	法國動物試驗替代方法發展平臺	French Platform for the Development of Alternative Methods in Animal Testing	法國研究部 法國藥品和健康產品安全局 (2007/7/6)

資料來源：<https://norecopa.no/global3Rs>

表 2.1-1 國際 3Rs 中心列表 (2/3)

國家	國際 3Rs 中心		
	中文名稱	英文名稱	隸屬單位及創立時間
比利時	3Rs 替代品創新中心	Innovation Centre for 3Rs Alternatives	布魯塞爾自由大學 (2017)
	瓦隆替代品共識平臺	Wallonia Consensus Platform for Alternatives	動物福利部 (2015/10)
荷蘭	烏得勒支生命科學 3Rs 中心	3Rs-Centre Utrecht Life Sciences	烏得勒支大學
德國	萊布尼茨替代品研究平臺	Leibniz Alternatives Research Platform	萊布尼茨環境醫學研究所
	替代及減量網路	Replace and Reduce Network	漢諾威醫學院
	動物試驗替代和補充方法虛擬中心	Virtual Centre for Alternative and Complementary Methods to Animal Testing	漢諾威獸醫大學 (2009/1)
	跨學科動物研究 3Rs 中心	Interdisciplinary Centre for 3Rs in Animal Research	基森尤斯圖斯-李比希大學 (2017/10)
	德國促進替代和補充方法以減少動物試驗基金會	SET (Stiftung zur Förderung der Erforschung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zur Einschränkung von Tierversuchen) Foundation	聯邦食品、農業和林業部 (1986/3/21)
	轉化動物研究中心附屬 3Rs 中心	Translational Animal Research Center force 3Rs Center	美因茨約翰內斯古騰堡大學醫學中心轉化動物研究中心
	德國萊茵-內卡 3Rs 中心	3Rs-Center Rhein-Neckar	中央心理健康研究所 曼海姆大學醫學中心 海德堡大學 (2021/1)
	德國圖賓根 3Rs 中心	3Rs Center Tübingen	圖賓根大學醫院 羅伊特林根自然與醫學科學研究所
	歐洲動物試驗替代品中心	Centre of Alternatives to Animal Testing (CAAT-Europe)	康斯坦茨大學
	柏林 3Rs 中心	Charite 3Rs Berlin	夏里特大學醫院 (2018)
	柏林-勃蘭登堡研究平臺	Berlin-Brandenburg Research Platform	德國聯邦教育及研究部 柏林自由大學
	德國實驗動物保護中心	German Centre for the Protection of Laboratory Animals (Bf3Rs) Center for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments (ZEBET) 1989	聯邦風險評估研究所 聯邦食品部和農業部
瑞士	瑞士 3Rs 能力中心	Swiss 3Rs Competence Center	國家研究教育和創新秘書處 國家級重要科學中心 瑞士大學 (2018/3/27)

資料來源：<https://norecopa.no/global3Rs>

表 2.1-1 國際 3Rs 中心列表 (3/3)

國家	國際 3Rs 中心		
	中文名稱	英文名稱	隸屬單位及創立時間
義大利	歐盟參考實驗室-歐洲替代測試方法驗證中心	European Union Reference Laboratory (EURL) European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)	歐盟委員會聯合研究中心
	歐盟替代方法驗證實驗室網路	European Union Network of Laboratories for the Validation of Alternative Methods (EU-NETVAL)	歐盟參考實驗室-歐洲替代測試方法驗證中心
	義大利替代方法平臺	Italian Platform on Alternative Methods (IPAM)	義大利政府 (2003/5/8)
	義大利大學院校間促進 3Rs 教學及研究中心	Italian Inter-university Center for the Promotion of 3Rs Principles in Teaching and Research	比薩大學 熱那亞大學 (2017/12)
捷克	捷克共和國 3Rs 中心	3Rs Centre Czech Republic	布拉格國家公共衛生研究所 毒理學和健康安全中心 (1999)
奧地利	因斯布魯克醫學大學無動物研究中心	Medizinische Universität Innsbruck animalFree Research Cluster	因斯布魯克醫學大學
	促進替代生物模型協會	Gesellschaft zur Förderung von alternativen Biomodellen	格拉茨醫科大學 (2016/1/18)
	歐洲動物試驗替代品協會	European Society for Alternatives to Animal Testing	維也納醫學大學
	倫理與人類-動物研究部門	Unit for Ethics and Human-Animal Studies	維也納梅塞利研究所
匈牙利	匈牙利替代品共識平臺	Hungarian Consensus Platform on Alternatives	匈牙利政府
斯洛伐克	斯洛伐克國家 3Rs 平臺	Slovak National Platform for 3Rs	斯洛伐克共和國農業和農村發展部 (2018/6/21)
羅馬尼亞	羅馬尼亞替代測試方法中心	Romanian Center for Alternative Test Methods	克盧日納波卡農業科學和獸醫大學生命科學研究所 (2015/6)
日本	日本替代方法驗證中心	Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM)	國立衛生科學研究所生物安全研究中心 (2005/11)
韓國	韓國替代方法驗證中心	Korean Center for the Validation of Alternative Methods (KoCVAM)	韓國食品藥品監督管理局 國家食品藥品安全評價研究所 (2009)
印度	國際研究與教育替代品中心	International Centre for Alternatives in Research and Education	印度政府
	動物實驗替代品協會	Society for Alternatives to Animal Experiments	巴拉迪達桑大學國家動物實驗替代中心 (2019/1)

資料來源：<https://norecopa.no/global3Rs>



圖 2.1-1 國際 3Rs 中心分布圖

藉由研析並歸納國際間 3Rs 中心之相關資訊，可初步得知國際 3Rs 中心之主要目標及執行方向。其成立宗旨多為透過科學研究、方法驗證及教育推廣，以創造、開發、驗證動物替代測試方法來實踐 3Rs 原則，藉此保護人類及生物之健康及福祉。並以下列 4 點作為執行準則及主要任務：

1. 開發技術：開發體外和其他替代技術研究。
2. 聯繫溝通：設置開放式論壇，廣納各界意見促使替代測試方法的發展。
3. 提供資訊：提供政府、學界、工商業界及大眾有關替代方案可靠資訊。
4. 教育訓練：教育並培訓替代測試方法的應用。

透過與工商業界、政府機構及學術界的科學家合作，以開發動物替代測試方法，取代或減少動物使用量或減輕動物的痛苦及壓力，以推廣並達成 3Rs 原則之終極目標。

二、替代方法驗證中心

(一) 首先以美國替代方法驗證機構協調委員會（ICCVAM）為例，該委員會於 2000 年因 ICCVAM 授權法而正式成立，其設置目的為：

1. 提升美國聯邦機構替代測試方法審查之效率及有效性。
2. 藉由橫向聯繫以減少不必要的重複試驗。
3. 充分利用外部科學研究及專業資訊。
4. 確保新的替代測試方法得到驗證。
5. 在各項測試中達到替代、減量及精緻化（優化）動物的使用。

由於動物替代測試涉及領域極為廣泛，因此美國替代方法驗證機構協調委員會（ICCVAM）跨足 16 個美國聯邦監管和研究機構，包含有毒物質和疾病登記署、消費品安全委員會、農業部、國防部、能源部、內政部、交通部、環境保護署、食品和藥物管理局、國家癌症研究所、國家職業安全與健康研究所、國立環境健康科學研究所、美國國家標準與技術研究所、美國國立衛生研究院、國家醫學圖書館及職業安全與健康管理局。

美國替代方法驗證機構協調委員會（ICCVAM）為了執行動物替代試驗方法的開發及驗證，特別建立了 7 個工作小組，各工作小組皆由該領域之專家及團體所組成，並著手進行研擬戰略路線及目標，以建立新的替代測試方法來評估美國化學物質及醫療產品的安全性。

1. 急毒性工作小組。
2. 生態毒理學工作小組。
3. 體外推至體內工作小組。
4. 奈米材料工作小組。
5. 交叉參照工作小組。
6. 驗證工作小組。
7. 替代方法驗證機構協調委員會專家小組。

經由美國替代方法驗證機構協調委員會（ICCVAM）及美國聯邦監管和研究機構與各工作小組之間的合作及努力，目前美國替代方法驗證機構協調委員會已審查通過 124 種動物替代測試方法可供使用。

(二) 歐盟參考實驗室-歐洲替代測試方法驗證中心（EURL ECVAM）位於義大利伊斯普拉的聯合研究中心，聯合研究中心是歐盟委員會的科學和知識服務機構。EURL ECVAM 設置的主要目的為：

1. 協調並促進歐盟和國際各國在 3Rs 計畫中之研究及合作。
2. 發展化學物質安全性評估替代測試方法的驗證及研究。
3. 跨越國界、部門及學術之藩籬，以調和並傳遞資訊使知識共享。
4. 推廣動物替代測試方法及 3Rs 原則。

歐盟參考實驗室-歐洲替代測試方法驗證中心 (EURL ECVAM) 之提交及驗證流程共包含 4 個步驟，驗證步驟是新替代測試方法開發與受國際認可之重要程序，必須確保新替代測試方法基於科學及嚴格的評估，原則上，測試方法也可由驗證機構以外的其他獨立機構驗證，例如學術界或工商業界的測試方法開發人員，後續再由其他中立機關進行審查以驗證其適用性。歐盟參考實驗室-歐洲替代測試方法驗證中心 (EURL ECVAM) 之驗證流程 4 步驟如下：

1. 考量利害關係人和替代測試方法國際合作組織 (International Cooperation on Alternative Test Methods) 之意見後，對該替代測試方法提交評估意見。
2. 與歐盟替代方法驗證實驗室網路 (European Union Network of Laboratories for the Validation of Alternative Methods) 合作進行驗證及評估。
3. 由 EURL ECVAM 科學諮詢委員會 (EURL ECVAM Scientific Advisory Committee) 提出獨立審查。
4. 綜合整理多方意見後，提出有效性評估建議報告。

在經過上述 4 步驟的審查過程中，利害關係人、國際合作夥伴以及 EURL ECVAM 相關部門皆分別參與各關鍵階段，藉此以便儘可能考量各方觀點並提出最佳審查意見。截至目前為止，EURL ECVAM 已審查通過 190 種動物替代測試方法可供使用，包含 24 種物理及化學特性、51 種生物系統、23 種環境宿命、82 種健康影響以及 10 種其他測試指引。

歐美及世界各國之 3Rs 中心及替代測試方法驗證中心皆發展已久且極具規模，不但具有完整之行政架構及組織策略，各國之間的合作網路也日趨成熟，至今經過認證之替代測試方法已百餘種。並藉由初步瞭解國際間 3Rs 中心之成立宗旨、執行準則及主要任務，以及國際間兩大替代方法驗證中心之設置目的、組織架構及驗證流程，可作為我國未來規劃進入 3Rs 領域之敲門磚。

2.2 國內各部會減少動物試驗的實際做法與替代測試的發展現況

2.2.1 我國各部會相關法規中替代測試的應用現況

一、環境保護署

環保署於 2014 年 12 月 11 日起開始施行新及既有化學物質登錄，登錄業者可繳交動物替代測試方法之數據以取代動物試驗之毒理資訊及生態毒理資訊。在「既有化學物質標準登錄資料撰寫指引」第一版（2020 年 6 月）中針對毒理與生態毒理項目提供 OECD 動物替代測試規範清單，作為各項測試評估終點建議使用之測試方法，包含體外替代方法及多項減量替代方法，業者亦可繳交模型推估及理論計算之資料，如結構活性關係、趨勢分析或交叉參照等替代方法。

在新化學物質標準登錄的部分，目前毒物及化學物質局與職業安全衛生署採共同審查的方式，因此在新化學物質及既有化學物質資料登錄工具說明中建議登錄人使用的替代測試，於實際審查中逐步實踐，積極共同推廣替代測試的施行。

二、食品藥物管理署

根據修訂之「化粧品衛生安全管理法」第 23 條之 2，於 2019 年 11 月 9 日起實施化粧品動物試驗禁令，禁止化粧品製造、輸入或販賣業者於國內進行化粧品或化粧品成分之安全性評估，除有下列情形之一，並經中央主管機關許可者外，不得以動物作為檢測對象：一、該成分被廣泛使用，且其功能無法以其他成分替代。二、具評估資料顯示有損害人體健康之虞，須進行動物試驗者。違反前項規定之化粧品，不得販賣。

根據修訂第 5 版之「藥品非臨床試驗安全性規範」，亦已將動物福祉觀念列入其中，依循我國動物保護法之立法，並依時代之發展能建立動物實驗之減量與取代原則。根據「健康食品安全評估方法」，建議優先採用國際已認可之非活體試驗方法（OECD），如無非活體試驗方法可替代，應優先採用國際認可之減量、減低痛苦或縮短時程之活體試驗方法。若微生物基因突變分析、體外哺乳類細胞基因毒性分析結果已確認受試產品基因毒性陽性，則該產品不建議為健康食品，無須再進行動物實驗。

三、經濟部標準檢驗局

根據中華民國國家標準「化學品分類及標示-總則」，化學品之物化、毒理或生態毒理相關數據，如皮膚刺激腐蝕性、眼睛刺激性及嚴重損傷，可使用結構性質關係及結構活性關係之推估模型及理論計算所提供之數據資料，並亦可使用 OECD 測試規範之體外替代試驗方法作為分類準則。

四、農業委員會

根據農業委員會「農藥管理法-理化性及毒試驗準則」之修正規定辦法，農藥原體之物理化學性及產品成分符合等同性評估者，得免提供毒理及生態毒理試驗資料。該等同性評估原則可減量使用動物試驗於毒理測試項目，符合 3Rs 之減量原則。

動物替代測試 3Rs 原則議題至今已發酵 60 餘年，代表淺層意義為關心動物福祉，實際上深層意義為新科學技術的開發及新國際貿易壁壘的產生。以化粧品產業為例，歐盟 2013 對化粧品實施動物試驗禁令，為避免貿易壁壘造成出口障礙，我國已跟隨世界潮流於 2016 年通過化粧品衛生管理條例修正案，自此臺灣化粧品業者將不得再對化粧品之成品及原料進行動物試驗，該法案於 2019 年正式實施。

於此期間我國經濟部工業局及化粧品保養品業者致力於仿生皮膚之開發研究及產品改良，皆得到相當顯著之成效，不但使我國仿生皮膚研發技術突飛猛進，亦使臺灣化粧品保養品業者成功站穩國際市場並獲取銷售佳績，以此為證，參與、推廣並發展動物替代測試不但可以為新興科技及產業帶來藍海效應，亦為突破國際新貿易壁壘之唯一方法。我國應藉此機會針對國內各部會及產業，對動物替代測試相關法規進行地毯式盤點，在顧及動物福祉之餘進一步推動新興產業技術之發展並與國際趨勢接軌，藉以消除各產業未來所面臨之國際貿易壁壘。

2.2.2 替代測試在我國化學物質管理扮演的角色

鑒於我國化學產業興盛且新化學物質研發迅速，為掌握國內化學物質之生產、運作與流布情形，並強化環境生態與國人健康安全風險管理，環保署參考國際間針對化學物質管理之相關方法，於 103 年發布「新化學物質及既有化學物質資料登錄辦法」，規定化學物質於製造或輸入前應先取得核准登錄，以達化學物質源頭管理之目的。而化學物質登錄過程需要提供大量的脊椎動物實驗資訊，以評

估物質可能造成的不同毒性終點。因化學物質種類繁多，若需要針對各項物質進行動物實驗，不僅花費金錢與時間不貲，也不符合世界持續推動動物福祉的精神。

目前國際在需要進行安全性評估的領域中逐漸推動動物實驗減量的制度，包含歐盟化粧品安全性評估已經全面排除動物實驗資訊，而我國也於 2016 年 10 月三讀通過化粧品衛生安全管理法部分條文，禁止化粧品安全性評估進行動物實驗。歐盟在化學物質管理也秉持同樣的作法，強調以現有資訊評估物質毒性，不進行不必要或重複的動物實驗，而美國環保署更預計在 2035 年全面禁止動物實驗的施行。而除了制度面的更新，國際同樣注重實驗技術層面的發展，各國除持續建立替代測試的發展組織，針對新興替代測試進行確效、評估及推動外，經濟合作暨發展組織（OECD）也持續公布更符合動物福祉的動物減量或體外替代方法。聯合國發展的全球化學品分類及標示全球調和制度（GHS）更在每兩年的更新版本中，持續增加以替代測試進行分級分類的方法，強化替代測試數據的使用範圍，達到技術與管理調和之目的。

由此可見，3Rs 原則非動物替代測試是全世界共同推行的目標，為了建立對動物更友善的試驗環境，同時減少制度差異所造成的貿易壁壘，我國動物替代測試議題的發展實是刻不容緩。由於在我國新及既有化學物質登錄制度管理規範中，需要由業者繳交毒理及生態毒理的相關資訊，故由國際化學物質管理的精神及目標為起始，再接續介紹我國化學物質登錄制度及替代測試在制度中的施行現況，而後進一步介紹在國際間持續發展的替代測試及相關資訊。

2.2.3 以動物減量為目的所設計的登錄資訊繳交邏輯

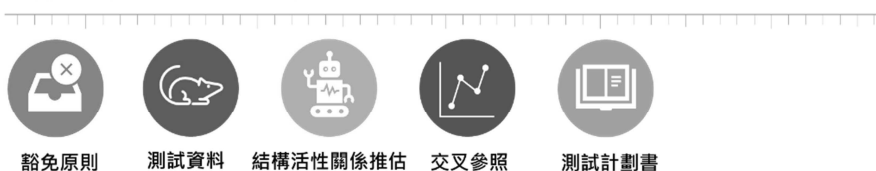
化學物質登錄的繳交邏輯中，大量融入以動物福祉為前提的階層式評估概念。以局部毒性為例，當化學物質具有皮膚腐蝕性時，無須進行眼睛刺激性及皮膚過敏性測試，除非物質顯示在非腐蝕性濃度下，其解離離子仍具有毒性的情形外，皮膚腐蝕性物質亦可豁免急毒性資訊繳交。而基因毒性部分，若細菌突變試驗及體外哺乳類細胞基因毒性結果皆為陰性時，體內基因毒性可繳交測試計畫書。生態毒理資訊中，短期魚類毒性需繳交測試數據，但長期魚類毒性可繳交測試計畫書；反之若已繳交長期魚類毒性資訊，則可豁免繳交短期毒性資訊。種種繳交邏輯設計，除希望減少登錄人負擔外，更希望減少不必要的測試，減少動物的犧牲。

而雖然表 2.2-1 顯示，新及既有化學物質登錄所需繳交的資訊相同，但主管機關亦考量新及既有化學物質使用歷史及情境差異，設計不同繳交類型（圖 2.2-1），在取得可信資料的前提下，最大幅度的減少動物試驗的使用。

新化學物質因多為新興研發或製造，相關毒性資訊多缺乏，故取得具代表性或依照國際規範執行的測試資料有其必要性，設計邏輯上以繳交試驗或測試計畫書為主，新化學物質登錄指引中加入大量國際認可的動物減量或體外測試，但僅在部分項目提供非測試方法（結構活性推估及交叉參照報告）的繳交，藉此用來評估新興化學物質的未知危害。

既有化學物質多為使用歷史悠久，多數物質在國際間具豐富毒理及生態毒理資料，且既有化學物質操作噸數通常較新化學物質大，預計有更多登錄人須進行第 4 級標準登錄，為避免登錄人在未評估下直接進行如生物蓄積性、重複劑量毒性及生殖毒性等高成本且須使用大量脊椎動物的測試，故鼓勵登錄人優先以國際現有資訊評估是否符合豁免原則，若該項目無法豁免，則建議優先蒐集登錄指引提供之國際資料庫資訊進行繳交。若國際資料庫無相關數據，則鼓勵使用非測試方法或於特定項目繳交替代測試計畫書。若前述方法皆不可行，需要進行實驗時，仍建議登錄人優先參考替代測試，減少常規動物測試的施行。

新化學物質標準登錄



既有化學物質標準登錄



圖 2.2-1 新及既有化學物質標準登錄資料繳交類型

表 2.2-1 各級標準登錄所需物化、毒理及生態毒理資料項目

分級資料提交規定				第一級	第二級	第三級	第四級
5	物理與化學特性資訊	5.1	物質狀態	V	V	V	V
		5.2	熔點/凝固點	V	V	V	V
		5.3	沸點	V	V	V	V
		5.4	密度	V	V	V	V
		5.5	分配係數：正辛醇/水	V	V	V	V
		5.6	水中溶解度	V	V	V	V
		5.7	蒸氣壓	V	V	V	V
		5.8	閃火點	V	V	V	V
		5.9	易燃性	V	V	V	V
		5.10	爆炸性	V	V	V	V
		5.11	氧化性	V	V	V	V
		5.12	pH 值	V	V	V	V
		5.13	自燃溫度	V	V	V	V
		5.14	黏度			V	V
		5.15	金屬腐蝕性			V	V
6	毒理資訊	6.1	急毒性：吞食、吸入、皮膚	V	V	V	V
		6.2	皮膚刺激性/腐蝕性	V	V	V	V
		6.3	眼睛刺激性	V	V	V	V
		6.4	皮膚過敏性	V	V	V	V
		6.5	基因毒性	V	V	V	V
		6.6	基礎毒物動力學		V	V	V
		6.7	重複劑量毒性：吞食、吸入、皮膚		V	V	V
		6.8	生殖/發育毒性		V	V	V
		6.9	致癌性				V
7	生態毒理資訊	7.1	非脊椎動物（如水蚤）之短期毒性	V	V	V	V
		7.2	對水生藻類及藍綠藻的毒性	V	V	V	V
		7.3	水中生物降解：篩檢試驗	V	V	V	V
		7.4	魚類之短期毒性		V	V	V
		7.5	水解作用		V	V	V
		7.6	對微生物的毒性		V	V	V
		7.7	吸附/脫附作用		V	V	V
		7.8	非脊椎動物（如水蚤）之長期毒性			V	V
		7.9	魚類之長期毒性			V	V
		7.10	對土壤中大生物體（節肢動物外）的毒性				V
		7.11	對陸生植物的毒性				V
		7.12	對土壤中微生物的毒性				V
		7.13	水及底泥中生物降解：模擬試驗				V
		7.14	土壤中生物降解				V
		7.15	生物蓄積：水生生物底泥				V
		7.16	底泥毒性				V

除設計邏輯的差異外，各毒性終點各自特性具不同的替代測試精神，表 2.2-2 依我國新及既有化學物質標準登錄指引，逐項說明所包含的替代測試設計。各毒性終點可使用的替代測試仍符合化學物質特性及精神，另隨著國際發展趨勢，持續新增可使用之替代測試，如皮膚過敏性體外測試。雖然許多項目都已具備動物減量或體外測試技術，但仍有部分項目主要依靠脊椎動物實驗數據，在表 2.2-2 顯示不建議使用替代測試的原因，通常是因為國際間尚未有完善的替代策略或相關方法仍處於確效階段，因此持續關注研析國際新興替代測試發展及導入國際已確效之替代測試尤為重要，後續章節將介紹奈米物質新興替代測試發展。

表 2.2-2 我國化學物質登錄指引中建議繳交的替代測試樣態

項次	終點名稱	常規動物測試	動物減量測試	體外測試	QSAR 或 Read-Across	國際資料或文獻回顧
6.1	急毒性	新：不建議	新：建議	新：不建議	新：不建議	新：不建議
		既有：不建議	既有：建議	既有：不建議	既有：不建議	既有：建議
6.2	皮膚刺激性/腐蝕性	新：建議	新：不建議	新：建議	新：建議	新：不建議
		既有：不建議優先	既有：不建議	既有：建議	既有：建議	既有：建議
6.3	眼睛刺激性	新：建議	新：不建議	新：建議	新：建議	新：不建議
		既有：不建議優先	既有：不建議	既有：建議	既有：建議	既有：建議
6.4	皮膚過敏性	新：建議	新：建議	新：不建議	新：不建議	新：不建議
		既有：不建議優先	既有：建議	既有：建議	既有：建議	既有：建議
6.5	基因毒性	新：建議	新：建議	新：建議	新：不建議	新：不建議
		既有：不建議優先	既有：建議	既有：建議	既有：建議	既有：建議
6.6	基礎毒物動力學	新：建議	新：不建議	新：不建議	新：不建議	新：不建議
		既有：不建議優先	既有：不建議	既有：不建議	既有：不建議	既有：建議
6.7	重複劑量毒性	新：建議	新：建議	新：不建議	新：不建議	新：不建議
		既有：不建議優先	既有：建議	既有：不建議	既有：不建議	既有：建議
6.8	生殖/發育毒性	新：建議	新：建議	新：不建議	新：不建議	新：不建議
		既有：不建議優先	既有：建議	既有：不建議	既有：不建議	既有：建議
6.9	致癌性	新：建議	新：建議	新：不建議	新：不建議	新：不建議
		既有：不建議優先	既有：建議	既有：不建議	既有：不建議	既有：建議
7.4 及 7.9	魚類之短期及長期毒性	新：建議	新：不建議	新：建議	新：不建議	新：不建議
		既有：不建議優先	既有：不建議	既有：建議	既有：建議	既有：建議
7.15	生物累積	新：建議	新：不建議	新：不建議	新：不建議	新：不建議
		既有：不建議優先	既有：不建議	既有：不建議	既有：建議	既有：建議

註：「不建議」包含國際間尚未有完善的替代策略或相關方法仍處於確效階段等不同情況。

2.3 國際奈米物質管理現況

奈米科技係運用物質粒徑差異而造成性質改變之科技，這些奈米材料被陸續開發使用以提供特殊功能及需求，然而這些奈米物質可能會造成環境、健康與安全上的危害，故引起各國主管機關及國際官方組織的重視。目前國際上正積極展開研究及發展奈米物質源頭登錄管理制度、管控策略、測試標準及評估工具等。以下說明國際間對於奈米物質的定義及先進國家之管理現況。

2.3.1 歐盟以 REACH 法規為核心的奈米安全管理

一、註冊要求與法規更新

REACH 對化學物質資訊需求 (information requirements) 取決於每年總噸數 (tonnage)。每年製造或輸入大於 1 噸即需註冊，大於 10 噸則需要有化學品安全性評估 (CSR) (Hong et al., 2014)。這些資訊需求須採用法規建議的方法 (如 OECD 標準方法)，亦可用不同方式來符合要求，包括使用交叉參照及分群方式。相關文件可參考 ECHA 公告的《根據 REACH 和 CLP 進行物質識別和命名的指引》(Guidance for identification and naming of substances under REACH and CLP)、《資訊需求及化學品安全評估指引》(Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment) (ECHA, 2019)。

而根據 ECHA 2016 年 11 月《註冊指引》(Guidance on the registration) (ECHA, 2016) 及相關文件，若物質僅以奈米型態存在 (nanoforms)，符合歐盟執委會對於奈米物質的定義需求，註冊者須針對此奈米物質繳交註冊文件檔 (registration dossier)，奈米型態物質的註冊取決於廠商生產或進口物質的年度總噸位，若該物質的總量每年少於 1 噸，則無需註冊該物質。但若物質的總體積每年超過 1 噸，即使在該總體積中的奈米物質每年的量不足 1 噸，也需對其進行登記。而每年 100 到 1,000 噸範圍內的有效註冊中若包括每年生產低於 1 噸的奈米物質，也須考慮或評估該奈米型態物質的 (生態) 毒理學數據，意即有關註冊所涵蓋的所有奈米型態的危害和風險的資訊必須在物質檔案中提交。相關規定在《註冊指引》(Guidance on the registration) 第 4.1 節資訊要求 (Information requirements) 中有詳細羅列出個別噸位範圍要求的 (生態) 毒理學數據資料。

2018 年 12 月，歐盟執委會在布魯塞爾簽署《Amending Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on REACH as regards Annexes I, III, VI, VII, VIII, IX, X, XI, and XII to address nanoforms of substances》（《歐洲議會和理事會關於 REACH 法規（EC）No 1907/2006 附件 1、3、6 至 12 以制定處理奈米型態物質的修訂條例》）。歐盟通過此 REACH 修正指令（EU）2018/1881（REACH 2018）所定義之奈米材料，相關修改之附錄與要求包括：註冊涵蓋之奈米物質型態或奈米物質型態的組合之特性（附件 6）、化學品安全評估（附件 1）、註冊資訊需求（附件 3 和附件 7 至 11）、下游使用者義務（附件 12），此修訂條例將在 2020 年 1 月 1 日前強制適用於新的和現有的註冊，這將大大闡明 REACH 對奈米物質的註冊要求。簡述如下表 2.3-1。

2021 年 6 月中，歐盟執委會條例(EU)2021/979 修訂了 REACH 法規(EC) No 1907/2006 的附件 VII 至 XI 對於註冊的部分資訊要求，並將在年底發布更多更新，將於 2022 年開始生效。此次主要的更新涉及：

1. 澄清附件 VII 有關物質物化特性資訊的某些規定：對金屬和略溶（Sparingly Soluble）金屬化合物的表面張力和水溶性的要求。
2. 修改附件 VII 及附件 VIII 有關毒理學資訊的某些規定：對眼睛刺激體外測試和皮膚或眼睛刺激的體內測試要求。
3. 修改附件 VIII 有關毒理學資訊的某些規定：28 天和 90 天重複劑量毒性研究的要求和調整。
4. 調整附件 IX 和 X 中關於生殖毒性研究的具體規則。
5. 適用的一般規則基於：
 - 使用現有數據
 - 附件 XI 應闡明證據權重的修改如何適用於特定訊息要求及應如何記錄。
 - 物質定制的暴露驅動測試
 - 物質分組：特別是那些成分未知或可變的物質、複雜的反應產物和生物材料（unknown or variable composition, complex reaction products and biological materials, UVCBs）

表 2.3-1 與奈米物質相關的歐盟法規內容

項次	內容
1	附件 I、III、VI 至 XII 應包括奈米型態物質註冊要求和相關下游用戶義務的說明。
2	製造商和進口商應在化學品安全報告中評估並在相關情況下產生必要的訊息和文件，以便充分控制使用含有奈米材料之物質其所帶來的風險。
3	由於大多數奈米材料預計是既有物質的奈米型態，因此應制定關於產生新的低含量物質的毒理學和生態毒理學資訊之要求條件，以確保評估標準是基於奈米型態的預測性質。
4	奈米型態可能具有特定的毒理學特徵和暴露模式，因此可能需要進行特定的風險評估和適當的風險管理措施。
5	所有不同的奈米型態和奈米型態的組合，註冊者都應該證明其安全性。
6	為了有效評估吸入性奈米材料的潛在暴露風險（特別是在工作場所），因此針對不同的奈米型態或奈米型態的組合，有關粉塵資訊都應該要提供出來。
7	儘管以口服途徑進行最低噸位產品的急性毒性試驗是必要的，但是對於奈米型態而言，吸入或在非常特殊的情況下，皮膚途徑可能被認為是更適當的接觸途徑。
8	一些個別情況下之必要參數所造成的特定物理化學性質，除了那些用於識別不同的奈米型態或奈米型態的組合外，也需要考慮其奈米材料性質之相關科學理解。但由於可行性和比例原則的緣故，除非其他顆粒特性會顯著影響這些奈米型態的危害或暴露，否則只有每年大於 100 噸的高含量物質的註冊人需要明確考慮這些進一步的資訊。
9	現有的定性或定量結構活性關係（QSAR）和其他工具尚無法確定優先次序。
10	不可溶（insolubility）這項性質訊息應作為物質奈米型態的潛在毒理學和生態毒理學方面的重要參數。
11	奈米型態應始終考慮在水中及相關生物和環境介質中的解離速率，因它代表了水溶性的重要補充訊息，作為奈米型態的基本物理化學性質，可能決定其風險的方法評估和測試。
12	辛醇/水中的水溶性或分配係數，可作為良好建立的 QSAR 預測模型的輸入。由於基本假設可能並不適用於奈米物質，因此只有科學論證才能將這種適應性用於奈米型態。在特定情況下，可以使用相關測試介質中的溶出速率。
13	奈米的特定性質有時可能阻止它們通過細菌細胞壁的攝取，使細菌的體外基因突變研究（AMES 測試 B.13-14，OECD TG 471）不合適。在這種情況下應提供哺乳動物細胞中的一種或多種其他體外致突變性研究或其他國際公認的體外方法。

註：內容為歐洲議會和理事會關於 REACH 法規（EC）No 1907/2006 附件 1、3、6 至 12 以制定處理奈米型態物質的修訂條例。

6. 修改附件 IX，以排除在不適當的情況下，僅基於低辛醇水分配係數而放棄對環境宿命和行為進行相關研究。
7. 澄清附件 IX 有關物質物化特性資訊的某些規定：適應解離常數和黏度的新特定規則。
8. 附件 VII 至 X 應為人類健康和環境目的加入額外要求，並應確保以適當高劑量進行動物試驗。

另一方面，2020 年 7 月歐盟奈米材料觀察站 (European Union Observatory for Nanomaterials, EUON) 更新了 ECHA 奈米物質法規的最新進展，內容提到奈米對於人體及環境的毒性影響方面有幾個試驗終點可供近期作為奈米毒理的測試目標，包括重複劑量毒性、亞慢性、無脊椎動物的短期毒性、水生植物生長抑制研究、魚類的短期毒性試驗、活性污泥呼吸抑制測試、退化、水解與 pH 值的關係、吸附解吸篩選、地表水中最終降解的模擬測試、水生物種/優選魚類中的生物蓄積及對陸地生物的影響等。

根據 EUON 網站統計更新至 2021 年 8 月 5 日止，其由 REACH 註冊資料、《化粧品法規》及法國和比利時國家清單中公開獲得的資訊所羅列出的奈米物質共 340 種條目，資料結果連接到 ECHA 的化學品數據庫 (ECHA's chemicals database)，而 340 種中有 139 種在 REACH 註冊，彙整於表 2.3-2。

表 2.3-2 REACH 註冊的奈米物質資料 (1/7)

	Substance name	EC/List no	CAS no
1	Zinc oxide	215-222-5	1314-13-2
2	Xanthylum, 9-[2-(ethoxycarbonyl)phenyl]-3,6-bis(ethylamino)-2,7-dimethyl-, molybdatesilicate	263-793-4	63022-06-0
3	Xanthylum, 9-(2-carboxyphenyl)-3,6-bis(diethylamino)-, molybdatesilicate	263-778-2	62973-79-9
4	Xanthylum, 3,6-bis(diethylamino)-9-[2-(ethoxycarbonyl)phenyl]-, molybdatetungstatephosphate	215-414-9	1326-04-1
5	Triiron tetraoxide	215-277-5	1317-61-9
6	Titanium nitride	247-117-5	25583-20-4
7	Titanium dioxide	236-675-5	13463-67-7
8	Thuya occidentalis, ext.	290-370-1	90131-58-1

表 2.3-2 REACH 註冊的奈米物質資料 (2/7)

	Substance name	EC/List no	CAS no
9	Tetramethyl 2,2'-[1,4-phenylenebis[imino(1-acetyl-2-oxoethane-1,2-diyl)azo]]bisterephthalate	271-176-6	68516-73-4
10	Tangled Multi-Walled Carbon Nanotubes	701-160-0	-
11	Strontium titanium trioxide	235-044-1	12060-59-2
12	Strontium 4-[(5-chloro-4-methyl-2-sulphonatophenyl)azo]-3-hydroxy-2-naphthoate (1:1)	239-879-2	15782-05-5
13	Strontium 4-[(4-chloro-5-methyl-2-sulphonatophenyl)azo]-3-hydroxy-2-naphthoate (1:1)	267-291-6	67828-72-2
14	Strontium 3-hydroxy-4-[(4-methyl-2-sulphonatophenyl)azo]-2-naphthoate	277-552-6	73612-29-0
15	Single Wall Carbon Nanotubes (SWCNT)	943-098-9	-
16	Silver	231-131-3	7440-22-4
17	Silicon dioxide	231-545-4	7631-86-9
18	Silicic acid, lithium magnesium sodium salt	258-476-2	53320-86-8
19	Silicic acid, calcium salt	215-710-8	1344-95-2
20	Silicic acid, aluminum magnesium sodium salt	234-919-5	12040-43-6
21	Silicate(2-), hexafluoro-, disodium, reaction products with lithium magnesium sodium silicate	285-349-9	85085-18-3
22	Reaction product of Graphite, acid-treated and potassium permanganate	947-768-1	-
23	Reaction mass of melamine and Nickel, 5,5'-azobis-2,4,6(1H,3H,5H)-pyrimidinetrione complexes	939-379-0	-
24	Reaction mass of cerium dioxide and zirconium dioxide	909-709-8	-
25	Reaction mass of barium chromate, copper dichromium tetraoxide and copper oxide	701-287-1	-
26	Reaction mass of 2,2'-[(3,3'-dichloro[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[N-(2,4-dimethylphenyl)-3-oxobutyramide] and 2,2'-[(3,3'-dichloro[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[N-(2-methylphenyl)-3-oxobutyramide] and 2-[[[3,3'-dichloro-4'-[[1-[(2,4-dimethylphenyl)amino]carbonyl]-2-oxopropyl]azo][1,1'-biphenyl]-4-yl]azo]-3-oxo-N-(o-tolyl)butyramide	911-715-0	-
27	Reaction mass of (E)-3,7-dimethylocta-1,3,6-triene and (R)-p-mentha-1,8-diene and (Z)-3,7-dimethylocta-1,3,6,-triene and 7-methyl-3-methylenoocta-1,6-diene and DL-borneol and bornan-2-one and cineole and linalool and linalyl acetate and p-menth-1-en-4-ol	946-855-1	-
28	Pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4-dione, 3,6-bis([1,1'-biphenyl]-4-yl)-2,5-dihydro-	413-920-6	88949-33-1
29	Pyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4-dione, 3,6-bis(4-chlorophenyl)-2,5-dihydro-	401-540-3	84632-65-5

表 2.3-2 REACH 註冊的奈米物質資料 (3/7)

	Substance name	EC/List no	CAS no
30	Pyrimido[5,4-g]pteridine-2,4,6,8-tetramine, 4-methylbenzenesulfonate, base-hydrolyzed	440-560-7	346709-25-9
31	Polychloro copper phthalocyanine	215-524-7	1328-53-6
32	Perylene-3,4:9,10-tetracarboxydiimide	201-344-6	81-33-4
33	N-(5-chloro-2-methoxyphenyl)-3-hydroxy-4-[[2-methoxy-5-[(phenylamino)carbonyl]phenyl]azo]naphthalene-2-carboxamide	268-028-8	67990-05-0
34	N-(5-chloro-2-methoxyphenyl)-2-[(2-methoxy-4-nitrophenyl)azo]-3-oxobutylamide	240-131-2	15993-42-7
35	N-(4-chloro-2,5-dimethoxyphenyl)-3-hydroxy-4-[[2-methoxy-5-[(phenylamino)carbonyl]phenyl]azo]naphthalene-2-carboxamide	226-103-2	5280-68-2
36	N-(2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-5-yl)-3-hydroxy-4-[[2-methoxy-5-methyl-4-[(methylamino)sulphonyl]phenyl]azo]naphthalene-2-carboxamide	257-515-0	51920-12-8
37	N-(2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-5-yl)-3-hydroxy-4-[[2-methoxy-5-[(phenylamino)carbonyl]phenyl]azo]naphthalene-2-carboxamide	235-425-2	12225-06-8
38	N-(2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-5-yl)-3-hydroxy-4-[[2,5-dimethoxy-4-[(methylamino)sulphonyl]phenyl]azo]naphthalene-2-carboxamide	235-426-8	12225-08-0
39	N,N'-naphthalene-1,5-diylbis[4-[(2,3-dichlorophenyl)azo]-3-hydroxynaphthalene-2-carboxamide]	271-178-7	68516-75-6
40	N,N'-[6,13-diacetamido-2,9-diethoxy-3,10-triphenodioxazinediyl]bis(benzamide)	241-734-3	17741-63-8
41	N,N'-(2-chloro-1,4-phenylene)bis[4-[(4-chloro-2-nitrophenyl)azo]-3-hydroxynaphthalene-2-carboxamide]	252-772-5	35869-64-8
42	N,N'-(2,5-dichloro-1,4-phenylene)bis[4-[[2-chloro-5-(trifluoromethyl)phenyl]azo]-3-hydroxynaphthalene-2-carboxamide]	257-776-0	52238-92-3
43	Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNT), synthetic graphite in tubular shape	936-414-1	-
44	Manganese, 4-[(5-chloro-4-methyl-2-sulfophenyl)azo]-3-hydroxy-2-naphthalenecarboxylic acid complex	226-102-7	5280-66-0
45	Manganese, 4-[(4-chloro-5-methyl-2-sulfophenyl)azo]-3-hydroxy-2-naphthalenecarboxylic acid complex	235-471-3	12238-31-2
46	Manganese, 3-hydroxy-4-[(1-sulfo-2-naphthalenyl)azo]-2-naphthalenecarboxylic acid complex	252-525-1	35355-77-2
47	Manganese ferrite black spinel	269-056-3	68186-94-7
48	magnesium sodium fluoride silicate	442-650-1	56450-90-9
49	Magnesium hydroxide	215-170-3	1309-42-8

表 2.3-2 REACH 註冊的奈米物質資料 (4/7)

	Substance name	EC/List no	CAS no
50	Iron manganese trioxide	235-049-9	12062-81-6
51	Iron hydroxide oxide yellow	257-098-5	51274-00-1
52	Iron	231-096-4	7439-89-6
53	Graphene	801-282-5	1034343-98-0
54	Fumes, silica	273-761-1	69012-64-2
55	Ethanaminium, N-[4-[[4-(diethylamino)phenyl][4-(ethylamino)-1-naphthalenyl]methylene]-2,5-cyclohexadien-1-ylidene]-N-ethyl-, molybdatetungstatephosphate	215-410-7	1325-87-7
56	Dimethyl 5-[[1-[[[(2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-5-yl)amino]carbonyl]-2-oxopropyl]azoterephthalate	249-955-7	29920-31-8
57	Dimethyl 2-[[1-[[[(2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-5-yl)amino]carbonyl]-2-oxopropyl]azo]terephthalate	252-650-1	35636-63-6
58	Diisopropyl 3,3'-[(2,5-dichloro-1,4-phenylene)bis[iminocarbonyl(2-hydroxy-3,1-naphthylene)azo]]bis[4-methylbenzoate]	275-639-3	71566-54-6
59	Diiron trioxide	215-168-2	1309-37-1
60	Diethyl 4,4'-[(3,3'-dichloro[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[4,5-dihydro-5-oxo-1-phenyl-1H-pyrazole-3-carboxylate]	228-788-3	6358-87-8
61	Diantimony pentoxide	215-237-7	1314-60-9
62	Copper, [29H,31H-phthalocyaninato(2-)-N29,N30,N31,N32]-, chlorinated	701-371-8	-
63	Copper, [29H,31H-phthalocyaninato(2-)-N29,N30,N31,N32]-, brominated chlorinated	270-958-4	68512-13-0
64	Copper chlorophthalocyanine	235-476-0	12239-87-1
65	Chromium potassium bis(sulphate)	233-401-6	10141-00-1
66	Cesium tungsten oxide	466-380-9	52350-17-1
67	Cerium oxide isostearate	419-760-3	-
68	Cerium dioxide	215-150-4	1306-38-3
69	Carbon black	215-609-9	1333-86-4
70	Calcium titanium trioxide	234-988-1	12049-50-2
71	Calcium magnesium silicate	945-327-8	-
72	Calcium carbonate	207-439-9	471-34-1
73	Calcium 4-chloro-2-(5-hydroxy-3-methyl-1-(3-sulfonatophenyl)pyrazol-4-ylazo)-5-methylbenzenesulfonate	403-530-4	129423-54-7

表 2.3-2 REACH 註冊的奈米物質資料 (5/7)

	Substance name	EC/List no	CAS no
74	Calcium 4-[(5-chloro-4-methyl-2-sulphonatophenyl)azo]-3-hydroxy-2-naphthoate	230-303-5	7023-61-2
75	Calcium 3-hydroxy-4-[(4-methyl-2-sulphonatophenyl)azo]-2-naphthoate	226-109-5	5281-04-9
76	Calcium 3-hydroxy-4-[(1-sulphonato-2-naphthyl)azo]-2-naphthoate	229-142-3	6417-83-0
77	C.I. Pigment Orange 72	407-660-2	78245-94-0
78	Butyl 2-[[3-[[[(2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-5-yl)amino]carbonyl]-2-hydroxy-1-naphthyl]azo]benzoate	250-800-0	31778-10-6
79	Butanamide, 2,2'-[(3,3'-dichloro[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[3-oxo-, N,N'-bis(p-anisyl and Ph) derivs.	290-823-3	90268-23-8
80	Butanamide, 2,2'-[(3,3'-dichloro[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[3-oxo-, N,N'-bis(4-chloro-2,5-dimethoxyphenyl and 2,4-xylyl) derivs.	290-824-9	90268-24-9
81	Boehmite (Al(OH)O)	215-284-3	1318-23-6
82	Bisbenzimidazo[2,1-b:2',1'-i]benzo[lmn][3,8]phenanthroline-8,17-dione	224-597-4	4424-06-0
83	Benzonitrile, 3,3'-(2,3,5,6-tetrahydro-3,6-dioxopyrrolo[3,4-c]pyrrole-1,4-diyl)bis-	412-640-1	84632-50-8
84	Benzoic acid, 2,3,4,5-tetrachloro-6-cyano-, methyl ester, reaction products with p-phenylenediamine and sodium methoxide	600-736-8	106276-80-6
85	Benzoic acid, 2,3,4,5-tetrachloro-6-cyano-, methyl ester, reaction products with 4-[2-(4-aminophenyl)diazenyl]-3-methylbenzenamine and methanol sodium salt (1:1)	600-734-7	106276-78-2
86	Benzenamine, 4-[(4-aminophenyl)(4-imino-2,5-cyclohexadien-1-ylidene)methyl]-, N-Me derivatives, molybdatephosphates	268-006-8	67989-22-4
87	Barium sulfate	231-784-4	7727-43-7
88	Barium carbonate	208-167-3	513-77-9
89	Barium bis[2-chloro-5-[(2-hydroxy-1-naphthyl)azo]toluene-4-sulphonate]	225-935-3	5160-02-1
90	Barium 4-[(5-chloro-4-methyl-2-sulphonatophenyl)azo]-3-hydroxy-2-naphthoate	231-494-8	7585-41-3
91	Aluminium tris(dihydrogen phosphate)	236-875-2	13530-50-2
92	Aluminium oxide	215-691-6	1344-28-1
93	[Phthalocyanine-29,31-diide- κ 4,N29,N30,N31,N32] hydroxido aluminium	947-645-2	-
94	[No public or meaningful name is available]	-	-
95	[No public or meaningful name is available]	476-890-3	-
96	[No public or meaningful name is available]	442-240-2	-

表 2.3-2 REACH 註冊的奈米物質資料 (6/7)

	Substance name	EC/List no	CAS no
97	[No public or meaningful name is available]	479-300-2	-
98	[No public or meaningful name is available]	465-080-5	-
99	[No public or meaningful name is available]	475-310-6	-
100	[[2,2',2''-[29H,31H-phthalocyaninetriyl]tris(methylene)]tris[1H-isoindole-1,3(2H)-dionato]](2-)-N29,N30,N31,N32]copper	261-638-5	59160-79-1
101	[1-[[[(2-hydroxyphenyl)imino]methyl]-2-naphtholato(2-)-N,O,O']copper	239-763-1	15680-42-9
102	6-chloro-2-(6-chloro-4-methyl-3-oxobenzo[b]thien-2(3H)-ylidene)-4-methylbenzo[b]thiophene-3(2H)-one	219-163-6	2379-74-0
103	6,15-dihydroanthrazine-5,9,14,18-tetrone	201-375-5	81-77-6
104	5-[(2,3-dihydro-6-methyl-2-oxo-1H-benzimidazol-5-yl)azo]barbituric acid	276-344-2	72102-84-2
105	5,12-dihydroquino[2,3-b]acridine-7,14-dione	213-879-2	1047-16-1
106	5,12-dihydro-2,9-dimethylquino[2,3-b]acridine-7,14-dione	213-561-3	980-26-7
107	4-[(2,5-dichlorophenyl)azo]-N-(2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-5-yl)-3-hydroxynaphthalene-2-carboxamide	230-258-1	6992-11-6
108	4,4'-diamino[1,1'-bianthracene]-9,9',10,10'-tetraone	223-754-4	4051-63-2
109	4,4'-[(3,3'-dichloro[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[2,4-dihydro-5-methyl-2-phenyl-3H-pyrazol-3-one]	222-530-3	3520-72-7
110	4,4'-[(3,3'-dichloro[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[2,4-dihydro-5-methyl-2-(p-tolyl)-3H-pyrazol-3-one]	239-898-6	15793-73-4
111	4,10-dibromodibenzo[def,mno]chrysene-6,12-dione	224-481-3	4378-61-4
112	3-hydroxy-N-(o-tolyl)-4-[(2,4,5-trichlorophenyl)azo]naphthalene-2-carboxamide	229-440-3	6535-46-2
113	3,3'-thiodi(propionic acid)	203-841-3	111-17-1
114	3,3'-[(2-chloro-5-methyl-p-phenylene)bis[imino(1-acetyl-2-oxoethylene)azo]]bis[4-chloro-N-[2-(4-chlorophenoxy)-5-(trifluoromethyl)phenyl]benzamide]	279-356-6	79953-85-8
115	3,3'-[(2-chloro-5-methyl-p-phenylene)bis[imino(1-acetyl-2-oxoethylene)azo]]bis[4-chloro-N-(3-chloro-o-tolyl)benzamide]	226-970-7	5580-57-4
116	3,3'-[(2,5-dimethyl-p-phenylene)bis[imino(1-acetyl-2-oxoethylene)azo]]bis[4-chloro-N-(5-chloro-o-tolyl)benzamide]	226-107-4	5280-80-8
117	29H,31H-phthalocyanine	209-378-3	574-93-6
118	29H,31H-phthalocyaninato(2-)-N29,N30,N31,N32 copper	205-685-1	147-14-8
119	2-cyano-2-[2,3-dihydro-3-(tetrahydro-2,4,6-trioxo-5(2H)-pyrimidinylidene)-1H-isoindol-1-ylidene]-N-methylacetamide	278-388-8	76199-85-4
120	2-[(4-methyl-2-nitrophenyl)azo]-3-oxo-N-phenylbutyramide	219-730-8	2512-29-0
121	2-[(4-chloro-2-nitrophenyl)azo]-N-(2-methoxyphenyl)-3-oxobutyramide	236-852-7	13515-40-7

表 2.3-2 REACH 註冊的奈米物質資料 (7/7)

	Substance name	EC/List no	CAS no
122	2-[(4-chloro-2-nitrophenyl)azo]-N-(2-chlorophenyl)-3-oxobutyramide	229-355-1	6486-23-3
123	2-[(4-chloro-2-nitrophenyl)azo]-N-(2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-5-yl)-3-oxobutyramide	235-462-4	12236-62-3
124	2-[(2-methoxy-4-nitrophenyl)azo]-N-(2-methoxyphenyl)-3-oxobutyramide	228-768-4	6358-31-2
125	2,9-dimethylanthra[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f]diisoquinoline-1,3,8,10(2H,9H)-tetrone	226-866-1	5521-31-3
126	2,9-dichloro-5,12-dihydroquino[2,3-b]acridine-7,14-dione	221-424-4	3089-17-6
127	2,9-bis[4-(phenylazo)phenyl]anthra[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f]diisoquinoline-1,3,8,10(2H,9H)-tetrone	221-264-5	3049-71-6
128	2,9-bis(p-methoxybenzyl)anthra[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f]diisoquinoline-1,3,8,10(2H,9H)-tetrone	280-472-4	83524-75-8
129	2,9-bis(3,5-dimethylphenyl)anthra[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f]diisoquinoline-1,3,8,10(2H,9H)-tetrone	225-590-9	4948-15-6
130	2,9-bis(2-phenylethyl)anthra[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f]diisoquinoline-1,3,8,10(2H,9H)-tetrone	266-564-7	67075-37-0
131	2,20-dichloro-13,31-diethyl-4,22-dioxa-13,18,31,36-tetraazanonacyclo[19.15.0.03,19.05,17.06,14.07,12.023,25.024,32.025,30]hexatriaconta-1(36),2,5,7,9,11,14,16,18,20,23,25,27,29,32,34-hexadecaene	606-790-9	215247-95-3
132	2,2'-[ethylenebis(oxyphenyl-2,1-eneazo)]bis[N-(2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-5-yl)-3-oxobutyramide]	278-770-4	77804-81-0
133	2,2'-[(3,3'-dimethoxy[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[3-oxo-N-phenylbutyramide]	229-388-1	6505-28-8
134	2,2'-[(3,3'-dichloro[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[N-(4-chloro-2,5-dimethoxyphenyl)-3-oxobutyramide]	226-939-8	5567-15-7
135	2,2'-[(3,3'-dichloro[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[N-(2-methylphenyl)-3-oxobutyramide]	226-789-3	5468-75-7
136	2,2'-[(3,3'-dichloro[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[N-(2-methoxyphenyl)-3-oxobutyramide]	224-867-1	4531-49-1
137	2,2'-[(3,3'-dichloro[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[N-(2,4-dimethylphenyl)-3-oxobutyramide]	225-822-9	5102-83-0
138	2,2'-[(3,3'-dichloro[1,1'-biphenyl]-4,4'-diyl)bis(azo)]bis[3-oxo-N-phenylbutyramide]	228-787-8	6358-85-6
139	1,3,5-Triazine, 2,4,6-tris((1,1'-biphenyl)-4-yl)-	479-950-7	31274-51-8

二、相關支持與指導文件的更新

前期研究已羅列出與 ECHA 奈米型態物質註冊有關的支持與指導文件，例如 ECHA 在 2017 年公告了幾項針對奈米物質特定測試終點指引（Endpoint specific guidance），如《Appendix R7-1 Recommendations for nanomaterials applicable to chapter R7a endpoint specific guidance.》對於奈米物質的鑑定有較清楚說明。另外 REACH 附件 7-10（annexes VII-X），提供了化學物質依噸數為主的資訊需求中所必須提供的測試終點（endpoints）項目及方法。

而 2019 年 12 月，ECHA 更新附錄《適用於奈米型態註冊和物質識別指引》（Appendix for nanoforms applicable to the guidance on registration and substance identification）（ECHA, 2019）。《資訊需求及化學品安全評估指引》（Guidance on information requirements and chemical safety assessment, IR & CSA）與奈米型態物質相關的有 R.6、R.7a、R.7b、R.7c、R.8、R.10、R.14 等章，尤其在考慮使用現有數據時，指引第 R.6 章 QSAR 和化學物質分組（QSARs and grouping of chemicals (Chapter R.6)）：奈米型態的 R.6 章的附錄（Appendix to Chapter R.6 for nanoforms（即《資訊需求及化學品安全評估指引：適用於 QSAR 和化學物質分組指引的奈米型態的附錄 R.6-1》（Guidance on information requirements and chemical safety assessment: appendix R.6-1 for nanoforms applicable to the guidance on QSARs and grouping of chemicals (Version 2.0, December 2019)）此文件可能會有幫助，因為它提供了同一物質的奈米和非奈米型態的衝突數據（hazard data）如何交叉參照（read-across）的方法。

2020 年 1 月 28 日，歐盟出版了《奈米定義方法手冊》（The NanoDefine methods manual）（Friedrich et al., 2020），是歐盟聯合研究中心（European commission's joint research centre, JRC）3 份技術報告的集結，是綜合驗證和標準化方法，來支持並實施 EC 關於奈米材料定義建議書（2011/696/EU），可以根據 EC 建議將材料識別為奈米或非奈米材料。

而 ECHA 於 2021 年 4 月更新了前述 IR & CSA 中的奈米型態部分。ECHA 製定了三個有關資訊需求的附錄：即 IR & CSA 指引 R.7a、R.7b、R.7c 的附錄，為註冊人提供建議，並更新其中兩個附錄：R.7a 章的附錄 R7-1 和 R.7c 章的附錄 R7-2，文件名為《資訊需求及化學品安全評估指引：適用於 R7a 和 R7c 章端點特定指引的奈米型態的附錄 R7-1》（Guidance on information

requirements and chemical safety assessment: appendix R7-1 for nanoforms applicable to chapter R7a and R7c endpoint specific guidance) (Draft (Internal) Version 3.0, April 2021)。本文件提供的建議著重於對測試材料 (testing materials) 為奈米型態物質 (nanoforms of substances) 的具體建議。但並不排除第 R.7a 章的一般原則 (即母指引) 的適用性。如果未針對特定端點提供建議, 則應遵循上級指引中提供的建議。文件指出, REACH 附件六 (Annex VI) 定義了術語「奈米型態」(nanoform) 和「相似奈米型態的集合」(set of similar nanoforms), 並確立了對已鑑定的「奈米型態」/ 該物質「相似奈米型態的集合」進行表徵 (characterisation) 的要求。根據更新草案, 部分的建議並非嚴格針對奈米型態, 也可能適用於其他顆粒型態的物質 (例如溶解率的關聯性)。

另一方面, ECHA 在 2020 年底公布要對奈米型態物質進行強制命名以進行註冊, 換言之, 根據 REACH 法規以「國際統一化學品資訊庫」(International uniform chemical information database, IUCLID) 6 版註冊奈米材料時, 公司須提供其物質 (substance) 的奈米型態 (nanoforms) 或奈米型態的集合 (sets of nanoforms) 之名稱, 才能使註冊者和主管部門能夠明確引用法規文件中已註冊的奈米型態, 例如決策和安全數據表。事實上, EU 早在 2012 年的《奈米支持計畫: 對 REACH 註冊檔案中奈米材料評估和可用資訊充分的科學技術支持》(NANO SUPPORT Project: Scientific technical support on assessment of nanomaterials in REACH registration dossiers and adequacy of available information) (ECHA, 2012) 第 14 頁已提出 IUCLID 5.2 版註冊中一些有關物質標識含糊不清或其他關鍵訊息之問題, 即 IUCLID 5.2 版允許註冊人在 IUCLID 第 2.1 節分類和標示、第 4.1 節外觀和物理狀態, 聲明其物質為奈米材料或包含塊材物質的奈米型態 (nanoform of a bulk substance), 但沒有明確要求註冊人將其檔案定義為 (包括) 奈米材料。沒有要求明確確定其檔案中存在奈米材料意味著在許多情況下, 評估人必須推斷註冊人的意圖, 即在檔案中註冊的物質確實是奈米材料和 / 或包括物質的奈米型態 (nanoform(s)), 或檔案是否涵蓋奈米材料 / 奈米型態。

奈米技術產業協會 (Nanotechnology Industries Association, NIA) 於 2021 年 4 月發表立場文件:《改變奈米尺度監管環境和語言》(A changing regulatory landscape and language for the nanoscale) (NIA, 2021), 探討奈米材料到奈米型態的轉變, 以反應奈米材料特性相對於體積對應和相同物質奈米型態差異。

圖 2.3-1 中兩者法規之差異比較顯示，奈米材料：2011 年 10 月 18 日歐盟執委會〈Recommendation on the definition of a nanomaterial〉(2011/696/EU)，其定義奈米材料 (nanomaterial) 為天然的、意外產生或人為製造的材料 (material) 含有的顆粒中，在自由形態、聚集或團聚狀態下，有 50% 以上在粒徑分布 / 顆粒數目及至少一維空間界於 1nm 至 100 nm。但在特定情況下，且在考慮到環境、健康、安全或競爭力的情況下，此定義在 50% 或以上的顆粒數目可調整為界於 1% 至 50%。奈米型態：2018 年 12 月歐盟執委會〈Commission Regulation (EU) 2018/1881〉，其定義奈米型態 (nanoform) 為一種天然或人造物質 (substance) 含有的顆粒中的型態 (form)，在自由形態、聚集或團聚狀態下，有 50% 以上在粒徑分布 / 顆粒數目及至少一維空間界於 1 至 100nm。包含立體空間有一維小於 1nm 的富勒烯 (Fullerenes)、石墨烯片 (Graphene flakes)、單壁奈米碳管 (Single-walled carbon nanotubes)。

2020 年 6 月 EC 在《歐盟官方雜誌》發布 Commission Regulation (EU) 2020/878 法規 (即歐盟新版安全資料表 (Safety Data Sheet, SDS) 法規)。由於考慮上述 Commission Regulation (EU) 2018/1881 之要求，因同一個奈米物質根據粒徑、顆粒形狀、表面處理、結晶型態和表面積的不同，後續的危害分類和數據要求可能會有所不同，其資訊須體現在物質安全資料表 (SDS) 中，故歐盟修訂了 REACH 指令附件二 SDS 之格式，包括奈米型態的 SDS 要求。此修正案於 2021 年 1 月 1 日正式生效，而包括有關奈米型態的規定在此不再贅述。

Commission Recommendation of October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU) A natural, incidental or manufactured material containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50 % or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1 nm - 100 nm. In specific cases and where warranted by concerns for the environment, health, safety or competitiveness the number size distribution threshold of 50 % may be replaced by a threshold between 1 and 50 %.	Commission Regulation (EU) 2018/1881 A nanoform is a form of a natural or manufactured substance containing particles, in an unbound state or as an aggregate or as an agglomerate and where, for 50 % or more of the particles in the number size distribution, one or more external dimensions is in the size range 1 nm-100 nm, including also by derogation fullerenes, graphene flakes and single wall carbon nanotubes with one or more external dimensions below 1 nm.
<i>Definitions of nanomaterials and nanoforms according to the EU Commission</i>	

圖 2.3-1 奈米材料與奈米型態定義上之差異

就上述修正案而言，奈米技術產業協會認為其可呈現和證明具有明確定義物質危害特徵的不同奈米型態（**nanoform**）和奈米型態的集合，反而「奈米材料」（**nanomaterials**）一詞在描述物質危害概況時，對於各國監管機關之目的而言過於籠統且含糊不清，無法明確表達其實質意義，可能會破壞奈米技術產業的長期發展。

對於此點，檢視 2011/696/EU 建議書，其第 4 點即指出：「本建議書中的定義應用作確定材料是否應被視為出於歐盟立法和政策目的的『奈米材料』的參考。歐盟立法中『奈米材料』一詞的定義應僅基於材料組成顆粒的大小，而不考慮危害或風險。該定義僅基於材料的尺寸，涵蓋天然、附帶或人造材料。」

因此，奈米技術產業協會建議所有利益關係人（**stakeholders**）重新評估他們使用的相關語言，「特別是在討論危害（**hazard**）時，及非特定術語（**non-specific terminology**）可能會誤導並導致對奈米級物質的安全性產生混淆和不信任的結果。」因此，奈米技術產業協會呼籲使用「奈米型態」一詞來指稱給定類別中的特定奈米材料。

總而言之，若我們簡單地由 EC 網站的簡介「**Nanomaterials are chemical substances or materials that are manufactured and used at a very small scale.**」與 ECHA 網站的簡介「**Nanomaterials are chemical substances or materials with particle sizes between 1 to 100 nanometres in at least one dimension.**」僅能得知 **Nanomaterials** 可能是化學物質或材料，但奈米技術產業協會在立場文中，藉由上述法規的修正過程，討論了一個過渡階段，指出在該階段中，「奈米型態」的語言得到了更廣泛的使用、「奈米型態的集合」（**nanoform sets**）的示例可以在公共領域中得到越來越多的證明。

奈米技術產業協會指出，監管框架的演變帶來了對圍繞奈米級物質的新術語的需求。在歐盟體制內，監管機構和行業業者已開始採用奈米型態的語言。所有其他利益關係人都需要遵循，以便充分反映出奈米級材料（**nanoscale materials**）開發和投放市場的前景。人們還假設，即使英國退出歐盟後，英國的情況也將會類似，預計將在英國 **REACH** 中採用奈米型態。其他國家也跟隨歐盟的發展，將來可能會考慮將奈米型態範式的某些面向納入自己的法規中。

另一方面，目前歐盟將「奈米材料」定義為在其三個維度中的一個或多個維度上的尺寸或結構在大約 1 奈米至 100 奈米間的材料。但此定義可能因行業而異，例如相同的材料在食品中不會被視為奈米，但在化粧品中被視為奈米。因此，EC 為奈米材料尋求更具保護性的歐洲定義（**protective European definition**）而於 5、6 月發起一項諮詢，就是否修訂定義的條款並考慮在各個行業進行調整與協調進行了公眾諮詢。

在諮詢回應中，法國食品、環境和職業健康與安全局（**The French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, ANSES**）敦促 EC 不要將某些可能對人類健康和環境造成問題的奈米材料排除在該定義之外。ANSES 認為，EC 建議的更改傾向於限制最終將被視為奈米材料的物體的數量和類型。奈米塑料及某些乳液和脂質奈米粒子可能不被視為屬於此定義，但這些物體越來越多地被開發用於工業目的。ANSES 認為定義需儘可能全面，並根據物理化學標準以獨特的方式定義奈米材料。行業法規（針對化粧品、殺菌劑、食品等）應澄清奈米材料中的哪些該受到具體措施的約束：如產品標示、具體評估、投放市場前的授權等。此外 ANSES 也表示對目前定義中的尺寸閾值（1 奈米至 100 奈米）未在此次進行討論感到遺憾。不過 ANSES 將於 2022 年發表意見，提供更多回應。

而 ECHA 最新進展則是 2021 年 9 月更新了註冊指引，使其與目前歐盟執委會的兩項實施條例保持一致，一項是關於最終註冊截止日期後分階段物質的註冊和數據共享，另一項則是關於註冊檔案的更新。新版本闡明了在預註冊不再有效的情況下的註冊方式，並建議公司如何計算註冊的噸位範圍，及幫助公司確定何時需要更新其 REACH 註冊，包括關於聯合提交數據的部分。

三、其他相關資源與研究現況

成立於 2017 年的歐盟奈米物質觀察站（EUON）除了提供目前歐盟市場上現有奈米物質的資訊、奈米安全小組的計畫成果，也提供最新 REACH 附件修訂和現有的測試方法概述。而 EUON 也設立兩個網站，針對奈米物質進行數據的整理，以供大眾得以獲得更多有關含有奈米物質的資訊：一為 NanoData 網站，其含有不同產品、研究、公眾、專利和公司的資訊，而通過內置的圖表可幫助用戶可得到統計訊息。此外數據資料還可以透過不同部門和地理資訊進行過濾審核，民眾可透過網站得知產品中使用了何種奈米技術。二為

eNanoMapper 資訊架構，提供管理奈米物質的毒理學資料，透過這個網站可以得知奈米材料所具有的毒理學特性，而數據來源為許多研究報告（含 EU 所建立的 NanoREG project），是目前奈米物質毒理特性最大的資料來源。

在美國環境保護署（U.S. Environmental Protection Agency, EPA）完成了對兩種石墨烯氧化物物質、金屬氧化物物質和碳奈米管的小體積豁免審查。EPA 允許在限制人類和環境暴露的特定條件下進行豁免，以防止不合理的風險。此外，EPA 審查並完成 1 個奈米碳管和 6 個量子點（quantum dots）的製造前通知。由於有關奈米材料的可用數據有限，這些新的化學物質受到同意令的管制，這些同意書命令限制使用的範圍以及對人類和環境的影響，以防止不合理的風險暴露。OECD 在 2020 年 12 月發表的〈Developments in Delegations on the Safety of Manufactured Nanomaterials-Tour de Table, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials, No.97〉報告指出在 2018 年 11 月至 2020 年 8 月之間，EPA 根據美國有毒物質控制法案（Toxic Substances Control Act, TSCA）第 8(a)節的授權，收到了 10 種符合報告標準的奈米級物質通報，使通報總數達到 77 個。這些被豁免的奈米化學物質，已經在 TSCA 中被歸類為沒有獨特或沒有新穎特性的新化學物質，報告最多的是金屬或金屬氧化物。自 2005 年 1 月以來，EPA 已在 TSCA 下收到並審查了多項關於奈米材料的新化學公告，其中包括富勒烯，量子點和奈米碳管。EPA 已發布同意令和重要新使用規則（Significant New Uses Rule, SNUR），以規範這些奈米材料的新化學物質提交，從而允許在有限的條件下進行生產，希望相關製造商或加工商必須至少在 90 天之前向 EPA 提交《重要新用途通知》，提供此類同意令的經過修飾的版本（即沒有機密的商業信息）。由於提交人要求擁有商業機密，因此 EPA 在發布奈米材料的 SNUR 中可能不會向公眾披露奈米材料的所有資訊。EPA 將在未來繼續發布 SNUR 和新化學奈米材料的同意令，由於評估奈米材料的數據有限，同意書和 SNURS 包含以下要求：通過使用個人防護設備來限制對工人的暴露；通過不允許向地表水中釋放或直接向空氣中釋放來限制環境暴露；以及限制特定的應用 / 用途與新化學通告中所述的用途相同。用於區分是否為同一成分但為不同型態化學物質的標準方法同樣可用於奈米物質，例如傳統用在區分物化特性的標準測試方法也適用在奈米物質上，此法已運用在商業中引進的新型奈米級材料來與已經使用了數十年或幾個世紀的現有產品之間作區別。

2.3.2 國際組織對奈米安全性評估及標準化的現況摘要

國際組織對奈米物質的測試規範 (TG) 及標準化 (standardization) 投入很多努力，如 OECD 工程奈米工作小組 (Working Party on Manufactured Nanomaterials, WPMN) 及 ISO/TC229 的成立，也因貿易法規要求奈米物質在國際的安全輸出入需要符合相關規定，因而更強化國際組織的功能。

一、OECD 在奈米物質毒性測試的相關指引

OECD 在 2006 年成立工程奈米工作小組 (WPMN)，並於 2007 年 11 月啟動及贊助工程奈米物質 (Engineered nanomaterials, ENMs) 安全測試計畫。

1981 年開始，OECD 首次出版化學品測試規範 (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals)，其是 OECD 所制定的一套國際公認的化學物質 (工業化學品、農藥、個人護理產品等) 安全性檢測標準方法，提供專業測試或研究使用，用以評估對人類健康與環境的影響。測試規範主要分為 5 個章節：第 1 節：物理化學性質；第 2 節：對生物系統的影響；第 3 節：環境命運與行為；第 4 節：健康效應；第 5 節：其他測試規範。

2020 年 6 月，OECD 針對奈米物質安全性測試評估測試規範 (TG) 共有 8 篇，更新 TG 437、TG 458、TG 488、TG 491 並更正 TG 405、TG 439、TG 442C、TG 471，包含 6 項化學 (*in chemico*) 或體外試驗 (*in vitro*)，2 項動物試驗 (*in vivo*, animal test)。旨在與 OECD 會員國以及數據相互接受 (Mutual Acceptance of Data, MAD) 約定國能因應科學進展而保持同步更新，詳細清單如表 2.3-3。

此外，這些指引中關於奈米物質在模擬環境介質中穩定性測試有 3 篇，其中和 28 天及 90 天吸入毒性測試相關的有 OECD TG 412 及 TG 413 等。OECD 其它相關的奈米物質安全及測試報告集結為《奈米物質安全系列報告》(The Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials)，截至目前為止共有 91 冊。

另方面，OECD 也於 2020 年 7 月發布兩篇奈米物質測試和評估的指引文件 (Guidance Document)，它們涵蓋了溶解和分散穩定性及水生和底泥毒性。兩者均適用於根據 REACH 法規進行的測試，分別為：

表 2.3-3 OECD 針對奈米物質安全性測試完成的規範與更新

編號	英文文件名稱	中文文件名稱	內容
化學試驗 / 體外試驗			
Test No.442C	<i>In Chemico</i> Skin Sensitisation	皮膚致敏性試驗（胜肽/胺基酸衍生物反應測試）	ADRA 方法的附錄 1、表 1「熟練度確認之建議化學物質表」(Proficiency Substances)，其中 Propyl paraben 之分子量由 110.1 修正為 180.2
Test No.437	Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage	牛角膜混濁和通透性試驗	新增一種新的儀器 (laserlight-based opacitometer, LLBO)，用於測量角膜通透性
Test No.439	<i>In Vitro</i> Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method	體外皮膚刺激-重建人類表皮試驗	將測試方法 439 中表 2 epiCS 模組的陰性對照組 OD 值之「較低接受標準」從 ≥1 修訂為 ≥0.8
Test No.458	Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals	穩定轉染人類雄激素受體轉錄活化試驗：用於檢測化學品對雄激素之促進性和拮抗性活性	新增了 3 種測試方法： (1)日本開發的 AR-Ecoscreen 方法 (2)歐洲開發的 AR CALUX 方法 (3)韓國開發的 22Rv1 / MMTV ARTA 方法
Test No.471	Bacterial Reverse Mutation Test	細菌回復突變試驗	修正第 24 段中所描述之大腸桿菌陽性對照組物質之 CAS 編號： (f) N-Ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine [CAS No. 4245-77-6] 或 -Methyl-N-nitroN-nitrosoguanidine [CAS No. 70-25-7]
Test No.491	Short Time Exposure <i>In Vitro</i> Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage	短時間暴露體外試驗：鑑別(1) 導致眼睛嚴重損傷的化學物質與(2) 不需分類眼睛刺激或嚴重眼睛損傷的化學物質	此測試方法可擴大適用於「高揮發性物質」
動物試驗			
Test No.405	Acute Eye Irritation/Corrosion	急性眼睛刺激性 / 腐蝕性（嚴重損傷）試驗	測試規範的分層測試策略部分已經刪除。這是因為此部分已被收錄在眼睛嚴重傷害與眼睛刺激的 IATA 指導文件 GD No.263 之中
Test No.488	Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays	轉殖嚙齒類動物體細胞與生殖細胞基因突變試驗	原先於第 36 段記載對生殖細胞部分的描述，於第 39 段也新增了描述

測試編號 317 號的奈米物質的水生和底泥毒理學測試指引文件 [Guidance Document on Aquatic and Sediment Toxicological Testing of Nanomaterials (No.317)]。涵蓋人工沉積的奈米物質的水生生物（包括沉積物）生態毒性測試，以確定其危害。它著重於 OECD 測試指引中描述的淡水水生和底泥毒性測試方法，並給出了使用人造奈米物質進行有效測試的實際考慮，包括解釋和報告結果。它涉及對 OECD 測試準則程序的修改或補充，旨在逐步提高結果的準確性，實驗室內可重複性和實驗室內可重複性。

測試編號 318 號的奈米物質的溶解和分散穩定性測試暨運用數據於環境測試和評估策略的指引文件[Guidance Document for the Testing of Dissolution and Dispersion Stability of Nanomaterials and the Use of the Data for Further Environmental Testing and Assessment Strategies (No.318)]。涵蓋了奈米物質溶解和分散穩定性的測試，以及將數據用於進一步的環境測試和評估的方法。

目前 OECD 正在修訂 REACH 的測試規範及指引，以確保奈米物質資料的可靠性及符合法規監管標準，並且調整法律條文，特別是針對物化特徵的資訊需求。其他歐洲的法律也已調適設定規則用於鑑別（identification）含奈米產品如：化粧品法規（Cosmetics Regulation EC No 1223/2009）及殺生物劑產品法規（BPR）。

OECD 測試規範於 2021 年 6 月新增數篇測試指引文件，清單如表 2.3-4。

OECD 關於測試和評估的出版物（OECD Publications on Testing and Assessment）及人造奈米物質安全性系列的出版物（OECD Publications in the Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials），列於表 2.3-5 及 2.3-6。

此外，OECD 於 2021 年 3 月 17 日發布「全球化學物質資訊入口網站」（eChemPortal）v3.4 版本，新版網頁包括全新的用戶界面及改良的搜尋方式。eChemPortal 更與 OECD Harmonized Template 2018 提供之現有化學測試報告的摘要資訊進行結合。eChemPortal 的用戶可以快速、有效地搜索化學物質資訊，包含：物理化學性質、生態毒理資訊、毒理資訊、環境宿命與行為、分類與標示、暴露與使用。搜尋結果會經過濾和排序，並根據目標化學物的性質預期搜尋結果的數量。搜尋結果也會提供資料來源的外部連結，如 EviChem、ACToR、ChemInfo、ECHA C&L Inventory 等。

表 2.3-4 OECD 於 2021 年發布之測試指引文件

日期	編號	英文文件名稱	中文文件名稱
第 2 節：對生物系統的影響 (Effects on Biotic Systems)			
6/18	Test No. 249	Fish Cell Line Acute Toxicity - The RTgill-W1 cell line assay	魚類細胞急性毒性 RTgill-W1 細胞株試驗
6/17	Test No. 250	EASZY assay - Detection of Endocrine Active Substances, acting through estrogen receptors, using transgenic tg(cyp19a1b:GFP) Zebrafish embryos	EASZY 檢測——使用轉殖基因斑馬魚 Tg (cyp19a1b-GFP) 胚胎檢測通過雌激素受體起作用的內分泌活性物質
第 4 節：健康效應 (Health Effects)			
6/17	Test No. 405	Acute Eye Irritation/Corrosion	急性眼睛刺激/腐蝕試驗
6/17	Test No. 406	Skin Sensitisation	皮膚致敏
6/17	Test No. 439	<i>In Vitro</i> Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method	體外皮膚刺激：重建人類表皮試驗
6/17	Test No. 442C	<i>In Chemico</i> Skin Sensitisation	皮膚致敏性試驗
6/17	Test No. 455	Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation <i>In Vitro</i> Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists	基於性能的測試指引——用於檢測雌激素受體激動劑和拮抗劑的穩定轉染體外反式激活試驗
6/17	Test No. 494	Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals Not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage	對眼睛刺激或嚴重眼睛損傷——用於識別不需要分類和標記的化學品的玻璃膠眼刺激性測試方法
6/17	Test No. 498	<i>In vitro</i> Phototoxicity - Reconstructed Human Epidermis Phototoxicity test method	體外光毒性：重建的人類表皮光毒性試驗
6/22	Guideline No. 497	Defined Approaches on Skin Sensitisation	皮膚致敏的定義方法
第 5 節：其他測試規範 (Other Test Guidelines)			
6/17	Test No. 509	Crop Field Trial	作物田間試驗

表 2.3-5 OECD 關於測試和評估的出版物

年代	編號	測試和評估文件名稱 (Testing and Assessment)
2020	318	Guidance Document for the Testing of Dissolution and Dispersion Stability of Nanomaterials, and the Use of the Data for Further Environmental Testing and Assessment
2020	317	Guidance Document on Aquatic and Sediment Toxicological Testing of Nanomaterials
2018	292	Case Study on Grouping and Read-across for Nanomaterials Genotoxicity of Nano-TiO ₂
2017	276	Report of the validation study supporting the development of the draft (new) TG 318 on dispersion behaviour of nanomaterials in different environmental media

表 2.3-6 OECD 關於人造奈米物質安全性系列的出版物 (1/5)

編號	報告名稱 (REPORTS)
2020 年	
97	Developments in Delegations on the Safety of Manufactured Nanomaterials – Tour de Table
96	Moving Towards a Safe(r) Innovation Approach (SIA) for More Sustainable Nanomaterials and Nano-enabled Products
95	Advancing Adverse Outcome Pathway (AOP) Development for Nanomaterial Risk Assessment and Categorisation/ PART3: Workshop Report and Recommendations
94	Advancing Adverse Outcome Pathway (AOP) Development for Nanomaterial Risk Assessment and Categorisation/ PART2: Case Study on Tissue Injury
93	Advancing Adverse Outcome Pathway (AOP) Development for Nanomaterial Risk Assessment and Categorisation/ PART1: Final Project Report and Recommendations with Methodology to Prioritise Key Events (KEs) Relevant for Manufactured Nanomaterials
92	Ability of biopersistent/biodurable manufactured nanomaterials (MNs) to induce lysosomal membrane permeabilization (LMP) as a prediction of their long-term toxic effects
2019 年	
91	Guiding Principles for Measurements and Reporting for Nanomaterials: Physical Chemical Parameters
90	Physical-Chemical Decision Framework to inform Decisions for Risk Assessment of Manufactured Nanomaterials (see accompanying worksheets)
89	Developments in Delegations on the Safety of Manufactured Nanomaterials - Tour de Table

表 2.3-6 OECD 關於人造奈米物質安全性系列的出版物 (2/5)

編號	報告名稱 (REPORTS)
2018 年	
88	Investigating the Different Types of Risk Assessments of Manufactured Nanomaterials
87	Developments in Delegations on the Safety of Manufactured Nanomaterials - Tour de Table
86	Assessment of Biodurability of Nanomaterials and the Surface Ligands
85	Evaluation of <i>in vitro</i> methods for human hazard assessment applied in the OECD Testing Programme for the Safety of Manufactured Nanomaterials
TG 318	Dispersion Stability of Nanomaterials in Simulated Environmental Media - Spreadsheet to be used in conjunction with TG 318 (Excel) 奈米材料在模擬環境介質中的分散穩定性。 該測試指引描述了一種測試程序，可獲取有關人造奈米材料在模擬環境介質中的分散穩定性的信息。該指引的主要目的是評估奈米材料在環境相關條件下獲得膠體分散體並保持該分散體的能力。該測試程序涉及在校準的超聲處理程序的幫助下分散奈米材料，並確定一組測試瓶中奈米材料的質量濃度，同時顆粒在不同水化學環境中進行均聚和沈降。
TG 412	28 days (Subacute) Inhalation Toxicity Study 亞急性吸入毒性：28 天研究。 修訂後的《測試指引 412 (TG 412)》旨在在反復暴露有限的時間段 (28 天) 後，通過吸入途徑充分錶徵測試物品的毒性，並為定量吸入風險評估提供數據。它於 2017 年進行了更新，以能夠測試和表徵所測試的奈米材料的效果。每天至少 6 隻雄性和 5 隻雌性嚙齒動物的組每天暴露 6 小時，持續 28 天：a) 三種或三種以上濃度水平的測試化學品，b) 過濾空氣 (陰性對照)，和/或 c) 車輛 (車輛) 控制。動物通常每週暴露 5 天，但每周也允許暴露 7 天。總是對男性和女性進行測試，但是如果已知某性別更容易受特定測試物品的影響，則可以將它們暴露在不同的濃度水平下。該指引使研究主管可以靈活地包括衛星 (可逆性) 組，支氣管肺泡灌洗 (BAL)，肺部負擔 (LB)，顆粒，神經系統檢查以及其他臨床病理和組織病理學評估，以便更好地表徵檢查的毒性化學的。
TG 413	90 days (Subchronic) Inhalation Toxicity Study 亞慢性吸入毒性：90 天研究 修訂後的《試驗指引 413 (TG 413)》旨在重複表徵 90 天后，通過吸入途徑充分錶徵試驗物品的毒性，並為定量吸入風險評估提供數據。它於 2017 年進行了更新，以能夠測試和表徵所測試的奈米材料的效果。每天至少 6 隻雄性嚙齒動物和 10 隻雌性嚙齒動物在 90 天的時間內暴露於以下環境中：a) 三種或三種以上濃度的測試化學品，b) 過濾空氣 (陰性對照)，和/或 c) 車輛 (車輛) 控制。動物通常每週暴露 5 天，但每周也允許暴露 7 天。雄性和雌性總是經過測試，但是如果已知某性別更容易受特定測試化學物質的影響，則可能會以不同的濃度水平暴露於男性和女性。研究的結果包括測量以及日常和詳細的觀察 (血液學和臨床化學)，以及眼科，大體病理學，器官重量和組織病理學。該測試指引可靈活地包括附屬 (可逆性) 組，臨時犧牲，支氣管肺泡灌洗 (BAL)，微粒肺負荷 (LB)
2017 年	
84	Consumer and Environmental Exposure to Manufactured Nanomaterials -Information Used to Characterize Exposures: Analysis of a Survey
83	Silver Nanoparticles: Summary of the Dossier
82	Strategies, Techniques and Sampling Protocols for Determining the Concentrations of Manufactured Nanomaterials in Air at the Workplace
81	Developments in Delegations on the safety of manufactured nanomaterials
80	Alternative testing strategies in risk assessment of manufactured nanomaterials: current state of knowledge and research needs to advance their use

表 2.3-6 OECD 關於人造奈米物質安全性系列的出版物 (3/5)

編號	報告名稱 (REPORTS)
2016 年	
79	Strategy for Using Metal Impurities as Carbon Nanotube Tracers
78	Developments on the Safety of Manufactured Nanomaterials Tour de Table from OECD Delegations
77	Gold Nanoparticle Occupational Exposure Assessment in A Pilot Scale Facility
76/ ADD	Grouping and Read-Across for the Hazard Assessment of Manufactured Nanomaterials: Participants List to the Expert Meeting
76	Grouping and Read-Across for the Hazard Assessment of Manufactured Nanomaterials
75	Future Challenges Related to the Safety of Manufactured Nanomaterials: Report from the Special Session
74	Exposure Assessment of Nano-Silver (AgNP):Case Study
73	Titanium Dioxide: Summary of the Dossier
72	Toxicokinetics of Manufactured Nanomaterials: Report from the OECD Expert Meeting
71	Silicon dioxide: summary of the dossier
70	Single walled carbon nanotubes (SWCNTs): summary of the dossier
69	Fullerenes (C60): summary of the dossier
68	Multiwalled carbon nanotubes (MWCNT): summary of the dossier
67	Developments in delegations on the safety of manufactured nanomaterials - Tour de table
66	Categorisation of manufactured nanomaterials
65	Physical-chemical properties of nanomaterials: Evaluation of methods applied in the OECD-WPMN testing programme
64	Approaches on nano grouping/ equivalence/ read-across concepts based on physical-chemical properties (GERA-PC) for regulatory regimes
63	Physical-chemical parameters: measurements and methods relevant for the regulation of nanomaterials
2015 年	
62	Considerations for using dissolution as a function of surface chemistry to evaluate environmental behaviour of nanomaterials in risk assessments: Preliminary Case Study Using Silver Nanoparticles
61	Developments in delegations on the safety of manufactured nanomaterials - Tour de table
60	Developments in delegations on the safety of manufactured nanomaterials - Tour de table
59	Developments on the Safety of Manufactured Nanomaterials: 2013
58	Preliminary guidance notes on Nanomaterials: Interspecies variability factors in human health risk assessment
57	Guidance Manual towards the Integration of Risk Assessment into Life Cycle Assessment of Nano-Enabled Applications
56	Analysis of the Survey on Available Methods and Models for Assessing Exposure to Manufactured Nanomaterials

表 2.3-6 OECD 關於人造奈米物質安全性系列的出版物（4/5）

編號	報告名稱 (REPORTS)
55	Harmonized Tiered Approach to Measure and Assess the Potential Exposure to Airborne Emissions of Engineered Nano-Objects and their Agglomerates and Aggregates at Workplaces
44-54	Dossiers derived from the Testing Programme on Manufactured Nanomaterials available at: http://www.oecd.org/chemicalsafety/nanosafety/testing-programme-manufactured-nanomaterials.htm
43	Genotoxicity of Manufactured Nanomaterials : Report of the OECD expert meeting
42	Report of the questionnaire on regulatory regimes for manufactured nanomaterials 2010-2011
41	Report of the OECD expert meeting on the physical chemical properties of manufactured nanomaterials and test guidelines + Addendum
40	Ecotoxicology and Environmental Fate of Manufactured Nanomaterials: Test Guidelines + Addendum
39	Workshop on Environmentally Sustainable Use of Manufactured Nanomaterials
38	Co-Operation on Risk Assessment: Prioritisation of Important Issues on Risk Assessment of Manufactured Nanomaterials
37	Developments on the Safety of Manufactured Nanomaterials - Tour de Table - 10th Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials
36	Guidance on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials
35	Inhalation Toxicity Testing: Expert Meeting on Potential Revisions to OECD Test Guidelines and Guidance Document
34	Developments on the Safety of Manufactured Nanomaterials - Tour de Table - 9th Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials
33	Important Issues on Risk Assessment of Manufactured Nanomaterials
32	National Activities on Life Cycle Assessment of Nanomaterials
31	Information Gathering Schemes on Nanomaterials: Lessons Learned and Reported Information
30	Regulated Nanomaterials: 2006-2009
29	Developments/Activities on the Safety of Manufactured Nanomaterials - Tour de Table - 8th Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials - ENV/JM/MONO(2011)12
28	Compilation and Comparison of Guidelines Related to Exposure to Nanomaterials in Laboratories - ENV/JM/MONO(2010)47
27	List of Manufactured Nanomaterials and List of Endpoints for Phase One of the Sponsorship Programme for the Testing of Manufactured Nanomaterials: Revision
26	Developments/Activities on the Safety of Manufactured Nanomaterials, Tour de Table - 7th Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials
25	Guidance Manual for the Testing of Manufactured Nanomaterials: OECD Sponsorship Programme: First Revision
24	Preliminary Guidance Notes on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials
23	Report of the Questionnaire on Regulatory Regimes for Manufactured Nanomaterials (2010)

表 2.3-6 OECD 關於人造奈米物質安全性系列的出版物（5/5）

編號	報告名稱 (REPORTS)
22	OECD Programme on the Safety of Manufactured Nanomaterials 2009-2012 Operational Plans of the Projects
21	Report of the Workshop on Risk Assessment of Manufactured Nanomaterials in a regulatory context, September 2009, Washington D.C., USA
20	Developments/Activities on the Safety of Manufactured Nanomaterials: Tour de Table - 6th Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials, October 2009
19	Analysis of Information Gathering Initiatives on Manufactured Nanomaterials
18	Manufactured Nanomaterials: Roadmap for Activities during 2009 and 2010
17	Developments in Delegations and other International Organisations on the Safety of Manufactured Nanomaterials - Tour de Table
16	Manufactured Nanomaterials: Work Programme 2009- 2012
15	Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials
14	Guidance Manual for the Testing of Manufactured Nanomaterials: OECD's Sponsorship Programme (This document has been updated)
13	Report of an OECD Workshop on Exposure Assessment and Exposure Mitigation: Manufactured Nanomaterials
12	Comparison of Guidance on Selection of Skin Protective Equipment and Respirators for Use in the Workplace: Manufactured Nanomaterials
11	Emission Assessment for Identification of Sources and Release of Airborne Manufactured Nanomaterials in the Workplace: Compilation of Existing Guidance
10	Identification, Compilation and Analysis of Guidance Information for Exposure Measurement and Exposure Mitigation: Manufactured Nanomaterials
9	EHS Research Strategies on Manufactured Nanomaterials: Compilation of Outputs
8	Preliminary Analysis of Exposure Measurement and Exposure Mitigation in Occupational Settings: Manufactured Nanomaterials
7	Developments/Activities on the Safety of Manufactured Nanomaterials - Tour de Table - 4th Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials, June 2008
6	List of Manufactured Nanomaterials and List of Endpoints for Phase One of the OECD Testing Programme
5	Developments/Activities on the Safety of Manufactured Nanomaterials: Tour de Table - 3Rsd Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials, November 2007
4	Manufactured Nanomaterials: Programme of Work 2006-2008
3	Developments/Activities on the Safety of Manufactured Nanomaterials: Tour de table - 2nd Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials, April 2007
2	Developments/Activities on the Safety of Manufactured Nanomaterials: Tour de table - 1st Meeting of the Working Party on Manufactured Nanomaterials, October 2006
1	Report of the OECD Workshop on the Safety of Manufactured Nanomaterials: Building Co-operation, Co-ordination and Communication, December 2005

二、國際標準化組織（International Organization for Standardization, ISO）在奈米物質物化特性及毒性測試的相關技術報告

ISO 於 2005 年成立「ISO/TC 229」奈米技術委員會，負責奈米物質標準的制定，參與之會員國有 39 國、觀察員國有 18 國。至 2021 年 9 月 28 日止已發布之奈米物質標準有 92 項(表 2.3-7)、正在制訂之標準有 31 項(表 2.3-8)。

而針對毒性測試相關的技術報告，目前最新公布的標準資料為 2020 年 5 月的〈ISO/TS 22082:2020 Nanotechnologies-Assessment of nanomaterial toxicity using dechorionated zebrafish embryo〉（奈米技術-使用去絨毛膜斑馬魚胚胎評估奈米物質的毒性）此文以使用斑馬魚的去絨毛膜胚胎（包括去除程序）來對奈米物質進行毒性評估（ISO, 2020）。

奈米相關的毒性測試技術報告如〈ISO/TR 16197〉，此技術報告指出為了符合國際間對於動物毒性試驗的 3Rs 原則以及能夠加快進行毒性試驗的流程，快速與大量的高通量毒性篩選（high throughput screening, HTS）是跟上奈米材料在目前市場上出現速率不可缺少的方式。其公告之奈米物質毒理測試篩選方法即提供了很好的測試建議方法包括：（一）體外試驗模式之毒性篩選方法：細胞毒性篩選指引、細胞內氧化壓力篩選方法、發炎及免疫反應篩選方法、基因毒性篩選方法與皮膚毒性測試。（二）體內試驗模式之毒性篩選方法：斑馬魚胚胎模式、大鼠血管栓塞篩檢及皮膚致敏測試。此外，ISO 於 2021 年 4 月更新 ISO / TS 80004 國際奈米技術標準系列（表 2.3-9）。

表 2.3-7 已發佈之奈米物質 ISO 標準 (1/6)

編號	奈米物質 ISO 標準
1	ISO/TS 12025:2021 Nanomaterials — Quantification of nano-object release from powders by generation of aerosols
2	ISO 19749:2021 Nanotechnologies — Measurements of particle size and shape distributions by scanning electron microscopy
3	ISO/TS 22292:2021 Nanotechnologies — 3D image reconstruction of rod-supported nano-objects using transmission electron microscopy
4	ISO/TR 22293:2021 Evaluation of methods for assessing the release of nanomaterials from commercial, nanomaterial-containing polymer composites
5	ISO/TS 21236-2:2021 Nanotechnologies — Clay nanomaterials — Part 2: Specification of characteristics and measurements for clay nanoplates used for gas-barrier film applications
6	ISO/TS 21346:2021 Nanotechnologies — Characterization of individualized cellulose nanofibril samples
7	ISO/TS 21356-1:2021 Nanotechnologies — Structural characterization of graphene — Part 1: Graphene from powders and dispersions
8	ISO/TS 21633:2021 Label-free impedance technology to assess the toxicity of nanomaterials in vitro
9	ISO/TS 23034:2021 Nanotechnologies — Method to estimate cellular uptake of carbon nanomaterials using optical
10	ISO/TS 23362:2021 Nanotechnologies — Nanostructured porous alumina as catalyst support for vehicle exhaust emission control — Specification of characteristics and measurement methods
11	ISO/TS 23459:2021 Nanotechnologies — Assessment of protein secondary structure during an interaction with nanomaterials using ultraviolet circular dichroism
12	IEC/TR 63258:2021 Nanotechnologies — A guideline for ellipsometry application to evaluate the thickness of nanoscale films
13	ISO/TS 80004-6:2021 NANOTECHNOLOGIES — VOCABULARY — PART 6: NANO-OBJECT CHARACTERIZATION
14	ISO/TS 11308:2020 Nanotechnologies — Characterization of carbon nanotube samples using thermogravimetric analysis
15	ISO 17200:2020 Nanotechnology — Nanoparticles in powder form — Characteristics and measurements

表 2.3-7 已發佈之奈米物質 ISO 標準 (2/6)

編號	奈米物質 ISO 標準
16	ISO/TS 19808:2020 Nanotechnologies — Carbon nanotube suspensions — Specification of characteristics and measurement methods
17	ISO/TS 21237:2020 Nanotechnologies — Air filter media containing polymeric nanofibres — Specification of characteristics and measurement methods
18	ISO 21363:2020 Nanotechnologies — Measurements of particle size and shape distributions by transmission electron microscopy
19	ISO/TS 21412:2020 Nanotechnologies — Nano-object-assembled layers for electrochemical bio-sensing applications — Specification of characteristics and measurement methods
20	ISO/TR 21624:2020 Nanotechnologies — Considerations for <i>in vitro</i> studies of airborne nano-objects and their aggregates and agglomerates (NOAA)
21	ISO/TS 21975:2020 Nanotechnologies — Polymeric nanocomposite films for food packaging with barrier properties — Specification of characteristics and measurement methods
22	ISO/TS 22082:2020 Nanotechnologies — Assessment of nanomaterial toxicity using dechorionated zebrafish embryo
23	ISO/TS 80004-3:2020 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 3: Carbon nano-objects
24	ISO/TS 80004-8:2020 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 8: Nanomanufacturing processes
25	ISO/TS 10867:2019 Nanotechnologies — Characterization of single-wall carbon nanotubes using near infrared photoluminescence spectroscopy
26	ISO/TS 11251:2019 Nanotechnologies — Characterization of volatile components in single-wall carbon nanotube samples using evolved gas analysis/gas chromatograph-mass spectrometry
27	ISO/TR 19733:2019 Nanotechnologies — Matrix of properties and measurement techniques for graphene and related two-dimensional (2D) materials
28	ISO/TS 19807-1:2019 Nanotechnologies — Magnetic nanomaterials — Part 1: Specification of characteristics and measurements for magnetic nanosuspensions
29	ISO/TS 20660:2019 Nanotechnologies — Antibacterial silver nanoparticles — Specification of characteristics and measurement methods
30	ISO 20814:2019 Nanotechnologies — Testing the photocatalytic activity of nanoparticles for NADH oxidation

表 2.3-7 已發佈之奈米物質 ISO 標準 (3/6)

編號	奈米物質 ISO 標準
31	ISO/TS 21236-1:2019 Nanotechnologies — Clay nanomaterials — Part 1: Specification of characteristics and measurement methods for layered clay nanomaterials
32	ISO/TS 21361:2019 Nanotechnologies — Method to quantify air concentrations of carbon black and amorphous silica in the nanoparticle size range in a mixed dust manufacturing environment
33	ISO/TR 21386:2019 Nanotechnologies — Considerations for the measurement of nano-objects and their aggregates and agglomerates (NOAA) in environmental matrices
34	ISO/TR 22019:2019 Nanotechnologies — Considerations for performing toxicokinetic studies with nanomaterials
35	ISO/TR 12885:2018 Nanotechnologies — Health and safety practices in occupational settings
36	ISO/TS 16195:2018 Nanotechnologies — Specification for developing representative test materials consisting of nano-objects in dry powder form
37	ISO 19007:2018 Nanotechnologies — <i>In vitro</i> MTS assay for measuring the cytotoxic effect of nanoparticles
38	ISO/TR 20489:2018 Nanotechnologies — Sample preparation for the characterization of metal and metal-oxide nano-objects in water samples
39	ISO/TS 21362:2018 Nanotechnologies — Analysis of nano-objects using asymmetrical-flow and centrifugal field-flow fractionation
40	ISO/TS 10868:2017 Nanotechnologies — Characterization of single-wall carbon nanotubes using ultraviolet-visible-near infrared (UV-vis-NIR) absorption spectroscopy
41	ISO/TS 11888:2017 Nanotechnologies — Characterization of multiwall carbon nanotubes — Mesoscopic shape factors
42	ISO/TS 13278:2017 Nanotechnologies — Determination of elemental impurities in samples of carbon nanotubes using inductively coupled plasma mass spectrometry
43	ISO/TR 18401:2017 Nanotechnologies — Plain language explanation of selected terms from the ISO/IEC 80004 series
44	ISO/TS 18827:2017 Nanotechnologies — Electron spin resonance (ESR) as a method for measuring reactive oxygen species (ROS) generated by metal oxide nanomaterials
45	ISO/TR 19057:2017 Nanotechnologies — Use and application of acellular <i>in vitro</i> tests and methodologies to assess nanomaterial biodegradability

表 2.3-7 已發佈之奈米物質 ISO 標準 (4/6)

編號	奈米物質 ISO 標準
46	ISO/TS 19590:2017 Nanotechnologies — Size distribution and concentration of inorganic nanoparticles in aqueous media via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry
47	ISO/TR 19601:2017 Nanotechnologies — Aerosol generation for air exposure studies of nano-objects and their aggregates and agglomerates (NOAA)
48	ISO/TS 20477:2017 Nanotechnologies — Standard terms and their definition for cellulose nanomaterial
49	ISO/TS 20787:2017 Nanotechnologies - Aquatic toxicity assessment of manufactured nanomaterials in saltwater lakes using <i>Artemia</i> sp. Nauplii
50	IEC/TS 80004-9:2017 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 9: Nano-enabled electrotechnical products and systems
51	ISO/TS 80004-11:2017 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 11: Nanolayer, nanocoating, nanofilm, and related terms
52	ISO/TS 80004-13:2017 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 13: Graphene and related two-dimensional (2D) materials
53	ISO/TR 16196:2016 Nanotechnologies — Compilation and description of sample preparation and dosing methods for engineered and manufactured nanomaterials
54	ISO/TR 18196:2016 Nanotechnologies — Measurement technique matrix for the characterization of nano-objects
55	ISO/TR 18637:2016 Nanotechnologies — Overview of available frameworks for the development of occupational exposure limits and bands for nano-objects and their aggregates and agglomerates (NOAAs)
56	ISO/TS 19006:2016 Nanotechnologies — 5-(and 6)-Chloromethyl-2',7' Dichloro-dihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCF-DA) assay for evaluating nanoparticle-induced intracellular reactive oxygen species (ROS) production in RAW 264.7 macrophage cell line
57	ISO/TS 19337:2016 Nanotechnologies — Characteristics of working suspensions of nano-objects for <i>in vitro</i> assays to evaluate inherent nano-object toxicity
58	ISO/TR 19716:2016 Nanotechnologies — Characterization of cellulose nanocrystals
59	ISO/TS 80004-12:2016 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 12: Quantum phenomena in nanotechnology
60	ISO/TR 17302:2015 Nanotechnologies — Framework for identifying vocabulary development for nanotechnology applications in human healthcare
61	ISO/TS 17466:2015 Use of UV-Vis absorption spectroscopy in the characterization of cadmium chalcogenide colloidal quantum dots

表 2.3-7 已發佈之奈米物質 ISO 標準 (5/6)

編號	奈米物質 ISO 標準
62	ISO/TS 18110:2015 Nanotechnologies — Vocabularies for science, technology and innovation indicators
63	ISO/TS 80004-1:2015 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 1: Core terms
64	ISO/TS 80004-2:2015 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 2: Nano-objects
65	ISO/TS 12901-2:2014 Nanotechnologies — Occupational risk management applied to engineered nanomaterials — Part 2: Use of the control banding approach
66	ISO/TR 14786:2014 Nanotechnologies — Considerations for the development of chemical nomenclature for selected nano-objects
67	ISO/TR 16197:2014 Nanotechnologies — Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials
68	ISO/TS 16550:2014 Nanotechnologies — Determination of silver nanoparticles potency by release of muramic acid from <i>Staphylococcus aureus</i>
69	ISO/TS 13830:2013 Nanotechnologies — Guidance on voluntary labelling for consumer products containing manufactured nano-objects
70	ISO/TS 10797:2012 Nanotechnologies — Characterization of single-wall carbon nanotubes using transmission electron microscopy
71	ISO/TR 10929:2012 Nanotechnologies — Characterization of multiwall carbon nanotube (MWCNT) samples
72	ISO/TR 11811:2012 Nanotechnologies — Guidance on methods for nano- and microtribology measurements
73	ISO/TS 11931:2012 Nanotechnologies — Nanoscale calcium carbonate in powder form — Characteristics and measurement
74	ISO/TS 11937:2012 Nanotechnologies — Nanoscale titanium dioxide in powder form — Characteristics and measurement
75	ISO/TS 12901-1:2012 Nanotechnologies — Occupational risk management applied to engineered nanomaterials — Part 1: Principles and approaches
76	ISO/TR 13014:2012 Nanotechnologies — Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment
77	ISO/TR 13014:2012/COR 1:2012 Nanotechnologies — Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment — Technical Corrigendum 1

表 2.3-7 已發佈之奈米物質 ISO 標準 (6/6)

編號	奈米物質 ISO 標準
78	ISO/TR 13329:2012 Nanomaterials — Preparation of material safety data sheet (MSDS)
79	ISO/TS 14101:2012 Surface characterization of gold nanoparticles for nanomaterial specific toxicity screening: FT-IR method
80	IEC/TS 62607-2-1:2012 Nanomanufacturing - key control characteristics for CNT film applications - Resistivity — Part 2-1:
81	IEC/TS 62622:2012 Artificial gratings used in nanotechnology — Description and measurement of dimensional quality parameters
82	ISO/TS 80004-7:2011 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 7: Diagnostics and therapeutics for healthcare
83	ISO/TS 10798:2011 Nanotechnologies — Characterization of single-wall carbon nanotubes using scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray spectrometry analysis
84	ISO/TS 12805:2011 Nanotechnologies — Materials specifications — Guidance on specifying nano-objects
85	ISO/TR 13121:2011 Nanotechnologies — Nanomaterial risk evaluation
86	ISO/TS 80004-4:2011 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 4: Nanostructured materials
87	ISO/TS 80004-5:2011 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 5: Nano/bio interface
88	ISO/TR 11360:2010 Nanotechnologies — Methodology for the classification and categorization of nanomaterials
89	ISO/TR 12802:2010 Nanotechnologies — Model taxonomic framework for use in developing vocabularies — Core concepts
90	ISO 10801:2010 Nanotechnologies — Generation of metal nanoparticles for inhalation toxicity testing using the evaporation/condensation method
91	ISO 10808:2010 Nanotechnologies — Characterization of nanoparticles in inhalation exposure chambers for inhalation toxicity testing
92	ISO 29701:2010 Nanotechnologies — Endotoxin test on nanomaterial samples for <i>in vitro</i> systems — Limulus amoebocyte lysate (LAL) test

表 2.3-8 正在開發制定中的測試標準（1/2）

編號	奈米物質 ISO 標準
1	ISO/AWI TS 4958 Nanotechnologies — Liposomes terminology
2	ISO/AWI TS 4971 Nanotechnologies — Performance evaluation of nanosuspensions containing clay nanoplates for quorum quenching
3	ISO/WD TS 4988 Nanotechnologies — Bioavailability assessment of manufactured nanomaterials in an aquatic environment using <i>Tetrahymena</i> sp.
4	ISO/WD TS 5094 Nanotechnologies — Assessment of peroxidase-like activity of metal and metal oxide nanoparticles
5	ISO/WD TR 5387 Nanotechnologies: Lung burden measurement of nanomaterials for inhalation toxicity studies
6	ISO/WD TS 7833 Extraction method of nanomaterials from organs by the proteinase K digestion
7	ISO/CD TS 12901-1 Nanotechnologies — Occupational risk management applied to engineered nanomaterials — Part 1: Principles and approaches
8	ISO/AWI TS 12901-2 Nanotechnologies — Occupational risk management applied to engineered nanomaterials — Part 2: Use of the control banding approach
9	ISO/AWI TR 13329 Nanomaterials — Preparation of material safety data sheet (MSDS)
10	ISO/CD TS 19337 Nanotechnologies — Characteristics of working suspensions of nano-objects for in vitro assays to evaluate inherent nano-object toxicity
11	ISO/WD TS 19590 Nanotechnologies — Size distribution and concentration of inorganic nanoparticles in aqueous media via single particle inductively coupled plasma mass spectrometry
12	ISO/DTS 19807-2 Nanotechnologies — Magnetic nanomaterials — Part 2: Part 2: Specification of characteristics and measurement methods for nanostructured magnetic beads for nucleic acid extraction
13	ISO/AWI TS 20477 Nanotechnologies — Standard terms and their definition for cellulose nanomaterial
14	ISO/DTS 21357 Nanotechnologies — Evaluation of the mean size of nano-objects in liquid dispersions by static multiple light scattering (SMLS)
15	ISO/AWI 21362 Nanotechnologies — Analysis of nano-objects using asymmetrical-flow and centrifugal field-flow fractionation
16	ISO/AWI TS 22298 Nanotechnologies — Silica nanomaterials — Specifications of characteristics and measurement methods for nanostructured porous silica samples with ordered nanopore array

表 2.3-8 正在開發制定中的測試標準 (2/2)

編號	奈米物質 ISO 標準
17	ISO/DTR 22455 Nanotechnologies - High throughput screening method for nanoparticles toxicity using 3D model cells
18	ISO/PRF TS 23151 Nanotechnologies — Particle size distribution for cellulose nanocrystals
19	ISO/DTS 23302 Nanotechnologies — Guidance on measurands for characterising nano-objects and materials that contain them
20	ISO/AWI TS 23361 Nanotechnologies — Crystallinity of cellulose nanomaterials by powder X-ray diffraction (Ruland-Rietveld analysis)
21	ISO/WD TS 23366 Nanotechnologies — Performance evaluation requirements for quantifying biomolecules using fluorescent nanoparticles in immunohistochemistry
22	ISO/WD TS 23367 Nanotechnologies — Performance characteristics of nanosensors for chemical and biomolecule detection
23	ISO/DTR 23463 Nanotechnologies — Characterization of carbon nanotube and carbon nanofiber aerosols in relation to inhalation toxicity tests
24	ISO/DTS 23650 Nanotechnologies — Evaluation of the antimicrobial performance of textiles containing manufactured nanomaterials
25	ISO/WD TR 23652 Nanotechnologies — Considerations for radiolabelling methods of nanomaterials for performance evaluation
26	ISO/DTS 23690 Nanotechnologies — Multiwall carbon nanotubes — Determination of amorphous carbon content by thermogravimetric analysis
27	ISO/AWI TS 23878 Nanotechnologies — Positron annihilation lifetime measurement for nanopore evaluation in materials
28	ISO/WD TR 24672 Nanotechnologies — Guidance on the measurement of nanoparticle number concentration
29	IEC/CD 62565-3-1 Nanomanufacturing — Material specifications — Part 3-1: Graphene — Blank detail specification
30	ISO/AWI 80004-1 Nanotechnologies – Vocabulary — Part 1: Core terms and definitions
31	ISO/AWI TS 80004-13 Nanotechnologies — Vocabulary — Part 13: Graphene and related two-dimensional (2D) materials

表 2.3-9 國際奈米技術標準系列

編號	奈米物質 ISO 標準系列
1	ISO/TS 80004-1 : Nanotechnologies – Vocabulary – Part 1: Core terms
2	ISO/TS 80004-2 : Nanotechnologies – Vocabulary – Part 2: Nano-objects
3	ISO/TS 80004-3 : Nanotechnologies – Vocabulary – Part 3: Carbon nano-objects
4	ISO/TS 80004-4 : Nanotechnologies – Vocabulary – Part 4: Nanostructured materials
5	ISO/TS 80004-5 : Nanotechnologies – Vocabulary – Part 5: Nano/bio interface
6	ISO/TS 80004-6 : Nanotechnologies – Vocabulary – Part 6: Nano-object characterization
7	ISO/TS 80004-7 : Nanotechnologies – Vocabulary – Part 7: Diagnostics and therapeutics for healthcare
8	ISO/TS 80004-8 : Vocabulary – Part 8: Nanomanufacturing processes
9	ISO/TS 80004-9 : Nanotechnologies – Vocabulary – Part 9: Nano-enabled electrotechnical products and systems
10	ISO/TS 80004-11 : Nanotechnologies – Vocabulary – Part 11: Nanolayer, nanocoating, nanofilm, and related terms
11	ISO/TS 80004-12 : Nanotechnologies – Vocabulary – Part 12: Quantum phenomena in nanotechnology
12	ISO/TS 80004-13 : Nanotechnologies – Vocabulary – Part 13: Graphene and related two-dimensional (2D) materials

第三章 導入國際化學品新興替代測試方法

章節摘要

本章主要說明國際化學品新興替代測試方法。3.1 節說明國際化學物質毒理及生態毒理替代測試發展，3.2 節說明優先採納替代測試清單與化學物質登錄指引調修建議，3.3 節說明奈米物質毒理及生態毒理替代測試發展，以及 3.4 節說明我國各部會共同推動替代測試方法。

3.1 國際化學物質毒理及生態毒理替代測試發展

國際上毒理及生態毒理替代測試日益成熟，各項評估技術、指引或工具方法更為多元，並為各國所採納可作為化學物質安全評估報告或物質登錄資料使用，近年國際上已有推廣替代測試方法的趨勢，許多先進國家或管理組織均致力於發展及應用替代測試方法，如 2020 年 6 月 ECHA 發布的技術報告中闡述，建議可使用於 REACH 法規的非動物方法，涵蓋使用過往數據、證據權重法、體外試驗（*in vitro*）、電腦模擬（*in silico*）等。許多毒理及生態毒理替代測試已逐步為各國所採納應用，我國應因應國情，選擇適宜之替代測試方法將其進行適當調適後，應用於毒理及生態毒理資訊的繳交，以符合動物福祉的精神來評估化學物質的危害。

隨著現今醫學與科技技術研發的進步，在各研究領域中動物試驗的需求也逐漸增加，全世界每年的實驗動物使用量不計其數。實驗動物在試驗過程中經歷痛苦甚至死亡，除涉及敏感的道德爭議外，還花費大量時間及高昂的費用，因此目前有許多替代測試的方法已被提出。以下概要說明國際間化學物質毒理及生態毒理資訊替代測試的發展現況。

3.1.1 替代測試方法的國際趨勢

一、動物替代 3Rs 原則

動物實驗 3Rs 原則是 by 科學家 William Russell 和 Rex Burch 於 1959 年在《人道實驗技術原理》中定義，核心內容包括：（一）替代（replacement），即

使用非動物系統、無脊椎動物、發育早期階段的脊椎動物、或其他非動物方法的測試方式來取代動物測試；(二)減量(reduction)，即減少所使用的動物數量；(三)精緻化(優化)(refinement)，即讓測試方法優化以提升受試動物的健康狀態，儘量選擇讓動物承受較少疼痛或折磨，或透過使用低等脊椎動物，如非哺乳動物的魚類來替代。目前歐盟已針對科學研究目的下與其他特定法規制定時，對實驗動物進行立法保護，雖 REACH 法案與生物產品規範內尚未明確提到，但 3Rs 原則已成為動物測試相關規定的基礎，不僅是應用在藥物的開發檢驗，也廣泛用在化學物質的測試中(Doke and Dhawale, 2015)。

二、毒理及生態毒理替代測試方法的國際發展

(一) 歐洲化學總署

REACH 法案、歐盟殺生物劑產品法規(BPR)及物質分類、標示與包裝法規(CLP)中均規範脊椎動物應作為最後的試驗動物方法，並須符合 3Rs 原則精神，因此需儘可能考量使用非動物方法來滿足所需之訊息要求及危害分類，僅在無法以非動物方法收集足夠可靠數據的情況下才能進行動物試驗(Strickland et al., 2016)。

非動物方法包括不涉及體內測試方式的所有方法，也涵蓋從動物試驗中所獲得之現有資訊所建立的方法，而不需要再進行新的動物測試(Raunio, 2011)。例如透過電腦預測模式定量結構活性關係(QSAR)的預測或分類(grouping)，都是根據現有的體內測試數據來進行。ECHA 亦密切關注國際上的科學發展與合作，包含建立非動物方法於危害分類等應用。

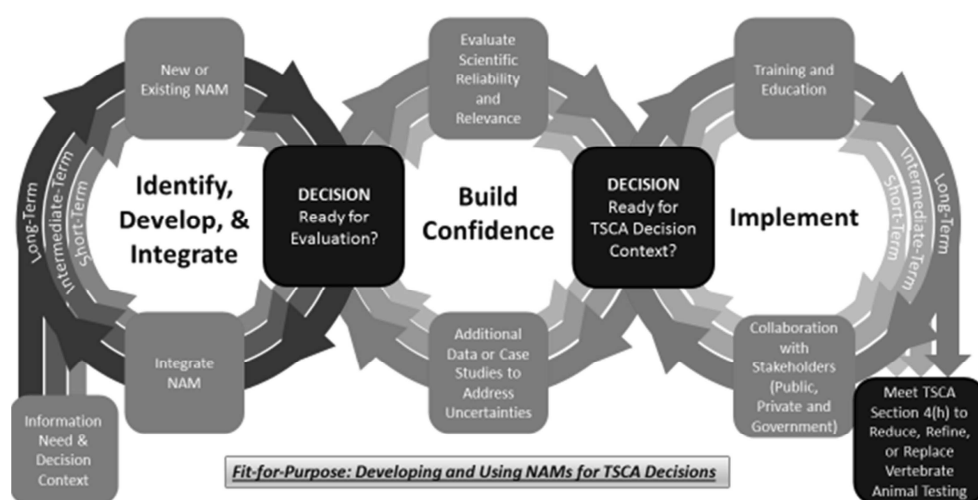
ECHA 於 2020 年 6 月發布《REACH 法規使用替代測試方法的現況》(The use of alternatives to testing on animals for REACH)，闡述業者使用替代測試方法的情況，統計 12,000 筆的登錄資料中，業者主要使用的替代測試方法，依次為交叉參照(25.1%)、數據豁免(7.7%)、證據權重法(3.7%)及 QSAR(2.6%)，且 2019 年相較於 2016 年起，皮膚腐蝕/刺激性使用替代測試方法增加 3 倍、嚴重的眼部損傷/眼睛刺激性增加 4 倍，而皮膚過敏性更是提高 20 倍以上。因此目前在 REACH 法規要求下，已大幅落實替代測試方法的使用。

三、美國環保署毒性物質管理法

美國環保署污染預防與毒性物質管制辦公室（The office of pollution prevention and toxics, OPPT）與其他相關單位共同制定與發起策略計畫（Strategic Plan），以發展與實施替代測試方法，提供與脊椎動物同等或更好的科學品質和相關訊息，評估化學物質或混合物對健康或環境造成之危害風險。策略計畫中大部分需仰賴新測試方法學（New approach methodologies, NAMs）達成，NAMs 已被廣泛定義為可減少使用動物，並且可應用於化學危害和風險評估的任何技術、方法、策略或組合，例如 AOPs、整合型測試評估方法（Integrated approaches to testing and assessment, IATA）及定義方法（defined approaches, DA）。

策略計畫包含 3 個重要核心：（一）以協助 TSCA 決策為目的，辨識、發展和整合 NAMs；（二）建立 NAMs 科學上的可信賴性及與 TSCA 決策的關聯性；（三）執行前述建立之 NAMs。NAMs 具有可快速提供資訊的特性，有助於確定評估化學物質的優先順序（prioritizing），並應用於新化學物質和既有化學物質的定量風險評估（圖 3.1-1），其驗證方法亦迅速發展。

有鑒於先進國家對於替代測試發展高度重視，以及落實使用替代測試方法，以避免使用動物試驗滿足資訊填補的現況，我國應逐漸跟進世界潮流，藉由替代測試方法來替代傳統毒理及生態毒理的試驗。



參考資料：https://www.epa.gov/sites/production/files/2018-06/documents/epa_alt_strat_plan_6-20-18_clean_final.pdf

圖 3.1-1 美國策略計畫的三個核心組成

3.1.2 國際多元化資料繳交策略用以減少不必要的動物實驗

早期大部分毒性測試方法均使用實驗動物進行體內試驗，但 OECD 早已持續驗證、接受許多替代方法，如體外試驗 (*in vitro*)、電腦模擬 (*in silico*)、化學方法 (*in chemico*) 等。另外，我國「中華民國國家標準 (CNS)」化學品分類與標示總則與「化學品分類及標示全球調和制度 (GHS)」，在分類總則中也已提到可以使用替代方法。而國際上正在嘗試落實此精神於化粧品產業以及化學品登記。另外，在歐盟 REACH 法規中亦提供不同的方式來避免不必要的動物測試，並確保新的脊椎動物測試只能做為最後的手段進行，建議採行之方式包含數據共享和運用調適方法 (*adaptations*)。

一、資料共享和聯合提交 (*data sharing and joint submission*)

所有相同化學物質的註冊者必須共享與脊椎動物相關的實驗資料，若無法達成協議，註冊者可以向 ECHA 提交申請，ECHA 經評估後提供相關實驗資訊。此外在 REACH 實施條例的第 15 條中提到，若是該物質在結構上類似於已登記的物質，則鼓勵共享已登記物質的動物研究數據，以用於分類或交叉參照，藉以發展並推廣使用替代方法來評估物質的危害，並避免不必要的動物試驗。

二、運用調適方法

歐盟 REACH 法規中，建議許多的調適方法，可以避免傳統標準測試方法並且應用替代方法，替代測試方法具有適當的理由和科學的合理性。調適方法可單獨應用或是結合證據權重方法，例如 QSAR、交叉參照及結合文獻上的證據，或許能預測目標物質可能的性質及宿命，上述所使用的數據必須充足、可靠並與特定測試終點相關。REACH 法規附件中被列為是可行的調適方法說明如下，除下列調適方法外，登錄人亦可藉由數據豁免減少繳交項目。

- (一) 使用現有數據，包括歷史上的人類數據。
- (二) 使用證據權重方法。
- (三) 使用定量結構活性關係滿足訊息要求。
- (四) 體外試驗方法。
- (五) 物質分類和交叉參照。

三、國際認可之替代測試方法簡介

(一) 體外模式系統－細胞和組織的培養

體外模式系統通常包含分離的器官、組織、細胞及生物化學系統，大部分的體外細胞模式是建立於類似細胞（單一細胞培養）或包含不同類型的細胞、組織培養。某些測試方法是以體外模式培養小器官，這些器官培養因是直接或取出部分暴露後或未暴露的動物、人類組織，因此也稱之為體外活體培養，活體外測試包含：雞眼分離方法(EU B.48/OECD TG 438)和牛角膜混濁和滲透性試驗方法(EU B.47/OECD TG 437) (Haque and Ward, 2018)。

細胞的來源可以直接取自人類、動物（初代培養）或是通常來自於癌細胞的特定不朽細胞株（specifically-developed immortal cell lines），細胞不朽化的替代技術方法目前已被發展且商業化，特定條件下不朽化細胞株可以進行分化並具有代謝能力。此外胚胎幹細胞（embryonic stem cells）或其他多功能幹細胞（pluripotent stem cells）亦可分化為器官特异性細胞類型，以檢測物質在不同組織中的活性作用，幹細胞應用目前仍在發展階段中，例如：以體外神經胚胎幹細胞作為替代方法測試神經發育毒性。

(二) 電腦模擬方法（*In silico*）

電腦預測毒理學（*In silico toxicology*）是一種以電腦計算所進行的毒性預測方法，電腦模式可以用於不同的目的，包含統合、分析數據、建立模型、模擬計算及預測毒性等，除此之外，電腦模式也經常應用於藥理學當中，可以分析藥物是否能產生治療效果亦或是產生不良反應 (Raies and Bajic, 2016)。這些方法學在建立過程及應用於毒理學效應預測時所使用到的資料，都是來自於現有的資料（包括體內研究的成果）。相關生態毒性電腦模擬工具目前已可取得，並且在科學文獻上廣泛地被使用 (Haque and Ward, 2018)。上述電腦預測模型可以透過不同方法得到，如結構警報（structural alerts）、定量結構活性關係（QSAR）、交叉參照（read across）等。

(三) 證據權重法

在法規毒理學上，證據權重法（weight of evidence, WOE）是用來判斷替代測試有無足夠證據來取代完整的動物實驗（Rovida et al., 2015）。對於 1 個完整的動物實驗而言，活體的生理狀況是複雜的，僅用 1 種替代方法不易取代此類研究。因此，使用 2 種或 2 種以上的替代測試研究結果作為證據，需完整解釋各自能替代掉動物實驗的哪些部分，不同的替代方法可取代部分不同。QSAR 模型在法規上屬於一小部分的 WOE，此時若能搭配其他的替代測試研究，2 者結合後可提升 WOE 之確效性，毒性替代測試的結果就更有法規毒理學上的意義，甚至能納入法規上的毒性測試報告。

(四) 整合型測試評估方法（IATA）

OECD 在 2020 年整理並公告了整合型測試評估方法之概況與指引的相關文件（IATA）。文件涵蓋從 IATA 的總體原則到特定的部分（方法和技術）如數據質量、不確定性評估、系統審查和證據權重等跨領域的問題。隨著新方法的快速發展以及在實際應用中所累積的經驗，OECD 也建議希望能不定期地更新該文件，以便能獲取更多的評估指引。

3.1.3 生態毒理資訊及其替代測試發展之現況

一、生態毒理學

當化學物質經排放到環境後，導致環境污染及造成環境中生物的不良影響及危害，這樣的議題是隸屬於生態毒理學的研究範疇，生態毒理學在化學品登錄的相關規範中，和其他的物質資訊有相同嚴格的標準，而化學品的環境危害和風險評估中，水生毒性和生物蓄積性評估是重要的部分，因此被納入歐盟的數項化學品法規中。其中包括有關化學品註冊、評估、授權和限制的法規、歐盟殺生物劑產品法規（BPR）植物保護產品（Plant Protection Products）法規和數據要求、藥品、飼料添加劑等（表 3.1-1）。

表 3.1-1 歐盟有關魚類毒性和生物蓄積性的法規訊息要求 (1/2)

監管框架	試驗終點		
	短期魚類毒性	長期魚類毒性	生物蓄積
工業化學品 (REACH) 法規 (EC) 第 1907/2006 號 (EC, 2006)	> 10 噸/年，若發生以下情況，則不進行： - 不太可能發生水生毒性，例如：高度不溶於水或不可能穿過生物膜的化學物質。 - 可以進行魚類的長期水生毒性研究。一般而言，請申請人考慮進行長期水生毒性測試。 - 若化學安全性評估表明有必要調查對水生生物的進一步影響。	> 100 噸/年 - 若化學安全性評估表明需要進一步研究對水生生物的影響，則註冊人應提議進行長期毒性試驗，適當測試的選擇取決於化學安全性評估的結果。 適當的測試： - 魚類生命早期毒性測試 (FELS) (OECD TG 210)。 - 魚類胚胎和卵黃囊吸收階段短期毒性測試 (OECD TG 212)。	> 1000 噸/年，在以下情況下不進行： - 物質具有低的生物蓄積性。 (例如 $\log K_{ow} \leq 3$) - 穿透生物膜的可能性低。 - 不可能直接和間接暴露於水生生物隔離區。
化粧品成分法規 (EC) 第 1223/2009 號 (EC, 2009b)	通過應用歐洲議會和理事會於 2006 年 12 月 18 日頒布的關於註冊、評估、授權和認證的第 1907/2006 號法規 (EC)，來考慮化粧品中使用的物質可能引起的環境問題，歐洲化學品管理局可以以跨部門的方式評估環境安全。		
植物保護產品數據要求-活性物質法規 (EU) 第 283/2013 號 (EU, 2013a)	活性物質：閾值法或 OECD TG 203 (虹鱔魚)。	活性物質：魚類生命早期階段 (FELS) 毒性測試 (OECD TG 210) 若可能暴露於地表水中，且該物質在水中穩定，則可能需要魚的整個生命週期測試。	活性物質：在以下情況下進行： $\log K_{ow} > 3$ 或其他跡象表明該化學物質可能在魚類中具有生物蓄積性。 - 該物質在水中穩定。
植物保護產品數據要求-產品法規 (EU) 284/2013 號 (EU, 2013b)	僅當無法從活性物質或整個物質中預測出毒性時，才需要魚的數據：閾值法或 OECD TG 203 (虹鱔魚)。	僅當無法從活性物質中預測毒性時，才應與主管當局討論研究的必要	
(EU) 528/2012 號歐盟法規 (歐盟, 2012a) 數據要求指南 (ECHA, 2013 年) 僅在可能接觸的情況下執行。產品說明：僅當缺少組件的有效數據或產生協同效應時，才對產品本身進行測試	活性物質：核心數據集對魚類的短期毒性測試 當需要短期魚類毒性數據時，應採用閾值方法 (分層策略)。如果可以進行有效的魚類長期水生毒性研究，則無需進行該研究。	活性物質：取決於命運/行為和預期用途的研究結果的附加數據集，例如對水生環境的危險和長期接觸： 可能需要對魚類進行長期毒性研究，一項或兩項試驗，OECD TG 210、212、215 或魚類整個生命週期試驗。	活性物質：核心數據集：估算方法和實驗確定。在以下情況下，可能無需進行實驗確定： 可以根據理化性質 (例如 $\log K_{ow} < 3$) 或其他證據表明該物質具有較低的生物濃縮潛力，可以證明這一點：可能需要在適當的水生物種中進行生物蓄積。

表 3.1-1 歐盟有關魚類毒性和生物蓄積性的法規訊息要求 (2/2)

監管框架	試驗終點		
	短期魚類毒性	長期魚類毒性	生物蓄積
獸藥產品採用初步篩選的逐步方法（第一階段）來識別暴露、生物蓄積性、持久性。如有必要則進行研究（第二階段）。 第二階段：CVMP/ VICH / 790/ 03-FINAL；歐洲、中東非洲（EMA, 2004）（對應於 VICH GL 38）	第二階段： A 級 - 水生作用研究 - OECD TG 203。	第二階段： B 級 - 如果魚類的風險商（PEC/PNEC）> 1，則執行 OECD TG 210-魚類早期生命階段測試。	II 期方法 B-如果 $\log K_{ow} > 4$ 且有其他研究的生物積累證據，則將進行 OECD TG 305。
人類藥物產品初步篩選（第一階段）逐步方法，以確定暴露、生物蓄積性及持久性。如果必要則將進行研究（第二階段）， 第二階段：CHMP/ SWP/ 4447/0（EMA, 2006 年）	不需要。	第二階段：Tier A - 基本要求 OECD TG 210 - 魚類早期生命階段測試。	第二階段：B 級-取決於 A 級命運的信息，有關藥物或其代謝物的生物富集作用研究。
飼料添加劑法規（EC）429/2008 號（EC, 2008a）和（EFSA, 2008）逐步確定初始階段（第一階段）添加劑是否可能對環境產生重大影響（基於估計的 PEC）。如果必要則進行研究（第二階段）	IIa 期：OECD TG 203	IIb 期：OECD TG 210	
CLP 法規（EC）1272/2008 EC（2008b）	在歐盟，水生環境危害的核心分類系統包括一種急性（急性 1）和三種慢性（慢性 1-3）危害分類類別（歐盟，2008 年）。如果沒有足夠的慢性毒性數據，則結合急性水生毒性數據和有關環境命運的信息（可降解性和生物蓄積性）來確定適當的慢性類別。		

二、生態毒理學之毒性範圍定義

生態毒理學相關的研究可以輔助研究人員評估於自然環境中，特定化學品是否會對相似的生物在短期或長期暴露下產生顯著的影響。而對於要如何描述化學物質的毒性，聯合國提出了 1 份規範，在 2003 年完成了「化學品分類及標示全球調和制度（GHS）」，其中對魚類急毒性做出以下的毒性範圍定義，以量化出的半致死濃度(50% lethal concentration, LC_{50})判斷在該範圍之下被稱為「對生態環境有毒性」或「對生態環境無毒性」等等毒性在法規毒理學上的描述（UN, 2001）。根據表 3.1-2 的標準分類，化學物質的生態毒性將被歸類為「對水生生物危害之不同程度」。這些標準詳細地說明危害分類的標準。可使用數據包含非脊椎動物的水蚤、水生植物的綠藻和水生脊椎動物的魚類，以下簡述生態毒理學 3 種常用於毒性試驗的標準方法及國際上對生態毒性範圍之定義。

表 3.1-2 水環境之危害物質級別（急毒性）

Category: Acute I	Acute toxicity	
	96 hr LC_{50} (for fish)	≤ 1 mg/L and/or
	48 hr EC_{50} (for crustacea)	≤ 1 mg/L and/or
	72 or 96 hr ErC_{50} (for algae or other aquatic plants)	≤ 1 mg/L.
Acute I may be subdivided for some regulatory systems to include a lower band at $L(E)C_{50} \leq 0.1$ mg/L.		
Category: Acute II		
	96 hr LC_{50} (for fish)	$>1 - \leq 10$ mg/L and/or
	48 hr EC_{50} (for crustacea)	$>1 - \leq 10$ mg/L and/or
	72 or 96 hr ErC_{50} (for algae or other aquatic plants)	$>1 - \leq 10$ mg/L.
Category: Acute III		
	96 hr LC_{50} (for fish)	$>10 - \leq 100$ mg/L and/or
	48 hr EC_{50} (for crustacea)	$>10 - \leq 100$ mg/L and/or
	72 or 96 hr ErC_{50} (for algae or other aquatic plants)	$>10 - \leq 100$ mg/L.
Some regulatory systems may extend this range beyond an $L(E)C_{50}$ of 100 mg/L through the introduction of another class.		

註：實驗結果的魚類急毒性之 LC_{50} 可參閱此規範，進一步判斷測試物質之水生毒性（UN, 2001）。

(一) 水藻（或稱綠藻）生長抑制試驗

藻類為水環境中最基本之生產者。將水藻直接暴露在含有不同濃度化學物質的水溶液中，持續一段時間後（水藻通常為 72 或 96 小時），觀察是否會對水藻的狀態產生持續生長、抑制生長或死亡，並可計算求得半致效濃度（50% effective concentration, EC_{50} ）或未觀察到效應濃度（no observed effect concentration, NOEC），藉以評估試驗化學物質對水藻之毒性。

(二) 水蚤急毒性試驗

水蚤作為甲殼綱動物，是水中生態系最為底層的消費者，也是急毒性試驗最常被用來檢測水質毒性的。其測試方法為將水蚤直接暴露在含有不同濃度化學品中，持續一段時間（水蚤通常為 48 小時），觀察是否會對水蚤產生無法行動的狀態或死亡，並求得半數影響濃度（ EC_{50} ）或無影響濃度（NOEC），以評估試驗物質對水蚤之毒性。

(三) 魚類急毒性試驗

魚類急毒性試驗原理是做為水中生態系之最高級消費者的魚類。將魚類暴露在試驗物質中，觀察是否會對魚類造成死亡，並求得 LC_{50} ，以評估物質對魚類之毒性（Raies & Bajic, 2016）。然而魚類急性毒性試驗並不符合 3Rs 原則的精神，因此，有許多研究團隊致力於改善魚類急性毒性試驗。將試驗物種的魚類替換成不具感知能力的斑馬魚胚胎，希望以斑馬魚胚胎替代魚類的毒性研究（OECD, 2013）。

然而目前大部分的既有化學物質及新興化學物質大多都缺乏生態相關的毒性資訊，生態毒理急需發展合理的解決方案來進行資訊的填補，也因此若是能應用替代測試方法來進行生態毒理學之資訊填補，將能有效率的避免化學品對於環境的危害，而過去 20 幾年在開發應用於生態毒性試驗的非哺乳類脊椎動物的替代方法方面獲得重大進展。目前認為有多項的替代測試方法具有潛力評估生態毒性，其中包含電腦模擬模式、體外模式，以及將這些工具結合而成的整合測試策略，都能更有效率的協助瞭解化學物質對環境的可能帶來的影響。

因魚類急性毒性、魚類長期毒性試驗及生物蓄積性是在生態毒理學上較難解決的議題，其中涉及脊椎動物、耗費大量時間及金錢的相關實驗，因此應更加關注相關替代測試方法的開發及發展，著重研析魚類短期毒性、魚類長期毒性試驗及生物蓄積性的替代測試方法，以下為魚類短期毒性、魚類長期毒性試驗及生物蓄積性的說明。

三、先進國家對於減少生態毒理試驗所需動物的發展現況

「歐盟參考實驗室－歐洲替代方法驗證中心（ECVAM）在水生毒性和生物蓄積性測試中，以替代、減量和精緻化（優化）的精神使用魚類之策略」文件中（2014），歐盟參考實驗室－歐洲替代方法驗證中心概述一種基於替代、減量及精緻化（優化）精神，用以測試水生毒性及生物蓄積性的策略，該策略是著重於監管單位所需要的試驗終點、最先進的科學技術以及在這些領域當中的近期活動。

考量到近期最先進的概念，歐盟參考實驗室－歐洲替代方法驗證中心提議應致力於使用各種不同方法，來進行物質在急性與慢性水生毒性以及生物蓄積性的辨識與分類，儘量減少或避免動物的使用。為了達到這個目的，應著重在以下 3 個關鍵目標：

- 策略目標 1：在水生毒性試驗替代及減少魚類的需求。
- 策略目標 2：在生物蓄積試驗替代及減少魚類的需求。
- 策略目標 3：減量及精緻化（優化）近期的魚類試驗。

圖 3.1-2、圖 3.1-3 中總結及描述了達到目的所需的目標、相關行動及時間表。儘管不同的試驗可能有更適合的操作方式，只要確保這些方法是對環境無害的，合併使用這些方法，亦能對規範測試產生重大影響。

（一）策略目標 1：在水生毒性試驗替代及減少魚類的需求

替代和減量水生毒性測試中的魚類。在第 1 年至 3 年間，提升魚類胚胎急性毒性試驗（OECD TG 236）以及閾值方法（OECD GD 126）的急性魚類毒性測試，並探討支持豁免慢性魚類試驗的可能性；而 3 年至 5 年間，對驗證可應用於急性魚類毒性測驗的魚細胞株相關試驗；在第 5 年之後應用於 AOP。

EURL ECVAM 在替代、減少及精緻化魚類水生毒性試驗與生物累積試驗的策略			
目標與相關行動	策略目標1： 在水生毒性試驗替代及減少魚類的需求	策略目標2： 在生物蓄積試驗替代及減少魚類的需求	策略目標3： 減少及精緻化近期的魚類試驗
	探索魚細胞株試驗的使用 • 驗證作為魚類急性毒性試驗的可能	探索毒物動力模型預測生物蓄積性的可行性 • 體外試驗數據、胚胎數據及體外代謝數據的使用	修改 OECD TG 203 魚類急性毒性試驗 • 減少魚類使用、降低濃度;使用人道的測試終點
	促進魚類胚胎試驗 (OECD TG 236) 作為魚類急毒性的試驗 • 使用規範、指導文件、資料庫的維護	改善推估 BCF 的 QSAR 模型 如:涵蓋代謝進行考量	修訂或刪除 OECD TG 212 魚類胚胎階段與卵黃囊階段的短期毒性試驗 • 更新至最新版本或考慮刪除
	促進閾值方法 (OECD GD 126) 作為魚類急性毒性試驗的使用 • 例如:動物用藥、飼料	OECD 魚肝體外代謝測試指南的發展 • 兩種方法試驗 (S9, 冷凍保存的肝細胞) • 測試方法的發展	制定 OECD TG 305 的 OECD 指引文件 • 應包含減量水生方法的細節規範
	應用 AOP 概念 • 魚類慢性毒性試驗		減少在魚類試驗中的控制組 • 探索使用溶劑控制組時捨棄水控制組的可能性
	探索支持豁免魚類慢性毒性試驗的可能性 • 魚類慢毒性的電腦預測方法 • 跨物種外推和急性-慢性的關係 • 生態毒性的毒理關切閾值		

圖 3.1-2 ECVAM 在替代、減量及精緻化（優化）魚類水生毒性試驗與生物蓄積試驗的策略

EURL ECVAM Strategy – Indicative timelines			
	Strategic Aim 1: Replacement and reduction of fish for aquatic toxicity testing	Strategic Aim 2: Replacement and reduction of fish for bioaccumulation testing	Strategic Aim 3: Reduction and refinement of current fish tests
	Promotion of OECD TG 236 for acute fish toxicity testing	Development of OECD test guideline <i>In vitro</i> fish hepatic metabolism	Revision of OECD TG 203 Fish Acute Toxicity
	Promotion of the threshold approach (OECD GD 126) for acute fish test toxicity testing	Explore the use of toxicokinetic models to predict bioaccumulation	Update to state-of-the art or deletion of OECD TG 212
	Explore possibilities in supporting the waiving of chronic fish toxicity tests	Improvement of QSAR models for BCF prediction	Development of an OECD guidance document on OECD TG 305
	Fish cell line-based assays possible validation for acute fish toxicity testing		Reduction of control animals in fish tests
	Applying the AOP concept		

圖 3.1-3 ECVAM 策略時間表，其假設所有利益相關者齊心協力，且有足夠的資源可供使用

1. 探討魚細胞株試驗替代魚類毒性測驗的可行性

魚類細胞株試驗被認為可作為魚類水生毒性試驗之良好替代方法，此試驗甚至被提議可作為探索分子及細胞毒性路徑的工具，且能應用於毒物動力學模型來預測物質在魚體內濃度，近期由 Cefic 遠程研究倡議所集資的最新計畫（CEFIC-LRI; ECO8 - CellSens project; <http://www.cefic-lri.org/projects>），使用虹鱒魚鰓細胞株（RTG ill-W1）來建立細胞毒性的標準化試驗。Tanneberger 等人於 2013 年，使用標準試驗測試 35 種有機化學品，並建議使用虹鱒魚鰓細胞株來進行魚類急毒性的測試，但是，針對此標準試驗再現性、預測能力和適用範圍有必要再進一步評估。

2. 建議使用斑馬魚胚胎急性毒性試驗替代急性魚類毒性試驗

ECVAM 在與監管機構、利害關係人和公眾協商後，於 2014 年發布有關斑馬魚胚胎相關的建議書。OECD 驗證研究顯示，斑馬魚胚胎急毒性試驗在實驗室內和實驗室之間是具有可轉移和可重複性。在一項以 144 種化學物質的調查中證明，魚類胚胎急性毒性數據（暴露 24 至 120 小時，主要物種為斑馬魚）與魚類急性毒性數據（96 小時）之間有很高度的相關性（ $r = 0.9$ ）。並且值得注意的是，這些化學品涵蓋廣泛的物理化學性質、毒理作用方式和用途，例如：工業化學品、植物保護產品、殺菌劑和藥品。因此 ECVAM 建議斑馬魚胚胎急毒性試驗所提供的數據與標準魚類急性毒性試驗相似，應將其納入相應的立法和指引文件中。

3. 藉由閾值方法進行魚類急性毒性試驗

從 2010 年開始，已有 OECD 指導文件（guidance document, GD）126 之「關於使用閾值方法進行魚類急性毒性試驗簡短指引（Short guidance on the use of the threshold approach for acute fish toxicity testing）」（OECD, 2010）可供使用。簡而言之，魚類急性毒性試驗是在由水蚤或藻類中所得到的最低 LC_{50}/EC_{50} 值之單一濃度（閾值濃度）下進行的，如果在閾值濃度下沒有發生死亡，則可以得出結論：魚類並非這 3 種物種中最敏感的生物，且該濃度對魚類的毒性大於閾值濃

度；如果發生死亡現象，則需要完整的魚類急性毒性試驗（OECD TG 203）研究。ECVAM 在與監管機構、利害關係人和公眾協商後，於 2014 年發布有關斑馬魚胚胎相關的建議書。

4. 評估慢性魚類毒性測試數據豁免之可能性

數個研究小組正在研究透過大數據驅動的方法，建立合理的科學基礎來證明豁免動物試驗之合理性，其中包含使用種間外推法（interspecies extrapolations）、急性-慢性關係（acute to-chronic relationships）及毒理關切閾值（threshold of toxicological concern approach），後續段落將詳述個別方法。

（二）策略目標 2：在生物蓄積試驗替代及減少魚類的需求

替代和減量生物累積測試中的魚類。在第 1 年至 3 年間，在魚體外肝臟代謝中建立 OECD 測試的指引；而 3 年至 5 年間，探討使用毒物動力學模式推估生物蓄積性的可行性，並改良 QSAR 對生物濃縮係數（Bioconcentration factor, BCF）的預測。

1. 利用毒物動力學模式推估生物蓄積性

對於急性與慢性魚類毒性的生物蓄積性而言，可以透過結合毒物動力學模式與魚類細胞株試驗及魚類胚胎的數據，來推估生物蓄積性。該毒物動力學模型可用於在確定的暴露場合下預測受試動物（例如魚）的生物蓄積和毒理學相關的內部濃度（Internal concentration），藉此減少對於魚類的需求。

2. 生物蓄積性的 QSAR 模式

一般生物蓄積性的 QSAR 模式是以 $\log K_{ow}$ 為基礎，來推估化學物質的潛在生物蓄積性，然而這樣的模式因忽略吸收、分布、代謝及排泄（Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion, ADME）的過程，使得推估上經常是有高估的情況，因此近期研究所開發的 QSAR 模式，除考量原本的參數，也納入代謝與生物轉化等貢獻因子，開發以化學結構為基礎的方式來預測代謝生物轉化率的 QSAR 模式，此為美國 EPA Episuite 軟體中 BCF/BAFTM 程式的一部分。

3. 發展 OECD 魚肝臟代謝體外測試指引

OECD 測試指引計畫國家協調員工作組 (Working Group of National Coordinators for the OECD Test Guideline Program, WNT) 批准關於發展新 OECD TG 體外魚肝代謝 (*In vitro* Fish Hepatic Metabolism) 的項目。該項目目的是標準化虹鱒魚 S9 肝臟萃取液 (S9 fraction) 或冷凍保存的虹鱒魚肝細胞兩種體外方法，以確定體外魚類固有肝清除率，現今兩種方法皆已公布 OECD 標準方法 (OECD TG 319A 及 OECD TG 319B)。

(三) 策略目標 3：減量及精緻化 (優化) 近期的魚類試驗

減少和精緻化 (優化) 當前的魚類試驗。在第 1 年至 3 年間修訂 OECD TG 203 中的魚類急毒性試驗，並對 OECD TG 212 (以胚胎和卵黃時期評估魚類的短期毒性) 進行最新技術的更新或者刪除，以及在 OECD TG 305 (生物累積性) 中制定 OECD 的指引文件，並且減少魚類試驗中的對照動物。

1. 修訂魚類急毒性試驗

魚類急毒性試驗 (OECD TG 203) 是目前為數不多的以死亡為終點的測試之一，根據歐盟法規規範，儘量避免使用不人道的試驗終點。在 2014 年 9 月，OECD 網站上發布減量的測試方法，其中建議將每種濃度的魚隻數量從 7 隻減少至 6 隻，並應採用人道的試驗終點，當觀察到嚴重的臨床特徵時，如異常的游泳行為、平衡、呼吸、色素沉澱，應進行人道犧牲。

2. 修訂或刪除魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗

OECD 魚類毒性測試框架 (OECD Fish Toxicity Testing Framework) 建議刪除魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗 (OECD TG 212)，這不僅是出於科學和動物福利方面的考量，而且還缺乏監管相關性。在歐洲僅 REACH 法規指出魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗可能可作為慢性魚毒性的測試方法。根據 OECD TG 212，暴露是從受精卵開始的，應在卵黃囊被完全吸收之前或在魚

胚胎因飢餓而導致死亡之前終止暴露。魚胚胎可能需要仰賴外部食物的供應，甚至在卵黃囊被吸收完全之前就開始攝食。例如：斑馬魚的胚胎在孵化後 48 小時左右開始覓食，若建議的飼養時間為 8 天至 10 天，這將在沒有外部食物供應的情況下因飢餓而死亡。因此 OECD TG 212 應基於動物福祉的議題進行修訂或刪除。

3. 減少魚類測驗中的對照組動物

OECD 的魚類毒性測試架構指出，當使用溶劑時需考量是否需要同時具有控制組和溶劑控制組。對於目前魚類測驗而言，上述考量是必須的。根據 2013 年第 25 屆的 WNT 會議中 OECD 動物保護國際理事會（International Council on Animal Protection in OECD Programmes, ICAPO）所發起的討論，JRC 和 ICAPO 已向 OECD 提交一個以回顧歷史資料和實施兩種控制的關聯性為目的之項目提案。

四、魚類急毒性及其替代方法

魚類急毒性試驗是生態毒理學中其中一項動物實驗，但動物實驗往往造成動物痛苦，沒有滿足動物福祉的要求（Douglas et al., 1986）。在魚類急毒性試驗當中，建議使用經濟合作暨發展組織（OECD）所公布的第 203 號測試指引，指引中已完整地說明魚類急毒性的實驗方法，並提供建議使用魚種等資訊。

魚類急毒性試驗中，替代測試方法包含：魚類胚胎急毒性（Fish Embryo Acute Toxicity, FET）、QSAR、交叉參照、魚細胞株品系，以下簡易說明。

（一）魚類胚胎急毒性試驗

魚類胚胎急毒性試驗在國際上已有認可文件，為 OECD TG 236（2013），其測試方法旨在確定化學品對魚類胚胎期的急性或致死毒性，將受精的胚胎暴露於測試化學品中 96 小時，於每 24 小時，計算各濃度的死亡率後推算 LC_{50} 值（OECD, 2013），目前已證實魚類胚胎急毒性試驗能夠經由公式換算為成魚毒性數據，並具有良好的相關性。美國環保署和歐洲替代方法驗證中心已認可接受魚類胚胎急毒性試驗，而歐洲化學總署上，則認為需納入綜合測試與評估方法（IATA）進行評估。

(二) 魚類細胞株

目前已證明魚類體外測試方法能與魚類急毒性數據具有良好的關聯性，且具有高度的穩定性及再現性，魚類的體外測試方法已被證實能夠為環境化學物質的監測中提供可靠的訊息，例如魚鰓細胞株能夠區分廢水的毒性，而國際標準化組織（ISO）已逐步評估其作為新標準方法的潛力。

目前已經建立大量的魚細胞株，並且廣泛涵蓋多種魚類及組織，針對毒性測試而言，魚鰓或肝臟的細胞扮演重要的角色，魚鰓是水中污染物主要標的及攝取部位，並參與氣體交換、滲透調節等其他關鍵功能，而肝臟則具有較高代謝能力和解毒功能。多年以來，魚類細胞株試驗被提議可以作為魚類在水生毒性試驗中的替代方法。

(三) 定量結構活性關係與交叉參照

電腦模擬模型已應用於許多領域，如快篩、危害預測、風險評估、監管應用（Regulatory applications）和藥物開發，ECHA 的報告中顯示，目前已接受使用 QSAR 和交叉參照來預測魚類的生物蓄積性和短期、長期毒性，在許多的監管機構當中都將其納入發展目標，電腦模擬模型應用於生態毒理的詳細內容可參閱第四章。

(四) 閾值方法（threshold approach）

水生毒性研究是藉由三種物種，包含：魚類、藻類和無脊椎動物，測出最敏感的 LC_{50} / EC_{50} 值來進行危害和風險評估，然而魚類通常不會是敏感度最佳的測試物種。閾值方法為一種分層式的測試方法，能顯著降低用於測試魚類急性毒性試驗的魚隻數量。該概念由 Hutchinson 等人首先應用於藥物的「閾值 / 降低（threshold/step-down）」方法，由歐盟聯合研究中心（JRC）進一步開發，並將其運用於化學物質上。

(五) 跨物種以及從急性到慢性效應之外推

為得出水生毒性的預估無效應濃度（Predicted No Effect Concentration, PNEC），將需納入安全係數於實驗數據。這些係數旨在說明物種間的差異、敏感性、從急性到慢性的推斷、實驗室測試介質之物

化複雜性，以及生態系統與單一物種實驗測試的複雜性。係數（10、100 或 1,000）的選擇取決於現有數據的質量和數量。

物種對急性水生毒性的敏感性差異已被文獻充分證實。Netzeva 等人 在 2007 年回顧數個物種之間的定量活性關係，發現對魚類急性毒性最相關且最可靠的大型蚤和虹鱔（ $n = 360$ ）之間的 r^2 值為 0.67。近期研究證實急性魚類和水蚤毒性之間有良好相關性，特別是對於有機硫代磷酸鹽（ $0.74 < r^2 < 0.94$ ）和苯並三唑（ $r^2 = 0.87$ ）的數據。這些相關性主要是取決於化學物質的生物利用過程、作用方式以及其物化特性。

五、魚類慢毒性替代測試方法應用現況

儘管大多數歐盟化學品法規對急性水生毒性測試是一項基本要求，但如果急性結果表明存在危險，或者預期長期接觸，則可能需要進行慢性水生毒性測試及生物蓄積性。

魚類早期階段時期，如：胚胎和新孵出的魚隻，已被證明非常敏感，長期以來早期生命階段被認為是毒理學研究的一個強而有力的模型，已被證明可以預測全生命週期試驗中的效應，因此早期階段的魚隻經常被應用於亞慢性和慢性試驗。一般而言魚類慢毒性會使用三種方式進行瞭解，包含魚類的生命早期毒性測試（OECD Test No. 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test, FELS）、魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗（OECD Test No. 212: Fish Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages）及魚類幼魚成長試驗（Test No. 215: Fish, Juvenile Growth Test）。

魚類的生命早期毒性測試常用於評估物質對魚類的慢性毒性，用以確認物質對魚類早期生命週期的致死（lethal）和亞致死（sub-lethal）作用。測試終點是孵化成功的比例、外觀與行為的異常、存活或死亡率以及測試結束時魚的重量和長度。藉由與對照組比較，可確定每個測試終點的最低可觀察到效應濃度（Lowest observed effect concentration, LOEC）、未觀察到效應濃度（NOEC）和/或致效濃度（EC_x）。

而魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗及魚類幼魚成長試驗所涵蓋的發育階段較短，且使用頻率較低。魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試

驗使用魚胚胎和卵黃囊進行試驗；魚類幼魚成長試驗評估 28 天暴露化學物質對幼魚生長的影響。若無法執行魚類的生命早期毒性測試時，部分試驗管理機構建議使用魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗及魚類幼魚成長試驗。

魚類慢毒性所使用的魚隻數量遠高於其他水生試驗，因此許多團隊皆致力於降低測試頻率或完全取代慢性測試，迄今為止，慢性毒性的替代測試方法之優先努力目標著重於取代魚隻的使用，不過以現況而言，現在必須把重點放在開發生態慢毒性試驗的替代動物上。

(一) QSAR 慢性毒性模型

目前有許多 QSAR 模型用於魚類急毒性的文獻。這些研究大部分都在探討開發特定作用方式的 QSAR 模型，包括極性麻醉、非極性麻醉、基於反應性的毒性以及特定的作用機制（涉及與受體或酵素或內分泌活性化學物質的非共價相互作用）。而近期已經開發出幾種用於慢性魚類毒性的 QSAR 模型，主要針對通過麻醉效應作用的化學物質。以機轉為基礎的 QSAR 模型對魚類毒性的開發應被重視，在未來支持慢性魚類試驗數據豁免的可能性。

(二) 跨物種以及從急性到慢性效應之外推

ECVAM 目前正在研究是否可以將物種間外推與急性-慢性關係用於支持豁免慢性魚類測試，因而從各個資料庫中收集了大型蚤和魚類的數據（LC₅₀ 及 NOEC）並進行分析，並考量到不同的作用模式來辨別可能的關係。

六、生物蓄積性替代測試方法

水生生物的化學物質生物蓄積性，受到 ADME 過程的控制，對於魚類而言可在概念上表示為速率常數的函數，包括：飲食攝取、糞便消化、透過鰓的攝取和消除、代謝轉化和生長稀釋（Growth dilution），任一過程都可在一定程度上量化，並且每個過程都取決於化學物質的物化特性，如 $\log K_{ow}$ ，其表明化學物質分配至脂肪的可能性，為篩選化學物質具有生物累積潛力的經典標準。

生物蓄積性傳統上會藉由 OECD TG 305（魚類生物累積：水和食物中的暴露）進行測試，其中包括水和食物中的兩種暴露途徑。生物濃縮係數（BCF）通常需要兩種濃度的測試物質溶液，必要時需要溶劑控制組，並在不同的時間點進行採樣。此外如果可以透過使用物化性質（例如 $\log K_{ow} < 3$ ）或其他證據證明化學物質具有較低的生物蓄積潛力，則無需進行生物蓄積的試驗確認。

目前國際間已發展出數項生物蓄積性的替代測試方法，例如 QSAR、凍存鱒魚肝細胞的固有清除體外判定試驗及體外利用虹鱒肝 S9 亞細胞萃取液測定肝固有清除率。最近 OECD 採用最少化的體內試驗方法（*minimized in vivo approach*），用於評估化學物質的生物蓄積，最終以證據權重方法將所有數據結合，無需進行魚類生物蓄積試驗。另外分層評估策略（*tiered assessment strategies*），也可能在未來進一步強化生物蓄積的評估，以下簡述生物蓄積性的替代測試方法。

（一）生物蓄積性之體外模式

凍存鱒魚肝細胞的固有清除體外判定試驗及體外利用虹鱒肝 S9 亞細胞萃取液測定肝固有清除率，被認為是強而有力的生物蓄積體外測試替代測試方法，目前已被美國環保署認可。ECVAM 提供魚類體外生物轉化數據庫，該數據庫可從 JRC 數據目錄中公開獲得。

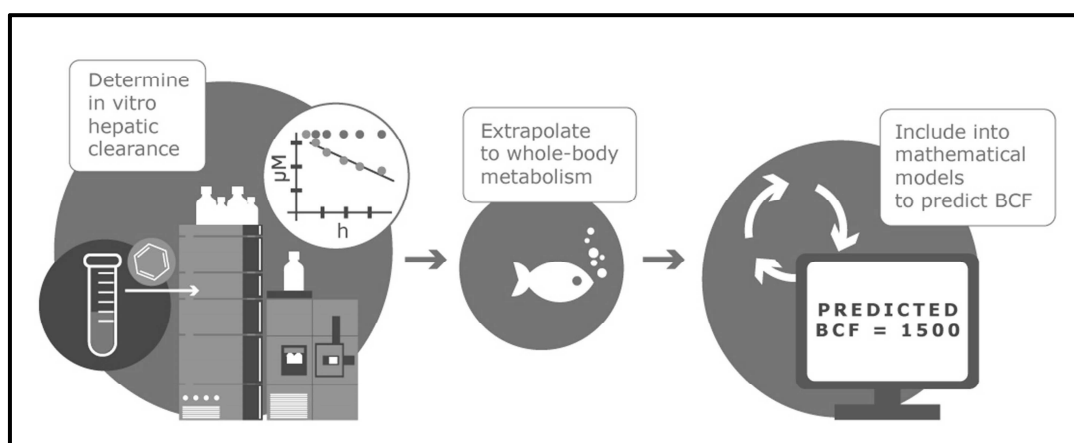
（二）QSAR 模型預測生物蓄積性

QSAR 模型而言，包含基於 $\log K_{ow}$ 方法的簡單模型，或者藉由不同營養階層中魚類的生物轉化率（*Biotransformation rate*）的 QSAR 模型，這樣的模式被認為比僅基於 $\log K_{ow}$ 的 QSAR 模型更加符合真實情況。以 $\log K_{ow}$ 為基礎的 QSAR 模式被廣泛用於篩選化學物質的潛在生物蓄積性與預測 BCF，但是這些大多是線性回歸模型，且未說明吸收、分布、代謝及排泄（ADME）的過程，忽略代謝作為清除機制的貢獻，使這些模型可能高估化學物質的生物蓄積潛力，因而導致不必要的體內試驗。

（三）毒物動力模式預測生物蓄積性

就急性與慢性魚類毒性的預測而言，目前有結合使用魚類細胞株試驗或魚類胚胎的數據，來研究毒物動力模式並預測生物蓄積性。Nichols

等人開發兩種毒物動力模式推估易代謝的化學物質於虹鱒中的生物濃縮（圖 3.1-4）。兩者均為 1-隔室模式（1-compartment models），使用 S9 鱒魚的肝臟或肝細胞體外試驗推斷體內清除率，以計算全身的生物轉化率，另外 Nichols 等人開發的 S9 BCF 模式，預測九個香味成分的 BCF 值，並將其與魚類的 BCF 值進行比較。結果表明 S9 BCF 模式提供最準確的 BCF 預測。



資料來源：<https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/improving-ways-predicting-bioconcentration-environmental-chemicals-fish>

圖 3.1-4 如何使用體外測定的肝清除率預測 BCF 值

3.2 優先採納替代測試清單與化學物質登錄指引調修建議

3.2.1 國際認可之替代測試方法清單

美國國家毒物計畫（National Toxicology Program, NTP）替代毒理學方法評估跨機構中心（The NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, NICEATM）更新美國和國際監管機構接受的化學物質安全性測試方法，其中更新的部分包含：體外皮膚刺激重組人表皮試驗（OECD TG 439），測試指引中增加新的 3D 重建人類上表皮細胞層測試方法—KeraSkin-M™，以增進替代動物的可能性，並且更新化學皮膚過敏：直接勝肽反應性分析（OECD TG 442C），其主要修訂附件中，勝肽反應性測定應用於預測致敏性的潛力，進一步強化減量、替代的精神。另外，OECD 於今年度亦新增魚類細胞急性毒性 RTG ill-W1 細胞株試驗（Fish Cell Line Acute Toxicity - The RTG ill-W1 cell line assay, OECE TG 249）和皮膚過敏性的定義方法（Defined Approaches for Skin Sensitisation, OECE TG 497）。魚類細胞急性毒性 RTG ill-W1 細胞株試驗方法藉由測試魚鰓上皮細胞在暴露化學品時的存活率來評估對魚類急性毒性，此試驗可作為魚類急性毒性的替代測試方法。

而 ECVAM、ICATM 等國際組織則今年度無新增認可的替代測試方法，表 3.2-1 及表 3.2-2 為彙整目前國際認可之毒理及生態毒理替代測試方法清單，及其所對應之資訊項目類別。

3.2.2 我國採納之替代測試方法

我國近年來積極發展符合動物福祉精神的替代測試方法，並於 2020 年 6 月份公告既有化學物質標準登錄資料撰寫指引第一版中，建議登錄人優先選擇符合動物福祉的替代測試，避免不必要的脊椎動物測試。目前在毒理資訊項目建議測試規範列出部分建議的替代測試方法，但因替代測試方法往往單一數據無法完整替代傳統方法，需要數項資訊共同整併後，才能得出適當的結論及詮釋，因此需隨時更新國際上的最新趨勢，並探究每種替代測試方法所適用的範疇。表 3.2-3 和表 3.2-4 為既有化學物質標準登錄資料撰寫指引第一版所認可之替代測試方法。

表 3.2-1 國際認可之毒理資料項目替代測試方法（1/2）

毒理資訊項目	體內 / 外試驗	國際認可之測試方法
6.1.1 急毒性：吞食	體外試驗	【TM2007-03 (EU)】3T3中性紅細胞毒性試驗 (3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity assay) ¹
	體內試驗	【OECD TG 420】急性吞食毒性-固定劑量法 ⁵ (Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure) 【OECD TG 423】急性吞食毒性-急性毒性級別法 (Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method) 【OECD TG 425】急性吞食毒性-上下增減劑量法 (Acute Oral Toxicity-Up-and-Down-Procedure, UDP)
6.1.2 急毒性：皮膚	體內試驗	【OECD TG 402】急性皮膚毒性 (Acute Dermal Toxicity)
6.1.3 急毒性：吸入	體內試驗	【OECD TG 433】急性吸入毒性-固定劑量法 Acute Inhalation Toxicity : Fixed Concentration Procedure 【OECD TG 436】急性吸入毒性-急性毒性級別法 (Acute Inhalation toxicity - acute toxic class method)
6.1 急毒性	體外試驗	【OECD GD 129】NHK細胞中性紅吸收試驗 (NHK Neutral Red Uptake assay) 【TM2007-03 (EU)】3T3細胞中性紅吸收細胞毒性試驗 (3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity assay)
6.2 皮膚刺激性/ 腐蝕性	體外試驗	【OECD TG 430】體外皮膚腐蝕：經皮電阻試驗 (<i>In Vitro</i> Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method, TER) 【OECD TG 431】體外皮膚腐蝕人體皮膚模型試驗 (<i>In vitro</i> skin corrosion reconstructed human epidermis (RHE) test method) 【OECD TG 435】皮膚腐蝕：體外膜阻隔試驗法 (<i>In Vitro</i> Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion) 【OECD TG 439】體外皮膚刺激重組人表皮試驗 (<i>In Vitro</i> Skin Irritation Reconstructed Human Epidermis Test)
6.3 眼睛刺激性	體外試驗	【OECD TG 437】牛角膜混濁和通透性試驗 (Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method) 【OECD TG 438】離體雞眼試驗 (Isolated Chicken Eye Test Method) 【OECD TG 460】螢光素滲漏測試方法：鑑別眼睛腐蝕與嚴重刺激物 (Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants) 【OECD TG 491】i)誘導嚴重眼部損傷的化學物質 ii)不需要分類至眼刺激或嚴重眼部損傷的化學物質之體外短期暴露試驗方法 (Short Time Exposure <i>In Vitro</i> Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage) 【OECD TG 492】重建人類角膜樣上皮細胞(RhCE)檢測方法，用於識別不需要分類和標記為眼睛刺激或嚴重眼睛損傷的化學品 (Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage) 【OECD TG 494】Vitrigel 膠原膜眼刺激檢測方法，用於識別不需要分類和標記為眼睛刺激或嚴重眼睛損傷的化學品 (Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals not requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage) U.S.&EU: Accepted via OECD TG 494 (2019) 【OECD TG 496】高分子檢測方法，用於識別誘發嚴重眼部危害，及不需要分類為眼睛刺激或嚴重眼睛損傷的化學品 (<i>In Vitro</i> Macromolecular Test Method for Identifying Chemicals Inducing Serious Eye Damage and Chemicals Not Requiring Classification for Eye) ⁴ 【ICCVAM Eye Irritation Test】針對眼部安全的細胞傳感器微生理計體外試驗方法 (Cytosensor Microphysiometer™ <i>in vitro</i> test method for eye safety) ² U.S.: Accepted by agencies in 2011 (OECD TG under consideration)
6.4 皮膚過敏性	體外試驗	【OECD TG 442C】化學皮膚過敏：直接肽反應性分析 (<i>In Chemico</i> Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay, DPRA) 【OECD TG 442D】皮膚過敏體外試驗：ARE-Nrf2螢光酶測試法 (<i>In Vitro</i> Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method) 【OECD TG 442E】皮膚過敏體外試驗：人類細胞株活化試驗 (<i>In Vitro</i> Skin Sensitisation Human cell Line Activation Test(h-CLAT))

表3.2-1 國際認可之毒理資料項目替代測試方法（2/2）

毒理資訊項目	體內 / 外試驗	國際認可之測試方法
6.4 皮膚過敏性	電腦模擬	【OECD TG 497】皮膚過敏性的定義方法 (Defined Approaches for Skin Sensitisation)
	體內試驗	【OECD TG 429】皮膚過敏：局部淋巴結試驗 (Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay) 【OECD TG 442A】皮膚過敏：局部淋巴結試驗_DA法 (Skin Sensitisation: Local lymph node assay: DA) 【OECD TG 442B】皮膚過敏：局部淋巴結試驗_溴脫氧核苷尿嘧啶-酵素免疫吸附法與流式細胞儀法 (Skin Sensitisation: Local lymph node assay: BRDU-ELISA or -FCM)
6.5 基因毒性	體外試驗	【OECD TG 471】細菌回復突變試驗 (Bacterial Reverse Mutation Test) 【OECD TG 473】體外哺乳動物染色體異常試驗 (<i>In Vitro</i> Mammalian Chromosomal Aberration Test) 【OECD TG 476】體外哺乳動物細胞基因突變試驗 (<i>In Vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xprt genes) 【OECD TG 487】體外哺乳動物微核試驗 (<i>In Vitro</i> Mammalian Cell Micronucleus Test) 【OECD TG 490】利用胸腺嘧啶核苷激酶基因進行體外哺乳動物細胞基因突變試驗 (<i>In Vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene)
	體內試驗	【OECD TG 489】體內試驗：鹼性彗星試驗分析 (<i>In Vivo</i> Mammalian Alkaline Comet Assay)
6.7 重複劑量毒性	體內試驗	【OECD TG 408】齧齒類動物的 90 天重複劑量吞食毒性研究 (Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents) 【OECD TG 412】28 天亞急性吸入毒性研究 (Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study) 【OECD TG 413】90 天亞急性吸入毒性研究 (Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study) 【OECD TG 452】慢性毒性研究(chronic toxicity studies)
6.8 生殖發育 毒性	體外試驗	【OECD TG 455】檢測雌激素受體活化劑和拮抗劑的穩定轉染轉錄活性體外試驗的測試準則(Performance-based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation <i>in vitro</i> Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists) U.S.: Accepted via OECD TG 455(2009, updated 2012, 2015, 2016); EPA OPPTS 890.1300 (2009) EU: Accepted via OECD TG 455 (2009, updated 2012, 2015, 2016) 【OECD TG 458】穩定轉染人類雄激素受體轉錄活性試驗：用於檢測化學品對雄激素之活化劑和拮抗劑活性 (Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity) U.S. & EU : Accepted via OECD TG 458 (2016, updated 2020) 【OECD TG 456】H295R 類固醇合成試驗 (H295R Steroidogenesis Assay) ² U.S. & EU: Accepted via OECD TG 456 (2011) 【OECD TG 493】檢測有結合親合力化學物的人類重組雌激素受體體外試驗的測試準則(Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) <i>in vitro</i> Assays to detect chemicals with ER binding affinity) U.S. & EU : Accepted via OECD TG 493 (2015) 【TM2016-08 (US)】毒性預測雌激素受體活化路徑模型 (The ToxCast Estrogen Receptor Agonist Pathway Model) ³ Regulatory accepted by ICCVAM/NICEATM (US) in 2016
	體內試驗	【OECD TG 443】延續的一代生殖毒性研究 (Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study)
6.9 致癌性	體外試驗	【TM2004-07 (EU)】體外BALB/c 3T3細胞轉化試驗 (<i>In vitro</i> BALB/c 3T3 Cell Transformation Assay) ³ Regulatory accepted by ICCVAM/NICEATM (EU) in 2004
	體內試驗	【OECD TG 453】結合慢性毒性/致癌性研究 (Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies) 【OECD TG 451】致癌性研究(carcinogenicity study)

¹EPA. 2021. Alternative Test Methods and Strategies to Reduce Vertebrate Animal Testing.

²ECHA. 2020. The use of alternatives to testing on animals for REACH : ECVAM. 2020. EURL ECVAM Status Report - Non-animal Methods in Science Regulation.

³From NICEATM (Alternative Methods Accepted by US Agencies); excludes methods used for specific purposes by other agencies (e.g., vaccines by FDA)

⁴Recommended as initial step of a testing strategy (see OECD GD 263 in Potentially Useful Information table) to identify chemicals that induce serious eye damage.

⁵「Oral」翻譯為「吞食」係參考自新化學物質及既有化學物質資料登錄辦法附表文字，與食入、口服等用法皆屬常見翻譯。

表 3.2-2 國際認可之生態毒理資料項目替代測試方法

生態毒理資訊項目	國際認可之測試方法
7.1 非脊椎動物之短期毒性	【OECD TG 202】蚤類急性活動抑制試驗 (Daphnia sp. Acute Immobilisation Test) 【OECD TG 235】搖蚊急性活動抑制試驗 (Chironomus sp. Acute Immobilisation test)
7.2 對水生藻類及藍綠藻的毒性	【OECD TG 201】藻類生長抑制試驗 (Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test) 【OECD TG 221】浮萍物種生長抑制試驗 (Lemna species Growth Inhibition Test)¹ 【OECD TG 238】聚藻無沉積物毒性試驗 (Sediment-free Myriophyllum spicatum Toxicity Test)² 【OECD TG 239】水體-沉積物中的聚藻毒性試驗 (Water-Sediment Myriophyllum spicatum Toxicity Test)
7.4 魚類之短期毒性	【OECD TG 236】魚類胚胎急性毒性試驗 (Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test) 【OECD TG 249】魚細胞株急性毒性：RTG ill-W1 鱒魚細胞株試驗 (Fish Cell Line Acute Toxicity: The RTG ill-W1 cell line assay)
7.8 非脊椎動物之長期毒性	【OECD TG 211】Daphnia magna 生殖試驗 (Daphnia magna Reproduction Test)
7.9 魚類之長期毒性	【OECD TG 212】魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗 (Fish Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages)
7.10 對土壤中大生物體（節肢動物外）的毒性	【OECD TG 207】蚯蚓急性毒性試驗 (Earthworm Acute Toxicity test) 【OECD TG 222】蚯蚓生殖試驗 (Earthworm Reproduction Toxicity Test)
7.15 生物蓄積：水生生物/底	【OECD TG 319A】使用凍存鱒魚肝細胞的固有清除體外判定試驗 (Determination of <i>in vitro</i> intrinsic clearance using rainbow trout hepatocytes) U.S.& EU: Accepted via OECD TG 319A (2018) 【OECD TG 319B】體外利用虹鱒肝 S9 次級細胞分群測定固有清除率 (Determination of <i>in vitro</i> intrinsic clearance using rainbow trout liver S9 sub-cellular fraction (RT-S9)) U.S.& EU: Accepted via OECD TG 319B (2018)
7.16 底泥毒性	【OECD TG 218】沉積物-水體搖蚊毒性試驗：沉積物加標法 (Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment) 【OECD TG 219】沉積物-水體搖蚊毒性試驗：水體加標法 (Sediment-Water Chironomid Toxicity) 【OECD TG 225】沉積物-水體中帶絲蚓毒性試驗：沉積物加標法 (Sediment-Water Lumbriculus Toxicity) 【OECD TG 233】沉積物-水體搖蚊生命週期毒性試驗 (Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity)
¹The Lemna test is also generally considered a suitable alternative to the algal test (OECD TG 201) ²OECD TG 238 does not replace other aquatic toxicity tests; but can be used in companion with other test results to obtain a more complete aquatic plant hazard and risk assessment for the test substance.	

表 3.2-3 我國登錄資料接受之毒理資料項目替代測試方法（1/2）

毒理資訊項目	體內外試驗	我國認可之測試方法
6.1.1 急毒性：吞食	體內試驗	【OECD TG 420】急性吞食毒性-固定劑量法 (Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure) 【OECD TG 423】急性吞食毒性-急性毒性級別法 (Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method) 【OECD TG 425】急性吞食毒性-上下增減劑量法 (Acute Oral Toxicity-Up-and-Down-Procedure, UDP)
6.1.2 急毒性：皮膚	體內試驗	【OECD TG 402】急性皮膚毒性 (Acute Dermal Toxicity)
6.1.3 急毒性：吸入	體內試驗	【OECD TG 433】急性吸入毒性-固定劑量法 (Acute Inhalation Toxicity: Fixed Concentration Procedure) 【OECD TG 436】急性吸入毒性-急性毒性級別法 (Acute Inhalation Toxicity – Acute Toxic Class Method)
6.2 皮膚刺激性/ 腐蝕性	體外試驗	【OECD TG 430】體外皮膚腐蝕：透皮電阻試驗 (<i>In Vitro</i> Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method, TER) 【OECD TG 431】體外皮膚腐蝕人體皮膚模型試驗 (<i>In vitro</i> skin corrosion reconstructed human epidermis (RHE) test method) 【OECD TG 435】皮膚腐蝕：體外膜阻隔試驗法 (<i>In Vitro</i> Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion) 【OECD TG 439】體外皮膚刺激重組人表皮試驗 (<i>In Vitro</i> Skin Irritation Reconstructed Human Epidermis Test)
6.3 眼睛刺激性	體外試驗	【OECD TG 437】牛角膜混濁和通透性試驗 (Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method) 【OECD TG 438】離體雞眼試驗 (Isolated Chicken Eye Test Method) 【OECD TG 460】螢光素滲漏測試方法：鑑別眼睛腐蝕與嚴重刺激物 (Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants) 【OECD TG 491】i)誘導嚴重眼部損傷的化學物質 ii)不需要分類至眼刺激或嚴重眼部損傷的化學物質之體外短期暴露試驗方法 (Short Time Exposure <i>In Vitro</i> Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage) 【OECD TG 492】重建人類角膜樣上皮細胞(RhCE)檢測方法，用於識別不需要分類和標記為眼睛刺激或嚴重眼睛損傷的化學品 (Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage)
6.4 皮膚過敏性	體外試驗	【OECD TG 442C】化學皮膚過敏：直接肽反應性分析 (<i>In Chemico</i> Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay, DPRA) 【OECD TG 442D】皮膚過敏體外試驗：ARE-Nrf2螢光酶測試法 (<i>In Vitro</i> Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method) 【OECD TG 442E】皮膚過敏體外試驗：人類細胞株活化試驗 (<i>In Vitro</i> Skin Sensitisation Human cell Line Activation Test(h-CLAT))
	體內試驗	【OECD TG 429】皮膚過敏：局部淋巴結試驗 (Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay) 【OECD TG 442A】皮膚過敏：局部淋巴結試驗_DA法 (Skin Sensitisation: Local lymph node assay: DA) 【OECD TG 442B】皮膚過敏：局部淋巴結試驗_溴脫氧核苷尿嘧啶-酵素免疫吸附法與流式細胞儀法 (Skin Sensitisation: Local lymph node assay: BRDU-ELISA or -FCM)
6.5 基因毒性	體外試驗	【OECD TG 471】細菌回復突變試驗 (Bacterial Reverse Mutation Test) 【OECD TG 473】體外哺乳動物染色體異常試驗 (<i>In Vitro</i> Mammalian Chromosomal Aberration Test) 【OECD TG 476】體外哺乳動物細胞基因突變試驗 (<i>In Vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xprt genes) 【OECD TG 487】體外哺乳動物微核試驗 (<i>In Vitro</i> Mammalian Cell Micronucleus Test) 【OECD TG 490】利用胸腺嘧啶核苷激酶基因進行體外哺乳動物細胞基因突變試驗 (<i>In Vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene)
	體內試驗	【OECD TG 489】體內試驗：鹼性彗星試驗分析 (<i>In Vivo</i> Mammalian Alkaline Comet Assay)

表 3.2-3 我國登錄資料接受之毒理資料項目替代測試方法 (2/2)

毒理資訊項目	體內外試驗	我國認可之測試方法
6.7 重複劑量毒性	體內試驗	【OECD TG 408】 齧齒類動物的 90 天重複劑量吞食毒性研究 (Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents) 【OECD TG 412】 28 天亞急性吸入毒性研究 (Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study) 【OECD TG 413】 90 天亞急性吸入毒性研究 (Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study) 【OECD TG 452】 慢性毒性研究 (Chronic toxicity studies)
6.8 生殖/發育毒性	體內試驗	【OECD TG 443】 延續的一代生殖毒性研究 (Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study) 【OECD TG 422】 結合重複劑量毒性研究與生殖/發育毒性篩選試驗 (Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study)
6.9 致癌性	體內試驗	【OECD TG 453】 結合慢性毒性/致癌性研究 (Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies) 【OECD TG 451】 致癌性研究 (Carcinogenicity study)

表 3.2-4 我國登錄資料接受之生態毒理資料項目替代測試方法

生態毒理資訊項目	我國認可之測試方法
7.1 非脊椎動物之短期毒性	【OECD TG 202】 蚤類急性活動抑制試驗 (Daphnia sp. Acute Immobilisation Test)
7.2 對水生藻類及藍綠藻的毒性	【OECD TG 201】 藻類生長抑制試驗 (Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test)
7.8 非脊椎動物之長期毒性	【OECD TG 211】 Daphnia magna 生殖試驗 (Daphnia magna Reproduction Test)
7.9 魚類之長期毒性	【OECD TG 212】 魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗 (Fish Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages)
7.10 對土壤中大生物體（節肢動物外）的毒性	【OECD TG 207】 蚯蚓急性毒性試驗 (Earthworm Acute Toxicity test) 【OECD TG 222】 蚯蚓生殖試驗 (Earthworm Reproduction Toxicity Test)
7.16 底泥毒性	【OECD TG 218】 沉積物-水體搖蚊毒性試驗：沉積物加標法 (Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment) 【OECD TG 219】 沉積物-水體搖蚊毒性試驗：水體加標法 (Sediment-Water Chironomid Toxicity) 【OECD TG 225】 沉積物-水體中帶絲蚓毒性試驗：沉積物加標法 (Sediment-Water Lumbriculus Toxicity) 【OECD TG 233】 沉積物-水體搖蚊生命週期毒性試驗 (Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity)

值得注意的是，結合重複劑量毒性研究與生殖/發育毒性篩選試驗（OECD TG 422），目前未被納入 NICEATM 或 USEPA 的替代測試清單，但在歐盟與我國化學物質登錄的架構下，若登錄人繳交標準登錄第 2 級以上資訊，需同時要繳交 6.8.1_生殖/發育毒性篩選及 6.7.1_28 天重複劑量毒性試驗時，執行 OECD TG 422 相較於同時執行兩個單一測試，的確可有效減少動物用量。歐盟在 2020 年 REACH 制度中動物替代測試的使用報告中亦指出目前有越來越多登錄人基於動物減量與減少花費而使用 OECD TG 422 的測試方法（REACH, 2020）。日本厚生勞動省也執行許多 OECD TG 422 的測試來同時評估重複劑量毒性與生殖發育毒性。藉由這個例子，也展現了不同制度/國家對是否屬於替代測試的認定也可能有差異。

3.2.3 以我國採納之替代測試方法研析適用範疇

我國雖已舉列出化學品登錄可使用之替代測試方法，然於既有化學物質標準登錄資料撰寫指引第一版當中，並未清楚表明替代測試方法之適用範圍及限制，且國際間許多替代測試方法之適用性目前尚未明朗，故應持續研析及更新替代測試方法之使用性原則及其適用性範圍。以下針對我國認可之毒理及生態毒理替代測試方法研析其使用性原則。毒理資訊替代測試方法：

一、急毒性（吞食）

（一）吞食急毒性的發展

Trevaan（1927）首次提出一種旨在鑑定物質致死性的試驗，該試驗藉由半致死劑量（50% lethal dose, LD₅₀）來辨別測試物質的毒性，如：洋地黃和胰島素等。到 1970 年代，該測試方法已被普遍接受，作為比較和分類化學品毒性的基礎，也逐漸成為新藥開發、食品添加劑、化粧品成分、家用產品、工業品、農藥各領域監管機構必需的測試方法，在當時該測試需要高達 100 隻的動物進行測試，每種測試物質，有時需要兩種動物進行測試，通常測試動物為小鼠、大鼠。

1981 年，OECD 將半致死劑量測試納入新的測試指引當中，即急性-吞食測試指引（OECD TG 401-Acute Oral Toxicity）。吞食急性毒性試驗中，每個劑量組使用兩種性別各五隻動物，且涵蓋極限測試的概念，無毒性物質最高測試最高濃度為 5,000 mg/kg。基於動物福祉的考量，於

1987 年修訂 OECD TG 401，可僅使用一種性別的動物進行該測試，並通過在第二種性別當中，僅需使用一種劑量進行測試以確認測試物質的吞食急毒性不具有性別差異。同時亦將極限測試劑量降低到 2,000 mg/kg。為促進動物福祉及國際上對於固定劑量法、上下增減劑量法和急性毒性級別法的應用，開始逐步淘汰 OECD TG 401 的使用，並在 OECD 理事會於 2002 年 12 月 17 日刪除急毒性-吞食測試指引。

(二) 吞食急毒性的替代測試方法

OECD 在 1998 年至 2000 年之間組織一系列的專家會議針對固定劑量法、上下增減劑量法和急性毒性級別法進行修正，及提供有關毒理學家和管理者使用替代方法和解釋的相關指引文件，這些修訂保留對動物福利的概念，更重要的是促使全球將其替代方法應用於所有法規當中。舉例來說，對於動物使用隻數而言，急毒性-吞食測試指引（OECD TG 401）單次試驗使用動物高於 25 隻，替代測試方法能夠有效率的降低至 5-9 隻，且不論選擇三者中任何一項，原則上所使用的動物數量都非常類似（表 3.2-5）。

表 3.2-5 吞食急毒性之替代方法比較

	固定劑量法 (OECD TG 420)	急性毒性級別法 (OECD TG 423)	上下增減劑量法 (OECD TG 425)
目的	確定引起明顯毒性的最低固定劑量	確定導致死亡的最低固定劑量	計算 LD ₅₀
試驗方法	以單次劑量進行暴露。使用單一性別的年輕成年大鼠，以固定的體積或濃度進行管餵，在 14 天內進行臨床觀察、體重和死亡率，試驗終止時的進行組織病理觀察。		
起始劑量選定試驗	是	否	否
劑量	固定劑量 5、50、300、2,000 (5,000) mg/kg，每個劑量使用 5 隻大鼠	固定劑量 5、50、300、2,000 (5,000) mg/kg，每個劑量 3 隻大鼠	從最佳估計 LD ₅₀ 開始(或 175 mg/kg)，並藉由 3.2 的劑量進展因子(後一劑量為前一劑量的 3.2 倍)，對單隻動物進行暴露，直至滿足其中一個停止標準
單次試驗的使用動物數量	5~7	7	6~9 (使用動物數量取決於試驗停止標準)
得到資訊	• 推估 LD₅₀ 範圍值 • 急性毒性徵兆 • 標的器官	• 推估 LD₅₀ 範圍值 • 急性毒性徵兆 • 標的器官	• LD₅₀ 點估計及信賴區間 • 急性毒性徵兆 • 標的器官

1. 急性吞食毒性-固定劑量法 (OECD TG 420-Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure, FDP)

1984 年，英國毒理學學會 (British Toxicology Society) 的一個工作組提出一種新的吞食急毒性測試方法，該方法避免以動物死亡為試驗終點，藉由在固定濃度之下觀察多項毒性反應跡象來進行判定。這種測試方法即為目前所熟知的固定劑量法，經過研究證實固定劑量法能夠呈現與典型急性吞食毒性試驗得到相似的毒性分類結果，除此之外，固定劑量法還提供風險評估所需的毒性徵兆相關必要資訊，包含：發生不良反應的時間、持續時間和結果。因此固定劑量法所使用的動物數量較傳統的 OECD TG 401 少，且所造成與化學物質有關的死亡率也更低，另外動物所承受的痛苦也得以減輕。

本方法在研究中僅使用適度的毒性劑量，且避免使用致死劑量，主要以大鼠為試驗對象，依照性別分組後（通常是使用雌性），以 5、50、300、2,000 mg/kg 等固定劑量（最高可達 5,000 mg/kg）進行測試物質的吞食急毒性測驗，暴露方法是使用胃管 (stomach tube) 或合適的插管用套管 (intubation canula)，藉由灌食的方式來給予單一劑量的測試物質。其初始劑量是依據選定試驗 (sighting study) 的結果來決定，而所選擇的劑量必須為預期不引發嚴重的毒性效應或死亡但仍會產生某些中毒的現象。根據中毒現象或死亡情況，在後續試驗中，動物組別可以用高於或低於這些固定劑量來進行試驗。給藥之前動物應先進行禁食，一般來說每個測試劑量使用 5 隻單一性別的動物，試驗結果包括：體重測量、每日詳細觀察報告以及屍體解剖檢驗。此試驗可提供 LD₅₀ 的範圍值、急性毒性的徵兆、標的器官等危害性質的資訊，並可依據 GHS 對該物質進行急毒性分類。

2. 急性吞食毒性-急性毒性級別法 (OECD TG 423-Acute Oral Toxicity-acute toxic class method, ATC)

後續新的傳統吞食急毒性替代方法逐漸被發展出來，包含急性毒性級別法 (1996 年) 和上下增減劑量法 (1998 年)。急性毒性級別法是使用固定劑量的概念，保留死亡率作為主要終點。此指引所提出的

急毒性分類方法是一種逐步檢測程序，每個步驟使用 3 隻單一性別的動物，若 3 隻動物死亡大於 1 隻則降低劑量；若等於 1 隻則相同劑量暴露一次；若 3 隻動物無動物死亡則提高濃度。根據動物的死亡率（或瀕死狀態），平均需要 2 至 4 個步驟才能對測試物質的急性毒性進行判斷，極限測試最高測試劑量為 2,000 mg/kg。試驗結果包括：體重測量、每日詳細觀察報告以及屍體解剖檢驗。此試驗可提供 LD₅₀ 的範圍值、急性毒性的徵兆、標的器官等危害性質的資訊，且可以根據 GHS 對物質進行急毒性分類。

3. 急性吞食毒性-上下增減劑量法（OECD TG 425-Acute Oral Toxicity-Up-and-Down Procedure, UDP）

上下增減劑量法於 1998 年被發展出來，目的是藉由依序測試單隻動物來估算 LD₅₀，並根據先前動物的結果上下調整每隻動物的後續使用劑量。本試驗適用於啮齒類動物（雌性較為適合），分為極限測試和主試驗。極限測試可以有效地用來識別可能具有低毒性的化學品，極限測試最高濃度為 2,000 或 5,000 mg/kg。主試驗給予測試物質前動物必須禁食，接著以管餵的方式以單劑量給予測試物質，通常於間隔 48 小時後再次給藥。第 1 隻動物的劑量以低於 LD₅₀ 為最佳初步估計值，第 2 隻動物根據第 1 隻動物的存活給予較高或較低的劑量。必須在給藥後的 4 小時內以及每天觀察實驗動物的狀況，試驗進行 14 天。動物體重應至少每週測量 1 次，所有動物犧牲後都進行屍體解剖檢驗。此試驗可提供 LD₅₀ 的點估計值及信賴區間，且指引中加入明確的試驗停止標準，因此試驗的動物死亡率也相對較低，另外上下增減劑量法的結果可以根據 GHS 對物質進行急毒性分類。

（三）急毒性（吞食）替代測試方法使用性建議：

在 OECD 理事會於 2002 年刪除 OECD TG 401 後，全面藉由急性吞食毒性-固定劑量法、急性毒性級別法與上下增減劑量法進行替代，這三種方法皆納入許多動物福祉的重要概念，如：藉由使用單一性別動物、階段式投予法以達到減少動物數量，以及藉由極限劑量來進行測試低毒物質、避免使用動物死亡為試驗終點來達到精緻化（優化）的目的。

目前我國既有化學物質標準登錄資料撰寫指引中，建議可使用固定劑量法（OECD TG 420）、急性毒性級別法（OECD TG 423）與上下增減劑量法（OECD TG 425）來獲取 LD₅₀ 及進行 GHS 急毒性分類。由於固定劑量法、上下增減劑量法和急性毒性級別法三種替代方法可以提供的資訊稍有不同，如：僅上下增減劑量法能夠得到半致死劑量點估計值。針對化學物質登錄而言，能獲取半致死劑量範圍值及進行 GHS 急毒性分類就已滿足登錄需求，因此固定劑量法、急性毒性級別法與上下增減劑量法皆適用於化學物質登錄，但若考量動物福祉，在使用動物數量相仿的情形之下，建議避免以動物死亡為試驗終點的方法，強化精緻化（優化）的精神。

二、急毒性（吸入）

（一）吸入急毒性的發展

呼吸吸入是人體接觸物質的主要途徑，如顆粒、纖維、氣體和揮發性有機化學物質等，由於呼吸道是重要的標的組織，亦是從外部環境到全身循環的進入途徑，因此探討物質透過呼吸暴露的方式可能導致危害是非常重要的，全球許多監管單位會要求吸入急毒性的數據，針對監管目的而言，吸入急毒性數據被用於產品或物質註冊危害辨識中、分類標示和運輸要求等，並提供有關安全資料表的資訊。

一般是藉由急性吸入毒性（OECD TG 403-Acute Inhalation Toxicity）、急性吸入毒性-急性毒性級別法（OECD TG 436-Acute Inhalation Toxicity - ACT）進行呼吸急毒性試驗以滿足監管單位需求。

急性吸入毒性試驗（OECD TG 403）係嚙齒動物（通常是大鼠）在全身或鼻腔暴露的系統中，暴露 24 小時或更短時間，以辨別短期暴露後可能引起毒性的物質。該方法提供有關通過吸入短期暴露於氣體、蒸氣或氣膠/顆粒可能引起健康危害的資訊。修訂後的測試指引闡述兩項研究方式：傳統的 LC₅₀ 測試方法（Traditional protocol）和濃度 x 時間測試方法（Concentration × time protocol, C × t）。此方法可用於估計半致死濃度（LC₅₀）、無致死閾值濃度（non-lethal threshold concentration, LC₀₁）和斜率。本測試指引可根據 GHS 對測試物質進行定量風險評估和分類。傳統

的 LC₅₀ 測試方法中，動物暴露於 1 種或 3 種濃度下，暴露時間通常為 4 小時，每種濃度應使用 10 隻動物。在濃度×時間測試方法中，動物在多個時間段內暴露於 1 個濃度或 1 系列濃度，通常每個 C × t 間隔使用 2 隻動物，動物應至少觀察 14 天，試驗結果包括體重測量、每日詳細觀察報告以及屍體解剖檢驗。

而 OECD TG 403 已涵蓋部分 3Rs 精神，例如：考量測試物質使用場景或預期人類暴露的相關訊息、以電腦模擬模式推估測試物質或結構相似物的可能危害性，或是藉由極限測試確認最高劑量下仍是無毒的物質。

而急性吸入毒性-急性毒性級別法（OECD TG 436）被認為是可用於替代 OECD TG 403 的替代測試方法，其使用的動物少於 OECD TG 403，此試驗方法是遵循在固定濃度下暴露 4 小時的逐步程序，但 OECD TG 436 仍以致死率為主要的試驗終點。此測試的目的是對短期吸入測試物質進行危害評估，並可根據 GHS 對物質進行分類。測試方法基於逐步程序，每個步驟使用兩種性別各 3 隻動物，共 6 隻動物（通常是使用大鼠）。動物在吸入室中暴露特定濃度 4 小時。在一個步驟中動物的死亡率將決定下一步。試驗後應人道犧牲處於劇烈疼痛或痛苦中的動物。暴露濃度由 GHS 分級界線的四個固定濃度擇一為起始，每天觀察動物的臨床毒性症狀，至少 14 天，動物的體重應至少每週測量一次，所有動物都進行屍體解剖檢驗（表 3.2-6）。

表 3.2-6 傳統急毒性吸入之替代方法

	急性呼吸毒性 (OECD TG 403)	急性呼吸毒性-急性毒性級別法 (OECD TG 436)	急性呼吸毒性-固定濃度法 (OECD TG 433)
目的	用於需要濃度-反應關係的定量風險評估，以及應用於分類	應用於分類和標示	應用於分類和標示
試驗終點	死亡	死亡	毒性臨床特徵
劑量	藉由起始劑量選定試驗選擇至少 3 個濃度	該方法使用適當之固定濃度的氣體、蒸氣、氣膠，依循步驟進行測試	藉由起始劑量選定試驗選擇濃度，再依照結果判斷是否進行後續實驗
單次試驗的使用動物數量	主試驗：至少 30 暴露時間長度：40-50	6（一個或多種濃度）	5（一個或多種濃度）
得到資訊	• LC ₅₀ 點估計	• LC ₅₀ 範圍值	• LC ₅₀ 範圍值

(二) 吸入急毒性的替代測試方法

急性吸入毒性-固定劑量法 (OECD TG 433: Acute Inhalation Toxicity: FDP)

我國目前建議使用急性吸入毒性-固定劑量法 (OECD TG 433: Acute Inhalation Toxicity: Fixed Concentration Procedure) 為替代測試方法，OECD TG 433 是一項經過精緻化 (優化) 的替代測試方法，此方法主要遵循 OECD TG 436 中使用的固定濃度方法，不論是 OECD TG 403 或 OECD TG 436，皆以動物死亡做為主要試驗終點，而精緻化 (優化) 的急性吸入毒性-固定劑量法 (OECD TG 433) 雖 OECD TG 436 類似，但以明顯的毒性臨床特徵 (evident toxicity) 來取代死亡，且避免使用預期致死濃度。明顯的毒性臨床特徵發生時，就可能表明在下一個濃度暴露時會引發大量的動物嚴重毒性及死亡，如：不規律呼吸及顫抖。

OECD TG 436 測試方法係藉由吸入而短期暴露於測試化學品時可能產生的健康危害。該方法使用適當固定濃度的氣體、蒸氣或氣膠，依步驟將單一性別的五隻動物，於短時間暴露於測試物質中。在較低濃度下，若沒有明顯毒性或死亡的情況下，可以測試較高濃度。持續該過程直至濃度產生明顯毒性或產生不超過一隻動物死亡或瀕臨垂死，反之當導致動物死亡時則降低測試濃度。這項研究結果包括：動物體重應每週測量和進行每日詳細觀察，且犧牲後所有動物都進行屍體解剖檢驗。該方法可提供有關危害特性的資訊，並根據 GHS 對該物質進行急毒性分類。

(三) 急毒性 (吸入) 替代測試方法使用性建議

吸入急毒性測試選擇主要是依據法規要求，目前我國既有化學物質標準登錄資料撰寫指引建議可使用急性呼吸毒性 (OECD TG 403)、急性呼吸毒性-急性毒性級別法 (OECD TG 436)、急性呼吸毒性-固定濃度法 (OECD TG 433)，獲取 LC_{50} 及進行 GHS 急毒性分類，由三者所獲得的資訊相似，建議登錄者優先選擇應符合動物福祉的急性呼吸毒性-固定濃度法 (OECD TG 433) 完成登錄需求。

三、皮膚刺激性 / 腐蝕性

(一) 皮膚刺激性 / 腐蝕性的發展

皮膚刺激是指在暴露化學品後對皮膚造成的可逆性損傷；皮膚腐蝕是指化學品對皮膚產生不可逆的組織損傷，並且肉眼明顯可見測試物質通過表皮，進入真皮並導致組織壞死。皮膚刺激/腐蝕性試驗的歷史最早可追溯至 1944 年，由美國食品藥品管理局(Food and Drug Administration, FDA) 的毒理學家 Draize 等人對化粧品皮膚或眼刺激性所開發的急毒性試驗，故也被稱為 Draize 測試。

OECD 的皮膚腐蝕/刺激性測試規範 (OECD TG 404) 最初於 1981 年開始採用，建議測試對象為兔子，但也有以其他物種進行試驗的情況。為精進動物福祉，OECD 於 1992 年至 2015 年間逐步修訂試驗條件以減少不必要的動物使用，但因實驗過程仍需使用一定量的動物，各國建議逐漸減少使用該測試規範，以非活體的試驗方法取代。近年來 OECD 與聯合國 (UN) 根據 GHS 分類所需，並以 OECD TG 404 為基礎，發展出以不同的體外試驗，包括：OECD TG 430、OECD TG 431、OECD TG 435 及 OECD TG 439。OECD TG 430 以體外模式判別物質或混和物是否具有腐蝕性，但其皮膚來源仍需取自活體動物。OECD TG 431 與 OECD TG 435 不需使用動物且可進一步判斷腐蝕性的子級別 (1A、1B 或 1C)。OECD TG 439 使用仿生人類皮膚組織判別物質是否具有刺激性，該規範為目前 OECD 唯一採納的皮膚刺激體外試驗。

傳統急性皮膚刺激 / 腐蝕試驗 (OECD TG 404)，每組至少使用 3 隻以上的雄性或雌性動物。測試前剃除軀幹的背側毛髮，再將 0.5 ml (液體) 或 0.5 g (固體) 測試物質敷貼於約 6 平方公分的皮膚，並以紗布覆蓋，暴露期通常為 4 小時。暴露後觀察期的時間長短以能充分評估化學物造成的影響及可逆性為主要決定依據，應至少包括給予物質後的 1、24、48 及 72 小時，必要時也可能連續觀察到 14 天。當動物持續出現劇烈疼痛或嚴重反應時，應以人道方式進行安樂死，並提前終止試驗。

試驗主要觀察動物皮膚紅斑與水腫情形以及相關效應是否於特定期間內可逆，並以嚴重度計分進行危害分類，最終結果可判定物質是否具

刺激性/腐蝕性。刺激性主要為對皮膚造成可逆性的反應，常見組織病理變化為造成皮膚表皮層有發炎細胞浸潤伴隨水腫液形成、表皮角化過度（hyperkeratosis）或角質細胞增生（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）及出血（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。試驗結果出現腐蝕性症狀會判定物質為第1級；刺激性綜合評分為 $\geq 2.3 \leq 4.0$ 時分類為第2級；刺激性綜合評分為 $\geq 1.5 < 2.3$ 時則分類為第3級。

（二）皮膚刺激性 / 腐蝕性的替代測試方法

1. 體外皮膚腐蝕：經皮電阻試驗（Test No.430: *In vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method, TER）

根據 GHS 定義，經皮電阻試驗是利用大鼠背部離體皮膚檢測腐蝕性，與傳統的白兔試驗相比，TER 減少動物數量且避免動物痛苦，符合 3Rs 原則。

試驗選用 28 日至 30 日齡大鼠，雌雄不限，每隻大鼠可產生 10 個至 15 個皮膚表皮，每個測試物質至少需要使用 3 個皮膚表皮。將大鼠以人道方式（安樂死）犧牲後，取背部去毛區域的皮膚並去除皮下脂肪，製成直徑約 20 mm 的圓盤狀皮膚（skin disk），在測試開始前，測量兩個圓盤狀皮膚的 TER 值作為品質控制標準，電阻值需大於 10 k Ω 方可使用。接著將以測試物質（150 μ L 液體或足量之固體塗抹、覆蓋於圓盤狀皮膚上，再加入去離子水 150 μ L）處理 24 小時（每個測試和對照物質使用三個皮膚表皮），通過物質對角質層的完整性影響和物質使屏障功能喪失的程度來判別測試結果。測試物質對皮膚無腐蝕性的 TER 值判讀標準為：(1) 處理測試物質後平均 TER 值大於 ($>$) 5 k Ω ，或(2) 使用測試物質後獲得的平均 TER 值小於或等於 ($\leq$) 5 k Ω ，同時圓盤狀皮膚無明顯損傷（如穿孔）且圓盤皮膚的平均染料含量（the mean disc dye content）小於陽性對照組（10M HCl）的平均染料含量。測試物質對皮膚有腐蝕性的判斷標準為，處理測試物質後，平均 TER 值小於或等於 ($\leq$) 5 k Ω ，並且皮膚有明顯受損（例如

穿孔)，或者在處理測試物質後平均 TER 值小於或等於 ($\leq$) $5 \text{ k}\Omega$ ，雖然於圓盤型皮膚無法觀察到明顯損傷（如穿孔），但平均染料含量大於或等於 ($\geq$) 陽性對照組（ 10M HCl ）的平均染料含量。

2. 體外皮膚腐蝕人體皮膚模型試驗（OECD TG 431: *In vitro* skin corrosion reconstructed human epidermis (RhE) test method）

此測試指引可用於識別腐蝕性化學物質和混合物，不須使用活體動物或動物組織，以體外細胞實驗進行評估。利用表皮角質細胞重建人類表皮的立體多層上皮結構（模擬人類皮膚之基底層、棘狀層、顆粒層），可被利用於探討皮膚上皮組織的形態、生化特性和生理特徵。此測試指引有以下 5 種已建立程序的市售模組，即 EpiSkin™(SM)、EpiDerm™(EPI-200)、SkinEthic™ RHE、epiCS® 和 LabCyte EPI-MODEL24 SCT。各模組的試驗方法類似，主要以重建人類表皮（RhE）模仿人類皮膚屏障功能的角質層。在固定的暴露時間後，評估物質使細胞存活率降低 50% 的劑量（ IC_{50} ），同時判別細胞型態是否顯著改變，藉此來代表物質對皮膚腐蝕性的結果。細胞存活率會使用 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 試驗測定，對於陰性對照組皆有可接受的吸光值（optical density, OD）範圍，如表 3.2-7 所示。

每種測試物質和對照組須至少進行二重覆試驗。對於液體和固體的測試物質，劑量建議使用 $70 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 或 $30 \text{ mg}/\text{cm}^2$ ，並使物質均勻覆蓋在重建的人類表皮（RhE）皮膚表面。依照不同模型的建議暴露時間操作後，用水性緩衝液或 0.9% 生理食鹽水清洗，而後進行 MTT 檢測做為試驗終點。以 EpiSkin 為例，細胞存活率所代表的腐蝕性結果，如表 3.2-8。

相較於 OECD TG 404，OECD TG 431 完全不需使用動物，符合 3Rs 精神中替代及減量 2 大原則。OECD TG 431 另一個優勢則為利用立體多層細胞培養技術模擬人類真實皮膚結構，更能體現出每層細胞受到毒性化學物質影響後的生理特性、型態改變與作用機轉。

表 3.2-7 RhE 測試方法其陰性對照組可接受之 OD 值範圍

	可接受下限	可接受上限
EpiSkin™ (SM)	≥ 0.6	≤ 1.5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	≥ 0.8	≤ 2.8
SkinEthic™ RHE	≥ 0.8	≤ 3.0
epiCS	≥ 0.8	≤ 2.8
LabCyte EPI-MODEL24 SCT	≥ 0.7	≤ 2.5

表 3.2-8 EpiSkin 預測模型腐蝕性結果判定

暴露時間後測量的存活率 (t = 3、60 和 240 分鐘)	預測結果
暴露 3 分鐘後 < 35%	腐蝕性：子類別 1A
暴露 3 分鐘後 $\geq 35\%$ 且暴露 60 分鐘後 < 35%； 暴露 60 分鐘後 $\geq 35\%$ 且暴露 240 分鐘後 < 35%	腐蝕性：子類別 1B；1C
暴露 240 分鐘後 $\geq 35\%$	無腐蝕性

3. 皮膚腐蝕：體外膜阻隔試驗法 (OECD TG 435: *In vitro* membrane barrier test method for skin corrosion)

此測試指引為使用人造膜進行體外膜阻隔測試，透過一系列化學偵測系統 (chemical detection system, CDS)，檢測物質是否具有腐蝕性。人造膜為大分子生物屏障，兩大主要成分為蛋白質大分子水凝膠（成分為角蛋白、膠原蛋白等）與滲透型支撐膜，類似動物皮膚。檢測原理主要依靠測試物質是否與角蛋白、膠原蛋白發生交互作用，並以 CDS 中多種指示劑與測試物質反應結果進行評估。判斷標準原則以肉眼觀察、電位改變、人造膜底下溶液是否具有測試物質濃度反應等要素建立，所有測試物質利用 CDS 檢測時，需先經過測試物質相容性檢測 (Test Chemical Compatibility Test)，如測試物質無法與 CDS 中檢測溶液起反應，則該測試物質則不適用於 OECD TG 435。肉眼觀察則依靠不同 pH 酸鹼指示劑與測試物質反應後所呈現不同顏色進行判斷。依據 CDS 不同溶液之定義與 GHS 的允許範圍，以測試物質穿透人造膜的時間（滲透率）來評斷腐蝕性子級別或不具腐蝕性。體外膜阻隔測試方法可用來測試固體、液體（pH 值 4.5~8.5 的含水物質通常不符合測試條件）和乳液狀物質，其測試結果判讀如表 3.2-9。

表 3.2-9 Corrositex[®] 預測模型結果判定

平均穿透時間（分鐘）		聯合國 GHS 預測
類別 1 測試物質 （由方法決定分類測試）	類別 2 測試物質 （由方法決定分類測試）	
0~3 分鐘	0~3 分鐘	具腐蝕性子類別 1A
3~60 分鐘	3~30 分鐘	具腐蝕性子類別 1B
6~240 分鐘	30~60 分鐘	具腐蝕性子類別 1C
> 240 分鐘	> 60 分鐘	無腐蝕性

4. 重建人類表皮層之體外皮膚刺激性測試（OECD TG 439: *In vitro* skin irritation reconstructed human epidermis test）

此測試方法根據人類表皮角質細胞重建 RhE，體現出具有多層上皮之立體結構（模擬人類皮膚之基底層、棘狀層、顆粒層）用以探討皮膚上皮組織的形態、生化特性和生理特徵。OECD TG 439 為目前最主要被國際動物替代驗證中心所接受的仿生人類皮膚組織刺激性試驗，也是目前 OECD 唯一採納的皮膚刺激毒性之體外試驗指引。

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（ECVAM）驗證後接受。OECD 於 2010 年首次發佈相關指引，隨後再歷經 2 次的修正，於 2019 年發佈最新修正版本。目前 OECD TG 439 測試指引建議可使用 6 種仿生人類皮膚組織的商品化套組進行刺激性試驗，包括 EpiSkin[™]、EpiDerm[™] SIT (EPI-200)、SkinEthic[™] RHE、LabCyte EPI MODEL 24 SIT、epiCS[®] 及 Skin+[®]。我國工業技術研究院（後稱工研院）也以華人的皮膚組織開發了相關商品化套組 - EPiTRI[®]，目前已在申請成為 OECD 指引接受的試驗方法。不同商品化套組為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，角質細胞可分化成相似於人類皮膚表皮的立體組織，其分層由外至內可包括角質層、顆粒層、棘狀層及基底層。分化後之立體組織會轉移到具備營養物質的瓊脂平板。相

較於單層皮膚角質細胞，使用立體組織進行測試能更真實還原人體皮膚受測試物質刺激後形態學變化與生化特性，顯著增進驗證能力。

以 EPI TRI[®] 模組為例，測試皮膚刺激性流程如圖 3.2-1 所示，將測試物質均勻暴露於立體組織皮膚組織上。液狀或半固體狀物質可直接使用，固體物質會建議先以少量純水潤濕組織表面，再將固體物質磨粉後均勻覆蓋於已潤濕之組織表面。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測試物質，再轉移至細胞培養盤中培養約 42 小時。待抵達作用時間後取出組織，以 MTT 測試做為試驗終點。當細胞存活率 $\leq 50\%$ 可視為物質具刺激性（第 2 級）；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與陽性對照組，所有組別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機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 2 次測試，第 1 次與第 2 次運行結果不一致時，則再進行第 3 次測試。

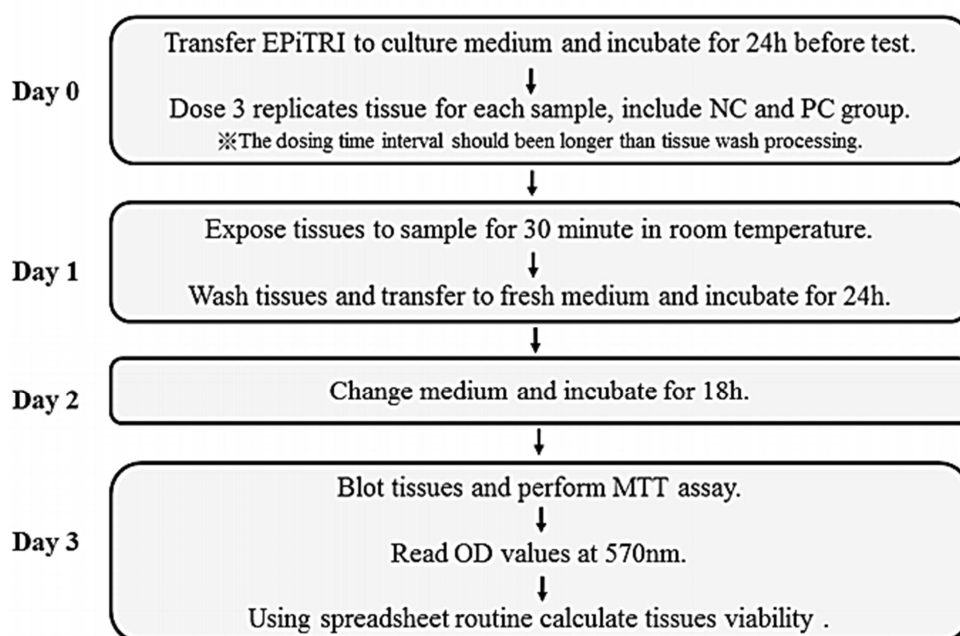


圖 3.2-1 以 EPI TRI[®] 體外試驗方式測試皮膚刺激性流程

(三) 皮膚刺激性 / 腐蝕性替代測試方法使用性建議

對於皮膚刺激性之評估，以白兔進行試驗是常見的評估方式，但基於動物福祉，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。

皮膚腐蝕性 / 刺激性評估可先以 IATA 評估進行分類（考參閱第五章），由於在前期已針對具明確皮膚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 3Rs 原則之精緻化（優化）精神。除此之外，皮膚刺激 / 腐蝕性替代測試方法 OECD TG 430、OECD TG 431、OECD TG 435、OECD TG 439 均致力於體現 3Rs 精神（表 3.2-10），並已有足夠證據與成熟技巧取代傳統動物試驗（OECD TG 404）。因此建議登錄者針對皮膚刺激性 / 腐蝕性資訊項目，應先遵循 IATA 分類原則，若缺乏人類及動物數據，則優先進行體外替代測試方法來評估化學品之皮膚刺激性 / 腐蝕性，最後仍難以分類才考量使用動物試驗。

表 3.2-10 皮膚刺激性 / 腐蝕性的標準測試方法與替代測試方法

	OECD TG 430 體外皮膚腐蝕：透皮電阻試驗	OECD TG 431 體外皮膚腐蝕人體 皮膚模型試驗	OECD TG 435 皮膚腐蝕：體外膜阻 隔試驗法	OECD TG 439 體外皮膚刺激重組 人表皮試驗
試驗分類替代方式	體外試驗替代	體外試驗替代	體外試驗替代	體外試驗替代
目的	判斷皮膚腐蝕性	判斷皮膚腐蝕性	判斷皮膚腐蝕性	判斷皮膚刺激性
劑量	150 μL 液體或足量之固體， 再加入去離子水 150 μL	70 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 的液體或 30 mg/cm^2 的粉末	500 μL 的液體或 500 mg 的粉末	26~83 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 或 mg/cm^2
動物使用量	使用大鼠背部離體皮膚檢測 腐蝕性，一隻大鼠可取得 10~15 塊直徑約 20 mm 之 皮膚表皮	無使用動物	無使用動物	無使用動物

四、眼睛刺激性

(一) 眼睛刺激性的發展

早期的眼睛刺激測試可追溯至 1940 年代，由德萊茲博士（John H. Draize）以及他的團隊所設計的急性毒性試驗，被稱為德萊茲試驗（Draize

Eye Test)。該測試最初用於測試化粧品，即測試物質塗抹到一隻受限制但有意識的動物的眼睛或皮膚上一段時間，接著沖洗掉測試物質並觀察記錄。測試結束後觀察皮膚是否有紅斑和水腫，或發紅、腫脹、出現分泌物、潰瘍（ulcer）、出血、眼睛有否混濁或失明。使用的測試動物通常為白化兔，但其他種類的動物也會使用，如狗。如果測試造成該動物眼睛或皮膚不可逆的損傷，測試後動物會被安樂死，否則將重新用於測試。然而這試驗存在著嚴重動物福祉的爭議。

德萊茲試驗後來於 1981 年被採用作為 OECD 的測試指引急性眼睛刺激 / 腐蝕 (OECD Test No.405-*In vivo* eye irritation/serious eye damage)。此後進行多次修訂，修訂內容包括減少動物隻數、測試中使用局部麻醉劑、全身鎮痛劑、採用人道終點以及綜合測試評估方法 (IATA) 的考量。

根據我國「新化學物質與既有化學物質資料登錄工具說明」，化學品標準登錄須提供毒理與生態毒理資訊，並建議其詳細內容之測試評估終點與建議利用之 OECD 測試指引。其中急性眼睛刺激 / 腐蝕 (OECD TG 405) 被列為該測試終點的「動物（體內）測試方法」列表當中。此外本指引也被列入於「既有化學物質標準登錄資料撰寫指引」中測試眼睛刺激性所建議的測試規範之一。

規範中所使用的測試對象為白化兔。隻數限制為最初實驗一隻、確認實驗中不得超過兩隻。劑量範圍是設定在 0.1 ml（液體）以及 100 mg（固體，需研磨成細粉）。測試物質會滴或塗抹於一隻眼的結膜囊（conjunctival sac），以另一眼作為對照組。滴入一小時後根據已定義之分級系統於組織對角膜（混濁）、虹膜（發炎）和結膜（發紅和腫脹）的影響進行評分。眼部病變評分標準表示於表 3.2-11 中。

在對可能嚴重損傷眼睛的物質進行分級時，是採用單一的調和危害級別-眼睛刺激物第 1 級（不可逆的眼睛效應）；而在可能引起可逆眼睛刺激的物質方面，同樣採用單一危害級別-眼睛刺激物第 2A 級（眼睛刺激），但允許在該單一危害級別內使用 1 個子級別-眼睛刺激物第 2B 級（輕微的眼睛刺激），用於引起 7 天觀察期內可逆的眼睛刺激效應物質（表 3.2-12）。

表 3.2-11 眼部病變評分表

角膜 (Cornea)	級別
混濁度 (Opacity): 密度 (應取自最密集區域判讀) *	
無任何潰瘍或混濁	0
擴散型的混濁區域 (正常光澤的輕微變暗除外); 虹膜細節清晰可見	1
容易辨別的半混濁區域; 虹膜細節略微模糊	2
裸露區 (Nacrous area); 沒有可見的虹膜細節; 瞳孔大小幾乎看不清	3
角膜混濁; 無法辨別虹膜	4
最大可能: 4	
*應注意角膜混濁區域	

虹膜 (Iris)	級別
正常	0
皺紋明顯加深、充血、腫脹、中度角膜周圍充血; 或注射; 虹膜對光有反應 (緩慢的反應被認為是一種效果)	1
出血、嚴重破壞或對光無反應	2
最大可能: 2	

結膜 (Conjunctivae)	級別
發紅 (指眼瞼和球結膜; 不包括角膜和虹膜)	
正常	0
一些血管充血 (注射)	1
擴散、深紅色; 個別血管不易辨別	2
擴散型的濃郁紅色	3
最大可能: 3	

化學反應 (Chemosis)	級別
腫脹 (指眼皮和 / 或瞬膜)	
正常	0
一些正常之上之腫脹	1
明顯腫脹、眼皮部分外翻	2
腫脹、眼皮大約關閉一半	3
腫脹, 眼皮合上一半以上	4
最大可能: 4	

表 3.2-12 眼睛刺激危害級別

級別	標準
眼睛刺激物 第 1 級 (不可逆的眼睛效應)	- 至少在 1 隻實驗動物的角膜、虹膜或結膜上產生效應，這樣的效應在正常 21 天觀察期內至少不會逆轉或不完全可逆；和 / 或 - 至少在 3 隻實驗動物中的 2 隻身上出現陽性反應： • 角膜混濁 ≥ 3；和 / 或 • 虹膜炎 > 1.5。 上述是指測試物質給予之後 24、48 和 72 小時分級後計算的平均分數。
眼睛刺激物 第 2A 級 (眼睛刺激)	至少在 3 隻實驗動物中的 2 隻身上出現陽性反應： • 角膜混濁 ≥ 1，和 / 或 • 虹膜炎 ≥ 1，和 / 或 • 結膜充血 ≥ 2，和 / 或 • 結膜水腫 ≥ 2。 上述是指測試物質施加之後 24、48 和 72 小時分級後計算的平均分數，而且在正常 21 天觀察期內完全可逆。
眼睛刺激物 第 2B 級 (輕微的眼睛刺激)	在眼睛刺激物第 2A 級（眼睛刺激）之級別範圍內所列的效應可在 7 天觀察期內完全可逆。

(二) 眼睛刺激性的替代測試方法

1. 牛角膜混濁和通透性測試方法 (OECD TG 437- Bovine corneal opacity and permeability test method)

牛角膜混濁和通透性測試方法 (OECD TG 437) 於 2009 年採用的測試指引，旨在辨別 (1) 引起嚴重眼部損傷的化學品和 (2) 不需要對眼刺激或嚴重眼部損傷進行分類的化學品。此分類法是依據聯合國 GHS 化學品全球調和制度所規範。該測試規範在最新的版本中更新允許使用基於雷射光的不透光光度計 (Laserlight-based opacitometer, LLBO)，其性能與用於驗證牛角膜混濁和通透性測試方法的 OP-KIT 不透光光度計相似 (表 3.2-13)。該試驗所使用的物種為牛角膜細胞。眼睛來源可由屠宰場、市售供應商以及研究單位取得。測試物品主要分為固態/液態界面活性劑以及固態非界面活性劑兩種。測試組別需包括陽性與陰性對照組。評估方式主要是觀察眼角膜的渾濁度和滲透性。渾濁度是藉由角膜的光透射量決定，因此會使用不透光光度計來定量角膜渾濁度；而滲透性是藉由將螢光素鈉 (sodium fluorescein)

滴在角膜表面數秒，然後用等滲透壓的鹽水進行沖洗，之後藉由穿透所有角膜細胞層之螢光素鈉（fluorescein）含量估角膜完整性。

2. 離體雞眼測試方法 [OECD TG 438- Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method]

本測試指引旨在描述用於評估測試化學品對眼睛之潛在危害的程序，透過雞眼中誘導毒性的能力來評估。角膜的毒性影響是藉由(1) 混濁度的評估，(2) 由螢光素應用於眼睛（螢光素滯留）對上皮損傷的評估，(3) 厚度增加的測量（腫脹），和(4) 對治療眼睛表面宏觀形態學損傷的評估。暴露於測試化學品後的角膜混濁、腫脹和損傷評估分別進行評估，然後結合得出眼刺激分類。此外，組織病理學觀察也可用作額外的測試終點，進而提高對 UN GHS 第 1 級非極端 pH（ $2 < \text{pH} < 11.5$ ）清潔劑和界面活性劑的預測。

指引中所使用的測試物種為雞角膜。測試劑量範圍為 0.03 ml（液體）以及 0.03 g（固體，需研磨成細粉）。測試過程中皆需要陰性和陽性對照組。將測試物塗抹或滴於角膜且沖洗完畢一段時間後進行評估。評估終點為角膜混濁、腫脹、螢光染劑滯留和形態學變化（例如：上皮凹陷或鬆散）（表 3.2-14）。接著根據下表定義之評估方式以表格整理各個測試重點，並進行分類。角膜腫脹是透過裂隙燈顯微鏡（slit-lamp microscope）利用光學測厚計（optical pachymeter）測量角膜厚度而定，接著根據以下公式計算得出（百分比表示）：

$$\left(\frac{\text{於時間 } t \text{ 的角膜厚度} - \text{於 } t = 0 \text{ 時的角膜厚度}}{\text{於 } t = 0 \text{ 時的角膜厚度}} \right) \times 100$$

一旦評估每個測試終點就可以根據預定範圍分配 ICE 類別。根據表 3.2-15~表 3.2-18 以角膜腫脹、混濁度和螢光素滯留所得出的評分來進行 ICE 等級分類。化學品的測試分類是以 UN GHS 分類標準來評估，該分類對應於所獲得的角膜腫脹、角膜混濁和螢光素滯留的分類組合，如表 3.2-19 所示。

表 3.2-13 用於辨別導致嚴重眼部損傷和不需要分類為眼部刺激或嚴重眼部損傷的測試化學品之預測模型

不透光光度計1	不透光光度計2	
OP-KIT and Duratec	LLBO	UN GHS
$IVIS \leq 3$	$LIS \leq 30$	無分級類別
$3 < IVIS \leq 55$	$LIS > 30$ 以及 $lux/7 \leq 145$ 以及 $OD490 \leq 2.5$	無法單獨預測
$IVIS > 55$	• $LIS > 30$ 以及 $lux/7 \leq 145$ 以及 $OD490 > 2.5$ 或 • $LIS > 30$ 以及 $lux/7 > 145$	第1級

註：IVIS：體外刺激指數（In Vitro Irritancy Score）

LIS：LLBO 刺激指數（LLBO Irritancy Score）

Lux 為 LLBO 的測量單位，是光照度的 SI 單位，不透明度定義為 $lux/7$ 之平均值

表 3.2-14 角膜混濁評分標準

評分	觀察
0	無任何混濁
0.5	非常微弱的混濁
1	區域分散型的混濁；虹膜細節清晰可見
2	容易辨別的半混濁區域；虹膜的細節有些模糊
3	嚴重的角膜混濁；無法看見虹膜的具體細節；瞳孔大小幾乎看不出來
4	完全角膜混濁；虹膜看不見

表 3.2-15 螢光素滯留評分標準

評分	觀察
0	無任何螢光素滯留
0.5	非常輕微的單細胞螢光素滯留
1	散佈在整個角膜處理區域之單細胞螢光素滯留
2	聚焦型或融合的密集單細胞螢光素滯留
3	融合大面積角膜的螢光素滯留

表 3.2-16 角膜腫脹之 ICE 分類標準

平均角膜腫脹 (%)	ICE 類別
0 到 5	I
>5 到 12	II
>12 到 18 (處理後 >75 分鐘)	
>12 到 18 (處理後 =75 分鐘)	III
>18 到 26	
>26 到 32 (處理後 >75 分鐘)	
>26 到 32 (處理後 =75 分鐘)	IV
>32	

表 3.2-17 混濁度之 ICE 分類標準

最大平均混濁度評分	ICE 類別
0.0 ~ 0.5	I
0.6 ~ 1.5	II
1.6 ~ 2.5	III
2.6 ~ 4.0	IV

表 3.2-18 平均螢光素滯留之 ICE 分類標準

處理後 30 分鐘之平均螢光素滯留評分	ICE 類別
0.0 ~ 0.5	I
0.6 ~ 1.5	II
1.6 ~ 2.5	III
2.6 ~ 3.0	IV

表 3.2-19 化學品整體測試分類

UN GHS 分類標準	3 個測試終點之綜合 ICE 類別
無類別	3 × I
	2 × I, 1 × II
	2 × II, 1 × I
無法預測	其他組合
類別 1	3 × IV
	2 × IV, 1 × III
	2 × IV, 1 × II
	2 × IV, 1 × I
	於 30 分鐘時角膜混濁 = 3 (至少 2 隻眼)
	任何時間點下角膜混濁 = 4 (至少 2 隻眼)
	上皮嚴重鬆動 (至少 1 隻眼)

3. 螢光素滲漏測試方法：鑑別眼睛腐蝕與嚴重刺激物（OECD TG 460-Fluorescein leakage test method for identifying ocular corrosives and severe irritants）

螢光素滲漏（Fluorescein leakage, FL）測試方法是一種體外測試方法，將化學品分類為眼部腐蝕性物質和嚴重刺激物。嚴重刺激物被定義為在施用測試物質後導致眼睛組織損傷且在 21 天內不可逆轉或導致視力嚴重物理衰退的化學物質，而眼部腐蝕性物質是對眼睛造成不可逆組織損傷的化學物質。

雖然螢光素滲漏測驗不能完全替代體內兔眼測試，但螢光素滲漏可用作監管分類和標示分層測試策略的一部分。因此，建議將 FL 作為自上而下方法（Top-down approach）中的第一步，以識別眼部腐蝕物/嚴重刺激物，本測試指引中使用的物種為腎小管上皮細胞株（MDCK CB997），測試劑量範圍為 1 mg/ml~250 mg/ml。若測試化學品為固體，則需包括 750 mg/ml 的極高濃度。若測試時毒性劑量介於 25 mg/ml 和 100 mg/ml 之間，則應測試兩次額外的濃度（1、25、50、75、100 mg/ml），且需包括陰性及陽性對照組。評估方式是根據螢光素滲漏的量，使用以下公式計算導致 20 %螢光素滲漏的化學物質濃度，以此臨界值來區分化學品為眼睛腐蝕 / 嚴重刺激物，相關分類標準請參考表 3.2-20。

$$FL_D = [(A-B) / (C-B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

註：D = 抑制百分比

A = 損傷百分比（20% 螢光素滲漏）

B = 螢光素滲漏百分比 < A

C = 螢光素滲漏百分比 > A

MC = C 的濃度（mg/ml）

MB = B 的濃度（mg/ml）

表 3.2-20 螢光素滲漏之分級分類方法標準

FL20 (mg/ml)	UN GHS 分類與標示	EU CPL 分類與標示	U.S. EPA 分類與標示
≤ 100	第 1 級	第 1 級	第 1 級

4. (1) 誘導嚴重眼部損傷的化學物質 (2)不需要分類至眼刺激或嚴重眼部損傷的化學物質之體外短期暴露試驗方法 (Test No.491- Short time exposure *in vitro* test method for identifying i) Chemicals inducing serious eye damage and ii) Chemicals not requiring classification for eye irritation or serious eye damage)

體外短時間暴露 (Short Time Exposure) 測試方法指在辨別誘導嚴重眼睛損傷的化學物質與不需要分類和標記為眼睛刺激或嚴重眼睛損傷的化學物質。化學品對角膜上皮細胞的細胞毒性作用是導致角膜上皮損傷和眼睛刺激的重要作用方式。

該指引中使用單層兔角膜細胞株 (statens seruminstitut rabbit cornea cells) 進行測試。測試物質劑量為 5%和 0.05% (v/v)，且需包括陰性與陽性對照組。評估方式是以 MTT 檢測細胞存活率進行分類。表 3.2-21 為 STE 測試方法的預測模型：

表 3.2-21 體外短時間暴露測試方法的預測模型

細胞存活率		UN GHS 分類	適用性
於 5%	於 0.05%		
> 70%	> 70%	無類別	物質和混合物，但不包括：除界面活性劑和僅由界面活性劑組成的混合物以外的固體化學品 (物質和混合物)
≤ 70%	> 70%	無法單獨預測	無法適用
≤ 70%	≤ 70%	類別一	物質和混合物

5. 重建人類角膜樣上皮細胞 (RhCE) 檢測方法，用於識別不需要分類和標記為眼睛刺激或嚴重眼睛損傷的化學品 (OECD TG 492- Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage)

細胞的測試中使用的單層細胞培養難以反應真實組織的複雜 3D 微環境。培養器皿的人造剛性和平坦表面會改變細胞代謝和內在功能。本測試指引描述一種體外測試，根據 UN GHS 識別不需要對眼睛刺激或嚴重眼睛損傷進行分類和標示的化學品。此測試方法藉由重建

的人類角膜上皮 (RhCE) 來模擬人類角膜上皮的組織學、形態學、生化和生理特性。RhCE 組織由初代人類表皮角質形成細胞、人類不朽化角膜上皮細胞或初代培養人類角膜上皮細胞重建而成，這些細胞培養數天後所形成的分層與高度分化的鱗狀上皮，形態上會與人類角膜相似。

本指引中所提及的 3D RhCE 模式有 EpiOcular™ (美國)、SkinEthic™ HCE (法國)、Labcyte CORNEAMODEL24 (日本) 以及 MCTT HCE™ (韓國)。將測試物質局部應用於至少兩個 3D RhCE 組織構建體，並在暴露和治療後潛伏期後測量組織存活率。此組織存活率試驗分析是藉由四唑藍染劑 (tetrazolium dye) 來量化活細胞存活率，例如：MTT 或 WST。在暴露化學品後，後續立即進行四唑藍分析，在 VRM 組織模式中，以 1 mg/mL 的濃度置於 0.3 mL MTT 溶液中 180±15 分鐘，RhCE 組織構建體的活細胞將 MTT 還原成藍色 MTT 結晶沉澱，接著透過異丙醇做為溶劑來進行萃取，最後檢測波長 570 nm 的吸光值或藉由高效能液相層析法來量化細胞存活率。針對不同的重建人類角膜模式都有各自的測試參數、條件、數據解讀和分析，而這些資訊都有在指引中以表格呈現 (如表 3.2-22 所示)。

(三) 眼睛刺激性替代測試方法使用性建議

眼睛刺激性的測試指引選擇主要可參考我國既有化學物質標準登錄資料撰寫指引，建議可使用牛角膜混濁和通透性試驗 (OECD TG 437)、離體雞眼試驗 (OECD TG 438)、螢光素滲漏測試方法 (OECD TG 460)、(1) 誘導嚴重眼部損傷的化學物質(2) 不需要分類至眼刺激或嚴重眼部損傷的化學物質之體外短期暴露試驗方法 (OECD TG 491) 以及建人類角膜樣上皮細胞 (RhCE) 檢測方法，用於識別不需要分類和標記為眼睛刺激或嚴重眼睛損傷的化學品 (OECD TG 492) 來進行 UN GHS 的嚴重損傷 / 刺激眼睛危害級別分類，以填補 6.3 項眼睛刺激性的毒理資訊需求，相關方法比較請參考表 3.2-23。基於動物福祉考量，建議登錄者應先遵循 IATA 策略進行嚴重眼睛損傷 / 刺激分類，若表明當前數據不足以進行分類時，應考量使用上述體外測試方法來獲取數據，若仍無法進行適當分類，才考慮使用動物試驗方法。

表 3.2-22 重建的人類角膜上皮模型之測試參數與數據分析

OECD/OCDE

492 | 37

Nr.	1		2		3		4	
Test Method Component	EpiOcular™ EIT (VRM 1)		SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)		LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT		MCTT HCE™ EIT	
Protocol ¹	Liquids (pipetteable at 37±1°C or lower temperatures for)	Solids (not pipetteable)	Liquids and viscous (pipetteable)	Solids (not pipetteable)	Liquid (pipetteable)	Solids (not pipetteable)	Liquid (pipetteable)	Solids (not pipetteable)
Tetrazolium salt incubation and temperature	180 min (±15 min) at 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% RH	180 min (±15 min) at 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% RH	180 min (±15 min) at 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% RH	180 min (±15 min) at 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% RH	240 minutes (±15 minutes) at 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% RH	240 minutes (±15 minutes) at 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% RH	180 min (±5 min) at 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% RH	180 min (±5 min) at 37±2°C, 5±1% CO ₂ , ≥95% RH
Extraction solvent	2 mL isopropanol (extraction from top and bottom of insert by piercing the tissue)	2 mL isopropanol (extraction from top and bottom of insert by piercing the tissue)	1.5 mL isopropanol (extraction from top and bottom of insert)	1.5 mL isopropanol (extraction from top and bottom of insert)	Not required	Not required	Not required	Not required
Extraction time and temperature	2-3 h with shaking (~120 rpm) at RT or overnight at 4-10°C	2-3 h with shaking (~120 rpm) at RT or overnight at 4-10°C	4 h with shaking (~120 rpm) at RT or at least overnight without shaking at 4-10°C	At least 2 h with shaking (~120 rpm) at RT	Not required	Not required	Not required	Not required
OD reading	570 nm (550 - 590 nm) without reference filter	570 nm (550 - 590 nm) without reference filter	570 nm (540 - 600 nm) without reference filter	570 nm (540 - 600 nm) without reference filter	450 nm with reference filter (650 nm)	450 nm with reference filter (650 nm)	450 nm with reference filter (650 nm)	450 nm with reference filter (650 nm)
Tissue Quality Control	Treatment with 100 µL of 0.3% (v/v) Triton X-100 12.2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37.5 min	Treatment with 100 µL of 0.3% (v/v) Triton X-100 12.2 min ≤ ET ₅₀ ≤ 37.5 min	30 min treatment with SDS (50 µL) 1.0 mg/mL ≤ IC ₅₀ ≤ 3.5 mg/mL	30 min treatment with SDS (50 µL) 1.0 mg/mL ≤ IC ₅₀ ≤ 3.5 mg/mL	60 minutes treatment with SDS (25 µL) 1.0 mg/mL ≤ IC ₅₀ ≤ 4.0 mg/mL	60 minutes treatment with SDS (25 µL) 1.0 mg/mL ≤ IC ₅₀ ≤ 4.0 mg/mL	Treatment with 50 µL of 0.3% (v/v) Triton X-100 17.6 min ≤ ET ₅₀ ≤ 41.0 min	Treatment with 50 µL of 0.3% (v/v) Triton X-100 17.6 min ≤ ET ₅₀ ≤ 41.0 min

表 3.2-23 眼睛刺激性之替代方法

	牛角膜混濁和通透性試驗 (OECD TG 437)	離體雞眼試驗 (OECD TG 438)	螢光素滲漏試驗 (OECD TG 460)	體外短時間暴露試驗 (OECD TG 491)	重建人類角膜上皮細胞試驗 (OECD TG 492)
目的	分類和標示：辨別誘導眼睛損傷與嚴重刺激的化學物質；此外對該物質進行危害類別分類				
對應替代部位	角膜	角膜和虹膜	角膜	角膜	角膜
動物使用量	0*	0*	0	0	0
測試濃度	750 µl 於溶劑混合之測試物質	0.03 ml (液體) 0.03 g (固體)	1 ~250 mg/ml，若測試物為固體則增加 750 mg/ml 極高濃度	0.5% 和 0.05% (v/v)	依不同的組織模式給予不同濃度測試物
試驗限制	目前沒有單一的體外模式能夠取代體內模式 (OECD TG 405) 來預測不同化學類別的刺激性的，因此需配合使用分層測試策略和/或綜合測試評估方法 (IATA) 來評估其眼睛刺激性。				

五、皮膚過敏性

(一) 皮膚過敏性的發展

皮膚過敏：天竺鼠最大化試驗和貼布試驗（OECD TG 406: Skin Sensitisation Guinea Pig Maximisation Test and Buehler Test）是於 1981 年採用之 OECD 測試指引。隨後於 1991 以及 2021 年進行修訂，該指引描述兩種類型的測試：Magnusson 和 Kligman 的天竺鼠最大化試驗（Guinea Pig Maximisation Test, GPMT），即利用佐劑如佛朗氏完全佐劑（Freund's Complete Adjuvant, FCA）來增強皮膚過敏性，以及非佐劑型的貼布試驗（Buehler Test）。貼布試驗和天竺鼠最大化試驗都使用動物。基於動物福祉，若有正當理由，如當其他皮膚過敏試驗方法不適用時才建議使用。以下簡述皮膚過敏：天竺鼠最大化試驗和貼布試驗。

天竺鼠最大化試驗是由 B. Magnusson 和 Albert Kligman 於 1969 年首次提出的體內試驗，主要用於篩選導致人類皮膚過敏的物質，試驗動物最初透過皮內注射和 / 或表皮（誘導暴露）暴露於測試。經過 10~14 天的誘導暴露（induction exposure）後，將動物暴露於激發劑量（challenge dose）。將測試動物對激發暴露的皮膚反應程度與在誘導期間進行假處理並接受激發暴露的對照組進行比較。該試驗需使用至少 10 隻動物為藥物處理組以及 5 隻作為對照組。在劑量選擇方面，用於激發暴露的濃度應為最高的非刺激性劑量（non-irritant dose）。適當的濃度可以從使用兩隻或三隻動物的前導研究中確定。測試結束後根據以下評分量表觀察並且記錄皮膚反應。0 = 無可見變化；1 = 零散或斑片狀紅斑；2 = 中度的融合性紅斑；3 = 強烈的紅斑和腫脹，若試驗中至少有 30% 的動物反應率，將被認為是陽性，即該測試物質會導致皮膚過敏。

貼布試驗為一種用於篩選導致人類皮膚過敏的物質的體內測試，是由 Edwin Vernon Buehler 於 1965 年首次提出。這是一個非佐劑試驗（non-adjuvant test）。測試動物會暴露於高劑量的測試物質，隨後給於一個激發劑量，此劑量為不會引起刺激的最高劑量。基於動物福祉考量，該測試已在很大程度上被嚙齒類局部淋巴結試驗（OECD TG 429）所取代。試驗中會使用至少 20 隻作為藥物處理組以及 10 隻作為對照組。誘

導暴露 (Induction exposure) 的濃度應為引起輕微刺激的最高劑量。而用於挑戰暴露 (challenge exposure) 的濃度應該是最高的非刺激性劑量。適當的濃度可以從使用兩隻或三隻動物的前導研究中確定。測試結束後記錄皮膚有無任何異常並且觀察全身性的反應。試驗中若有至少 15% 的動物的反應率即被認為是陽性。

(二) 皮膚過敏性的替代測試方法

1. 皮膚過敏：局部淋巴結試驗 (OECD TG 429: Skin Sensitization Local Lymph Node Assay, LLNA)

啮齒類動物局部淋巴結試驗 (LLNA) 是由 Kimber 等人所描述作為評估化學物質皮膚過敏能力的方法。之後，LLNA 經歷廣泛的評估和驗證。而驗證報告於 1999 年發表於美國衛生研究院的網站上。這使得 LLNA 成為唯一經過驗證的體內皮膚過敏測試方法，其驗證過程可作為現今驗證過程的模式。OECD 於 2002 年採用 LLNA 作為獨立的替代測試，發布 OECD TG 429。LLNA 為動物福祉和科學利益提供優勢，從那時起大多數天竺鼠試驗都被 LLNA 試驗所取代。2010 年，OECD 更新該測試指引，其中針對主要測試步驟進行細微更改並包括替代測試終點。根據歐盟 REACH 法規，LLNA 是體內皮膚過敏測試的首選方法。只有在特殊情況下才使用其他測試，並且應提供使用其他測試方法的理由。

由於 LLNA 是一種體內方法，因此無法在皮膚過敏性評估中避免使用動物。然而這項測試方法能減少所需的動物數量。此外，LLNA 對使用動物提供實質性改進。例如，該測試方法不需要激發誘導皮膚過敏反應。此外，與天竺鼠最大化試驗不同的是 LLNA 不需使用佐劑，因此 LLNA 能減少動物的疼痛和痛苦。

LLNA 的實驗原理是將測試物質暴露於小鼠耳廓（耳瓣）背側，並測量耳廓引流（draining）淋巴結的增殖能力。淋巴細胞增殖可以透過放射性標記（定量 3H-胸腺嘧啶，tritiaded thymidine）、生物冷光（定量淋巴細胞中的 ATP 含量）或免疫測定（利用 BrdU 特異性抗體的 ELISA）來測量。而在 TG 429 中，淋巴細胞增殖能力是藉由放射性

標記的方式進行定量，將每個測試組中的平均增殖與溶劑對照組中的平均增殖進行比較。每個處理組與對照組平均增殖的比率，稱為刺激指數（simulation index, SI）。若 SI 值 ≥ 3 ，則該化學物質為潛在皮膚過敏物。

根據測試指引，本測試是使用 8~12 周齡、未懷孕的 CBA/Ca 或 CBA/J 品系的雌性小鼠。每個劑量組至少使用四隻動物，劑量範圍則需要至少三個濃度的測試物質外加陽性及陰性對照組。實驗開始前三天將 25 μL 適當稀釋的測試物質塗抹於耳背，休息兩天後以尾巴靜脈注射的方式給予 ^3H -胸腺嘧啶，五小時後再進行動物犧牲。隨後從耳穴淋巴結取出細胞並準備單細胞懸浮液，最後再轉移到裝有閃爍液（scintillation fluid）的閃爍瓶（scintillation vial）中進行 ^3H 計數。結果報告將會以 SI 值呈現，若 SI 值 ≥ 3 ，則可以判定該測試物質為皮膚過敏物。

2. 皮膚過敏：局部淋巴結試驗：DA（OECD TG 442A: Skin Sensitization Local Lymph Node Assay: DA）

「局部淋巴結試驗：DA」（LLNA:DA）為非放射性改良之 LLNA 測試，此試驗方法是透過生物冷光（bioluminescence）量化 ATP 之含量，以作為淋巴細胞增殖的指標。與 LLNA 試驗類似，LLNA：DA 研究皮膚過敏的誘導階段以提供適用於劑量反應評估的定量數據。此外，此試驗無需對 DNA 使用放射性標記即可檢測皮膚過敏物的能力，避免職業暴露於放射性和廢棄物處理問題的可能性。這可能使得應用小鼠來檢測皮膚過敏物，進一步減少使用天竺鼠來測試皮膚過敏潛力。

與 LLNA 原理相似同理，LLNA：DA 是利用生物冷光的特性（即測量淋巴細胞中 ATP 含量）來觀察耳廓暴露於測試物質後引流出來的淋巴結增殖能力，生物冷光法是利用螢光素酶催化 ATP 和螢光素來產生光，發射光強度與 ATP 濃度呈線性關係。處理組與其對照組會進行比較，計算出其比率而獲得 SI 值。若 SI 值 ≥ 1.8 則判定該測試物質為皮膚過敏物。

本測試所使用的動物品為 8~12 周齡大的 CBA/J 雌性小鼠。每個劑量組至少使用四隻動物，劑量範圍則需要至少三個濃度的測試物質，並且外加陽性及陰性對照組。實驗開始前三天先使用 1% 界面活性劑（Sodium Laurate Sulphate）塗抹於老鼠耳背進行預處理的動作，一小時後將 25 μ L 適當稀釋的測試物質塗抹於耳背。讓動物休息三天後於第七天同樣進行 SLS 預處理以及藥物處理的動作。處理完畢後 24~30 小時將老鼠進行犧牲，隨後從耳穴淋巴結取出細胞並準備單細胞懸浮液。最後透過螢光素測定法來淋巴結中 ATP 含量的表現。

淋巴結中 ATP 含量的增加是通過螢光素/螢光素酶方法使用 ATP 測量試劑盒進行檢測，該試劑盒以相對發光單位（Relative luminescence unit）檢測生物冷光。各實驗組別的結果會以平均 SI 值來表示。若 SI 值 $\geq$ 1.8 則判定該測試物質為皮膚過敏物。

3. 局部淋巴結試驗：BrdU-ELISA 或 BrdU-FCM（Test No.442B- Skin Sensitization Local Lymph Node Assay: BrdU-ELISA or –FCM）

本測試指引描述對 LLNA 測試方法的非放射性修改，該方法在基於 ELISA 或流式細胞儀方法（Flow cytometry method, FCM）的測試系統中利用非放射性標記的溴化脫氧尿苷（5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU）來測量淋巴細胞增殖。局部淋巴結試驗（OECD TG 429、TG 442A 和 TG 442B）在動物減量以及實驗精緻化（優化）方面比 OECD TG 406 中的天竺鼠試驗更具優勢。

本測試指引的實驗原理與前兩篇淋巴結試驗相似，差別在於使用測量 BrdU 含量來表示引流耳廓淋巴結中增殖細胞數量的增加。在 BrdU-ELISA 模式中，BrdU 的訊號是藉由 ELISA 測量，藉由對 BrdU 特異的抗體來進行標記。

本測試所使用的動物品係為 8~12 周齡大的 CBA/JN 雌性小鼠。每個劑量組至少使用四隻動物，劑量範圍則需要至少三個濃度的測試物質並且外加陽性及陰性對照組。實驗開始前三天將 25 μ L 適當稀釋的測試物質塗抹於耳背，休息一天後以腹腔注射的方式給予 0.5 mL（5 mg/老鼠）的 10 mg/mL BrdU 溶液。24 小時後將動物進行犧牲，取出

淋巴結細胞後 使用 ELISA，以 370 nm 吸收波長與 492 nm 的參考波長檢測 BrdU 含量。各實驗組別的結果會以平均 SI 值來表示。SI 值是通過將每個藥物處理組除以對照組的平均 BrdU 標記指數 (BrdU labeling index) 計算得出。若 SI 值 ≥ 1.6 則判定測試物質為皮膚過敏物。

BrdU-CFM 模式的實驗原理與前述的實驗相似，不同在於 BrdU 是透過流式細胞儀方法 (FCM) 測量，FCM 使用對 BrdU 抗體來進行偵測訊號，以異硫氰酸螢光素 (Fluorescein isothiocyanate) 進行標記。

本實驗中所使用的動物品係為 8 週至 12 週齡大的 BALB/C 雌性小鼠。每個劑量組至少使用四隻動物，劑量範圍則需要至少三個濃度的測試物質並且外加陽性及陰性對照組。實驗開始前三天將 25 μ L 適當稀釋的測試物質塗抹於耳背，休息一天後以腹腔注射的方式給予 0.1 mL (2 mg/老鼠) 的 20 mg/mL BrdU 溶液。24 小時後將動物進行犧牲，取出淋巴結細胞後使用流式細胞儀進行檢測。各實驗組別的結果會以平均 SI 值來表示，其 SI 值是藉由藥物處理組除以對照組中平均 BrdU 陽性淋巴結細胞的平均數量得出。若 SI 值 ≥ 2.7 則判定該測試物質為皮膚過敏物。

4. 皮膚過敏化學試驗：直接胜肽反應測試 (OECD TG 442C: *In Chemico* Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay, DPRA)

皮膚致敏性主要是指免疫系統對某一化學物質產生的過度免疫反應。當第一次接觸會引起過敏的化學物質時，免疫系統僅會引起輕微反應，也就是致敏 (sensitization) 反應，而當再次接觸到相同化學物質時，因後天型免疫系統已針對此化學物質具有記憶性，因此會引起劇烈反應。一般而言，皮膚過敏時會引起紅斑 (發紅)、水腫 (腫脹) 和水疱 (水泡) 等症狀。此外，相較於皮膚刺激性，皮膚致敏性所引起的生理反應不同，其中最主要為免疫系統的過度活化而導致更嚴重的併發症。皮膚接觸化學物質後導致過敏且引起一系列的免疫發炎反應是一個極其複雜的過程，因此 OECD 定義該過程中的主要三個關鍵事件分別為：(1) 蛋白與致敏物質的結合，(2) 角質細胞的活化，(3) 樹突狀細胞的活化。

本測試指引透過含有半胱氨酸 (cysteine, 0.667 mM in pH7.5)、離氨酸 (lysine 0.667 mM in pH 10.2) 及混合溶液與欲檢測之化學物質以 1:10 或 1:50 比例混勻後於室溫下 (22.5°C 至 30°C) 培養 24 小時。隨後透由高效液相色譜分析之 220 nm 波長偵測與梯度萃取來判斷相關胜肽剩餘濃度比例，半胱氨酸與離氨酸的剩餘濃度越少，則表示該測試物質與蛋白質具有高度結合能力，隨後可將胜肽剩餘濃度統計結果以預測模型進行評估，評估標準請參考表 3.2-24，藉此以分辨該測試物質是否為致敏 (skin sensitisers) / 非致敏物質 (non-sensitisers)。若是陽性結果代表具致敏物質潛勢，陰性結果代表具非致敏物質潛勢。

5. 皮膚過敏體外試驗：ARE-Nrf2 螢光酶測試法 (OECD TG 442D- *In vitro* skin sensitisation: ARE-Nrf2 luciferase test method)

OECD TG 442D 皮膚過敏體外試驗：ARE-Nrf2 螢光酶測試法可分為兩種方式：1. ARE-Nrf2 luciferase KeratinoSens™ test method 和 2. ARE-Nrf2 luciferase LuSens test method。兩者皆用於模擬皮膚致敏性結果途徑中的第二個關鍵事件。在導致皮膚過敏的不良反應中，角質細胞 (keratinocytes) 會產生幾項關鍵的反應過程，包括發炎反應 (inflammatory responses) 以及特定細胞信號相關的發炎或抗發炎基因表達，例如：抗氧化反應片段 (antioxidant/electrophile response element, ARE)，當角質細胞反應越激烈，該物質的致敏性潛力越大。

表 3.2-24 半胱氨酸 1:10 / 離氨酸 1:50 預測模型結果分類等級

半胱氨酸和離氨酸消耗百分比的平均值 (剩餘濃度)	反應結果等級	DPRA 預測結果
$0\% \leq \text{平均消耗百分比} \leq 6.38\%$	無反應或極低反應性	陰性結果
$6.38\% < \text{平均消耗百分比} \leq 22.62\%$	低度反應性	陽性結果
$22.62\% < \text{平均消耗百分比} \leq 42.47\%$	中度反應性	
$42.47\% < \text{平均消耗百分比} \leq 100\%$	高度反應性	

ARE-Nrf2 螢光素酶測試方法是利用一種為 ARE 種類的 AKRIC2 基因後嵌合 luciferase 綠螢光報導基因之人類角質細胞作為該測試對象，其中 AKRIC2 基因在過敏過程中已知會大量表現。其測試方法原理為當某一化學物質進入細胞後，化學物質會與感知蛋白（sensor protein）例如 Kelch-like ECH-associated protein 1（Keap1）結合，進而導致 Nrf2 的解離，而變成游離型的 Nrf2 將會進入細胞核，並結合在抗氧化反應片段（ARE）片段前的啟動子（promotor），促使活化 ARE，使相關抗氧化基因大量表達，而因為 luciferase 綠螢光報導基因被嵌合在 ARE 片段之末端，所以在轉錄 ARE 片段的過程中亦會轉錄出發綠螢光的報導基因，因此則可藉由綠螢光強度大小作為因測試物質而引起的抗氧化反應程度的依據。

當螢光強度越強代表 ARE 被測試物質活化的反應越大，亦表示測試物質的致敏潛力越大，其代表結果為陽性結果，反之亦然。GHS 區分皮膚致敏性物質和非致敏性物質的試驗方法，OECD TG 442D 皮膚過敏體外試驗：ARE-Nrf2 螢光酶測試法可評估在 AOP 機制下測試物質對皮膚致敏性的潛在危險，因此聯合國 GHS 將其物質歸類為第 1 級。

6. 皮膚過敏體外試驗：人類細胞株活化試驗（OECD TG 442E- *In vitro* skin sensitisation human cell line activation test, h-CLAT）

人類細胞株活化試驗指引以皮膚敏感性試驗使用 h-CLAT 方法原理，為量化暴露於致敏物質後，人類單核白血病細胞（THP-1）中與單核細胞和樹突細胞活化過程相關的細胞表面抗原（CD86 和 CD54）表現的變化。利用測得 CD86 和 CD54 細胞表面抗原表現量來區分物質對皮膚是否有過敏性反應。

h-CLAT 方法適用於測試多種不同質地的物質，適用在可溶解於溶劑中穩定的膠體及懸浮溶液，當測試物質不易溶解，在 DPBS 或 DMSO 中有沉澱現象，依據其是否有溶劑可溶解測試物質並穩定測試物質為溶液不再沉澱，即可使用此溶劑進行試驗。h-CLAT 方法證實可以區分致敏性及非致敏性物質，有效評估皮膚敏感性。利用體外培養人類單核白血病細胞與測試物質培養 24 小時，透過流式細胞儀檢測細胞表面抗原 CD86 和 CD54 表現的相對螢光強度量（Relative fluorescence intensity），以評估測試物質對皮膚敏感性及有效濃度。

由細胞存活率結果而言，對照物質中的溶劑組別(medium 及 DMSO) 與細胞反應 24 小時後，其細胞存活率需大於 90%；CD86 和 CD54 表現量，陽性對照物質 CD86 RFI ≥ 150 (EC150)及 CD54 RFI ≥ 200 (EC200)，陰性對照物質不得有陽性反應，即可判定細胞品質為穩定。細胞品質反應須確認兩次皆通過，方可進行後續的測試物質劑量分析。測試物質對 THP-1 細胞存活率影響，將以細胞存活率 75%為基準，來計算物質適合試驗之濃度。皮膚敏感性結果為陽性時，可計算出 EC₁₅₀ / EC₂₀₀ 有效濃度，重複進行二至三次試驗後結果皆為陽性，得到三次之有效濃度數值，取其中位數；若三次實驗中只有兩次試驗得陽性結果，則取其較高濃度為最終有效濃度。

(三) 皮膚過敏性替代測試方法使用性建議

REACH 對皮膚致敏性所規範的毒理資訊也在附件 VII 中闡明，要求提供識別皮膚致敏物的相關資訊，包括在類別 1A 中的潛在分類，根據需求進行風險評估。這些資訊應該來自：(1) 針對以下三個皮膚致敏性健康危害途徑 (AOP) 中關鍵事件 (Key events, KE) 的體外/化學性測試數據：與皮膚蛋白質分子相互作用、角質形成細胞發炎反應、樹突細胞活化；(2) 若上述體外 / 化學性研究不適用於物質或不足以進行分類和風險評估，則進行皮膚過敏體內研究，通常使用局部淋巴結測試 (LLNA)。並且在報告中也列出 REACH 法規下所採用之體外和體內皮膚致敏性測試。其中所接受的體外 / 化學性測試為 OECD TG 442C、TG 442D 以及 TG 442E，而體內皮膚致敏性測試的是 OECD TG 406、TG 429、TG 442A 與 TG 442B。針對體內試驗，局部淋巴結試驗 (OECD TG 429、442A 及 442B) 是體內皮膚致敏性測試的首選，相關差異請參考表 3.2-25。

我國標準登錄資料撰寫指引建議可使用皮膚過敏 (OECD TG 406)、局部淋巴結試驗 (OECD TG 429)、局部淋巴試驗：DA (OECD TG 442A) 以及局部淋巴結試驗：BrdU-ELISA (OECD TG 442B) 識別皮膚致敏物，滿足 6.4 項皮膚過敏性的資訊需求。建議登錄人若無特殊目的，僅可能使用現有非動物測試方法，先採 OECD TG 442C-E 體外皮膚過敏測試獲得資訊，確定有必要時，再考量動物實驗。

表 3.2-25 皮膚過敏性之體內替代方法

	【OECD TG 406】 皮膚過敏	【OECD TG 429】 LLNA	【OECD TG 442A】 LLNA：DA	【OECD TG 442B】 LLNA：BrdU
試驗分類替代方式	動物（體內）測試	體內實驗替代	體內實驗減量	
目的	辨別皮膚過敏物			
方法	實驗動物會以貼布方式給予測試物質進行誘導暴露與激發暴露	將測試物質暴露於小鼠耳背，並測量該區域淋巴結的增殖能力。淋巴細胞增殖可以透過放射性標記（TG 429）、生物發光（TG 442A）或免疫測定（TG 442B）來測量		
劑量	激發暴露的濃度應為最高的非刺激性劑量	劑量選擇參考文獻；後續劑量通常選自適當的濃度系列，例如 100%、50%、25%、10%、5%、2.5%、1%、0.5% 等		
動物使用量	GPMT：至少 15 隻（處理組 10 隻；對照組 5 隻） 貼布試驗：至少 30 隻（處理組 20 隻；對照組 10 隻）	至少 20 隻 （處理組至少四隻；至少 3 個濃度外加陽性和隱性對照組）		
法規資訊	只在管理機構要求時才使用，盡可能使用現有的非動物測試方法	與 TG 406 相比能減少動物使用量、減少動物疼痛與痛苦		

六、基因毒性

（一）基因毒性的發展

基因是細胞內最重要的物質，掌管細胞的一切活動，因此當基因受到傷害，將導致細胞的變性，突變甚至癌化。化學物質是否具基因毒性，需有科學實驗的基礎審慎評估。因此基因毒理三項試驗之目的，在於藉由從細菌、細胞到動物完整的試驗，評估試驗物質是否直接或間接引發基因損傷，藉此判別試驗物質的致癌性，或判別試驗物質是否具致突變劑的風險。基因毒性試驗可分為體內（*in vivo*）與體外（*in vitro*）測試，其目的為偵測試驗物質直接或間接引發的基因傷害及程度。試驗物質依照級別分別須進行三種以上的基因毒性測試，以評估其基因毒性，其規範如下表，基因毒性試驗包括：細菌基因突變分析（Gene mutation in bacteria）、體外哺乳類細胞的染色體損傷分析法（*In vitro* Chromosomal aberration test with mammalian cells in culture）或體外小鼠淋巴瘤胸腺嘧啶核苷激酶（Thymidine Kinase, TK）分析法（*In vitro* mouse lymphoma tk assay）以及嚙齒類動物造血細胞的動物體內染色體損傷分析法（*In vivo* test for chromosomal damage using rodent hematopoietic cells）等。

試驗基本原則以體外測試優先，應至少完成細菌基因突變分析、體外哺乳類細胞基因毒性分析，應至少完成細菌基因突變分析、體外哺乳類細胞基因毒性分析，若前述兩類試驗結果皆為基因毒性陰性，則無須再進行動物實驗，反之則必須參酌動物實驗數據。(表 3.2-26)，三項試驗比對列於表 3.2-27。

(二) 基因毒性之三項試驗之介紹

1. 細菌基因突變分析：一般使用細菌回復突變試驗 (OECD TG 471: Bacterial Reverse Mutation Test)

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.typhinurium* TA98；(2) *S.typhinurium* TA100；(3) *S.typhinurium* TA1535、(4) *S.typhinurium* 1537、TA97 或 TA97a；(5) *E.coli* WP2uvA、*E.coli* WP2uvta (pkM101) 或 *S.typhinurium* TA102。常以沙門氏桿菌進行致突變性測試。劑量選擇方面至少要有 5 個可分析的劑量，每個劑量間要有適當的間隔，建議進行前試驗來決定試驗物的殺菌力和溶解度。對於無殺菌力的試驗物設定最高測試劑量上限為 5 mg/plate (或 5 μ L/plate)，對於有殺菌力的試驗物，最高測試劑量應具有殺菌力。當有沉澱物產生時，應選擇不影響肉眼判讀的劑量。每個試驗不管有無添加體外代謝酵素處理均要包括陰性對照組 (溶劑或媒介物) 和陽性對照組。測試方法可使用前置培養法 (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。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，需選擇適當的體外代謝酵素，一般建議為 S9。結果觀察於 37 度培養 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殺菌力和沉澱物的產生。若有明確的陽性結果無需再重複試驗，當無法明確判斷陽或陰性結果時，應改變試驗條件後再進行確認。數據呈現包括每個處理、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，若能隨劑量增加而增加平均回復菌落數則判別為致突變物質，若不符合上述條件則為非致突變物質。

表 3.2-26 基因毒性資訊繳交規範

	第一級	第二級	第三級	第四級
基因毒性	細菌突變	細菌突變	細菌突變	細菌突變
		體外哺乳類細胞基因毒性	體外哺乳類細胞基因毒性	體外哺乳類細胞基因毒性
			體內基因毒性	體內基因毒性
豁免原則： 1. 標準登錄第一級如直接進行體外哺乳類細胞基因毒性試驗或體內基因毒性試驗，可不進行細菌突變試驗。 2. 標準登錄第二級如直接進行體內基因毒性試驗，可不進行細菌突變試驗與體外哺乳類細胞基因毒性試驗。				

表 3.2-27 基因毒性三項試驗比較

	基因毒性三項試驗之比較			
	細菌基因突變分析	體外哺乳類細胞基因毒性分析	動物活體基因毒性分析	
目的	其目的為偵測試驗物質直接或間接引發的基因傷害及程度			
試驗物種	需使用下列菌株： <i>S. typhimurium</i> TA98、 <i>S. typhimurium</i> TA100、 <i>S. typhimurium</i> TA1535、 <i>S. typhimurium</i> TA1537、TA97 或 TA97a、 <i>S. typhimurium</i> TA102、 <i>E. coli</i> WP2 uvr A、 <i>E. coli</i> WP2 uvr A (pkM101)。	哺乳類細胞株或初代哺乳類細胞	L5178Y TK+/-小鼠淋巴瘤細胞株	一般使用雄性小鼠。每組至少五隻動物
劑量範圍	進行五個以上劑量組，最高劑量須足以產生明顯的毒性。	進行三個以上劑量組，劑量間隔可為 2 倍或自然對數對半。	進行三個以上劑量組，劑量間隔可為 2 倍或自然對數對半。	三個以上劑量組。
代謝活化	進行含有/無 S9 混合液的測試	進行含有/無 S9 混合液的測試	進行含有/無 S9 混合液的測試	-
試驗結果	每盤培養皿中突變菌落的數量，判別受試物基因毒性為陽性或陰性。	以表格方式描述染色體變異的種類及數量，並計算含染色體結構變異細胞之頻率。	以表格方式描述每劑量組細胞突變及存活數目，同時計算細胞存活率、複製效率及細胞致突變之頻率。	嚙齒類骨髓細胞染色體異常測試法、嚙齒類骨髓細胞之微核測試法、嚙齒類周邊血液之微核測試法。
試驗基本原則	以體外測試優先，應至少完成細菌基因突變分析、體外哺乳類細胞基因毒性分析，若 1. 前述兩類試驗結果已確認受試物基因毒性為陰性，無須再進行動物實驗。 2. 上述測試選擇僅做為建議，亦可選擇其他 OECD 規範進行，例如：體外哺乳類細胞基因毒性分析，可選擇染色體變異的 OECD TG 473 進行測試。 3. 當近似物或以電腦模擬觀察到有基因毒性的可能時，建議可同時對基因突變及染色體變異兩項進行評估，用以釐清物質的基因毒性全貌。			

2. 體外哺乳類細胞基因毒性分析 - 體外哺乳類細胞的染色體異常分析 (OECD TG 473: *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test)

可使用初代細胞 (primary cell)、培養細胞 (culture cell)、繼代細胞 (subculture cell)，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。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。測試劑量至少要有 3 個可分析的劑量，每個劑量間要有適當的間隔。建議進行前試驗來決定後續主試驗劑量。對於無殺菌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；對於有細胞毒性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，在任何濃度下均無細胞毒性時，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。每個試驗不管有無添加體外代謝酵素處理均要包括陰性對照組 (溶劑或媒介物) 和陽性對照組，陽性對照組要選擇染色體誘裂劑 (clastogen)，其暴露濃度要確實能引起陽性反應，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。應使用增生 (proliferative) 期的細胞。先進行試驗物加與不加體外代謝酵素處理細胞 3 小時至 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；當短時間暴露試驗加與不加體外代謝酵素處理結果均為陰性時，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。需選擇適當的體外代謝酵素，一般建議為 S9。試驗物和對照組的每個處理均需觀察和計數各 100 個中期細胞，並記錄發生染色體畸變 (chromosome aberration) 的細胞數和頻率。其中，亦要包括染色體結構畸變的不同分型、發生數目和發生頻率；缺口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。當處理組的染色體畸變發生率與陰性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陽性反應結果。當無法明確判斷陽性或陰性反應時，應改變實驗條件後再進行確認。數據呈現

至少需包括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應對照組的細胞殺菌力及試驗物是否產生沉澱物情形。在結果的評估與解釋上，試驗組與陰性對照組相比，若至少有一個測試濃度有顯著增加並且達到統計上的差異；或是具有劑量效應；或試驗組的結果分布在陰性對照組的 95%信賴區間（Poissonbased 95% control limits）之外，可判定此測試物具有陽性反應結果，該測試物即符合此測試方法中誘導體外哺乳類細胞的染色體畸變；當無法明確判斷陽性或陰性反應時，應改變實驗條件後再進行確認。

3. 體外哺乳類細胞基因毒性分析 - 利用胸腺嘧啶核苷激酶基因進行體外哺乳動物細胞基因突變試驗（OECD TG 490: *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene）

此試驗可用於檢測化學物質引起的基因突變。該測試指引應用兩種不同的體外哺乳動物基因突變試驗，即兩種 TK 雜合細胞系，包括：L5178Y TK⁺/⁻小鼠淋巴瘤細胞株和 TK6 tk⁺/⁻細胞株。此試驗室基於胸腺嘧啶核苷激酶基因（thymidine kinase gene）的原理來確認突變的潛力，當化學品導致基因突變時，如：點突變（Point mutations）、讀碼框突變（frame-shift mutations）和小片段缺失（small deletions）和染色體異常，如：大片段（large deletions）、染色體重排（chromosome rearrangements）及有絲分裂重組合（mitotic recombination），胸腺嘧啶核苷激酶基因座會由 TK⁺/⁻突變為 TK⁻/⁻，缺乏胸腺嘧啶核苷激酶的細胞株將導致死亡。

試驗通常採用小鼠淋巴瘤 L5178Y tk⁺/⁻細胞，試驗物濃度至少應包含 4 個可用於結果分析的濃度。最高濃度主要取決於受試物的細胞毒性和/或溶解度，對於可溶性的無細胞毒性的受試物，建議最高濃度一般為 1 mM 或 0.5 mg/ml；而對於可溶性的有細胞毒性的受試物，應根據細胞毒性大小確定最高濃度，最高濃度應能產生 80%至 90%的細胞毒性。通過相對總生長率（Relative total growth, RTG）來反應細胞毒性；另外對於難溶性的受試物，若無細胞毒性，一般採用最小沉澱濃度作為最高濃度。濃度間距為 2 至 3 倍；對於有細胞毒性的受試

物，所選擇的濃度應覆蓋產生細胞毒性的範圍。代謝活化採用誘導劑，如 Aroclor 1254 或苯巴比妥和 β -萘黃酮聯合誘導處理後的 S9 進行體外代謝活化試驗，即在加 S9 和不加 S9 條件下測試。S9 在試驗介質中的終濃度一般為 1%~10% (v/v)。另外，此測試建議使用陽性與陰性對照組以更加確認突變頻率。

此試驗一般使用微孔盤或是軟瓊脂法進行，在代謝活化或非代謝活化條件下，測試物作用時間建議作用 3 小時至 4 小時，若結果為陰性，則需進行附加試驗（在非代謝活化條件下測試作用 24 小時之試驗）。另外也需觀察突變表達期，在測試物作用後去除測試物，並且將細胞培養於培養液中，在處理結束後及表達期結束後（L5178Y 細胞的突變表達期約為 2 天）測定平板接種效率以評估細胞毒性。表達期結束後，將細胞接種於含有突變選擇劑三氟胸苷的 96 孔板中進行三氟胸苷抗性突變群落的測定。如果測試物結果呈現陽性，則需要對至少一個測試物濃度組和陰性、陽性對照組分別記錄含有大、小群落的孔數；如果為陰性結果，僅需要對陰性和陽性對照組分別記錄含有大、小群落的孔數，不須紀錄測試物組。

結果判定應該描述各個測試物濃度組的細胞毒性以及測試物沉澱的情形，結果則是代表各個測試物濃度組的突變頻率。陽性對照組應滿足總突變頻率絕對增加，需較自發性的突變頻率增加至少 300×10^{-6} ，與陰性對照組相比，小菌落的突變頻率需增加至少 150×10^{-6} 。MLA 具有生物學統計差異的突變頻率增加為，在任何一種試驗條件下，如果一個以上的濃度組突變率增加超過總評價因數（Global evaluation factor），且呈劑量效應，則判定為陽性結果。當無法明確判斷陽性或陰性反應時，應改變實驗條件後再進行確認。

4. 動物體內基因毒性分析-哺乳動物紅血球微核試驗（OECD TG 474-Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test）

以骨髓細胞做為標的時可選用小鼠或大鼠作為試驗動物；當以週邊血為標的時則使用小鼠為試驗動物，若使用其他動物需要則需要正當的理由。若可證明試驗物質對於動物的作用並沒有存在性別差異

時，可只選用單一性別進行試驗，通常以雄性為優先選擇。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。投藥途徑可以口服給予或是腹腔內注射給予，單次投予或多次投予，使用其他給藥途徑時需要有正當的理由。測試劑量的部分至少要有三個測試劑量，每個劑量間要有適當間隔。可以以不成熟紅血球的減少、出現全身性的毒性症狀、或是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，當毒性無法確定時，以 2,000 mg/kg 做為最高測試劑量的上限。

測試方法可使用骨髓或週邊血的紅血球；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；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。每隻動物需觀察至少 2,000 顆不成熟紅血球，紀錄微核的發生率；以骨髓細胞為觀察標的時每隻動物至少計數 500 顆紅血球；以週邊血為觀察標的時每隻動物至少計數 2,000 顆紅血球，記錄紅血球內不成熟紅血球的數量和比率。結果評估以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陽性結果；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。數據呈現至少需包括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；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；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。

動物體內基因毒性分析-哺乳動物骨髓染色體異常試驗（OECD TG 475: Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test）：一般使用大鼠、小鼠或倉鼠（若報告中提供科學依據，可以使用任何其他適當的哺乳動物物種）。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五隻，若可證明試驗物質作用沒有存在性別差異時，可只選用單一性別進行試驗。如果人體暴露於化學物質可能會因不同性別而有差異，例如某些藥物，則應進行適當的性別測試。作為最大

典型動物要求的指引，兩個採樣時間的骨髓研究，至少要有三個測試劑量，每個劑量間要有適當間隔，可以出現骨髓毒性或是預期再增加劑量會造成死亡等指標做為最高測試劑量的選擇。當毒性無法確定時，以 2,000 mg/kg 做為最高測試劑量的上限。限量試驗：若試驗物於 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。主要應使用口服給予或是腹腔內注射給予，使用其他給藥途徑時應提供適當理由，暴露頻率可為單次暴露或一日內多次暴露。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 2 小時至 18 小時）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。在進行採樣前約 3 小時至 5 小時，經腹腔注射間期細胞中止劑，例如：Colcemid®或秋水仙素（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。處理組和對照組的每隻動物需觀察至少 1,000 顆細胞計算有絲分裂指數（mitotic index）以評估細胞毒性。處理組和對照組的每隻動物至少觀察 200 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染色體結構畸變（Structural chromosomal aberrations）的細胞比率。並根據染色體畸變的分型表列出發生數目和發生頻率。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。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陽性反應結果。當出現不確定結果時，需改變實驗條件再進行試驗確認。數據呈現至少需包括每隻動物發生畸變的種類和數目、每個處理和對照組的畸變總數及其平均值和標準偏差。

（三）基因毒性的替代測試方法

1. 體外哺乳動物微核試驗（OECD TG 487- *In Vitro* Mammalian Cell Micronucleus Test）

體外哺乳動物細胞微核試驗（OECD TG 487）用於檢測間期

(Mitosis phase) 細胞內，細胞質的微核發生。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) 或細胞分裂後期染色體因紡錘體損傷而無法被分配到兩極相關，故可評估試驗物對細胞是否有染色體斷裂 (clastogenicity)，也具有觀察染色體數目變異/非整倍性 (aneugenicity) 的能力，但測試規範中也說明，當不具有特殊技術時，例如：螢光染色體原位雜交技術 (fluorescence in situ hybridization, FISH)，微核測試無法區分誘導染色體斷裂物質與造成染色體數量變化的物質，當登錄人需要區分兩者時，仍須注意相關需求。

體外哺乳動物細胞微核試驗可使用人類邊血液淋巴球初代細胞 (primary cell) 或嚙齒動物來源的細胞株 (cell line) 例如：CHO、V79、CHL1U 或 L5178Y 等，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。至少要有 3 個可分析的劑量，每個劑量間要有適當的間隔，建議進行前試驗來決定後續主試驗劑量，對於無細胞毒性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；對於有細胞毒性的試驗物最高濃度需達到 55+5% 的細胞毒性。當溶解度有限，且在任何濃度下均無細胞毒性時，最高試驗濃度應為有沉澱物產生的最低濃度。每個試驗不管有無添加體外代謝酵素處理均要包括陰性對照組 (無處理對照組)、溶劑或介質對照組和陽性對照組。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，應使用於呈指數增長 (growing exponentially) 的細胞進行試驗；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；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 小時至 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 cytoB 的培養液，再培養 1.5~2 個細胞週期後收取細胞。先進行短時間暴露試驗，當試驗結果為陰性或不確定結果時，應進行連續暴露試驗。需選擇適當的體外代謝酵素，一般建議為 S9。所有試驗物處理濃度組和陰性對照組的細胞毒性情形亦要同時檢測。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 (replicate index) 反應細胞增生和細胞毒性現象。試驗無添加細胞鬆弛素 B：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 1000 個細胞，每個處理重複 2 個培養盤) 分析微核率。並計算其相對增生細胞數 (relative increase in Cell Count) 或相對細胞族群倍增值 (relative population doubling) 或增生指數 (proliferation index) 決定細胞增生和細胞毒性情形。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陽性結果，無符合上述條件時可判定為陰性結果，明確的陽性或陰性結果無需進行額外實驗再驗證，當無法明確判斷陽性反應或陰性反應時，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。數據呈現至少需包括所有觀察的原始數據及其平均值、各測試物質濃度組和對照組的細胞毒性及測試物質是否產生沉澱物情形。

結果判定應描述各濃度組細胞毒性大小和沉澱情況；結果表示為微核率。測試物在任一處理條件下一個或多個濃度組微核率顯著增加，且具有記浪效應，且微核率在陰性對照組範圍之外，可判定為陽性結果。結果判定時應首先考慮試驗結果的生物學意義，統計學分析有助於結果的評估。如果結果不是明確的陽性或陰性，或者為了確定陽性結果的生物學意義，應進行進一步的研究，像是分析更多的細胞，或者採用優化的試驗條件進行重複試驗 (如改變試驗劑量間距、其他給藥途徑、其他採樣時間或其他組織)。對於陰性結果，需提供支援靶組織暴露或毒性的直接或間接證據。若評估陽性或可疑結果的生物學意義，需提供靶組織細胞毒性資訊。

2. 體外哺乳動物細胞基因突變試驗 (OECD TG 476: *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xprt genes)

體外哺乳動物細胞基因突變試驗可用於檢測化學物質引起的基

因突變。可使用人類淋巴球母細胞（TK6）或齧齒動物來源的細胞株（cell line）例如：CHO、V79、或 L5178Y 等，在該測試中，使用的基因遺傳測試終點為測量次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶（hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, HPRT）和黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶（xanthine-guanine phosphoribosyl transferase, XPRT）轉基因處的突變。HPRT 和 XPRT 突變測試檢測不同的遺傳事件譜（spectra of genetic events.）。

在一般的情況下，細胞可以產生 HPRT，在含有 6-硫代鳥嘌呤（6-thioguanine, 6-TG）的細胞培養液中，HPRT 催化進而產生核苷-5-單磷酸，而核苷-5-單磷酸會進入 DNA 中進而導致細胞死亡。在致突變物質的作用下，某些細胞染色體上控制 HPRT 的結構基因發生突變而無法產生 HPRT，而使細胞對於 6-TG 產生抗性，因此細胞能夠在含有 6-TG 的細胞培養液中生長。懸浮或單層培養的細胞暴露於至少四種可分析濃度的測試物質，暴露一段時間後，繼代培養細胞以檢測細胞毒性。通常透過檢測暴露檢測物質的培養物的相對克隆效率〔Relative cloning efficiency (survival)〕或相對總生長來測定細胞毒性。暴露檢測物質的培養物在生長培養基中保持一定的測試時間，每個選定基因座和細胞類型的特徵，以誘導突變的接近表型表達。透過在含有選擇劑的培養基中接種已知數量的細胞來檢測突變細胞，並在不含選擇劑的培養基中接種以確定克隆效率（Cloning efficiency）來確定突變頻率。在合適的培養時間後，對菌落進行計數。

測試物質應充分溶解於細胞培養液中，溶解試驗物質的溶媒需是非致突變劑，且不予測試物質發生化學反應，不影響細胞的存活率，首選溶媒為蒸餾水，若較難容於蒸餾水中的測試物質可使用 DMSO。劑量選擇方面，可藉由細胞毒性、測試物質的溶解度、pH 質或是滲透壓的改變決定最高濃度。懸浮或單層培養的細胞暴露於至少四種可分析濃度的測試物質，對於測試物的最高濃度，所選擇的濃度應覆蓋產生細胞毒性的範圍（包括最大毒性至幾乎無毒性），且劑量建議以序列濃度以觀察劑量效應。若測試物質對於細胞毒性低，建議最高濃

度設為 5 $\mu\text{L/mL}$ 、5 mg/mL 或 0.01 mol/L 。若測試物質為低溶解度物質，建議其最高濃度應到達或是超過在細胞培養狀態下的溶解度限值；每個試驗不管有無添加體外代謝酵素處理均要包括陰性對照組、溶劑或介質對照組和陽性對照組。當使用代謝活化系統時，陽性對照組可使用 3-甲基胆蒽（3-methylcholanthrene）、N-亞硝基二甲胺（N-nitroso-dimethylamine）、7,12-二甲基苯并[a]蒽（7,12-dimethylbenz[a]anthracene）等；在沒有代謝活化系統時，陽性對照組可使用甲磺酸乙酯（ethyl methanesulphonate）、乙基亞硝基脲（ethylnitrosourea）等標準化學物質，若有充分的科學證據也可使用其他適合的陽性對照物，陰性對照組的處理方式應與測試物質組相同。

在代謝活化系統存在和不存在的情況下，用測試物處理細胞暴露時間應適當（通常 3 小時至 6 小時就足夠了）。在測試的每個階段，用於每個測試（對照組和處理組）培養物的最小細胞數應基於自發突變頻率（spontaneous mutant frequency）。建議繼代足夠的細胞，以便在測試的所有階段在每個培養物中保持 10 個自發突變體（spontaneous mutants），自發突變頻率一般在 $5\text{-}20 \times 10^{-6}$ 之間。

表型表達時間和測量突變頻率：暴露測試物一段時間後，繼代培養細胞以保留突變表型的表達（通常 7 天至 9 天可誘導 Hprt 和 xprt 突變體接近最佳表型表達），將細胞培養在含有和不含選擇劑（6-硫鳥嘌呤）的培養基中，分別用於確定選擇時的突變體數量和克隆效率（突變頻率是根據突變體選擇時克隆效率校正的突變菌落數計算的）。透過在含有選擇劑的培養基中接種已知數量的細胞來檢測突變細胞，並在不含選擇劑（6-硫鳥嘌呤）的培養基中接種以確定克隆效率（Cloning efficiency）（存活率）來確定突變頻率。在合適的培養時間後，對菌落進行計數。

結果判定應描述各濃度組細胞毒性大小；陽性結果的判斷為測試物質在任何一個劑量的突變頻率為陰性對照組的 3 倍或以上，即可判定為陽性；測試物質的突變頻率增加，且與陰性對照組相比具有統計

意義、劑量效應，可判定為陽性結果。若不符合上述陽性結果判定標準，即可判為陰性結果。若陽性對照組的集落形成率或細胞存活率低於 50%，則結果建議不採用，若測試物質為陰性或是弱陽性時，陽性對照組的又變率須到達正常值的下限以上，否則結果不成立。

如果結果不是明確的陽性或陰性，或者為了確定陽性結果的生物學意義，應進行進一步的研究，像是分析更多的細胞，或者採用優化的試驗條件進行重複試驗（如改變試驗劑量間距、其他給藥途徑、其他採樣時間或其他組織）。

3. 體內試驗：鹼性彗星試驗分析（OECD TG 489: *In vivo* mammalian alkaline comet assay）

體內鹼性單細胞凝膠電泳試驗，也稱為鹼性彗星試驗，是一種測量真核細胞 DNA 鏈斷裂的方法。通常使用性成熟、年齡 6 週至 10 週齡的齧齒類動物。通常使用大鼠。每個處理組中至少一種性別、至少 5 隻動物組成（或每種性別至少 5 隻）至少需要三個劑量組和同時進行的陰性和陽性對照（每組由五隻單一性別的動物組成），將需要 25 隻動物。

劑量選擇方面，最高劑量可根據相關毒性試驗或是預試驗的結果而決定，可採用最大耐受劑量（Maximal tolerance dose, MTD）、最大給藥量、最大暴露量或限度劑量為最高劑量。對於測試物的最高濃度，所選擇的濃度應覆蓋產生細胞毒性的範圍，且劑量建議以序列濃度以觀察劑量效應。給藥時間可每天給藥一次、或持續 2 天、或更長時間的每日劑量，確保測試化學品到達標靶組織，如果明確資訊，標靶組織可以是肝臟、腎臟或其他組織。

採樣時間為測試物到達標靶組織中最大濃度所需的時間，或是測試物誘導 DNA 鏈斷裂的時間點，採樣時間點可以參考測試物的藥物動力學資料，若無藥物動力學資料，則建議採樣時間點可以在最後一次給藥後的 2 小時至 6 小時；若是單次給藥則建議可在給藥後的 2 小時至 6 小時或是 16 小時至 26 小時。另外應清楚說明標靶組織選擇的理由及合理性。

結果判定應描述各個劑量組別的毒性大小、尾 DNA 百分率(% tail DNA)、尾長或尾距。除了遺傳毒性外，標靶組織毒性也可導致 DNA 遷移增加，因此結果分析時需區分遺傳毒性和細胞毒性。另外可透過組織病理學變化來對照細胞毒性，如發炎反應、細胞浸潤、凋亡或壞死性變化與 DNA 遷移增加有關，血液生化學指標的改變（如 AST、ALT 等）也可提供細胞毒性的資訊。測試物所誘發的尾 DNA 百分率與同期陰性對照組相比至少一個劑量組顯著升高、升高具有劑量依賴性，且在陰性對照範圍之外，可判定為陽性結果。如果結果不是明確的陽性或陰性，或者為了確定陽性結果的生物學意義，應進行進一步的研究，像是分析更多的細胞，或者採用優化的試驗條件進行重複試驗（如改變試驗劑量間距、其他給藥途徑、其他採樣時間或其他組織）。對於陰性結果，需提供支援靶組織暴露或毒性的直接或間接證據。若評估陽性或可疑結果的生物學意義，需提供靶組織細胞毒性資訊。

(四) 基因毒性替代測試方法使用性建議

基因毒性試驗目的在於檢測試驗物是否會引起基因突變、染色體結構畸變或是染色體數目性畸變，試驗方法的方法為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及使用齧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的試驗來取代。基因毒性的測試指引選擇主要是根據法規對於測試物質的要求，而目前我國既有化學物質標準登錄資料撰寫指引中建議可使用細菌回復突變試驗（OECD TG 471）、體外哺乳動物染色體異常試驗（OECD TG 473）、體外哺乳動物細胞基因突變試驗（OECD TG 476）、體外哺乳動物微核試驗（OECD TG 487）及體外哺乳動物細胞基因突變試驗（OECD TG 490），相關方法比較請參考表 3.2-28。基於動物福祉考量，因此建議登錄者若無特殊目的時，應先考量使用細菌基因突變分析、體外哺乳類細胞基因毒性分析，若前述兩類試驗結果皆為基因毒性陰性，則無須再進行動物實驗，反之則必須進行動物實驗來評估基因毒性的可能性。

表 3.2-28 基因毒性替代測試方法

	體內基因毒性試驗替代測試方法		
試驗方法	哺乳動物紅血球微核試驗 (OECD TG 474)	哺乳動物骨髓染色體異常試驗 (OECD TG 475)	體內試驗:鹼性彗星試驗分析 (OECD TG 489)
目的	以微核試驗觀察基因毒性	以檢測骨髓染色體以觀察 基因毒性	檢測真核細胞 DNA 鏈斷裂以 觀察基因毒性
起始劑量選定 試驗	最高容許劑量可引發骨髓 毒性或其他明顯之毒性 症狀	最高容許劑量可引發骨髓毒性 或其他明顯之毒性症狀	最高劑量可根據相關毒性試驗 或是預試驗的結果而決定，可 採用最大耐受量、最大給藥 量、最大暴露量或限度劑量為 最高劑量。
劑量	三個以上劑量組	三個以上劑量組	三個以上劑量組
單次試驗的使 用動物數量	每個劑量應使用至少 10 隻，最少三個劑量 (30)	45	25
得到資訊	特定化學品之基因毒性陽性或陰性		

七、非脊椎動物之短期毒性

(一) 非脊椎動物之短期毒性的發展

根據既有化學物質標準登錄資料撰寫指引第一版，目前蚤類急性活動抑制試驗 (OECD TG 202) 為生態毒理資訊當中，非脊椎動物之短期毒性類別的建議測試規範。在此類別關於化學物質毒性測試的適用性建議如下，若化學物質難溶於水（例如水中溶解度小於 1 mg/L），且不適用前述豁免原則時，除本項非脊椎動物之短期毒性資訊之外，中央主管機關得視其必要性要求繳交「非脊椎動物（如水蚤）之長期毒性」相關資訊。

以水生生物毒性試驗來說，水蚤是水中生態系最為底層的消費者。將水蚤暴露在試驗物質中後，觀察是否會對其產生活動抑制或死亡，因此水蚤常被用為測試物質毒性的靜水式試驗物種之一，經研究顯示水蚤對苯胺類的敏感性均高於其他測試物種，故其認為是敏感性很高的物種，因此檢測化學物質對水蚤的影響相當重要，在化學品的環境風險評估過程中，水蚤被用於評估水生毒性。

(二) 非脊椎動物之短期毒性替代測試方法

1. 蚤類急性活動抑制試驗 (OECD TG 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test)

蚤類急性活動抑制試驗分析化學物質是否會對水蚤產生活動抑制或死亡，並求得半致效濃度（ EC_{50} ）或無效應濃度（NOEC），以評估試驗物質對水蚤之毒性。

此試驗使水蚤暴露於至少 5 種濃度觀察其活動抑制狀況，測試的最高濃度最好能達到 100% 的活動抑制，而測試的最低濃度最好不會產生可觀察到的影響，而暴露設置建議為每個濃度使用 5 隻水蚤，每隻動物提供至少 2 毫升的測試溶液（即每個測試容器 5 只水蚤的體積為 10 毫升），並使用四重複。而隨後持續暴露於化學物質 48 小時，在測試開始後 24 和 48 小時檢查每個測試容器是否有活動抑制的水蚤及任何異常行為或外觀。在顯微鏡下觀察記錄，將在 24 小時和 48 小時活動抑制的百分比與測試濃度作圖，並通過適當的統計方法（例如概率分析等）分析數據以計算曲線的斜率和具有 95% 信賴區間的 EC_{50} ($p = 0.95$)。此測試項目的豁免原則為不會發生水生毒性的物質，例如：(1) 水中溶解度小於 1 mg/L，且可證明水溶解度極限下水生毒性不太可能發生的物質或無法穿透生物膜的物質。(2) 已有「非脊椎動物（如水蚤）之長期毒性」資訊。

根據 GHS 第 8 版當中水環境之危害物質之規範將物質分類， $L(E)C_{50} \leq 1$ mg/L，即分類為急毒性第一類物質；當 1 mg/L $< L(E)C_{50} \leq 10$ mg/L，分類為急毒性第二類物質； 10 mg/L $< L(E)C_{50} \leq 100$ mg/L，即分類為急毒性第三類物質。

(三) 非脊椎動物之短期毒性替代測試方法使用性建議

在生態毒理資訊當中，對非脊椎動物之短期毒性是每一級物質都須提供的測試項目資料，目前我國既有化學物質標準登錄資料撰寫指引中建議可使用蚤類急性活動抑制試驗（OECD TG 202）來獲取半致效應濃度（ EC_{50} ）或無效應濃度（NOEC），並據以進行全球化學品統一分類和標示制度的急毒性分類。在生態毒理資訊當中，對非脊椎動物的短期毒性之類別，蚤類急性活動抑制試驗是國際間認可且行之有年的替代方法，在實驗過程中沒有違反動物福祉之疑慮。因此建議主管機關可藉由蚤類急性活動抑制試驗所得之 EC_{50} 進行化學品登錄和急毒性分類。

八、對水生藻類及藍綠藻的毒性之替代測試方法

(一) 水生藻類及藍綠藻毒性的發展

以水生生物毒性試驗來說，藻類為自然水域的初級生產者，是浮游動物、貝類的營養來源，而藻類的數量會直接影響水環境生態及基礎生產力，因此檢測化學物質對藻類的影響相當重要，在化學品的環境風險評估過程中，藻類被用於評估水生毒性。藻類生長抑制試驗（OECD TG 201）是以傳統搖瓶作為測試之容器，近年來許多研究致力於改善此方法，轉而開發更省時省力的微量多孔盤測試。根據既有化學物質標準登錄資料撰寫指引第一版，目前藻類生長抑制試驗（OECD TG 201）為生態毒理資訊當中，水生藻類及藍綠藻的毒性類別之建議測試規範。

(二) 水生藻類及藍綠藻毒性替代測試方法

1. 藻類生長抑制試驗（OECD TG 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test）

藻類生長抑制試驗分析化學物質是否會抑制藻類的生長狀況，並求得半致效濃度（EC₅₀）或無效應濃度（NOEC），以評估試驗物質對藻類之毒性。此試驗使藻類暴露於至少 5 種濃度以觀察其生長狀況，濃度最好制定在導致生長速度抑制 5%至 75%的範圍內，由於暴露物質之後藻類會呈指數型生長，為了使生長之後還能保有足夠養分生存，一開始藻類的生物量（biomass）無需太多，以羊角月牙藻為例，建議起始生物量為 5×10^3 - 10^4 cell/ml，而隨後持續暴露於化學物質 72 小時，每天測定搖瓶（flask）中的藻類生物量。

計算生物量時，可以使用移液器移除少許的量，並在顯微鏡下手動計算，或是用電子顆粒計數器、螢光分析儀測其螢光值等方法得到生物量，最後由各不同濃度及空白試驗之重複平均值，利用線性內插法（linear interpolation method），計算效應濃度。極限測試是採用 100 mg/L 濃度去做測試，在此試驗當中測試終點為生長抑制，並且採用特定生長率的平均值和產量作為效應濃度參數，特定生長率的平均值是根據測試期間生物量的對數增長計算得出的，每濃度組別以每日的

生長率取平均，而產量是測試結束時的生物量減起始生物量。整個實驗會得到效應濃度（EC_x）、無效應濃度（NOEC）與最低觀察到效應濃度（LOEC）。

根據 GHS 第 8 版當中水環境之危害物質之規範將化學物質分類，可獲得慢毒性數據且不易快速降解之物質，於魚類長期毒性試驗中獲得的 NOEC 或 EC_x 小於或等於 0.1 mg/L，即分類為慢毒性第一類物質，當 NOEC 或 EC_x 小於或等於 1 mg/L，分類為慢毒性第二類物質。

而可獲得慢毒性數據且容易降解之化學物質，於試驗中獲得的 NOEC 或 EC_x 小於或等於 0.01 mg/L，即分類為慢毒性第一類物質，NOEC 或 EC_x 小於或等於 0.1 mg/L，即分類為慢毒性第二類物質，當 NOEC 或 EC_x 小於或等於 1 mg/L，分類為慢毒性第三類物質；若物質沒有足夠慢毒性數據之物質，則依據其急毒性試驗之結果判定物質毒性。

而具備以下條件之難溶物質，可直接歸類為慢毒性第四級物質，包括達物質水溶解度之下未顯示具急毒性、不能快速降解、 $\log K_{ow} \geq 4$ 、顯示其具生物蓄積潛力等，除非有其他科學證據顯示此物質不須被歸類。

（三）水生藻類及藍綠藻毒性替代測試方法使用性建議

目前我國既有化學物質標準登錄資料撰寫指引中建議可使用藻類生長抑制試驗（OECD TG 201）來獲取半致效濃度（EC₅₀）或無效應濃度（NOEC），並據以進行全球化學品統一分類和標示制度的急毒性分類。在生態毒理資訊當中，對水生藻類及藍綠藻的毒性的類別，在實驗過程中，並沒有使用動物來進行測試，故無動物福祉之疑慮。另外近年為負荷測試大量化學物質之需求，微量多孔盤測試方法的開發，結合科技趨勢，使得評估物質的過程更加便利，因此建議主管機關可藉由藻類生長抑制試驗所得 EC₅₀ 進行化學品登錄和急毒性分類，並且可考量接受使用微量多孔盤測試方法以提高測試效率。

九、非脊椎動物之長期毒性之替代測試方法

(一) 非脊椎動物長期毒性的發展

Daphnia magna 生殖試驗由水蚤急毒性試驗 (OECD TG 202) 發展而來，認知到生態毒理於慢性毒性資料的不足，OECD 成員與國際標準組織 (ISO) 自 1984 年著手進行開發設計水蚤慢毒性試驗、驗證及標準化研究。目的是建立無脊椎動物慢性亞致死 (多代) 繁殖測試，評估工業上持續排放的廢水及其衍生物代謝物是否對環境中生物體帶來長期慢性的不良影響 (OECD 2004)。*Daphnia magna* 生殖試驗於 1984 年第一次發表，分別於 1998 與 2012 年修改，修改內容為確定試驗時間長度為 21 天、確定實驗動物品種為 *Daphnia magna*、縮減實驗過程動物使用量及增加識別後代性別的程序。根據 1984 年 OECD 所公告之實驗操作版本，單次操作 *Daphnia magna* 生殖試驗會需要約 240 隻水蚤，隨後 1998 與 2012 年所公告之修訂版本，則降低動物使用量，單次僅需 60 至 120 隻水蚤，達到 3Rs 原則中，減少實驗動物使用量之目的。

(二) 非脊椎動物長期毒性之替代測試方法

1. *Daphnia magna* 生殖試驗 (OECD TG 211: *Daphnia magna* Reproduction Test)

水蚤為水中生態系最底層的消費者。*Daphnia magna* 生殖試驗將年齡小於 24 小時的雌性水蚤暴露於試驗物質，觀察是否會對水蚤產生活動抑制或死亡，並求得半致效濃度 (EC₅₀) 或未觀察到效應濃度 (NOEC)，以評估物質對水蚤之毒性。暴露為期 21 天，本試驗至少使用五種濃度進行，根據化學物質於水蚤急毒性試驗的毒性結果，或參考文獻，選擇適合進行實驗的濃度範圍，若是沒有相關急毒性文獻，以初次最高劑量以 10 mg/L 進行物質的濃度範圍尋找試驗，以靜態系統 (semi-static) 測試時，每濃度至少設置 10 隻單獨飼養的水蚤，或以動態系統 (flow-through) 測試時，每濃度應至少設置 20 隻水蚤。

Daphnia magna 生殖試驗所獲得之實驗數據，根據 GHS 第 8 版當中水環境之危害物質之規範將物質分類，可獲得慢毒性數據且不易

快速降解之物質，於 *Daphnia magna* 生殖試驗中獲得的 NOEC 或 ECx 小於或等於 0.1 mg/L，即分類為慢毒性第一類物質，當 NOEC 或 ECx 小於或等於 1 mg/L，分類為慢毒性第二類物質；可獲得慢毒性數據且容易降解之物質，於試驗中獲得的 NOEC 或 ECx 小於或等於 0.01 mg/L，即分類為慢毒性第一類物質，NOEC 或 ECx 小於或等於 0.1 mg/L，即分類為慢毒性第二類物質，而當 NOEC 或 ECx 小於或等於 1 mg/L，分類為慢毒性第三類物質；若物質沒有足夠慢毒性數據之物質，則依據其急毒性試驗之結果判定物質毒性，而具備以下條件之難溶物質，可直接歸類為慢毒性第四級物質，包括達物質水溶解度之下未顯示具急毒性、不能快速降解、 $\log K_{ow} \geq 4$ 、顯示其具生物蓄積潛力等，除非有其他科學證據顯示此物質不須被歸類。

（三）非脊椎動物長期毒性之替代測試方法使用性建議

近年來基於動物福祉的議題，在水環境危害物質之慢毒性分類上，可以使用非脊椎動物之結果填補脊椎動物試驗數據之不足。目前我國既有化學物質標準登錄資料撰寫指引中建議可使用 *Daphnia magna* 生殖試驗(OECD TG 211)來獲取半數效應濃度(EC₅₀)或無效應濃度(NOEC)，並據以進行全球化學品統一分類和標示制度的水生生物慢毒性分類，以這樣的測試方法可以在替代的原則上滿足化學物質的登錄需求，因此建議主管機關當面臨生態毒理之慢性毒性資訊匱乏的情形之下，可優先考量使用 *Daphnia magna* 生殖試驗來進行推估。

十一、魚類長期毒性之替代測試方法

（一）魚類長期毒性的發展

急性水生毒性試驗為歐盟化學品法規中基本要求的測試項目，而慢性水生毒性試驗則根據具體情況判定是否需要進行，當急毒性結果表明物質存在風險時，或預計會長期接觸該化學品等情形，即被認為需要物質的慢毒性試驗數據。目前在魚類長期毒性須結合魚類生命週期所有階段的測試才能準確估計化學品對魚類長期慢性毒性的影響，若是缺少其中一項生命階段可能使試驗結果的敏感度降低，進而導致低估慢毒性的影響。根據既有化學物質標準登錄資料撰寫指引第一版，

第三級及第四級的化學物質資料登錄中需附上魚類長期毒性的毒理資訊。於撰寫指引當中建議可用於評估魚類長期毒性的試驗為：魚類早期毒性試驗（OECD TG 210）、魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗（OECD TG 212）及魚類幼魚成長試驗（OECD TG 215）。魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗（OECD TG 212）為替代試驗，此試驗結果能夠作為範圍尋找試驗濃度的參考，減少實驗動物的使用量，但無法完全替代魚類早期毒性試驗（OECD TG 210）。

以下簡易說明魚類長期毒性之標準測試方法，包含：魚類幼魚成長試驗（OECD TG 205: Fish, Juvenile Growth Test）和魚類早期毒性試驗（OECD TG 210: Fish, Early-Life Stage Toxicity Test）

魚類為水生生態系的脊椎動物，而魚類的生長階段分為胚胎發育期（胚胎、卵黃囊吸收階段）、稚魚期、幼魚期及成魚期，成魚定義為魚類已完成發育至性成熟之階段。而魚類幼魚成長試驗（OECD TG 205）為評估慢性毒性最常使用之試驗，從稚魚階段開始進行，以斑馬魚（*Danio rerio*）為例，此試驗開始前 24 小時前事先禁食，於試驗之前先麻醉斑馬魚，並秤重紀錄，以便按照魚的體重分配飼食的量，體重介於 0.05 至 0.1 克的魚放入測試缸暴露，至少使用五種濃度進行試驗，將魚暴露一系列亞致死濃度，每日定期觀察魚的不良健康反應與存活狀況直到暴露終止，實驗結束時，再度麻醉魚隻並秤重紀錄，建議的暴露時間為至少 28 天以上，可以視實驗設計調整試驗長度，並根據結果推估效應濃度（EC_x）、未觀察到效應濃度（NOEC）及最低觀察到無效應濃度（LOEC），以評估物質對魚類之毒性（OECD 2000）。

針對魚類早期毒性試驗（OECD TG 210），其為觀察化學物質對於魚類胚胎到稚魚階段的影響，觀察其致死與亞致死的反應，不過此測試時間長度根據物種不同而有所差異。以斑馬魚為例，測試時間為胚胎受精後直至胚胎孵化第 30 天結束，此試驗將已受精之胚胎放入測試缸中的孵化杯進行暴露，於第 5 天後小心移除孵化杯，繼續暴露直至實驗結束，前 5 天每日定期觀察兩次紀錄死亡情況，當胚胎孵化後，每日定期觀察一次存活及生長狀況，試驗結束測量魚的體長、濕重及乾重，推估兩個測試終點（孵化後存活率、孵化後生長狀況）10%效

應濃度 (EC_{10})、最低觀察到效應濃度 (LOEC) 及未觀察到效應濃度 (NOEC)。文獻指出，魚類早期階段測試雖然是測試部分生命階段之試驗，但若不需要魚類其他機制或代謝數據，僅用於確定化學物質毒性之目的，此試驗最低觀察效應濃度 (LOEC) 為魚類所有生命階段試驗最為敏感的，依此用途可視為評估魚類長期慢性毒性之替代測試。

相較於魚類早期毒性試驗 (OECD TG 210) 及魚類幼魚成長試驗 (OECD TG 215)，魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗 (OECD TG 212) 用年齡較小之魚類，暴露階段為整個胚胎時期，此胚胎時期感覺器官尚未發展完全，因此不會感知到實驗中之痛苦。因此在進行測試魚類慢性毒性時，應考量使用叫為符合動物福利之替代測試方法，如：魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗 (OECD TG 212)。

(二) 魚類長期毒性替代測試方法

1. 基於現有數據和外推方法避免慢性魚類檢測的選擇

近年來，EURL ECVAM 欲探索物種間外推法與急性-慢性關係是否可用於支持豁免慢性魚類試驗，自各種數據庫中收集水蚤和魚類的急性及慢性毒性數據，並在考慮到不同作用模式的情況下對其進行分析，以確定兩種方式之間的關係，而該研究證實，特定水生毒性數據可用於評估慢性魚類毒性的可能性，建議以無脊椎動物（水蚤）數據進行物種間外推，從現有魚類急毒性數據進行急性外推到慢性毒性，而無需進行額外的魚類試驗。

比較化學物質在魚類早期毒性試驗、慢性水蚤繁殖試驗及藻類生長抑制試驗的結果，90.5%物質之結果都有達到良好的相關性，當中僅有 9.5%的特定作用機制物質在魚類早期毒性試驗的毒性結果敏感度高於其他試驗十倍，而這些物質為內分泌干擾物或非麻醉性化學物質。可以透過結合替代測試的使用，先使用魚類胚胎毒性試驗作為物質毒性範圍篩選，減少魚類早期毒性試驗當中動物使用量；或是只針對這些特定作用機制之物質，優先考慮採用魚類早期毒性試驗，其他大多數物質則使用慢性水蚤繁殖試驗及藻類生長抑制試驗的結果推估毒性 (Teixidó et al. 2020)。

2. 魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗 (OECD TG 212: Fish Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages)

魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗觀察化學品在整個胚胎發育階段的影響，由於整個試驗過程中是不餵食的，基於保護動物福祉，此實驗在魚類發育至卵黃囊完全吸收之後馬上終止，觀察其致死與亞致死的反應。同樣以斑馬魚為例，整個實驗從胚胎受精後至卵黃囊吸收需要大約 13 天，每天至少觀察一次並記錄孵化數和存活數，至少使用五種濃度進行實驗，參考魚類急毒性試驗 (OECD TG 203) 的 96h LC₅₀ 及文獻結果，選擇合適的試驗濃度範圍，或以初次試驗最高濃度不超過 100 mg/L 為原則 (OECD 1998)。然而魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗 (OECD TG 212) 不能替代魚類早期毒性試驗 (OECD TG 210)，但可以作為致死和亞致死試驗之間橋樑，其毒性結果可能有助於早期毒性試驗選擇測試濃度範圍，達到動物減量的效果。

根據 GHS 第 8 版當中水環境之危害物質之規範將物質分類，可獲得慢毒性數據且不易快速降解之物質，於魚類長期毒性試驗中獲得的 NOEC 或 ECx 小於或等於 0.1 mg/L，即分類為慢毒性第一類物質，當 NOEC 或 ECx 小於或等於 1 mg/L，分類為慢毒性第二類物質；可獲得慢毒性數據且容易降解之物質，於試驗中獲得的 NOEC 或 ECx 小於或等於 0.01 mg/L，即分類為慢毒性第一類物質，NOEC 或 ECx 小於或等於 0.1 mg/L，即分類為慢毒性第二類物質，而當 NOEC 或 ECx 小於或等於 1 mg/L，分類為慢毒性第三類物質；若物質沒有足夠慢毒性數據之物質，則依據其急毒性試驗之結果判定物質毒性；而具備以下條件之難溶物質，可直接歸類為慢毒性第四級物質，包括達物質水溶解度之下未顯示具急毒性、不能快速降解、 $\log K_{ow} \geq 4$ 、顯示其具生物蓄積潛力等，除非有其他科學證據顯示此物質不須被歸類。

(三) 魚類長期毒性替代測試方法使用性建議

目前在我國，水環境之危害物質於慢毒性之分類，皆參考物質在

急毒性試驗所獲得之數據結果作為分類依據，建議以無脊椎動物（水蚤）數據進行物種間外推，從現有魚類急毒性數據進行急性外推到慢性毒性，而無需進行額外的魚類試驗。

由於魚類為脊椎動物，相對其餘水生環境中生物，作為實驗動物存在道德爭議，魚類早期毒性試驗為最常用於評估化學物質之試驗，不過需要使用大量成魚，若經考量之後仍需進行動物試驗，建議使用幼魚成長試驗與胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗（OECD TG 212），使用年齡較小之魚類，感覺器官尚未發展完全，相較起來較不會感知到實驗當中所遇到之痛苦。透過以上方式能在達到減少動物使用，並且減少動物痛苦的前提下完成資訊的填補。

目前已研析急毒理替代測試方法使用原則，包含：毒性：吞食、急毒性：吸入、皮膚刺激性／腐蝕性、眼睛刺激性、皮膚過敏性、基因毒性，以及生態毒理之替代測試方法使用原則，包含：非脊椎動物之短期毒性、對水生藻類及藍綠藻的毒性、非脊椎動物之長期毒性、魚類之長期毒性，並依序提出毒理及生態毒理資訊之替代測試方法使用性原則建議，主管機關可考量我國之國情、替代測試方法之測試量能、特定測試方法之替代傳統測試方法之效力參酌開放及建議登錄者。

3.2.4 優先採納之替代測試方法清單

不同的替代測試方法其確效性及不同組織或國家中的認可程度上皆有不同，故我國替代測試方法的推動上，應優先考量不同國家的採納的現況，除此之外，化粧品領域已行之有年的替代測試方法也較尚未運行的替代測試方法有更多的數據及依據，應以為借鏡，延續過往的工作持續更新與彙整優先採納的替代測試方法。表 3.2-29 及表 3.2-30 彙整各國重要監管機構所接受的替代測試方法，其中 3T3 中性紅細胞毒性試驗（急毒性）、細胞傳感器微生理計體外試驗方法（眼睛刺激性）、BALB/c 3T3 細胞轉化體外試驗（致癌性）皆經由 ECVAM 確認其確效性，EPA 亦採納為替代測試方法，因此我國可持續關注後續國際發展及考量採納。

表 3.2-29 國際認可之毒理資訊項目替代測試方法總表

毒理資訊項目	測試方法名稱	國際監管認可文件 ^{註1}	國際替代測試方法合作組織認可用於化粧品 ^{註2}	美國環保署認可接受 ^{註3}	由歐盟參考實驗室替代方法確效中心認可 ^{註4}	由歐洲化學總署認可採用	既有化學物質標準登錄資料撰寫指引建議之測試規範（行政院環境保護署 2020）（第一版）
急毒性：吞食、吸入、皮膚	體外皮膚吸收試驗（Skin Absorption: <i>in vitro</i> Method）	OECD TG 428 (2004)		✓			
	3T3 中性紅細胞毒性試驗（3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity assay）	TM2007-03 (EU)		✓	✓		
皮膚刺激性/腐蝕性	體外皮膚腐蝕：透皮電阻試驗（ <i>In Vitro</i> Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance Test Method, TER）	OECD TG 430 (2015)	✓	✓	✓	✓	✓
	體外皮膚腐蝕人體皮膚模型試驗（ <i>In vitro</i> skin corrosion reconstructed human epidermis (RHE) test method）	OECD TG 431 (2019)	✓	✓	✓	✓	✓
	皮膚腐蝕：體外膜阻隔試驗法（ <i>In Vitro</i> Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion）	OECD TG 435 (2015)	✓	✓	✓	✓	✓
	體外皮膚刺激重組人表皮試驗（ <i>In Vitro</i> Skin Irritation Reconstructed Human Epidermis Test）	OECD TG 439 (2020)	✓	✓		✓	✓
眼睛刺激性	牛角膜混濁和通透性試驗（Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method）	OECD TG 437 (2020)	✓	✓	✓	✓	✓
	離體雞眼試驗（Isolated Chicken Eye Test Method）	OECD TG 438 (2018)	✓	✓	✓	✓	✓
	螢光素滲漏測試方法：鑑別眼睛腐蝕與嚴重刺激物（Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants）	OECD TG 460 (2017)	✓	✓		✓	✓
	(1) 誘導嚴重眼部損傷的化學物質 (2) 不需要分類至眼刺激或嚴重眼部損傷的化學物質之體外短期暴露試驗方法（Short Time Exposure <i>In Vitro</i> Test Method for Identifying (1) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and (2) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage）	OECD TG 491 (2020)		✓		✓	✓
	重建人類角膜樣上皮細胞（RhCE）檢測方法，用於識別不需要分類和標記為眼睛刺激或嚴重眼睛損傷的化學品（Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage）	OECD TG 492 (2019)		✓		✓	✓

毒理資訊項目	測試方法名稱	國際監管認可文件 ^{註1}	國際替代測試方法合作組織認可用於化粧品 ^{註2}	美國環保署認可接受 ^{註3}	由歐盟參考實驗室替代方法確效中心認可 ^{註4}	由歐洲化學總署認可採用	既有化學物質標準登錄資料撰寫指引建議之測試規範（行政院環境保護署 2020）（第一版）
	Vitrigel 膠原膜眼刺激檢測方法，用於識別不需要分類和標記為眼睛刺激或嚴重眼睛損傷的化學品（Vitrigel-Eye Irritancy Test Method for Identifying Chemicals not requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage）	OECD TG 494 (2019)		✓			
	高分子檢測方法，用於識別誘發嚴重眼部危害，及不需要分類為眼睛刺激或嚴重眼睛損傷的化學品（ <i>In Vitro</i> Macromolecular Test Method for Identifying Chemicals Inducing Serious Eye Damage and Chemicals Not Requiring Classification for Eye）	OECD TG 496 (2019)		✓			
	眼睛刺激性（Ocular Irritation）	TM2006-02 (EU)		✓			
	細胞傳感器微生理計體外試驗方法（Cytosensor Microphysiometer Test Method）	ICCVAM Eye Irritation Test (2010)		✓	✓		
皮膚過敏性	化學皮膚過敏：直接肽反應性分析（ <i>In Chemico</i> Skin Sensitisation: Direct Peptide Reactivity Assay, DPRA）	OECD TG 442C (2020)		✓	✓	✓	✓
	皮膚過敏體外試驗：ARE-Nrf2 螢光酶測試法（ <i>In Vitro</i> Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method）	OECD TG 442D (2018)		✓	✓	✓	✓
	皮膚過敏體外試驗：人類細胞株活化試驗（ <i>In Vitro</i> Skin Sensitisation Human cell Line Activation Test(h-CLAT)）	OECD TG 442E (2018)		✓	✓	✓	✓
	體內皮膚過敏性：局部淋巴結試驗（Skin Sensitization Local Lymph Node Assay）	OECD TG 429 (2010)		✓ (IATA)			✓
	皮膚過敏性的定義方法（Defined Approaches for Skin Sensitisation）	OECD TG 497 (2021)					
基因毒性	體外哺乳動物微核試驗（ <i>In Vitro</i> Mammalian Cell Micronucleus Test）	OECD TG 487 (2016)	✓	✓	✓	✓	✓
	體內試驗：鹼性彗星試驗分析（ <i>In Vivo</i> Mammalian Alkaline Comet Assay）	OECD TG 489 (2016)		✓	✓	✓	✓
	細菌回復突變試驗（Bacterial Reverse Mutation Test）	OECD TG 471 (2020)		✓		✓	✓
	體外哺乳動物染色體異常試驗（ <i>In Vitro</i> Mammalian Chromosomal Aberration Test）	OECD TG 473 (2016)		✓		✓	✓
	體外哺乳動物細胞基因突變試驗（ <i>In Vitro</i> Mammalian Cell Gene	OECD TG 476 (1997)		✓		✓	✓

整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試應用支援計畫

毒理資訊項目	測試方法名稱	國際監管認可文件 ^{註1}	國際替代測試方法合作組織認可用於化粧品 ^{註2}	美國環保署認可接受 ^{註3}	由歐盟參考實驗室替代方法確效中心認可 ^{註4}	由歐洲化學總署認可採用	既有化學物質標準登錄資料撰寫指引建議之測試規範（行政院環境保護署 2020）（第一版）
	Mutation Tests using the Hprt and xprt genes)						
	利用胸腺嘧啶核苷激酶基因進行體外哺乳動物細胞基因突變試驗 (<i>In Vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene)	OECD TG 490 (2016)		✓		✓	✓
生殖發育性	檢測雌激素受體活化劑和拮抗劑的穩定轉染轉錄活性體外試驗的測試準則 (Performance-based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation <i>in vitro</i> Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists)	OECD TG 455 (2016)	✓	✓			
	H295R 類固醇合成試驗 (H295R Steroidogenesis Assay)	OECD TG 456 (2011)		✓			
	穩定轉染人類雄激素受體轉錄活性試驗：用於檢測化學品對雄激素之活化劑和拮抗劑活性 (Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity)	OECD TG 458 (2020)		✓			
	檢測有結合親合力化學物的人類重組雌激素受體體外試驗的測試準則 (Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) <i>in vitro</i> Assays to detect chemicals with ER binding affinity)	OECD TG 493 (2015)		✓			
	內分泌干擾物篩檢計畫測試指南：芳香酶（人類重組） Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines: Aromatase (Human Recombinant)	OPPTS 890.1200 (2009)		✓			
致癌性	體外 BALB/c 3T3 細胞轉化試驗 (<i>In vitro</i> BALB/c 3T3 Cell Transformation Assay)	TM2004-07 (EU)		✓	✓		

參考資料：

1. Zuang V, Dura A, Asturiol Bofill D. 2019. EURL ECVAM status report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods and approaches. Publications office of the European Union, Luxembourg. 網頁：
https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC119292/eurl_ecvam_status_report_2019_online_1.pdf
2. ICCR Inventory of Alternatives to Animal Test Methods. 2013. 網頁：
https://www.iccr-cosmetics.org/files/5214/0475/4553/2013-11_ICCR_Inventory_of_Alternatives_to_Animal_Test_Methods_-_Overview.pdf
3. Alternative Methods Accepted by US Agencies. 2020. 網頁：
<https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/accept-methods/index.html>
4. EURL ECVAM Validated Test Methods. 網頁：
<https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/ecvam/alternative-methods-toxicity-testing/validated-test-methods>

表 3.2-30 國際認可之生態毒理項目替代測試方法總表

生態毒理項目	測試方法名稱	國際監管認可文件 ^{註1}	國際替代測試方法合作組織認可用於化粧品 ^{註2}	美國環保署認可接受 ^{註3}	由歐洲化學總署認可採用	既有化學物質標準登錄資料撰寫指引建議之測試規範（第一版）
非脊椎動物之短期毒性	蚤類急性活動抑制試驗（Daphnia sp. Acute Immobilisation Test）	OECD TG 202 (2004)		✓		✓
	搖蚊急性活動抑制試驗（Chironomus sp. Acute Immobilisation test）	OECD TG 235 (2011)		✓		
非脊椎動物之長期毒性	Daphnia magna 生殖試驗（Daphnia magna Reproduction Test）	OECD TG 211 (2012)		✓	✓	✓
對水生藻類及藍綠藻的毒性	藻類生長抑制試驗（Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test）	OECD TG 201 (2011)		✓		✓
	浮萍物種生長抑制試驗（Lemna species Growth Inhibition Test） ¹	OECD TG 221 (2006)		✓		
	聚藻無沉積物毒性試驗（Sediment-free Myriophyllum spicatum Toxicity Test）	OECD TG 238 (2014)		✓		
	水體-沉積物中的聚藻毒性試驗（Water-Sediment Myriophyllum spicatum Toxicity Test）	OECD TG 239 (2014)		✓		
魚類之短期毒性	魚類胚胎急性毒性試驗（Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test）	OECD TG 236 (2013)		✓	✓ (IATA)	
	魚細胞株急性毒性：RTG ill-W1 鱒魚細胞株試驗（Fish Cell Line Acute Toxicity: The RTG ill-W1 cell line assay）	OECD TG 249 (2021)		✓		
魚類之長期毒性	魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗（Fish Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages）	OECD TG 212 (1998)		✓		✓
對土壤中 大生物體 （節肢動物 外）的毒性	蚯蚓急性毒性試驗（Earthworm Acute Toxicity test）	OECD TG 207 (1984)		✓		✓
	蚯蚓生殖試驗（Earthworm Reproduction Toxicity Test）	OECD TG 222 (2016)		✓		✓
底泥毒性	沉積物-水體搖蚊毒性試驗：沉積物加標法（Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment）	OECD TG 218 (2004)		✓		✓
	沉積物-水體搖蚊毒性試驗：水體加標法（Sediment-Water Chironomid Toxicity）	OECD TG 219 (2007)		✓		✓
	沉積物-水體中帶絲蚓毒性試驗：沉積物加標法（Sediment-Water Lumbriculus Toxicity）	OECD TG 225 (2007)		✓		✓
	沉積物-水體搖蚊生命週期毒性試驗（Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity）	OECD TG 233 (2010)		✓	✓	✓
生物蓄積： 水生生物/ 底泥	使用凍存鱒魚肝細胞的固有清除體外判定試驗（Determination of in vitro intrinsic clearance using rainbow trout hepatocytes）	OECD TG 319A (2018)		✓		
	體外利用虹鱒肝 S9 次級細胞分群測定固有清除率（Determination of in vitro intrinsic clearance using rainbow trout）	OECD TG 319B (2018)		✓		

參考資料：1. Zuang V, Dura A, Asturiol Bofill D. 2019. EURL ECVAM status report on the development, validation and regulatory acceptance of alternative methods and approaches. Publications office of the European Union, Luxembourg. 網頁：
https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC119292/eurl_ecvam_status_report_2019_online_1.pdf

2. ICCR Inventory of Alternatives to Animal Test Methods, 2013. 網頁：
https://www.iccr-cosmetics.org/files/5214/0475/4553/2013-11_ICCR_Inventory_of_Alternatives_to_Animal_Test_Methods_-_Overview.pdf

3. Alternative Methods Accepted by US Agencies. 2020. 網頁：<https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/accept-methods/index.html>

3.2.5 替代測試相關之指引修正建議研析

我國近年致力於發展及落實符合動物福祉的替代測試方法，於既有化學物質標準登錄資料撰寫指引第一版中，建議登錄人優先選擇符合動物福祉的替代測試方法，以避免不必要的脊椎動物測試。指引中明確羅列出建議可使用的替代測試方法，不過因全球仍持續發展替代測試方法相關科技，許多替代測試方法之適用性仍尚未明確，因此仍須持續追蹤替代測試方法的國際趨勢。除此之外，因替代測試方法往往單一數據無法完整替代傳統方法，需要數項資訊共同整併後，才能得出適當的結論及詮釋，且部分替代測試方法之替代效力和適用性範圍仍有知識缺口，需隨時更新國際上的最新發展。

目前已研擬我國優先採納替代測試方法清單，建議納入三項替代測試方法於登錄指引之建議測試方法中，包含：中性紅細胞毒性試驗、細胞傳感器微生物計體外試驗方法、BALB/c 3T3 細胞轉化體外試驗，以下說明建議納入之原因。

一、中性紅細胞毒性試驗（TM2007-03）

中性紅細胞毒性試驗為急毒性吞食之替代測試方法，中性紅細胞毒性試驗是藉由中性紅的染劑來檢測細胞的存活率，活細胞能主動運輸中性紅，並將染劑攝入於溶酶體當中，而死細胞無法攝入中性紅，故藉由偵測中性紅之訊號即可得知細胞活性。

目前已由 ECVAM 和 EPA 確認其確效性並採納作為替代測試方法，根據 NICEATM/EURL ECVAM 驗證研究的研究報告顯示，當與預測模型結合以區分潛在有毒與無毒(即分類與非分類)物質時，假陰性 5%，即靈敏度約為 95%，此測試中發現陰性物質可能不需要根據 $LD_{50} > 2,000 \text{ mg/kg}$ 的臨界值進行急性口服毒性分類，不過因中性紅細胞毒性試驗仍為細胞毒性試驗，故仍缺乏器官代謝能力，因此對於需要進行代謝誘導毒性的物質可能會被忽略，考量其限制性，中性紅細胞毒性試驗適合成為證據權重（WOE）或綜合測試策略中（ITS）的一環，與化學類似物、物化特性、結構警報、結構活性關係、毒理動力學等數據共同考量。中性紅細胞毒性試驗無法單獨完全取代動物口服急毒性試驗，但能做為證據權重的考量，可用於決定起始劑量來增加後續實驗的精準度，避免因劑量設計偏差而重複進行動物試驗。

二、細胞傳感器微生理計體外試驗方法（ICCVAM Eye Irritation Test）

細胞傳感器微生理計體外試驗方法是眼睛刺激性之替代測試方法，眼睛刺激性目前雖有體外測試方法，但實務上並不易執行，例如：牛角膜混濁和通透性試驗（OECD TG 437）難以找到牛眼來源，或是建人類角膜樣上皮檢測方法，用於識別不需要分類和標示為眼睛刺激或嚴重眼睛損傷的化學品（OECD TG 492）之 3D 細胞模型昂貴且難以取得。

細胞傳感器微生理計體外試驗方法是透過光定址電位感測器檢測活細胞群的酸化速率（pH），來測試化學品對於細胞代謝率的影響。在 ECVAM 回顧性驗證研究中，考量管理目的，建議同時合併眼睛刺激測試的由上而下（Top-down approach）分層策略。ICCVAM 建議將胞傳感器微生理計體外試驗方法應用於篩選測試當中，識別可能導致永久性或嚴重眼部損傷的水溶性物質。對於方法所述範圍的物質，還可用於識別不為潛在造成眼部傷害的化學品和產品。在美國，細胞傳感器微生理計體外試驗方法是第一種用於此目的的體外測試方法。綜合以上建議納入細胞傳感器微生理計體外試驗方法，可用於辨別導致嚴重眼部損傷的水溶性物質，並且可做為分層測試策略中的一環。

三、BALB/c 3T3 細胞轉化體外試驗 [TM2004-07 (EU)]

BALB/c 3T3 細胞轉化體外試驗為致癌性之替代測試方法。由於體外細胞轉化和體內致癌作用之間的生物學相似性，細胞轉化分析通常用於篩選化學物質的致癌可能性並研究其機制，BALB/c 3T3 細胞株已被證實能夠模擬體內致癌性的多個階段，並能夠表現正常細胞成癌化的多項特徵。

致癌性實驗常耗費大量時間、金錢及試驗動物。基於動物福祉的考量，BALB/c 3T3 細胞轉化體外試驗能夠減少動物使用。針對管理目的，該試驗能夠應用於危害辨識和風險評估的證據權重，也可做為致癌性的前驅試驗，具有部分替代的能力，故建議未來可考慮納入 BALB/c 3T3 細胞轉化體外試驗。

3.3 奈米物質毒理及生態毒理替代測試發展

3.3.1 奈米物質毒理替代測試方法發展現況

奈米產品在上市前必須提供安全評估的資訊，為因應奈米產品的大量增加及符合 3Rs 動物試驗原則，以替代測試來評估奈米物質的安全性並提升試驗本身的可靠性實為必要且急迫，由於各國對奈米物質定義不一致，導致奈米物質的管理及測試方法尚未被完整評估和統一，彙整我國、歐盟、美國及國際化標準組織(ISO)對奈米物質的定義如表 3.3-1。歐盟及美國近年不斷更新及制訂奈米安全法規（nanosafety regulations）及毒理替代測試方法，持續彙整及更新國際上奈米物質毒理及生態毒理替代測試方法發展趨勢和相關指引。

歐盟執委會於 2012 年資助「ITS-NANO」計畫，該計畫是優先排列出可以發展成奈米材料安全的智慧測試策略之研究，願景為發展出可以讓所有的利害關係人均可適應及接受的研究優先順序，證據權重（weight-of-evidence-based）的智慧型測試策略也納入所有可用於所關注之奈米材料的數據，並提供一種合理的測試策略以瞭解奈米材料的危害特性，而無需進行不當的動物實驗。

表 3.3-1 各國對於奈米物質定義之比較

法令	意圖製造	奈米尺度	結構要求	奈米占比	奈米特性要求
臺灣毒性化學物質管理法(新化學物質及既有化學物質資料登錄工具說明第一版)	是	1~100 nm	物質之內部或表面結構為奈米尺寸，含大於 100 nm 且保有奈米特性的聚集體（aggregates）和聚結體（agglomerates）	數量>50%	無
歐盟（2011/696/EU）	無	1~100 nm	物質一維以上是奈米尺度，含大於 100 nm 的聚集體和聚結體	數量>50%	無
美國 TSCA（section 8(a) of TSCA）	是	1~100 nm	常溫常壓下為固體的物質，其任一維為奈米尺度，不含大於 100 nm 的聚集體和聚結體	重量>1%	是
ISO（ISO/TS 80004-1, 2015）	無	1~100 nm	任何內部或外在維度為奈米尺寸	-	無

OECD 在 2016 年發布的替代測試報告指出，獨立的替代測試方法可能有助於奈米基本機轉或毒性知識，但不足以用於定量風險評估，研究人員可利用證據權重法中使用的一系列替代測試方法，整合成替代測試策略，幫助理解奈米物質在測試終點、受體和受體之間的人類及環境行為中所可能造成的毒性及效應。

歐洲消費者安全科學委員會（scientific committee on consumer safety, SCCS）於 2019 年 10 月提出奈米物質在化粧品中的安全性測試指南，報告指出對於奈米物質毒性的評估，目前沒有獨立的體外測試可以替代毒理學標準化體內試驗方法，但提出幾個可行的測試終點及替代方法正在研究評估中，這些替代方式均未經過專門針對奈米物質的驗證，但對奈米物質可能造成的危險仍具有參考價值。將替代測試方法應用在奈米物質需要考慮更多的因素，例如：(1) 體外方法是否適用於奈米物質可能受特定奈米相關特性的影響，聚集團聚及隨後的沉降、漂浮和其他變化會影響判讀結果；(2) 奈米物質也可能透過影響參數（如吸光度）來干擾常用的測定或螢光，因此對奈米物質進行體外測定的結果通常難以解釋；(3) 測試設計需選擇適當的暴露途徑（口服、皮膚或吸入）及適當劑量；(4) 暴露後要優先考慮使用目前已獲得許可的替代測試方法來評估可能產生的毒性或機轉（如細胞毒性、ROS、發炎、細胞因子誘導及局部遺傳毒性）；(5) 替代測試應用在奈米物質對基因毒性的測試上，須以哺乳動物細胞取代細菌，此乃因細菌原核生物無法對奈米進行內吞作用，將造成測試結果的誤判。故建議使用一種以上的特定測試終點來分析奈米物質的毒性，以避免使用該單獨測定方法所導致的任何局限性，同時使用適當的對照組以識別奈米物質對測定背景潛在的干擾。

評估奈米物質潛在全身吸收的風險時，應考慮奈米物質在物理化學特性方面的各種變化，如奈米物質在生物流體中的溶解行為會提供試驗重要的資訊（如奈米物質在口服和 / 或全身吸收後，有多少比例還保持完整的顆粒形式）；若奈米物質存在全身系統性吸收的潛力，則需要做系統性毒性調查，對於涉及系統效應的體外測試，需考慮奈米物質的動力學以做體外至體內外推（*in vitro to in vivo extrapolation*, IVIVE），例如吸收的相關攝取途徑、相關體液中的溶解速度、與蛋白質結合情形、蛋白質電暈形成（Protein corona formation）及分布等。亦可使用 3D 細胞培養模型或微流體模型，並將證據權重法合併使用以增加其確效性。故將來應建立一套整合型測試策略，發展與應用替代測試方法，整合體外替代測試、電腦模擬方法、數據豁免及證據權重法等以對奈米物質做毒性效應評估。

EUON 網站在使用非動物方法來評估奈米材料上也提到根據歐洲法律，必須盡可能使用非動物方法，並且只能在不得已時才能對動物進行測試，最終目標是完全替代對動物的測試；在美國，環境保護署（EPA）計畫到 2035 年消除所有哺乳動物研究的要求和資助。有鑒於此，EUON 建議可以採用分組和交叉參照以便對現有數據做最大限度地利用，例如根據不同的物理化學特性對奈米材料進行分組，分組和交叉參照便可以最大程度地利用現有數據來預測未知物質的影響，然後根據需要對奈米材料進行排名和優先級，以做進一步評估。此外全世界每年約有 100 萬隻動物用於吸入毒性測試，由於吸入是奈米進入動物或人體的主要途徑之一，呼吸道便可能既是奈米物質進入體內的途徑，又是奈米物質之標的組織，故可利用 OECD TG 412 和 OECD TG 413 來做奈米材料的亞急性和亞慢性研究；然而使用這些指南進行的每項研究都可能包括數百隻動物（主要是嚙齒動物），由於人類和嚙齒動物之間有生理和解剖學差異，這些測試無法準確預測人類對這些物質吸入的反應，因此需要進一步開發和使用基於人體的非動物方法，且該方法應考慮相關的暴露情景和作用機制，例如使用健康危害途徑（AOP）來預測複雜的人類反應。

研究學者可利用健康危害途徑來組織現存的各種資訊以便更好地理解化學物質（包括奈米材料）的作用機轉，藉由測量導致危害結果的關鍵事件（Key events）可以幫助學者設計基於非動物方法的替代測試策略。例如，OECD 正在審查一種可能導致肺纖維化的健康危害途徑，利用由 PETA 國際科學聯盟有限公司（PETA International Science Consortium Ltd.）提供贊助所開發的氣血屏障 EpiAlveolar™（MatTek Life Sciences）之 3D 人體共同培養模型來預測奈米材料導致肺纖維化的潛力；這個模型使用包括原代人類肺泡上皮細胞、肺內皮細胞、纖維母細胞和任選的肺泡巨噬細胞，它會成功地捕獲危害結局途徑中造成肺纖維化的相關機轉，目前歐盟 2020 計畫中的「用於現實奈米危害評估的生理錨定工具」(Physiologically Anchored Tools for Realistic Nanomaterial Hazard Assessment) 正在對其進行評估，以決定是否能用它來測試奈米材料。

經合組織人造奈米材料工作組（The OECD Working Party on Manufactured Nanomaterials, WPMN）在第 20 屆會議（2020 年 9 月）提及歐盟委員會 JRC（Joint Research Centre of the European Commission）發表了關於金、矽和銀奈米顆粒在 5 個不同細胞株（Caco-2、A549、CHO、V79 和 TK6）中的體外細胞毒性和細胞攝

取評估之技術報告（European Commission, Ispra, 2020, JRC120791.）；這是 OCED 測試指引計畫 4.95（the OECD Test Guidelines project 4.95）的第 2 份報告，其重點是評估奈米材料遺傳毒性潛力體外方法的可用性，包括 JRC 在內的國際合作夥伴關係旨在通過逐步方法使體外微核測試（OECD TG 487）適應奈米材料的特定測試要求，它著重於體外細胞毒性測試的評估和對某些代表性奈米材料的吸收，目前已在 5 種不同的細胞株中分析了 5 nm 金、30 nm 金、22 nm 矽、30 nm 檸檬酸鹽和 30 nm PVP 穩定的銀奈米顆粒，所有細胞株都證明了它們能夠內化吞噬被測試的 NMs 以及具有將它們存儲在體內中的能力，而其中只有奈米銀顆粒會依據對不同細胞株的敏感性而被誘導出不同程度的細胞毒性。

圖 3.3-1 為符合 3Rs 原則且具有成本效益的方法（Hung-Jin Huang 2021），奈米物質在替代測試上主要包括體外（*In vitro*）和計算機模擬方法（*In silico*），這些方法可用於克服醫學研究和奈米技術中的倫理問題。其中，細胞體外測試通常用於評估藥物和化學品的安全性和毒性，以取代動物測試，且體外測試能夠提供更快速、更便宜和有價值的資訊，幫助研究人員在最終應用之前評估新開發的奈米材料的潛在風險或可能的毒性。目前符合 3Rs 原則常用的體外測試包含有以細胞為基礎的體外試驗和組織工程學（Tissue engineering），而使用計算機模擬的方法包含有分子對接研究（molecular docking）、QSAR 和分子動力學模擬（molecular dynamics simulations）。

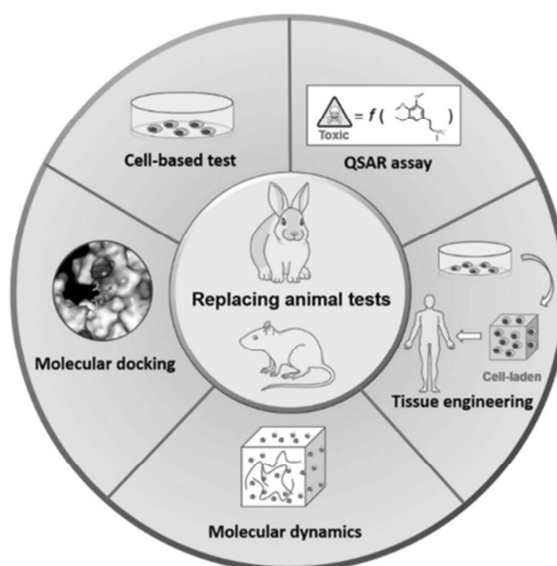


圖 3.3-1 替代或減少在奈米毒性評估中使用實驗動物的替代測試方法

以細胞為基礎的體外試驗方面，目前有多種幹細胞被用於毒性測試，例如纖維黏液瘤病源性幹細胞（fibromatosis-derived stem cells）、間質幹細胞（mesenchymal stem cells）、心臟幹細胞（cardiac stem cells）和胚胎幹細胞（embryonic stem cells）。人類胚胎幹細胞研究於 1998 年首次被報導，其具有分化成各種細胞類型的能力，因此人類幹細胞適合做為開發組織工程用的細胞來源。誘導多功能幹細胞（induced pluripotent stem cells, iPSC）是具備多能力分化的幹細胞，可直接從皮膚或血液中獲得，它可用來做為測試奈米物質安全的一種體外替代測試，例如，由 iPSCs 誘導的肝細胞樣細胞已被建議可做為研究奈米毒性的替代體外肝毒性模型；同樣，奈米氧化鋅的毒性也可以通過人類 iPSC 衍生的心肌細胞（hiPSC-CMs）進行研究，用於心臟安全性評估。因此，iPSC 不僅可以有效地應用於篩選新的生物材料/藥物，並且可用來研究細胞和組織層級與奈米物質交互作用期間其生理物理形態學可能的損傷和毒性機轉。使用 iPSC 所獲得的 3D 體外模型也可為奈米毒性評估和藥物篩選提供一個實際可行、依患者量身打造的試驗平臺。

組織工程學目前被用於開發 3D 細胞培養（3D culture），作為動物試驗毒性評估方法的替代方法。傳統的 2D 細胞培養（2D culture）最常用於研究生物過程、疾病機制、藥物開發和毒性測定，然而，2D culture 在模擬體內條件方面存在許多局限性，例如缺乏組織與組織的界面、存在天然屏障、缺氧梯度以及降低藥物擴散效率的緊密細胞與細胞的连接。而在 3D culture 條件下生長的細胞能夠模擬組織的自然條件，繼而克服 2D culture 系統的局限性（表 3.3-2）。例如以幾丁聚醣（chitosan，甲殼素、殼聚醣、幾丁酸）的材料模仿細胞外基質的理化特性而建構成一個 3D 骨架，為細胞黏附和生長提供合適的環境，此舉可以促進細胞的分化，技術的最終目的是能成功生產可用於評估奈米物質的 3D 組織或器官，最終取代動物測驗。但 3D culture 目前還沒有辦法完全取代 2D culture，原因列於表一中，2D 和 3D 細胞培養方法的優缺點比較。可以注意到的是，2D culture 細胞觀察和測量更容易，也比 3D 培養便宜。

電腦模型測試包含分子對接研究（molecular docking）、QSAR 和分子動力學模擬（molecular dynamics simulations）等。分子對接研究是一種計算模擬方法以及基於對 3D 結構化學-生物分子相互作用的評估，其本質是兩個或多個分子之間的

識別過程，涉及分子之間的空間匹配和能量匹配，簡單而言，分子對接方法可預測小分子（例如：藥物或奈米顆粒）與大生物分子（例如蛋白質或酶）間的相互作用，故在藥物設計和材料設計等領域被廣泛應用。最近有學者將對接策略用於研究奈米物質與目標酶的交互作用，這可提供蛋白質-奈米物質複合物幾何結構形成的可能機制；此計算模型也可利用蛋白質晶體結構來研究許多與奈米物質相關的細胞毒性作用和潛在風險，例如：細胞色素 P450（cytochrome P450, CYP）是一種重要的藥物代謝酶系統，利用分子對接 NPs 和 CYP 酶，可估計蛋白質和配體奈米物質間的相互作用，通過計算可知具功能性的奈米物質可能會降低藥物療效或增加毒性。其它分子對接例子包括被用來確定潛在具有生物大分子不同類型 NPs 的毒性，如 CuO、TiO₂、Fe₃O₄、Au、Ag、ZnO、Mn₂O₃ 和 Fe₃O₄，因此，NPs 和生物分子的交互作用在奈米毒理學領域受到越來越多的關注。

QSAR 分析是一種基於計算機模擬的技術，可作為替代動物試驗而進行毒性預測的替代方法。圖 3.3-2 為用於評估化學替代品和預測其毒性的 QSAR 模型生成示意圖。基於不同統計方法和特定分子描述符的典型方法，用於藥物設計或奈米毒理學研究中的計算機預測。

表 3.3-2 2D 細胞培養與 3D 細胞培養之比較

特徵	2D 細胞培養	3D 細胞培養
細胞生長速率	生長速率較體內測試快	不同細胞類型有不同的生長速率
細胞生長品質	可簡單且長期培養	可簡單且長期培養
細胞繼代培養時間	約一周	至少 4 周
細胞與細胞之間的交互作用	缺少細胞與細胞或是細胞與細胞外基質之間的交互作用	可提供細胞與細胞或是細胞與細胞外基質之間的交互作用
細胞培養花費	便宜且好維持	昂貴且耗時
體內模擬	模擬生物器官有一定的局限性	因生物器官為 3D，模擬上有一定的優勢
細胞繼代培養的準備	只需幾個小時	需幾個小時，甚至幾天以上

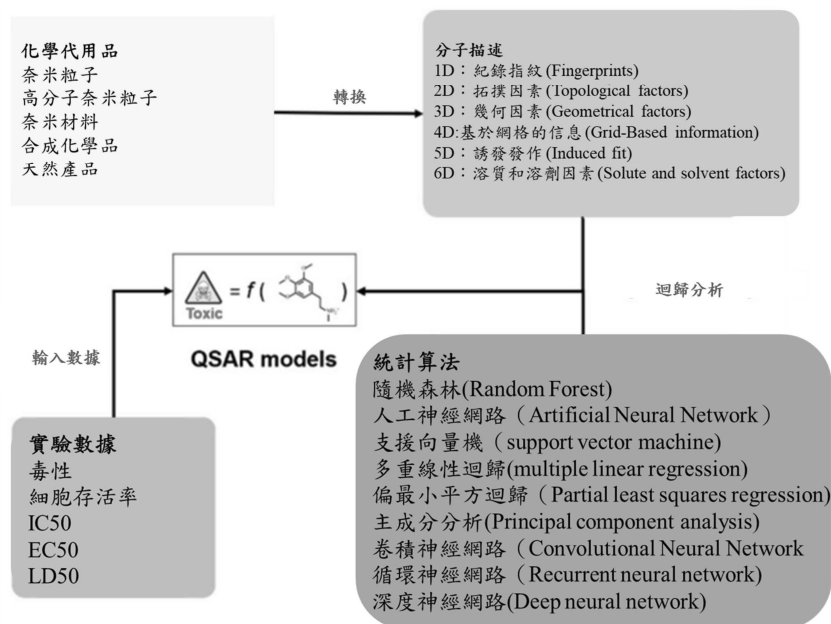


圖 3.3-2 用於評估化學替代品和預測其毒性的 QSAR 模型示意圖

分子動力學模擬 (molecular dynamics simulations) 簡稱 MD 模擬，應用在不同領域的工程科學中，並廣泛被用於研究和計算奈米毒理中的物理和化學特性。MD 模擬以數值方法解出系統中每個粒子的運動方程式，進而得到每個粒子的位置和速度，藉由材料原子級別系統的熱力學和動力學相關特性估算出微結構的單軸拉伸應力應變曲線，建構出一套適用在微系統的力學模型。它可分析在不同尺度下，該模型與巨觀體積下不同的行為差異，釐清兩種不同尺寸系統的力學行為，因此，關於構象變化的詳細資訊可以從 MD 模擬中觀察到大分子和 NPs 的差異和變化，例如 X 射線晶體學和核磁共振光譜法 (nuclear magnetic resonance spectrometry)。

然而奈米物質毒理的標準測試方法仍在發展中，ECHA 於 2019 年 12 月公布奈米形式物質的登錄和鑑定方法，其於環境中的溶解度和分散度穩定性測試之指導文件於 2020 年公布，OECD 目前也尚未公布奈米物質的替代測試標準方法，故奈米的替代測試方法不論是體外 (*in vitro*) 或計算機模擬方法 (*in silico*) 仍待進一步驗證和研究。

3.3.2 奈米物質生態毒理替代測試方法發展現況

在生態毒理替代測試方面，近年奈米物質的替代測試常以斑馬魚取代傳統的動物試驗，除斑馬魚具有體積小、基因序列和人類相似、發育快、繁殖容易等特性外，還可利用其透明的魚體觀察奈米顆粒沉澱及作用的器官，研究常用斑馬魚的成魚或胚胎來觀察奈米物質對其孵化率、器官發育畸形、皮膚損傷、異常行為（運動障礙）、免疫毒性、基因毒性或基因表達、神經毒性、內分泌系統破壞、生殖毒性和死亡率的影響以做毒理學分析；此外不同奈米顆粒也會有不同的毒性作用，如奈米銀顆粒、奈米金顆粒和金屬氧化物奈米顆粒（ TiO_2 、 Al_2O_3 、 CuO 、 NiO 和 ZnO ）所具有的毒性可能各不同（Stankic et al., 2016）；另外還可利用斑馬魚測試奈米物質的水生生物毒性或作為癌症臨床試驗奈米治療藥物的篩選工具（Patricia Letradoal., 2018）。然而奈米在環境中的溶解速率和分散穩定性是判讀奈米材料毒性的主要參數，即這些參數是奈米材料的環境歸宿和生物可用性的主要驅動因素，故在 2017 年關於人造奈米材料在模擬環境介質中的分散穩定性的測試指引（OECD TG 318）被認可使用，而於 2020 年也提出總體指導文件「奈米材料的溶解度和分散度穩定性測試之指導文件以及進一步使用數據做為對環境測試與評估策略，Guidance document for the testing of dissolution and dispersion stability of nanomaterials and the use of the data for further environmental testing and assessment strategies」，此舉意味關於奈米在生態毒理上仍處新興研究並待進一步發展和驗證。

雖然毒性評估可瞭解化學品的毒性作用和可能機轉，然而動物意識和倫理是需要考慮的重要課題。3Rs 原則的實施促進了各種替代方法的開發，替代方法包含了離體/體外細胞試驗、組織工程技術、電腦模擬技術和 QSAR 等，這些方法已被建議用於替代傳統的動物試驗。替代方法不僅可以用於研究奈米毒性，還可以廣泛用於藥物設計和臨床應用，使未來的實驗動物數量隨之減少，進而達到 3Rs 之目的。惟奈米物質及科技近年蓬勃發展，對於奈米物質的各種物理、化學及環境標準毒性測試目前仍在確認建立中，故如何將奈米物質的替代測試標準化仍待進一步研究和驗證。

3.4 我國各部會共同推動替代測試方法

3.4.1 預擬的替代測試發展藍圖與跨部會合作的前期規劃

對於未來替代測試發展藍圖可能的發展趨勢如圖 3.4-1，我國化學物質登錄的替代測試發展主要可以分 4 個階段：

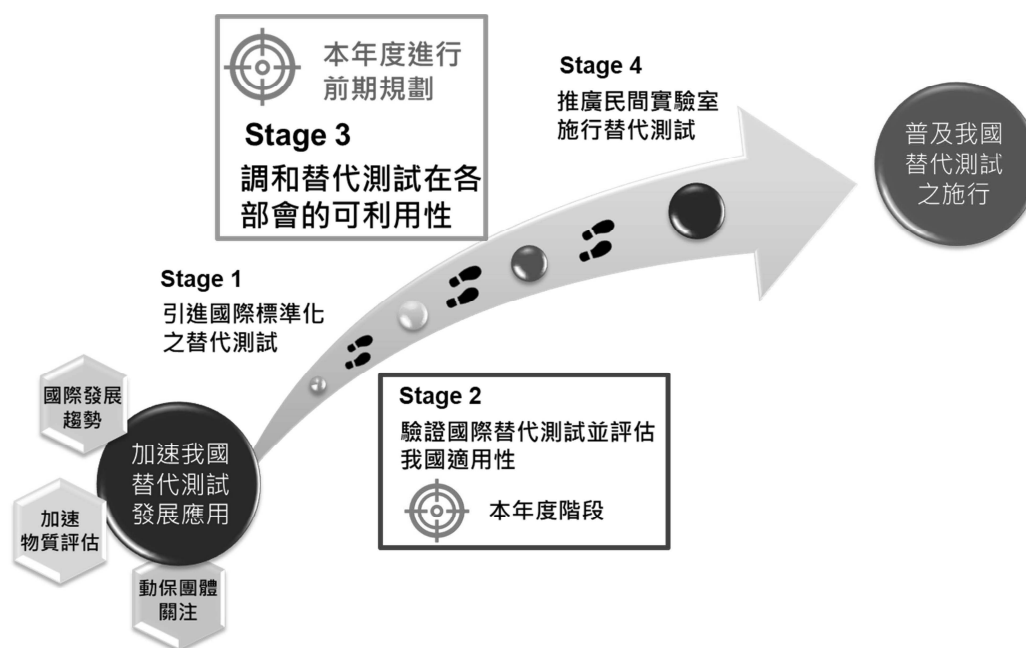


圖 3.4-1 預擬我國化學物質登錄替代測試發展策略

【階段一】、引進國際標準化之替代測試

此階段主要收集國際新興的替代測試方法，目前已在替代測試的前期計畫中完成當年度盤點，後續應持續更新，隨時關注包含奈米物質的國際替代測試發展。

【階段二】、驗證國際替代測試並評估我國適用性

此階段為本年目標，主要利用不同物質驗證電腦模擬或體外試驗的準確度，涵蓋範圍為新興化學物質。由於化學物質種類繁多，依照本年結果，可評估後續是否應加大驗證範圍或針對特殊化學物質進一步驗證，亦預計建立結合電腦模擬及體外試驗共同判斷物質危害性的流程，同時評估國際對於替代測試的分級分類標準，研析在我國的適用性。

【階段三】、調和替代測試在各部會的可利用性

如圖 3.4-2，此階段目前不屬於本年度工作範圍，為因應替代測試的持續發展進行前期規劃。為達到替代測試與各部會調和合作之目的，首先應瞭解各部會目前在替代測試的發展，分為兩大主軸探討：首先從分析不同制度對毒理資訊的需求及應用替代測試的情況進行分析，已完成對健康食品、醫療材料及化粧品之相關分析，也評估化學物質登錄所收集的報告是否可應用於其他領域，詳細內容將在下面章節詳述。



圖 3.4-2 跨部會替代測試合作的前期規劃與研析

瞭解不同制度對於毒理報告的需求，可有效減少動物實驗的重複進行。現階段不論國際或我國，都未發展完善的替代測試系統，尤其在複雜的毒性測試，例如：重複劑量毒性及生殖發育毒性，幾乎沒有能夠進行評估的體外測試。即便有部分體外測試，也受制於所花經費及人力時間不貲或準確率無法判定等因素，登錄人使用的意願不高。因此，在相關方法完善之前，不應僅關注於不使用動物的體外測試或電腦模擬，而應致力於減少不必要的動物實驗。使用動物減量的測試或調和各制度對於毒理資訊的需求皆可達到這個目的。藉由盤點不同制度對毒理資訊的需求，可瞭解目前化學物質登錄資訊的可利用範圍，而需求不同處，則可在後續跨部會會談或修改化學物質登錄資訊繳交原則來避免在不同制度執行相同毒性終點測試的情況。

第二大主軸則為盤點目前各部會在替代測試的研發研究，蒐集近 10 年衛生福利部、經濟部及農業委員會對於替代測試的研究。完成前期規劃後，後續應持續跨部會協商，確認各部會發展替代測試的量能及實際經濟面上的需求，作為推廣民間實驗室發展替代測試（階段四）的基石。

【階段四】、推廣民間實驗室施行替代測試

此階段為替代測試發展的最終目的，希望藉由方法開發、量能盤點與需求展現三個面向鼓勵民間實驗室施行替代測試，以產官學的多方角度完善替代測試的施行之目的。

3.4.2 各部會對於毒理資料繳交之法源依據及設計

根據表 3.4-1 可知，目前我國法規在落實 3Rs 精神的修法上，2019 年衛福部「化粧品衛生安全管理法」修正施行第 6 條，明確規定業者進行化粧品或成份安全性評估，除有特殊情形並經許可外，不得以動物為檢測對象。其他部會以 3Rs 精神推動替代方法取代動物試驗的進程上仍有所作為，例如：

2014 年底，環保署「毒性及關注化學物質管理法」接受繳交建議應用的替代方法取代動物試驗之生態毒理與毒理資料。2015 年，經濟部標檢局主管之國家標準「化學品分類及標示-總則」（CNS15030）針對皮膚刺激性 / 腐蝕性、眼睛刺激 / 嚴重損傷項目的安全性評估流程，接受使用結構-活性關係 / 結構-性質關係（SAR/SPR）之電腦分析（*in silico*）及體外（*in vitro*）測試方法所得之毒理資料。例如皮膚刺激性 / 腐蝕性部分，有效與公認之皮膚腐蝕性體外試驗，如 OECD 測試規範之測試方法 TG 430 及 TG 431；眼睛刺激 / 嚴重損傷部分，須是根據國際議定原則與準則驗證可用於評估眼睛刺激性 / 或嚴重損傷評估之替代方法。2020 年 6 月，環保署「既有化學物質標準登錄資料撰寫指引」第一版，針對毒理與生態毒理資訊項目之測試評估終點，提供 OECD 測試指引清單，其中含部分動物減量與體外（*in vitro*）試驗替代方法，也接受提交結構活性關係推估（QSAR Estimation）及交叉參照資料。2020 年 12 月，衛福部修正依健康食品管理法第 3 條第 2 項規定訂定之「健康食品安全評估方法」，修法重點之一包含合併並刪除非必要試驗，落實實驗動物福祉 3Rs 精神，且明定除評估方法建議的安全評估試驗方法外，亦可採用 OECD 化學品測試指引方法執行試驗。

表 3.4-1 我國各部會毒理資訊繳交之法源依據（1/2）

部會	法規	內容
行政院 農業委員會	農藥管理法	第 10 條 農藥生產業或販賣業者依前條申請核准登記時，應填具申請書，並檢附農藥標準規格檢驗合格證明文件、理化性與毒理試驗、田間試驗資料及其他相關資料。
	農藥理化性及毒理試驗準則	附件一 農藥理化性試驗項目 附件二 農藥毒理試驗項目 附件二附表一 有機化學製劑農藥毒理試驗項目 附件二附表二 無機鹽類製劑農藥毒理試驗項目 附件二附表三 微生物製劑農藥毒理試驗項目 附件二附表四 生化製劑農藥毒理試驗項目 附件二附表五 費洛蒙農藥毒理試驗項目
	農藥許可證申請及核發辦法	第 7 條 申請成品農藥輸入或加工許可證，該成品農藥使用時需添加增強農藥藥效之製品者，應另檢附其理化性及毒理試驗資料。
衛生福利部	食品安全衛生管理法	中央主管機關應召集食品安全、毒理與風險評估等專家學者及民間團體組成食品風險評估諮議會為之
	化粧品衛生安全管理法	化粧品業者於國內進行化粧品或化粧品成分之安全性評估，除有下列情形之一，並經中央主管機關許可者外，不得以動物作為檢測對象： 一、該成分被廣泛使用，且其功能無法以其他成分替代。 二、具評估資料顯示有損害人體健康之虞，須進行動物試驗者。 違反前項規定之化粧品，不得販賣。 第四項以動物作為檢測對象之申請程序及其他應遵行事項之辦法，由中央主管機關定之。
	化粧品產品資訊檔案管理辦法	第 3 條 化粧品產品資訊檔案，應以中文或英文建立下列資料： 九、產品及各別成分之物理及化學特性。 十、成分之毒理資料。 第 4 條 前項安全性評估訓練課程之內容及時數，規定如下： 三、化粧品安全評估方式：包括皮膚生理解剖學、化粧品經皮吸收能力、化粧品皮膚刺激、光老化與光過敏之機轉與臨床症狀、奈米安全性評估、天然物化粧品安全性評估、化粧品風險評估、毒理評估方法（皮膚刺激性、皮膚敏感性、皮膚腐蝕性、眼睛刺激性及基因毒性與致突變性測試）、系統性毒性與安全臨界值及動物試驗替代性方法；至少三十六小時。
	健康食品申請許可辦法	第 14 條 第二條第三款產品之安全評估報告，其審核重點如下： 一、產品之安全評估試驗，應依中央主管機關公告之健康食品安全評估方法進行。 二、前款評估方法之毒性測試資料。 有下列情形之一者，得免提前項第二款毒性測試資料： 一、產品之原料為傳統食用，且以通常加工食品形式供食。 二、產品或其原料具有完整之毒理學安全評估學術文獻報告，及長期供食用之紀錄，且其原料組成成分及製造過程與所提出之學術文獻報告相符。
勞動部	職業安全衛生法施行細則	第 18 條 中央主管機關依本法第十三條第二項，審查化學物質安全評估報告後，得予公開之資訊如下： 一、新化學物質編碼。二、危害分類及標示。三、物理及化學特性資訊。 四、毒理資訊。五、安全使用資訊。六、為因應緊急措施或維護工作者安全健康，有必要揭露予特定人員之資訊。 前項第六款之資訊範圍如下： 一、新化學物質名稱及基本辨識資訊。二、製造或輸入新化學物質之數量。三、新化學物質於混合物之組成。四、新化學物質之製造、用途及暴露資訊。
	新化學物質登記管理辦法	第 27 條 中央主管機關審查申請人檢送之評估報告後，得公開化學物質之下列資訊： 一、新化學物質編碼。二、危害分類及標示。三、物理及化學特性資訊。四、毒理資訊。五、安全使用資訊。六、為因應緊急措施或維護工作者安全健康，有必要揭露予特定人員之資訊。 前項第六款之資訊範圍如下： 一、新化學物質名稱及基本辨識資訊。二、製造或輸入新化學物質之數量。三、新化學物質於混合物之組成。四、新化學物質之製造、用途及暴露資訊。

表 3.4-1 我國各部會毒理資訊繳交之法源依據（2/2）

部會	法規	內容
行政院 環境保 護署	新化學物質及既有化學物質資料登錄辦法	第 19 條 經中央主管機關核准登錄之化學物質資料，其應予公開之內容如下：六、化學物質物理與化學特性資訊。 七、化學物質毒理與生態毒理資訊。 第 29 條 經核准登錄之化學物質，有下列情形之一者，登錄人應主動或依中央主管機關之要求及指定期限提出補充資料： 三、化學物質有新毒理或生態毒理資訊。
	毒性及關注化學物質管理法	第 30 條 第一項化學物質資料登錄內容包括製造或輸入情形、物理、化學、毒理、暴露、危害評估或其他經中央主管機關指定應登錄之資料項目，依每年製造或輸入量及物質種類分為標準登錄、簡易登錄及少量登錄。 前四項應登錄化學物質之種類、數量級距、製造或輸入情形、物理、化學、毒理、暴露及危害評估等資料及其他應備文件、登錄期限、標準、簡易、少量及共同登錄方式、審查程序、准駁、撤銷或廢止登錄核准、禁止或限制運作方式、登錄後化學物質資料之申報或增補、文件保存方式、資訊公開、工商機密保護方式及其他應遵行事項之辦法，由中央主管機關定之。
	毒性及關注化學物質標示與安全資料表管理辦法	第 14 條 毒性及關注化學物質如為混合物者，應依其混合後之毒理及危害性，製作安全資料表，並予標示。 前項毒性及關注化學物質，應列出其主要成分之化學名稱，其毒理及其他危害性之判定如下： 一、已作整體測試者，依整體測試結果。 二、未作整體測試者，其健康危害性及環境危害性，除具有科學資料佐證外，應依中華民國國家標準 CNS 15030 化學品分類及標示之混合物分類標準規定；對於燃燒、爆炸及反應性等物理危害性，應使用有科學根據之資料，評估其物理危害性。
	環境用藥管理法	第 9 條 製造、加工或輸入環境用藥，應將其名稱、成分、性能、製法之要旨、分析方法、毒理報告、藥效(效力)報告及有關資料或證件，連同標示及樣品，向中央主管機關申請查驗登記，經核發許可證後，始得製造、加工或輸入。
	環境用藥許可證申請核發作業準則	第 10 條 大陸地區製作之下列文書應先於大陸地區公證處辦理公證，並經行政院大陸委員會設立或指定之機構或委託之民間團體驗證： 一、大陸地區主管機關許可製造及上市販賣證明文件。 二、經銷授權書。 三、大陸地區主管機關核發之正式登記證影本。 四、毒理測試報告。 五、藥效（效力）檢測報告。 六、環境用藥於大陸地區為不列管者，所附產品管理相關機關（構）之證明文件或已於大陸地區及其他國家銷售並使用之商品化證明文件。 第 20 條 環境用藥之毒性檢測機構必須為專業毒理檢測機構，其規範應符合我國、美國、歐盟、日本或經濟合作與發展組織（OECD）之實驗室優良操作規範或檢測規範。 第 22 條 環境用藥藥效（效力）檢測、有效成分含量分析或物理化學性質檢測報告，其檢測方法依序為中華民國國家標準檢驗方法、中央主管機關公告之標準檢測方法。 前項標準檢驗或檢測方法，如國內尚未公告者，得引用經濟合作與發展組織（OECD）及其認可組織或美國、日本等任一國家主管機關認可之檢測規範，或由申請者提供檢測方法。

3.4.3 不同制度所需的毒理資料與接軌策略

為因應國際間動物福祉意識抬頭，採用替代測試方法儼然成為趨勢，不同部會亦在需要繳交毒理資訊的制度強化替代測試精神。部會合作首應評估所需資訊及報告的相容性，並針對不同處進行調和，才能達到不重複進行動物實驗的目標。以下將針對化學物質、健康食品、化粧品、醫療器材等不同領域的替代測試精神進行討論，並進一步研析目前化學物質登錄資訊與其他制度的接軌。

一、化學物質登錄制度的替代測試鼓勵策略（毒物及化學物質局）

環保署毒物及化學物質局於新化學物質登錄之毒理資訊中，接受業者以結構活性推估或體外試驗等方式，提交足以完整闡述其新化學物質危害性之皮膚刺激性、腐蝕性或眼睛刺激性等測試終點；於既有化學物質標準登錄資料撰寫指引中，建議業者提交生態毒理資訊時，優先使用符合動物福祉之替代測試，以避免不必要之脊椎動物測試。新化學物質標準登錄目前與職業安全衛生署採共同審查的方式，因此新化學物質及既有化學物質資料登錄工具說明中建議登錄人使用的替代測試，已於實際審查中逐步採納，共同推廣替代測試的施行。

110年4月7日環保署修正發布毒性及關注化學物質管理法規費收費標準，其中化學物質登錄鼓勵業者使用替代測試方法，如以指定之非動物替代測試資料申請標準登錄（指定項目為毒理資訊項目之皮膚刺激性、腐蝕性或眼睛刺激性等），可享審查費優惠。以下分析其他主管機關所列管產品之替代測試接受情形，如健康食品、化粧品與醫療器材等，綜合討論並初步整理可供化學物質登錄資訊之替代測試（方法）發展方向。

二、健康食品導入「階層式」安全性評估方法（食品藥物管理署）

衛生福利部食品藥物管制署於民國109年12月8日公告修正《健康食品安全評估方法》，此修正案最大亮點為將「分層試驗法」（Tiered Approach）概念導入此評估方法中，提倡由基因毒性等體外試驗依序執行相關試驗程序，若細菌回復突變分析、體外哺乳類細胞基因毒性分析等結果已確認受試產品基因毒性為陽性，則該產品不建議作為健康食品，且無須再進行任何動物實驗。

並於此評估方法文件新增優先採用國際已認可之非活體試驗方法等字眼，且無非活體試驗方法可替代，應優先採用國際認可之減量、減低痛苦或縮短時程之活體試驗方法；更建議若該健康食品屬應進行致畸胎試驗與繁殖試驗之類型（第四類），則得參考 OECD 或其他國際相關指引，將致畸胎試驗及繁殖試驗整合設計成單一試驗，減少不必要之動物使用。

在安全性評估試驗規範相關說明，也同時納入了其執行之動物實驗應符合行政院農業委員會公告之「實驗動物照護及使用指引」、使用之器材及設備材質應為造成動物疼痛或傷害最低者，且操作人員應經適當訓練等文字，著實符合動物福祉之精緻化（優化）精神。

三、不得以「動物」作為試驗對象之化粧品安全性評估（食品藥物管理署）

自歐盟禁止化粧品動物試驗後，衛生福利部食品藥物管制署於民國 108 年 11 月 9 日上路《化粧品或化粧品成分安全性評估申請動物試驗辦法》，若該化粧品非屬下列之一，即不得以動物作為檢測對象：

- (一) 該成分被廣泛使用，且其功能無法以其他成分替代
- (二) 具評估資料顯示有損害人體健康之虞，須進行動物試驗者

而根據《化粧品衛生安全管理法》，化粧品於供應、販賣、贈送、公開陳列或提供消費者試用前等，應完成建立產品資訊檔案，其檔案應包含各成分之毒理資料及產品安全評估資料等。依循化粧品產品資訊檔案製作指引，成分之毒理資料可取自原料其安全資料表（Safety data sheet）、科學文獻、國際資料庫或機構研究報告等，且符合毒性及關注化學物質管理法、公認的國際準則或標準，或於符合優良實驗室操作規範下進行之試驗數據，以臻安全性評估之可靠性及有效性等。製作指引中針對進口化粧品業者提供之成分毒理資料，應符合臺灣化粧品相關法規不得以動物作為試驗對象的要求。

針對產品安全性評估資料，並無標準模式，可依化粧品之不同性質制定格式，其安全性評估之基本原則主要以考慮其成分之毒理學特性為主，同時亦須考慮暴露範圍、途徑、持續時間或使用頻率等。而依循化粧品產品資訊檔案製作指引建議，評估成分安全性步驟如下：

- 鑑別危害
- 計算人體全身或局部暴露量
- 風險評估-人體全身（計算安全臨界值）與局部影響（如過敏或刺激性等）

若無法取得適當或可靠之成分毒理資料，該製作指引羅列建議進行之 OECD 公告替代測試方法，如皮膚刺激性、皮膚腐蝕性、皮膚過敏性與皮膚吸收性等。

四、藉由評估醫療器材之組成化學特性以減少動物測試（食品藥物管理署）

臺灣之醫療器材生物相容性測試主要依循國際規範[如 ISO、美國食品藥物管理署（Food and drug administration, FDA）等]，而根據於 2020 年發布之 ISO 規範，應以風險管理方式檢視其醫療器材之組成物質特性，其中包含物質辨識、物質含量、物理化學性質與毒理資訊等，以減少或避免生物相容性之動物測試。且美國 FDA 於 2020 年頒布之醫療器材指引文件亦提倡降低不需要之動物測試，建議業者應考量所有可用於風險評估（管理）之資訊，如文獻或其他公開合適資訊、臨床數據、動物測試數據、醫療器材許可標準或已經由主管機關核准之近似醫療器材相關資訊等。而美國 FDA 同時鼓勵業者向其諮詢非動物測試方法適用性等，若業者認定其替代測試方法具一定可靠性與適當性等，則美國 FDA 將評估與動物測試之相等性。

以美國 FDA 於醫療器材指引中針對文獻或其他公開合適資訊之說明，醫療器材業者應檢視全部適用之毒理文獻，以評估用於製造醫療器材之物質毒性風險，若該文獻數據無法合適推論其安全性，則可以毒理關切閾值（threshold of Toxicological Concern）評估部分生物相容性試驗終點。

業者也應藉由檢視毒理文獻或其他公開合適資訊，以辨識在使用醫療器材時可能產生之相關特定風險或能夠減少毒性發生的製程。舉例來說，文獻可提供醫療器材製造商在植入周邊血管支架時，將鎳鈦合金（nitinol）物質鈍化（passivation）可以確保具毒性之鎳物質不於人體釋放等相關資訊。

再者，業者應考量用於醫療器材風險評估之文獻相關性，即便該器材或組成物質已被美國 FDA 認定為公認安全（generally recognized as safe）之食品添加物，也可能無法充分闡述作為醫療器材用途之風險，因對於原食品用途而外推至特定組織接觸之醫療器材可能並不合適，如肌肉或血液循環等。

若該毒理文獻或其他公開合適資訊係用於豁免特定生物相容性試驗終點，則該文獻應包含投予劑量、途徑與暴露頻率等，並與申請之醫療器材用途相較。此外，文獻可能用於豁免或評估特定生物相容性試驗終點，而非全面性適用，如自系統性毒性文獻得到之未觀察到不良效應劑量（no observed adverse effect level, NOAEL）或最低觀察到不良效應劑量（lowest observed adverse effect level, LOAEL）等經常用於豁免急毒性、亞慢性或慢性系統毒性測試，而可能與基因毒性、局部或系統性致癌性、致敏性、刺激性或生殖毒性等較為無關，屬於生殖毒性之 NOAEL/LOAEL 則可用於評估自醫療器材釋放之潛在生殖毒性。表 3.4-2 為摘錄美國 FDA 針對評估醫療器材生物相容性之總結表格範例。

表 3.4-2 針對評估醫療器材生物相容性之範例

生物相容性終點	此次申請之測試報告資訊	以已申請之測試報告資訊	自文獻之支持性數據	引用出處	測試物質	無須提供額外資訊之原由
基因毒性	植入性醫療器材、化學特性（V2, App A-2, pdf p.x/200）	無	測試名稱（如染色體畸變測試）、致效劑量與無致效劑量	作者、文獻名稱、期刊名稱、日期、卷數、頁數	測試物質與最終醫療器材及滅菌醫療器材有些許不同，請見比較資訊（V1, pdf p.x/100）	基因毒性測試為辨識其基因毒性危害。化學特性數據可用於解釋此醫療器材釋出之化學物質並不具基因毒性
致癌性	無	使用物質製造醫療器材之原因（K#, V2, App Y-1, p.x/200）	可能人類致癌物質（Group B1） IARC Monograph Vx, date	引用出處（如網站連結等）	無	該物質(X)為已知致癌物質，但該醫療器材用於患者預期不超過六個月，且其效益大於風險，故無其他減少風險的措施或補充額外測試資訊

五、以動物減量及分層繳交為精神的農藥毒理及生態毒理資訊繳交

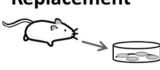
考量國民健康，與人體攝入相關的物質通常較少接受體外測試，例如：農藥、食品及藥品，以求資訊的可比較性。在農藥所需的毒理資訊以動物測試為主軸。在基因毒性測試，雖然包含體外測試，但同時要求體內資訊，此點與藥品類似，但與新修訂的健康食品安全評估方法不同。農藥相關的替代測試精神著重於動物減量的發展，依照「農藥理化性及毒理試驗準則」，明定在未訂定我國農藥理化性及毒理試驗測試規範前，應使用 OECD 的相關測試規範。考量農藥毒理資訊繳交，除基因毒性外，皆要求哺乳動物試驗結果，體外毒理測試尚不適用相關資訊的繳交，但 OECD 規範對於急毒性、皮膚過敏性及重複劑量毒性等符合 3Rs 原則的動物減量測試，則可應用於農藥毒理資訊的繳交。另外，依照評估物質/產品的特性設計繳交邏輯也是各制度用於減少動物實驗的重要手段，在農藥的部分毒理資料中，要求使用於食用作物的農藥需要繳交較多的資訊。在 90 天重複劑量測試中，使用於食用作物的農藥需繳交兩種哺乳類動物資訊；非食用作物則以一種動物進行試驗。而雖然皮膚及眼睛的推估資訊或體外測試目前尚未廣泛應用於農藥的毒理資訊繳交，但仍存在以物理特性判斷的豁免（酸鹼值大於 11.5 或小於 2），可避免動物接受不當物質的處理，符合減量與精緻化（優化）的精神。

生態毒理部分，由於農藥相較於化學品更清楚可能影響的對象生物，資料繳交包含對蜜蜂及鳥類等環境生物的評估，這是化學物質登錄所缺乏的資訊。生物蓄積性是環境宿命中的脊椎動物測試，由於耗費的動物數量龐大，且可由辛醇/水分配係數做初步判斷，因此各制度皆嘗試減少不必要的測試進行，農藥部分則依個案要求，當辛醇/水分配係數 $K_{ow} > 1,000$ 或不易代謝水解者應提供。另外對於水生作物，例如：水稻、菱角及蓮藕等，依照現有的毒性、生物累積性及環境續存性（水中半生期）資訊，訂定需要補充慢性/生命週期資訊的標準，雖然設計邏輯與化學物質登錄以噸數為依據的概念不同，但同樣都是以風險和動物福祉綜合考量的結果，另外農藥的慢性生態毒理資料也接受以國際公認的替代測試進行繳交（OECD TG 212 魚類胚胎-卵黃囊吸收階段短期毒性試驗）。整體來說，農藥的毒理資訊雖然接受的體外模式較少，但仍然具有完善的動物減量精神。

六、參考國際規範的環境用藥評估

環境用藥的替代測試資訊相對來說較少，也沒有像健康食品或化學物質登錄建議以符合 3Rs 原則的測試為優先的文字或說明，但依照「環境用藥許可證申請核發作業準則」，環境用藥之毒性檢測機構必須為專業毒理檢測機構，其規範應符合我國、美國、歐盟、日本或經濟合作與發展組織（OECD）之實驗室優良操作規範或檢測規範。因此，OECD 或各國的動物減量測試同樣可用於環境用藥的資訊繳交，但對於是否接受皮膚或眼睛體外模式資訊，目前尚未蒐集到明確規定，因此不進一步討論。

綜合上述分析，各主管機關對於其管轄產品之相關安全性評估皆朝向減少動物測試或以國際間接受之替代方法評估，於圖 3.4-3 初步彙整各產品之替代測試發展情形對應至動物福祉 3Rs 精神，以提供未來化學物質登錄之替代測試可發展方向。不論是實際進行測試或分析既有文獻資料進行評估，辨識其物質 / 產品之危害特徵為評估之基礎，若以蒐集、整理已知文獻或公開資訊為替代評估方法，其數據之適合性、相關性與可靠性等尤為重要，如：(1) 化粧品設置安全資料簽署人員，其人員必須經主管機關訓練核可，以確保其安全性分析結論、(2) 醫療器材之風險管理數據分析，應檢視其物質資訊相關性、可靠性等，並與實際使用之醫療器材相較其暴露途徑、劑量及頻率等。

	化學物質	健康食品	化粧品	農藥	環境用藥	醫療器材 ¹
取代 Replacement 	✓ 以體外或結構活性評估結果評估皮膚刺激性/眼睛刺激性 ✓ 以降低登錄經費實際促進替代測試繳交	✓ 以分層試驗法優先進行體外相關測試，以避免不必要之動物犧牲 ✓ 優先採用國際間認可之非活體試驗方法	✓ 以適當且可靠的毒理文獻進行安全性評估 ✓ 指引建議測試規範以體外試驗為主			✓ 風險管理方式檢視醫療器材之組成物質特性，以減少或避免生物相容性之動物測試，可用於風險管理資訊，包含：文獻或其他公開合適資訊、臨床數據、動物測試數據、醫療器材許可標準或已經由主關機關核准之近似醫療器材相關資訊等。
減少 Reduce 	✓ 若物質為腐蝕性或強酸/強鹼物質，則可豁免皮膚眼睛刺激性及皮膚過敏性資訊 ✓ 以其他物化或毒理資訊減少不必要試驗	✓ 刪除急性毒性資訊繳交 ✓ 進行活體試驗應優先採用國際認可之減量降低痛苦或縮短時程之活體試驗方法 ✓ 同時進行致畸胎試驗與繁殖試驗之產品，得參考國際指引，將兩者合併為單一測試	✓ 非經主管機關同意，不得進行動物測試	✓ 廣泛採用動物減量/精緻化方法。 ✓ 以危害程度與蓄存性減少脊椎動物試驗 ✓ 以農藥種類或施用對象等進行分類，訂定需要繳交之項目	✓ 以環境用藥的種類/有效成分的種類數量進行分類，訂定需要繳交之項目，僅少一視同仁所造成的動物不必要犧牲	✓ 以醫療器材接觸人體時間與侵入與否等決定其生物相容性評估終點。 ✓ 美國FDA提倡業者資訊其替代方法之適用性與可靠性等。
精緻化 Refinement 	✓ 急性建議包含精緻化精神的方法，例如：OECD TG423、436等	✓ 執行動物試驗應符合「實驗動物照護及使用指引」 ✓ 使用器材及設備材質應為造成動物疼痛或傷害最低者，且操作人員應具備適當訓練		✓ 廣泛採用動物減量/精緻化方法。 ✓ 持續評估符合動物福祉的實驗手法與策略		

註：臺灣醫療器材法規係遵循國際規範（如 ISO、美國 FDA 等），故敘述為整理國際規範中替代測試接收情況

圖 3.4-3 各領域替代測試發展與動物福祉 3Rs 精神之對應

以毒理資訊要求而言，圖 3.4-4 列出化學物質、健康食品、化粧品與醫療器材於各毒理項目資訊可接受之提交資訊，不同範疇之物質可接受之替代方法可能有所不同。健康食品立於對人類危害性較低之食品；化粧品與醫療器材則可依照法定規範禁止、限量使用之物質，以於製造時使用低危害性之物質；而化學物質通常不為直接人體使用，多為操作或洩漏時經皮或吸入暴露，藉由細部比較各產品於毒理項目可接受資訊差異，或許可提供化學物質登錄於接收替代測試方法之最合適規劃方向或未來登錄指引研擬調修重點。

若於化學物質登錄時繳交發展較為成熟之替代測試，幾乎可以對應至健康食品、化粧品或醫療器材之所需資訊，如圖 3.4-5 所示。惟臺灣化粧品相關法規已於民國 108 年發布不得以動物作為試驗對象的要求，故其替代測試若仍屬體內測試（符合減量或精緻化（優化）之動物福祉精神），仍應審慎考量其法規要求；而美國 FDA 則提倡業者以替代測試作為醫療器材生物相容性資訊，但其適用性或可靠性等仍須進一步討論、釐清，且其醫療器材之種類及侵入型態皆會影響替代測試使用之合理性。

國際間替代測試發展日新月異，然而對於以非動物測試方法，普遍認知無法以單一方法取代動物測試結果，如證據權重方式（WOE）、交叉參照（read across）或系統性文獻回顧（systemic review）等，故於化粧品或醫療器材之替代方法資訊接收可見以近似風險評估檢視其物質危害之方式，以充分且可靠之科學性論述豁免或減少動物測試進行。

由上述分析可知，化學物質登錄資訊所取得的數據幾乎可以涵蓋其他制度所需（圖 3.4-5），化學物質登錄所蒐集的資訊越完整或越具有公信力，在其他制度需要重複執行動物測試的機率也隨之大幅下降，各國對於報告接受性常考量是否符合優良實驗室規範（Good Laboratory Practice, GLP），報告是否符合 OECD GLP 或 ISO17025 是十分重要的議題，因此化學物質登錄除了考量登錄人取得報告的容易度以外，也應兼顧品質以擴大該報告的可利用性。建議定期盤點各領域對於毒理及生態毒理資訊的需求及安全性評估替代的新資訊，如醫療器材之上市後產品監督，並在可行範圍內調整化學物質登錄資訊繳交原則及邏輯，與其他制度接軌，才能達到避免重複進行動物試驗的最終精神。

產業別 項目	化學 物質 ¹	健康 食品 ²	化妝 品 ³	醫療 器材 ⁴	農藥 ⁵	環境 用藥 ⁶
6.1 急毒性		無須 繳交				
6.2 皮膚刺激/腐蝕		無須 繳交				
6.3 眼睛刺激性		無須 繳交				
6.4 皮膚過敏性		無須 繳交				
6.5 基因毒性						
6.7 重複劑量毒性						
6.8 生殖/發育毒性						
6.9 致癌性						
7 水生生物毒性		無須 繳交	無須 繳交	無須 繳交		



以組成物質特性，如物化、毒理資料等，減少動物測試



鼓勵/接受符合3R精神的測試



鼓勵/接受符合3R精神的測試，且明確指出可以體外測試或推估方式進行繳交/評估



非經主管機關同意，不得進行動物測試

註：1. 參考「既有化學物質標準登陸資料撰寫指引」進行判斷。

2. 參考「健康食品安全評估方法」，該文件中說明測試方法亦可參照 OECD 相關規範，並敘明以體外測試為優先考量，不具有體外測試方法才考量動物減量方法的原則。

3. 主要參考「化粧品衛生安全管理法」及「化粧品產品資訊檔案製作指引」進行判斷，於特定項目列出 OECD 規範供參考，認為明確指出可以體外測試方法進行評估的項目。

4. 臺灣醫療器材法規係遵循國際規範（如 ISO、美國 FDA 等），故敘述為整理國際規範中替代測試接收情況，目前美國 FDA 提倡業者發展符合 3Rs 測試。

5. 參考「農藥理化性及毒理試驗準則」進行判斷，其中除基因毒性外，皆列出動物品系及測試相關的建議及要求，並未指出可繳交體外測試，且針對測試規範要求，在訂定我國農藥理化性及毒理試驗測試規範前，應使用 OECD 的相關測試規範，故以 OECD 的動物減量方法進行整理。

6. 參考「環境用藥許可證申請核發作業準則」進行判斷，期敘明毒理測試規範應符合我國、美國、歐盟、日本或經濟合作與發展組織（OECD）之實驗室優良操作規範或檢測規範，由於未搜尋到體外測試繳交的規則，以環檢所方法及 OECD 動物減量規範進行整理。

a. 屬於對皮膚腐蝕性、強酸（ $\text{pH} \leq 2.0$ ）或強鹼（ $\text{pH} \geq 11.5$ ）物質不需繳交該項資訊。

b. 以物化或其他毒理/生態毒理資料，判斷是否需要繳交該項目。

c. 根據美國 FDA 相關醫療器材指引，若文獻數據分析無法合適推論其安全性，可於風險管理中以毒理關切閾值（TTC）或結構活性關係推估（SAR）評估其基因毒性與致癌性終點

d. 皮膚刺激性/腐蝕性及眼睛刺激性在 OECD 規範不具有動物減量的方法

e. 既有化學物質標準登錄的環境毒理資訊可以交叉參照及定量結構活性關係推估等推方式繳交。

圖 3.4-4 化學物質、健康食品、化粧品與醫療器材替代測試接受情形

替代測試發展 較為成熟之終點	化學物質 	健康食品 	化妝品 ² 	醫療器材 ³ 	農藥 	環境用藥 
6.1 急毒性	減量試驗	無須提交 ¹	☒	☒	☒	☒
6.2 皮膚刺激性/ 腐蝕性	體外試驗 推估計算	無須提交 ¹	☒	☒	傳統動物數據 可應用	傳統動物數據 ⁴ 可應用
6.3 眼睛刺激性	體外試驗 推估計算	無須提交 ¹	☒	☒	傳統動物數據 可應用	傳統動物數據 ⁴ 可應用
6.4 皮膚過敏性	減量試驗 體外試驗	無須提交 ¹	☒	☒	☒	☒
6.5 基因毒性	體外試驗	☒	☒	☒	☒	☒
7 水生生物毒性	非脊椎動物 試驗	無須提交	無須提交	無須提交	☒	☒

註：1. 為依據《健康食品安全評估方法》無要求之項目

2. 因應臺灣於民國 108 始禁止以動物作為化粧品安全性評估試驗對象，若其替代測試仍以活體動物為主體，仍應審慎檢視其法規符合性
3. 若替代測試屬非國際規範認可之方法（如交叉參照或結構活性推估等），應主動說明其使用合理性與可靠性等供主管機關核定
4. 「環境用藥許可證申請核發作業準則」並無對於該項繳交類型(動物或體外數據)進行說明，不進一步討論該制度是否接受體外測試。

圖 3.4-5 化學物質登錄制度所蒐集資訊可廣泛應用於不同領域

3.4.4 不同部會對於替代測試的研發現況

除了現行制度逐步融入替代測試，各部會在其執掌領域也積極研發新興替代測試，表 3.4-3 盤點近 10 年在經濟部、農委會與衛福部關於替代測試的研究計畫，並進行研究和分析，瞭解各部會替代測試研發走向與環保署的異同，並進一步提出替代測試研發跨部會合作的建議和可行方向。

一、經濟部

經濟部工業局於民國 99 年提出「化粧品保養品產業環境建構及推廣」計畫，由財團法人工業技術研究院生技與醫藥研究所執行，該計畫目標為提升國內化粧品業者之競爭力與產品研發能力，並為因應即將實施之歐盟化粧品動物試驗禁令，該計畫首先蒐集國際間動物替代測試最新方法，隨即分析並歸納動物替代測試之全球趨勢，最終研擬化粧品保養品原料及產品開發之相關資訊以供國內業者參考。

民國 102 年經濟部技術處為遵循歐盟於同年 3 月即將實施之動物試驗禁令，由財團法人工業技術研究院著手開發華人皮膚細胞組織仿生產品，發展

標的物為華人仿生表皮組織及華人含黑色素之仿生皮膚組織兩類，並積極進行測試實驗以符合國際規範，該計畫以生物體外細胞或組織為試驗產品，針對皮膚刺激性、腐蝕性以及敏感性作為動物替代試驗之終點，以完成符合歐盟 REACH 法規之 3Rs 規範及要求，並持續維持國內化粧品保養品產業之競爭力及增進未來之發展潛力。在成功開發仿生表皮組織及皮膚細胞產品後，欲將該技術實際應用於產業中仍需要經由國際認證，民國 104 年經濟部技術處接續提出「仿生表皮組織產品化之試量產、生產確效與符合國際標準驗證」計畫，該計畫工作主要有以下 3 項，量產仿生表皮組織並開發運送保存方式、標準化皮膚刺激性、皮膚腐蝕性及過敏性之檢驗方法、完成國際實驗室認證，在完成以上三項認證許可後，便可提供國內化粧品保養品業者所需之檢驗及認證，藉此認證亦可使我國化粧品保養品產業可與國際接軌、進入國際市場且具有相對競爭力及優勢。

表 3.4-3 不同部會近十年對於替代測試的研究

部會	年度	題目	經費	資料收集狀況
經濟部	99	化粧品保養品產業環境建構及推廣計畫	12,178 仟元	報告全文
	102	華人皮膚細胞組織之產品開發	20,837 仟元	摘要
	104	仿生表皮組織產品化之試量產、生產確效與符合國際標準驗證技術開發	26,980 仟元	摘要
農委會	99	大鼠口服急毒性之動物減量試驗技術研究	1,950 仟元	報告全文
	103	強化農藥管理及風險分析之研發與應用	3,950 仟元	報告全文
	107	動物保護及人道管理之改進與評估	1,853 仟元	報告全文
	109	建構飼料添加物動物替代方案支援體系與強化動物替代試驗品質及管理	15,843 仟元	報告全文
	109	建構驅動動物替代方案新興產業發展之科技研創與基礎環境	11,910 仟元	報告全文
	109	建構植保資材產業之農藥毒理動物替代體系	12,102 仟元	報告全文
衛福部	96	化學性防曬化粧品安全性評估與檢驗方法之研究	1,100 仟元	報告全文
	108	以定量構效關係模型預測化學品對斑馬魚的急性毒性	160 仟元	摘要
	109	生物藥品動物替代試驗之先期評估研究	5,400 仟元	摘要

除貿易及產業市場考量之外，新穎動物替代測試方法的開發也是相當重要之發展方向，民國 107 年工研院將 3D 列印技術應用於仿生表皮組織、真皮組織及全皮組織的建構，新興技術的發展除了提升動物替代測試於皮膚治療及化粧品產業的應用之外，亦可開創替代測試相關之新創產業，諸如符合國際認證之商品檢測、國際標準檢驗方法之開發及替代測試檢測元件設計製造等皆具有相當之發展潛能。

2013 年 3 月歐盟禁止使用動物測試之化粧品保養品，2016 年我國跟進該規範並於 2019 年正式實施，經濟部在此期間陸續完成仿生皮膚組織開發、量產、確效、認證及各項新穎技術發展等重要階段，除順利協助國內化粧品保養品產業打入國際市場之外，亦推動並增加國內仿生皮膚組織產業的發展及競爭力，雖此過程為時勢所趨，但階段性成果及未來發展性亦大有可為。

二、農委會

農委會於民國 99 年提出「大鼠口服急毒性之動物減量試驗技術研究」計畫，由農委會農業藥物毒物試驗所執行，其計畫目的為驗證測試規範之測試方法 OECD TG 425 以取代原測試方法 OECD TG 401，用以達成 3Rs 試驗動物減量之目標。原測試方法 OECD TG 401 於高、中、低 3 種劑量分別投入 10 隻動物（5 公、5 母），以估算其半數死亡劑量（LD₅₀），OECD 基於動物福祉則建議以 OECD TG 420、TG 423、TG 425 取代原測試方法，而 3 種測試方法當中僅 OECD TG 425 可推算半數死亡劑量，且 OECD TG 425 亦為當時美國環保署之口服急毒性更新方法，故需進行標準試驗以驗證其確效性。在以 10 種不同農藥試驗後之結果顯示，測試規範之測試方法 OECD TG 425 與原測試方法 OECD TG 401 所推算之半數死亡劑量雖略有不同，但其毒性分類幾乎一致，說明了 2 種測試方法於口服急毒性具有正相關性，基於動物福祉觀點及國際測試標準，可以 OECD TG 425 取代 OECD TG 401 作為大鼠口服急毒性之測試規範。

民國 103 年則是利用斑馬魚胚胎體外細胞模式來探討 3 種農藥對於性腺荷爾蒙之內分泌干擾作用，根據 3Rs 動物替代原則，斑馬魚胚胎體外試驗是一項符合替代、減量及優化原則的新穎模式，試驗結果最終證實，斑馬魚胚胎體外細胞模式可以辨識及分析環境化學物質之雌激素活性，再結合基因檢

驗，便可推測農藥對於性腺荷爾蒙之內分泌之干擾作用機制。民國 107 年與中華實驗動物協會合作，進行國內產品上市前動物測試相關法規盤點，強化試驗動物專業知識及教育訓練，協助國內動物科學應用機構以達提升試驗動物福祉之目標。民國 108 年則邀請英國皇家防止虐待動物協會（Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals）專家來台交流，協助我國實驗動物照護及使用委員會（Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC）完成專業之教育訓練。

農委會於民國 109 年大量投入動物替代測試研析共包含 3 項計畫，「建構飼料添加物動物替代方案支援體系與強化動物替代試驗品質及管理」、「建構驅動動物替代方案新興產業發展之科技研創與基礎環境」及「建構植保資材產業之農藥毒理動物替代體系」計畫。「建構飼料添加物動物替代方案支援體系與強化動物替代試驗品質及管理」計畫目標在於盤點並研析歐盟、美國、日本及中國等國際組織之飼料添加物、寵物食品之動物替代測試規範，並預計建置動物替代測試功效模式支援體系、體外細胞模式替代技術平臺及安全性評估替代測試平臺，以強化動物替代測試品質及管理。「建構驅動動物替代方案新興產業發展之科技研創與基礎環境」計畫目標為發展晶片及細胞之生物列印製程、建立創新之肺部類器官以及發展癌症轉移模型之癌細胞分離技術，並預計開發淡水魚類初代細胞用於水生動物毒性試驗之替代方法。「建構植保資材產業之農藥毒理動物替代體系」計畫目標為建立農藥毒理評估替代測試模式、建立國際認可農藥毒理評估之 3Rs 新穎技術及管理策略、皮膚過敏性電腦模擬預測評估、皮膚過敏性生物指標評估，並預期建立大鼠出生前發育毒性半體外替代測試模式、大鼠胚胎培養之半體外生殖與發育毒性及內分泌干擾試驗，並依據 OECD TG 203 之減量原則，修訂國內水生生物急毒性試驗標準作業程序之操作指引。

二、衛福部

衛生署藥物食品檢驗局於民國 96 年委託臺北醫學大學生物醫學材料研究所執行「化學性防曬化粧品安全性評估與檢驗方法之研究」計畫，計畫目的在於蒐集歐盟、美國及日本等先進國家對於化粧品之管理法規、檢驗方法及替代測試原則並進行比較，整合後建立安全性疑慮報告資料庫。民國 108 年

委託台南醫院執行「以定量構效關係模型預測化學品對斑馬魚的急性毒性」計畫，基於 21 世紀毒理學的測試研究強調非動物方法及 3Rs 動物福祉原則，該計畫以 OECD 所發展之 QSAR Toolbox 預測化學物質之水生毒性，並搭配斑馬魚胚胎體外細胞試驗及斑馬魚成魚試驗，以驗證替代測試模擬之確效性。民國 109 年衛福部食藥署則針對生物藥品動物替代測試進行先期評估研究，計畫為因應 3Rs 之國際趨勢，盤點中華藥典、歐洲藥典、美國藥典等國外生物藥品使用實驗動物之檢驗方法，研析比較國際間單核球活化試驗法、重組因子 C 試驗法等生物藥品替代測試方法，並挑選關鍵項目先期評估其方法及條件，作為建立生物藥品動物替代測試方法之基礎。

歸納綜整近 10 年各部會關於動物替代測試之研究及發展，大致上可從進程及用途兩大方向作探討，為跟隨世界化粧品保養品 3Rs 趨勢及規範，經濟部已於民國 102 年起投入大量資源，並偕同國內化粧品業者及其相關單位，逐步建置國內在皮膚刺激、腐蝕及過敏性動物替代測試之量能，尤其在仿生皮膚領域亦開啟一片藍海，除協助國內化粧品保養品業者保有高度競爭力並打進國際市場外，也帶動起仿生皮膚相關之生技產業及其周邊技術性產業之新興市場，就此領域而言，其動物替代測試之發展及技術應相當純熟。農委會近期亦投入大量資源於替代測試，其執行方向多半落於動物飼料及農藥兩大範疇，而衛福部之計畫研析則較著重於藥物、醫材及食品等範疇。基於動物替代測試所跨足之範圍廣闊，包含毒理及生態毒理兩大領域，此工程極為浩大，跨部會合作應可紓解各部會所背負之壓力，並促使國內動物替代測試加速發展。

3.4.5 未來發展跨部會替代合作的建議

未來替代測試發展與跨部會整合的建議如下：首先應加速資料整理與嘗試進行評估。化學物質登錄資料或相關資訊在各國都是物質管理十分重要的一環，我國自發展新化學物質標準登錄起，於 108 年度首先開始 106 種既有化學物質的標準登錄，隨之迎來的是為了減少不必要的動物實驗所作的配套措施，其中又以國際資訊接收最廣為登錄人使用。而國際資訊往往與標準測試差異甚大，通常單一資訊不足以作為後續評估。這樣的情形也同樣出現在體外替代測試資訊，證據權重往往是使用相關資訊不可或缺的一環。因此若希望將國際資訊或非動物數據提供給其他部會使用或進行管理層面的討論，都需進一步統整並作出結論或評估。

其次是統合繳交資訊以減少企業負擔。減少動物實驗不僅減少動物使用，更重要的是如何使用相對分散的數據作出結論，最常見的例子就是皮膚腐蝕刺激性和皮膚過敏性無法以單一資訊作出危害判斷，登錄人需花費更多危害評估成本，造成中小企業負擔。因此在推動替代測試的同時，應加速法規面或實務面之資料統合，並逐步嘗試跨部會中整合，若不同部會對於類似的管理目的都能使用相同資訊，一則可有效減少企業負擔，二則可以達到管理標準的一致性，因此應持續與不同部會進行交流，討論化學物質登錄資料的可利用性時，也應及持續關注國際的新資訊，當出現新證據時，都應再進行證據權重的評估以釐清物質毒性。

第三個則是強化替代測試方法與法規的橋接，經確效的替代測試具有高可信度，輔導國內實驗室進行相關方法的試行與演練有其意義，但應避免過度進行驗證，並調整發展走向，例如化學物質相關法令或指引中，替代測試資料若無法以 CNS 15030 進行分類時，可參考採用國際最新 GHS 分類的精神。

第四章 替代測試方法完備我國化學物質登錄所需之毒理及生態毒理資訊

章節摘要

本章主要說明替代測試方法完備我國化學物質登錄所需之毒理及生態毒理資訊。4.1 節簡介電腦模擬模式，4.2 節為電腦模擬模式試行毒理及生態毒理項目資料推估，4.3 節為 QSAR 模型之驗證所需資訊及範本，4.4 節為體外試驗結合定量結構活性關係篩選預測生態毒性之效能評估。

4.1 電腦模擬模式簡介

4.1.1 定量結構活性關係 (QSAR) 的發展沿革

在 21 世紀毒理學計畫中，電腦預測是重要的發展方向，而目前主要應用於電腦模擬模式的預測技術為 QSAR，指的是物質的分子結構和物理化學特性與生物活性有相關性，又被稱做 Hansch 方程式。1868 年 Crum-Brown 已經提出物質的分子結構、物化特性和生物活性是有關連性的，雖然當時已經有這樣的想法，但是卻沒有提出數學模型 (Brown and Fraser, 1868)。1962 年 Corwin Herman Hansch 根據此概念，做出數學模型，其中包含疏水性參數、電性參數和立體參數 (Hansch et al., 1962)。其優點是量化結構與活性之間的關係後，可以瞭解結構對於生物活性的影響，透過這樣的特性可以有系統的整理大量數據。這樣的預測模式可大量減少進行動物實驗的時間、成本及減少對動物的傷害，符合 3Rs 原則的需求，而這種替代試驗方法已被歐盟 REACH 法規及 OECD 在遵照 REACH Annex XI 的前提下接受，另美國環保署也將此技術運用在篩選評估工具的開發，以大量且快速的取得新化學物質所缺乏之實際測試數據。

一、定量結構活性關係在科學上的發展

早在 1778~1850 年間，Charles Babbage 提出最早的 QSAR 概念「所有化學將成為數學分析的 1 個分支，就像天文學一樣，從觀察中獲取其常數，將

能夠預測任何新化合物的特徵」(Babbage, 1838)，關於化學結構與生物活性之間關係的許多早期研究都涉及毒理而不是藥理活性。但令人驚訝的是 QSAR 在藥理學中得到了最廣泛的應用 (Habsch et al., 1963)。實際上，直到 1980 年初，QSAR 才開始在環境科學中得到不同程度的使用。在 1980 年起國際上對環境 QSAR 的興趣日益濃厚，Klaus Kaiser 於 1983 年發起一系列有關環境科學中 QSAR 的國際研討會，最初每 3 年舉辦 1 次，但從 1988 年起每 2 年舉辦 1 次。從 2004 年開始，國際研討會的範疇延伸到健康科學領域。為了提高在監管方面使用 QSAR 模型預測化學物質和物理化學特性的可能性，OECD 於 2002 年，在葡萄牙塞魯巴舉行了 QSAR 專家會議，以制定 1 套 QSAR 指引，確保正確驗證出於監管目的而提交的 QSAR 預測模型。

二、定量結構活性關係的定義及原理

結構活性關係 (Structure-Activity Relationship, SAR) 和定量結構活性關係統稱為 QSAR；利用化學物質的結構資訊，以定性或定量的方式預測化學物質的物化特性、生物學資料 (如毒理學) 和環境宿命性質。SAR 和 QSAR 的定義如下：

- (一) 結構活性關係：為子結構與目標特性或活性存在相關的定性關係。上述子結構可以由相鄰原子鏈結或與目標特性或活性共同關聯的非鍵結原子的排列組成。
- (二) 定量結構活性關係：為一種數學模型 (通常用於統計相關)，該模型將一個或多個化學結構衍生的定量參數與定量計算的目標特性或活性聯繫起來的定量模型。如圖 4.1-1 所示。

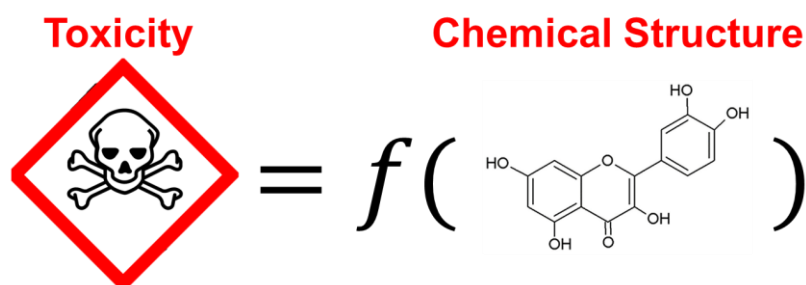


圖 4.1-1 定量結構活性關係示意圖

定量活性結構關係中定量計算的目標特性或活性稱為 (endpoint)，化學結構衍生的定量參數則稱為描述符 (descriptor)，而 QSAR 的開發最常用的技術是迴歸分析 (regression analysis)、神經網路 (neural nets) 和分類方法 (classification methods)。

在 QSAR 模型中，最常用來預測毒性的參數為辛醇-水分配係數 (the logarithm of 1-octanol water partition coefficient, $\log K_{ow}$ 或 $\log P$)，辛醇-水分配係數是一種物理性質，廣泛用於描述化學物質的親脂性 (lipophilic) 或疏水性 (hydrophobic)，為平衡狀態下兩相系統中辛醇相中化學物濃度與水相中濃度的比例 (公式 4-1)。辛醇-水分配係數的觀念最早由 Hansch (1969) 引用在生化上的結構活性分析 (biochemical structure activity relationship) (Hansch, 1969)，隨著越來越多的文獻提出 $\log K_{ow}$ 與有機物在生物體中的生物濃縮性相關，自此之後 $\log K_{ow}$ 就廣泛地運用在評估水生生物或其他生物之脂肪組織對有機物的生物濃縮性。

$$\log Kow(\text{或} \log P) = \log \frac{C_o^{nol}}{C_{H_2O}} \dots \dots \dots \text{(公式 4-1)}$$

其中

$C_{octanol}$ ：表示溶質在溶劑辛醇中之濃度

C_{water} ：表示溶質在溶劑水中之濃度

最早關於環境科學上 QSAR 的研究，是 Neely 等人在 1974 年間發現生物濃縮係數 (BCF) 與某些有機環境污染物的辛醇-水分配係數之間存在良好的直線相關性 (公式 4-2) (Neely Branson et al., 1974)：

$$\log BCF = 0.124 + 0.542 \log Kow \dots \dots \dots \text{(公式 4-2)}$$

$$n = 8, r^2 = 0.899, s = 0.34$$

其中 BCF：表示生物濃縮係數或化學物質在生物體或組織中的濃度與其所處環境介質 (通常為水) 中的濃度經平衡的值

n：表示為建立模型的化學品數

r^2 ：表示為相關係數 (coefficient of determine)

s：表示為標準差 (standard deviation)

其後，一篇由 Könemann (1981) 發表的重要論文顯示魚類急毒性與通過非極性麻醉作用的工業化學品的 $\log P$ 具良好相關性 (公式 4-3)。同時，文獻也提到此公式無法測量化學物質 $\log P > 6$ 的 LC_{50} 值，原因推斷為該化學物質的水溶性低。(Könemann, 1981)

$$\log \left(\frac{1}{LC_{50}} \right) = -4.87 + 0.871 \log P \dots\dots\dots \text{(公式 4-3)}$$

其中 LC_{50} : 表示半致死濃度 (LC_{50}); 動物實驗中施用之化學物質能使 50% 實驗動物族群發生死亡所需要之濃度。

4.1.2 QSAR 模型及可使用範圍簡介

REACH 法規目的為在產生化學物質危害特性的新資訊時，盡量避免不必要的動物測試，而在法規附件 11 (Annex XI) (Richards Barnes et al., 1969) 中提及若滿足 REACH 所規定的條件，則可以透過使用非測試方法 (如: QSAR) 來替代標準測試的結果; 隨後 ECHA 為了在非測試方法上更透明，先後公布 "Practical guide: How to use alternatives to animals testing to fulfil your information requirement for REACH registration (ECHA, 2016)" 與 "Practical guide: How to use and report QSAR (ECHA, 2016)"，前者描述非測試方法的條件與分類; 後者則是對 QSAR 方法作出更深入的討論。

由於 QSAR 模型用於評估化學物質特性逐漸普及，因此愈來愈多的開發者加入研發 QSAR 模型，導致市場上 QSAR 模型的程度參差不齊，故 ECHA 按每個 REACH 的測試終點提出不同 QSAR 模型供登錄者參考。整合 REACH 法規定義測試終點有關的 QSAR 模型如表 4.1-1 作為後續模型選定之依據。

ECHA 提出的 QSAR 模型共有 18 個，其中有 6 個 QSAR 模型是免費使用的模型，其餘為商業 QSAR 模型，而在 6 個公開的 QSAR 模型中只有 Danish QSAR Database、生態結構活性關係 (Ecological Structure Activity Relationships, ECOSAR)、毒性預測軟體工具 (Toxicity Estimation Software Tool, T.E.S.T.) 與全球架構化學物質性質評估虛擬模型 (Virtual Models for Property Evaluation of Chemicals within a Global Architecture, VEGA) 推薦使用在生態毒理的測試終點。對於毒理 QSAR 測試終點部分，僅有 Danish QSAR Database 涵蓋了 9 項毒理測試終點。以下將針對擬使用的 Danish QSAR Database、ECOSAR、T.E.S.T. 與 VEGA 進行個別簡介。

表 4.1-1 與 REACH 定義之測試終點相關的 QSAR 模型 (1/4)

測試終點	使用軟體	QSAR 模型 / 模組	是否公開 免費使用
一、物理化學特性的測試終點			
熔點 / 凝固點	EPI Suite	MPBPVP	是
沸點	EPI Suite	MPBPVP	是
	T.E.S.T.	Normal boiling point	是
	ACD / Percepta	Boiling Point / Vapor Pressure / Module	否
相對密度	T.E.S.T.	Density	是
蒸氣壓	EPI Suite	MPBPVP	是
	T.E.S.T.	Vapor at 25°C	是
	ACD / Percepta	Boiling Point / Vapor Pressure / Module	否
表面張力	T.E.S.T.	Surface tension at 25°C	是
水溶解度	EPI Suite	WSKOW and WATERNT	是
	T.E.S.T.	Water solubility at 25°C	是
	ACD / Percepta	Aqueous Solubility Module	否
	ADMET Predictor	Physicochemical and Biopharmaceutical Module	否
	Discovery studio	ADMIT descriptors	否
辛醇-水分配 係數	EPI Suite	KOWWIN	是
	VEGA	LogP Models	是
	ADMET Predictor	Physicochemical and Biopharmaceutical Module	否
	ACD / Percepta	LogP Module	否
	JChem	LogP / LogD predictor	否
閃點	T.E.S.T.	Flash point	是
解離常數	Danish QSAR Database	pKa from ACD/labs	是
	ADMET Predictor	Physicochemical and Biopharmaceutical Module	否
	ACD / Percepta	pKa module	否
	JChem	pKa predictor	否
黏度係數	T.E.S.T.	Viscosity at 25°C	是
二、環境宿命與途徑的測試終點			
水解	EPI Suite	HYDROWIN	是
生物降解	EPI Suite	BIOWIN and BioHCwin	是
	VEGA	IRFMN model	是
	Danish QSAR Database	Not ready Biodegradability model from DTU	是
	Discovery studio	Aerobic biodegradability model	否
	Meta-PC	Aerobic microbial biodegradation expert rules	否
	CATALOGIC	Several OECD 301model	否

表 4.1-1 與 REACH 定義之測試終點相關的 QSAR 模型 (2/4)

測試終點	使用軟體	QSAR 模型 / 模組	是否公開 免費使用
水生生物的 生物蓄積性	EPI Suite	BCFBAF	是
	T.E.S.T.	Bioaccumulation factor	是
	VEGA	CAESAR、Meylan and KNN/Read-across models	是
	CATALOGIC	Two BCF base-line models	否
	CASE Ultra	ECOTOX model bundle	否
吸附 / 脫附	EPI Suite	KOCWIN	是
三、生態毒理的測試終點			
魚類短期毒性	T.E.S.T.	Fathead minnow LC ₅₀ (96 hr)	是
	Danish QSAR Database	Fathead minnow 96h LC ₅₀	是
	ECOSAR	Fish, 96-hr, LC ₅₀	是
	ADMET Predictor	Toxicity module	否
	Discovery studio	Fathead minnow LC ₅₀	否
	VEGA	Sarpy/IRFMN claaification and KNN/Read-across model	否
	CASE Ultra	EcoTox model bundle	否
水生無脊椎動物 (水蚤) 的 短期毒性	T.E.S.T.	Daphnia magna LC ₅₀	是
	Danish QSAR Database	Daphnia magna 48h EC ₅₀ from DTU	是
	ECOSAR	Daphnia, 48-hr, LC ₅₀	是
	ADMET Predictor	Toxicity module	否
	Discovery studio	Daphnia EC ₅₀	否
	VEGA	Daphnia magna LC ₅₀	否
水生無脊椎動物 (水蚤) 的 長期毒性	ECOSAR	Daphnia ChV	是
水生植物 (水藻) 的毒性	Danish QSAR Database	Pseudokirchneriellas. 72h EC ₅₀ from DTU	是
	ECOSAR	Green algae, 96-hr, EC ₅₀	是
陸生無脊椎動物 的短期毒性	ECOSAR	Earthworm, 14-day, LC ₅₀	是
四、毒理學的測試終點			
急毒性	T.E.S.T.	Oral rat LC ₅₀	是
	Danish QSAR Database	Models for acute toxicity in rodent from ACD/Labs	是
	ADMET Predictor	Toxicity module	否
	ACD/Percepta	Acute toxicity module	否
	Discovery studio	Rat oral LD ₅₀ and rat inhalation toxicity LC ₅₀	否
	CASE Ultra	AcuteTox model bundle	否

表 4.1-1 與 REACH 定義之測試終點相關的 QSAR 模型 (3/4)

測試終點	使用軟體	QSAR 模型 / 模組	是否公開 免費使用
皮膚刺激或 腐蝕性	Danish QSAR Database	Skin irritation model	是
	OECD QSAR Toolbox	Skin irritation/corrosion inclusion rules by BfR	是
	Toxtree	Skin irritation/skin corrosion	是
	ACD/Percepta	Irritation module	否
	Discovery studio	Skin irritancy	否
	CASE Ultra	SkinEye toxicity model bundle	否
	Derek	Irritation alerts	否
眼睛刺激性	OECD QSAR Toolbox	Eye irritation/corrosion inclusion rules by BfR	是
	Toxtree	Eye irritation and corrosion	是
	ACD/Percepta	Irritation module	否
	Discovery studio	Ocular irritancy	否
	CASE Ultra	SkinEye toxicity model bundle	否
	Derek	Irritation alerts	否
皮膚敏感性	VEGA	CAESAR model	是
	Danish QSAR Database	Allergic contact dermatitis model	是
	OECD QSAR Toolbox	Protein binding alerts for skin sensitization by OASIS	是
	Toxtree	Skin sensitization reactivity domains	是
	ACD/Percepta	Irritation Module	否
	Discovery studio	Skin sensitization	否
	CASE Ultra	SkinEye toxicity model bundle	否
	Derek	Skin sensitization	否
	TIMES	Skin sensitization with autoxidation	否
重複劑量毒性	ADMET Predictor	Toxicity module	否
	Discovery studio	Rat chronic LOAEL	否
	CASE Ultra	Several model bundles associated with repeated dose toxicity	否
	Derek	Several endpoints associated with repeated dose toxicity	否
	Leadscope	Several models associated with repeated dose toxicity	否

表 4.1-1 與 REACH 定義之測試終點相關的 QSAR 模型 (4/4)

測試終點	使用軟體	QSAR 模型 / 模組	是否公開 免費使用
細菌中體外 基因突變 (Ames 試驗)	T.E.S.T.	Mutagenicity	是
	VEGA	CAESAR, Sarpy/IRFMN, ISS and KNN/read-across models	是
	Danish QSAR Database	Model for Ames test	是
	OECD QSAR Toolbox	Several profilers associated with this endpoint	是
	Toxtree	<i>In vitro</i> mutagenicity alerts by ISS	是
	ACD/Percepta	Genotoxicity module	否
	Discovery studio	Ames mutagenicity	否
	CASE Ultra	Bacterial mutagenicity model bundle	否
	Derek and Sarah	Mutagenicity <i>in vitro</i>	否
	Leadscope	Genetox expert alerts suite and non-human genetic toxicity suite	否
	TIMES	Ames mutagenicity	否
致突變性	Danish QSAR Database	Models for gentoxicity endpoints	是
	OECD QSAR Toolbox	Several profiles associated with mutagenicity	是
	Toxtree	Several decision trees associated with mutagenicity	是
	CASE Ultra	EcoTox model bundle	否
	Derek	Chromosome damage <i>in vitro</i>	否
	Leadscope	Non-human genetic toxicity suite	否
	TIMES	Several decision trees associated with mutagenicity	否
生殖毒性	VEGA	CAESAR and PG models	是
	Danish QSAR Database	Models for endocrine endpoints and model for teratogenic potential in humans	是
	ADMET Predictor	Toxicity module	否
	Discovery studio	Developmental toxicity potential	否
	CASE Ultra	Several models bundle associated with reproductive and developmental toxicity	否
	Derek	Several models bundle associated with reproductive and developmental toxicity	否
	Leadscope	Several models associated with reproductive and developmental toxicity	否
	TIMES	Androgen, AHR and Estrogen binding affinity models	否

一、丹麥 QSAR 資料庫 (Danish QSAR Database)

Danish QSAR Database 是一個由丹麥技術大學國家食品研究所 (National food institute, Technical University of Denmark) 開發的網站 (National food institute)，並獲得丹麥環境保護署、北歐理事會 (Nordic Council of Ministers) 與 ECHA 的支持，目的為向工業界、研究人員、政府或其他機構提供在網際網路上有關化學物質的危害資訊的探索，尤其是沒有或只有少許測試數據的化學物質危害資訊，助於識別潛在關注的化學物質。在使用上，Danish QSAR database 可以選擇輸入化學物質的 CAS 編號 (CAS No.)、REACH 註冊編號、PubChem CIDs、或自行繪畫出化學物質的結構，並輸入目標預測終點與模型，即可計算測試終點預測值。

Danish QSAR Database 為 QSAR 模型的數據庫，可以預測超過 600,000 個化學物質，其中 QSAR 模型可以預測包括物理化學特性、環境宿命、生物累積、生態毒理、吸收、代謝與毒性的測試終點，並利用 Leadscope、CASE Ultra 與 SciQSAR 模型進行試驗組合法 (battery approach) 綜合評估以上方法的預測值，以減少各個模型預估的誤差，從而提高預測的準確性或擴大適用範圍。

二、生態結構活性關係模式 (ECOSAR)

生態結構活性關係 (Ecological Structure Activity Relationships, ECOSAR) 是由美國環保署污染預防與毒理辦公室 (US EPA/OPPT) 開發用於評估水生毒性的 QSAR 軟體，其開發目的是向工業界或其他利益相關業者提供在沒有實驗數據的情況下去評估化學物質水生毒性的工具，以減輕 US EPA 在評估化學物質的工作。在使用上，ECOSAR 需要輸入化學物質的 CAS No. 或 SMILES (simplified molecular-input line-entry system) 字串即可計算毒性預測值。

ECOSAR 本身為一個可以預測水生毒性的分類基礎 (class-based) QSAR 資料庫，當中分類化學物質的方法為使用化學物質鑑別的專家決策樹 (expert decision tree) 進行分類，經過演算後可以識別 111 種化學物質類別，當中包含了 704 個 QSAR 模型，而 ECOSAR 預測的水生毒性測試終點可以分為水生急毒性與水生慢毒性。其中水生急毒性試驗終點包含：魚類 96 小時半致死劑量、水蚤 48 小時半致死劑量與藻類 72 小時或 96 小時半致死劑量。而水生慢毒性試驗終點涵蓋魚類慢毒性、水蚤慢毒性及藻類慢毒性。

ECOSAR 收集大量來自 ECOTOX 數據庫的生態毒性研究數據，並確保 ECOTOX 的生態毒性數據是特定條件下收集的，其條件為 pH 7、總有機碳含量不超過 2 mg/L 及水硬度約在 150 mg/L。

而這些收集的數據會按照 ECOSAR 的專家決策樹上進行分類，並針對每個類別的物質建立毒性值與辛醇-水分配係數的線性迴歸模型，當中的辛醇-水分配係數是利用 EPI suite 的 KOWWIN (Meylan and Howard, 1995) 模組計算，而 ECOSAR 在不同水生物種的辛醇-水分配係數都有一個範圍，符合該範圍與分子量<1,000 g/mol 的化學物質預測表現最佳；不符合該標準或在結構上與 ECOSAR 中每個 QSAR 模型的結構不同的化學物質，都被視為不在適用範圍內。

三、毒性預測軟體工具 (T.E.S.T)

毒性預測軟體工具 (T.E.S.T.) 是 US EPA 旗下的國家風險管理研究實驗室 (the National risk management research laboratory) 與民間機構合作開發的 QSAR 軟體，目的為以快速低成本的方法來預測化學物質對環境帶來的衝擊。在使用上，T.E.S.T.可以輸入化學物質的 CAS No.、SMILES 或自行繪畫出化學物質的結構，並輸入目標預測終點與模型，即可計算測試終點預測值。

T.E.S.T.可使用 6 種 QSAR 模型對測試終點進行預測，而這 6 種 QSAR 模型分別為：

(一) 分層方法 (Hierarchical method)

通過使用 Ward 的分群組法把訓練集中結構相似的化學物質分群，每個分群都分別利用基因遺傳演算法 (genetic algorithm) 建立 QSAR 預測模型，而目標化學物質的毒性預測是利用該物質結構與訓練集化學物質結構的相似性，挑選不同的 QSAR 預測模型，再把預測值加權平均而得出的。

(二) 單模型方法 (Single-model method)

單模型方法是利用訓練集化學物質的毒性與分子描述符建立出的多線性迴歸模型。

(三) 群體貢獻方法 (Group contribution method)

群體貢獻方法是利用訓練集化學物質的毒性與分子片段計數建立出的多線性迴歸模型。

(四) 最近鄰法 (Nearest neighbor method)

透過採用訓練集中與測試化學品最相似的三個化學物質的平均值來估計預測的毒性。

(五) 共識方法 (Consensus method)

透過採用上述每種 QSAR 方法的預測毒性的平均值來估計預測的毒性。

(六) 作用方式 (Mode of action method)

使用兩步法計算預測的毒性，只用在 96 小時黑頭呆魚半致死濃度：

1. 線性判別模型用於預測水生毒性作用模式。
2. 使用開發的多元線性迴歸模型預測定量毒性這種行動方式。

以上這些 QSAR 模型開發所使用的描述符都是使用化學開發套件 (the chemistry development kit, CDK) 中的二維描述符，描述符包括以下類別：E-state 值、E-state 計數、結構描述符、拓撲描述符、分子性質 (例如辛醇-水分配係數)、氫鍵受體或供體數、分子距離與分子片段數等，共 797 個描述符號。

四、全球架構化學物質性質評估虛擬模型 (VEGA)

VEGA 是由馬里奧內格里藥理研究所 (Istituto di ricerche farmaco logiche mario negri) 與數十家研究機構聯合開發的 QSAR 軟體，開發目的為符合 REACH 監管目的提供免費 QSAR 模型的預測平臺，在使用上，需要輸入化學物質的 SMILES 字串，並輸入目標預測終點與模型，即可計算測試終點預測值 (Benfenati Manganaro et al., 2013)。VEGA 免費提供數十種屬性 QSAR 模型，例如 $\log K_{ow}$ 、生物濃縮因子 (BCF)、致癌性與誘變性等，VEGA 對水生生態及毒性的預測 QSAR 模型主要以下列模型為主：

(一) 魚類水生急毒性

1. 魚類急毒性模型 (NIC)：由斯洛文尼亞國家化學研究所 (national institute of chemistry slovenia, NIC) 建立為反向傳播人工神經網路 (counter propagation artificial neural network) (Su Liu et al., 2014)，該模型以 946 個化學物質為基礎建立。
2. 魚類急毒性模型 (KNN／交叉參照)：馬里奧內格里藥理研究所開發，利用 istKNN 的應用程式計算在 VEGA 內訓練集中化學物質的相似性，再以交叉參照的方法求得目標化學物質的測試終點。
3. 魚類急毒性模型 (IRFMN/Combase)：利用 CORAL 的軟體 QSAR 模型進行預測，該 QSAR 模型為單線性迴歸方程。
4. 黑頭呆魚 96 小時 LC_{50} 魚類急毒性模型 (EPA)：基於 T.E.S.T.單模型以建立的 QSAR 模型。

(二) 水蚤水生急毒性

1. 水蚤毒性模型 48 小時 LC_{50} (EPA)：基於 T.E.S.T.單模型以建立的 QSAR 模型。
2. 水蚤毒性模型 48 小時 LC_{50} (DEMETER)：基於” Quantitative structure-activity relationship (QSAR) for pesticide regulatory purposes (Science, 2007)” 的多元線性方程。

(三) 藻類水生急毒性

藻類水生急毒性 EC_{50} (PhotoQSAR/Combase)：馬里奧內格里藥理研究所開發，基於支持向量機法建立的 QSAR 模型，總共有 650 個化學物質作為數據集。

4.1.3 OECD 驗證 QSAR 模型的 5 大原則

由於 QSAR 模型開發簡單且使用方便，因此，愈來愈多的 QSAR 模型使用在不同領域上，若 QSAR 模型需要使用在監管目的，則需要統一驗證 QSAR 模型有效性的方法 (OECD, 2005)。因此，2004 年 11 月，OECD 第 37 屆化學委員會聯席會議與化學、農藥和生物技術工作組協定了 OECD 出於監管的目的，對 QSAR 預測模式作出統一的驗證，該會議提出在解釋和應用 OECD 原則時都需要保有一定的靈活性，主要因為把 QSAR 模式適當的融合到任何類型的監管/決策框架中取決於特定監管機構的需求與約束 (OECD, 2006)。其驗證原則包含 5 項，明確的測試終點、明確的演算法、模型的適用範圍、模型的合適度、穩健性和預測性、機制的闡述，以下簡介 5 項驗證原則。

一、OECD 驗證原則 1—明確的測試終點

根據 OECD 驗證原則 1，QSAR 模型應用「明確的測試終點」相關，該測試終點是指可以測量並因此建模的任何物理化學特性、生物效應（人類健康或生態）與環境宿命參數；OECD 驗證原則 1 的目的為確保測試終點具有透明性，因為測試終點可以通過不同的實驗協議和不同的實驗條件來確認；同時，對於評估 QSAR 模型在特定監管目的的有效性上，透明度確實是監管機構的基本要求，並且 QSAR 模型的預測終點與監管目的越一致時，QSAR 模型對該監管目的下的化學物質有更可靠的預測。

為確立測試終點透明性，QSAR 模型建模的數據應使用同一實驗協議生成的實驗數據，該實驗協議以符合監管目的的實驗協議為佳，如 OECD 的《篩選資訊數據集》(screening information data set, SIDS)，包括各種 OECD 測試指引用於評估現有化學物質。

二、OECD 原則 2—明確的演算法

根據 OECD 驗證原則 2，QSAR 模型應以明確算法的形式表示，其目的是確保模型演算法為可用的並確保運算過程的透明性和重複性；對於不可驗證其運算過程與不能再現其預測結果的演算法是難以被監管機構接受，特別是使用非透明且難以複製的方法來構建的 QSAR 模型（例如使用許多結構描述符的人工神經網路）的情況下，需要採取特殊的預防措施。

由於在預估化學物質的測試終點時可能需要多個步驟，因此清楚描述各步驟使用的演算法非常重要。事實上，化學分類（chemical classification）的演算法是分子描述（molecular descriptor）和計算測試終點預測值可能涉及統計學、物理、化學和毒理學等領域的專業知識，但是 OECD 驗證原則 2 並非只在暗示 QSAR 建模的演算法需要包含這些科學領域的專業知識，而是在許多情況下，可以提供對演算法描述，不必深入研究數學或統計學用於開發演算法的方法。

三、OECD 原則 3—模型的適用範圍

根據 OECD 驗證原則 3，QSAR 模型應與定義的適用範疇相關，其目的為表達 QSAR 模型作為還原模型論（reductionist model），無可避免的會被化學結構特性、物理化學特性和作用機制等參數限制，而 QSAR 模型可以針對這些受限作出可靠的預測。對於 QSAR 模型的可靠性並沒有一個絕對的界線，而是在適用範疇的限制與多種化學物質的預測可靠性之間作出權衡，適用範疇的受限越少，模型可預測的化學物質種類越多，其模型的預測將不太可靠；適用範疇的受限越多，被排除的化學物質越多，其模型的預測則沒有代表性，決定適用範疇的要求取決於 QSAR 模型在何種情況下使用。

理想狀況下，適用範圍應該明確定義模型中的化學結構、物理化學特性與預測值的範疇，因為可靠的預測化學物質的最佳保證是確認該化學物質的結構片段（結構領域）、描述符值（物理化學領域）或預測值（預測值領域）而不是離群值（outlier）。事實上，即使化學物質位於模型已建立的結構和物理化學範疇內，預測結果也有不確定性（即目標化學物質通過不同的作用機制且不再 QSAR 模型考量之中的作用機制）。在這種情況下，模型應加入 OECD 驗證原則 5 的應用。

四、OECD 原則 4—模型的合適度、穩健性和預測性

根據 OECD 驗證原則 4，QSAR 模型應與擬合程度、穩健性和預測性的適當度量有關；該原則表示 QSAR 模型需要提供兩種統計驗證的資訊：

1. 內部驗證：通過使用訓練集確定模型的內部性能（以擬合程度和穩健性表示）
2. 外部驗證：通過使用適當的測試集確定模型的可預測性

在開發監管目的測試終點的 QSAR 模型時，會收集各種代表性化學品的數據集，若測試終點數據有足夠數量的化學物質資料，該數據集通常分為訓練集與測試集，前者為用於通過應用統計方法得出模型；後者為未在模型推導中使用但用於評估模型的化學物質。

訓練集建立的模型會對其模型本身作穩定性測試，而穩定性指的是模型統計參數的穩定性，指在訓練集中刪除一個或多個化學物質後，模型預測的穩定性。其後，訓練集建立的模型會對訓練集和測試集進行預測，用來評估模型的預測準確性，而模型的預測準確性是利用給定化學物質的預測值和實驗值的相關性來計算，預測值與實驗值相關性越高，則模型為高預測準確性，更有可能成為可靠的預測模型。

訓練集中化學物質的預測值用於評估模型的擬合程度，也是衡量模型對訓練集中不同預測值的整合程度，若新化學物質的預測值在訓練集的預測值範疇內，則為內插法（interpolation）；反之則為外推法（extrapolation）。為提高模型的擬合程度，可以從訓練集中的預測值範疇內刪除預測值，但必須有所依據，因在預測值範疇內刪除越多預測值，預測模型就越不可靠。測試集中化學物質的預測值用於評估模型的預測能力，這是模型對於新數據的預測能力的衡量標準，同時，測試集中的化學物質資料不能與訓練集重複。

五、OECD 原則 5—機制的闡述

根據 OECD 驗證原則 5，QSAR 應該與作用機制相關，前提為模型的建立與作用機制可以解釋。事實上，並非總是能夠對 QSAR 模型進行作用機制的解釋，因為 QSAR 模型的建立是一個迭代過程，涉及數據的統計、假設生成和假設檢驗，而迭代過程通常會導致對訓練集進行一系列改進，包括所含化學物質和化學物質的分子描述兩個方面，這使得最後建立模型的描述符並不能充分闡述化學物質的作用機制；數據挖掘（Data mining）建立的 QSAR 模型有比較好的表現，但有文獻提到這 QSAR 模型通常不會考慮訓練集的作用機制。因此，表現較好的 QSAR 模型可能缺乏作用機制的闡述，可能因為該模型處於建立的早期階段，或因為尚未從文獻中彙編應用領域的作用機制要素。因此 OECD 驗證原則 5 目的是確保對模型中使用的描述符和預測的測試終點之間有對化學物質的作用機制進行考量，而在可以進行作用機制解釋的地方，可以增強對根據驗證原則 1-4 所建立模型的信心。

4.2 電腦模擬模式試行毒理及生態毒理項目資料推估

4.2.1 進行電腦模擬及體外測試的化學物質選定

新化學物質：為使用新化學物質進行 QSAR 模型的驗證，從已完成登錄的 63 個新化學物質中，排除 UVCB 物質、複雜多組成物質、聚合物及含金屬物質，最後選擇 7 個單一組成的新化學物質（物質 A-G）。由於新化學物質辨識資訊是否公開牽涉業者保密程度，因此在報告中不揭露任何可能導致物質辨識與測試結果連結的資訊，僅以物質 A-G 代稱。物質資訊與結果的連結將會以其他形式提供主管機關參考。

既有化學物質：為進行有效的 QSAR 模型驗證及 IATA 之研發，另外收集國內 106 個既有化學物質清單中 QSAR 可預測的有機化學物質，經分析，106 個既有化學物質中有 82 個適合做預測的有機物質，共排除了 24 個物質，包含石油化學混合物中的 2 個物質（加氫處理輕（石油）及加氫處理重（石油））、1 個聚合物與 21 個無機化學物質。

7 個進行電腦模擬驗證的既有化學物質從環保署所公告的 106 個須優先完成標準登錄作業物質當中挑選，考量到這些物質於工業上使用量高、國內流通較廣泛、潛在危害性較高等特性，且物質分類為電腦模擬預測模式之重要理論基礎，故規劃以此 106 個化學物質為基礎，並進一步運用幾個在 QSAR Toolbox 中常被用在生態毒理學的物質分類方法，包含（1）維哈分類法（Acute aquatic toxicity classification by Verhaar）、（2）作用模式分類法（Acute aquatic toxicity MOA by OASIS）、（3）ECOSAR 分類法（Aquatic toxicity classification by ECOSAR）等，以篩選出具有更多分類理論基礎所支持之化學物質做為後續驗證替代測試方法可行性之待測物。以下說明各分類方法之考量依據。

一、維哈分類法（Acute aquatic toxicity classification by Verhaar）

本方法係以風險評估的方式進行分類，原本是針對中小型分子的有機化合物做分類，經過改良後可將物質分成 5 個種類，包含（1）惰性物質（inert chemicals），由於不易做實驗，因此用電腦預測的理論毒性（baseline toxicity）代表該物質的毒性；（2）弱反應物質（less inert chemicals）；（3）具反應性物質（reactive chemicals）；（4）特殊條件反應物質（specifically acting chemicals）；（5）無法分類的物質（unclassified chemicals），維哈分類法是水生生物毒性

物質常使用的分類法，但該分類法仍然有部份的缺點，像是許多工業常用的物質皆被分為第 5 類，而且在第 4 類及第 5 類的物質涵蓋了不同毒性和作用模式的物質，因此使用其他分類法來輔助是有必要的。

二、作用模式分類法 (Acute aquatic toxicity MOA by OASIS)

由於不同的物質特性可以分類出不同的作用模式(mode of action, MOA)，QSAR Toolbox 即結合急毒性作用模式以及 2D 結構(平面結構)分析，將化學物質主要分為以下 7 個種類：醛 (Aldehydes)、 α, β -不飽和醇 (α, β -unsaturated alcohols)、苯酚和苯胺 (Phenols and Anilines)、酯 (Esters)、含胺麻醉性物質 (Narcotic Amine) 和表面結構麻醉性物質 (Basesurface narcotics)。該分類方法主要針對魚類毒性設計，最大的優點是分類是以毒性的 MOA 作為依據，然而使用在其他水生生物時則應進一步確認關聯性是否充足。由於本次預測標的不僅僅針對魚類，也包含生產者和初級消費者，因此不單一使用 MOA 的分類法，而是做為多種分類方法的一環。

另外在本分類方法中，麻醉性物質屬於一種非特定性反應(nonspecifically acting)物質，在魚類毒性反應相關文獻中曾提到：對於魚類具有麻醉性之物質指的是，當魚類暴露於比該物質半數致死濃度(LC₅₀)低的濃度之下，會陷入假死狀態，而濃度再提高到超過 LC₅₀時魚類則會進入深層昏迷甚至導致死亡之結果，對於魚類而言，麻醉性物質造成的假死狀態是「可逆的」，和一般直接造成魚類死亡的閾值是不一樣的，所以在其他分類法中麻醉性物質常被稱之為非特定性反應物質，目前科學家對此類物質造成魚類麻醉的作用機制尚無明確研究結果，不過，目前最可靠的假說是麻醉性物質經由水體環境進入魚體內，接著部分進入到細胞中，造成細胞膜上的受體功能失常才導致所看到的假死狀態 (Gary M., 1995)。

三、ECOSAR 分類法 (Aquatic toxicity classification by ECOSAR)

本方法係由歐洲 LMC 實驗室和 OECD 仿效美國環境保護署 ECOSAR 計畫所開發的，而且主要是針對水生生物毒性分類之需求所設計的，本方法應用了決策樹做為評估化合物化學特性並進行分類和歸類之基礎。ECOSAR 主要目的為進行化學物質的分類，而非用於預測化學物質的毒性。此分類法的主要演算法係由美國環保署的 EPI Suite 模式所提供，並已內建於 OECD 所開

發的 QSAR Toolbox 中。ECOSAR 分類法最大的優點是其根據實驗數據所建立的多種分類群組。然而其缺點則是，若物質不屬於任何分類時，常被分類到特定群組，例如：中性有機物（neutral organic），可能導致這類物質不具有實驗證據的支持。另外同個物質也可能被分類到多種類別，因此使用時也建議進行保守評估，例如使用最低預測值的類別。

初步運用前述三種分類方法針對環保署化學局指定應優先辦理標準登錄作業的 106 個化學物質進行分類，結果如圖 4.2-1 所示，其中使用維哈分類法可辨識出約 43.4%的物質，作用模式分類法則可辨識出 44.3%的物質，而 ECOSAR 分類法則可辨識出 67.9%的物質，由於上述三種分類方法皆具有其優點及缺點，使用聯集的方式對物質進行是否可分類的辨識，總計共有 30 個物質可以被水生生態三種常用分類法共同辨識。

物質的篩選如圖 4.2-2，採用環保署化學局指定應優先辦理標準登錄作業的 106 個化學物質，初步排除不適合應用於 QSAR 模式的 24 個物質（涵蓋 21 個無機化學物質、1 個聚合物及 2 項石油化學物質）；後續與圖 4.2-2 之結果比對，從此 82 個物質中排除無法共同被 QSAR Toolbox 水生毒性三種分類共同辨識之物質，剩下 30 種物質；接著依序排除共 11 個先前於「化學物質毒理及生態毒理資訊與風險評估技術建置計畫」當中已驗證過之物質。由於水溶解度低的物質不適合進行體外試驗，同時排除溶解度低的 12 個物質。最終挑選出 7 個溶解度較高且適合進行魚類急毒性試驗之既有物質進行斑馬魚胚胎替代測試及 QSAR Toolbox 與 ECOSAR 等電腦模擬預測模式方法之可行性驗證作業，如表 4.2-1，後續實驗將從上述篩選出之 7 個之既有物質中選擇至少 5 個物質進行。

表 4.2-1 最終挑選 7 個溶解度較高之化學物質

編號	CAS No.	中文名稱	英文名稱
物質 H	111-76-2	2-丁氧基乙醇	2-Butoxyethanol
物質 I	95-48-7	鄰甲酚	o-Cresol
物質 J	108-94-1	環己酮	Cyclohexanone
物質 K	108-91-8	環己胺	Cyclohexylamine
物質 L	111-15-9	乙酸 2-乙氧基乙酯	2-Ethoxyethyl acetate
物質 M	98-00-0	2-呋喃甲醇	Furfuryl alcohol
物質 N	108-95-2	苯酚	Phenol

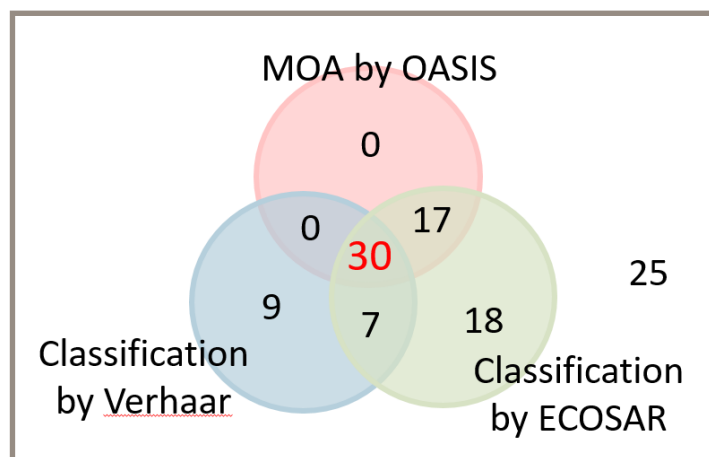
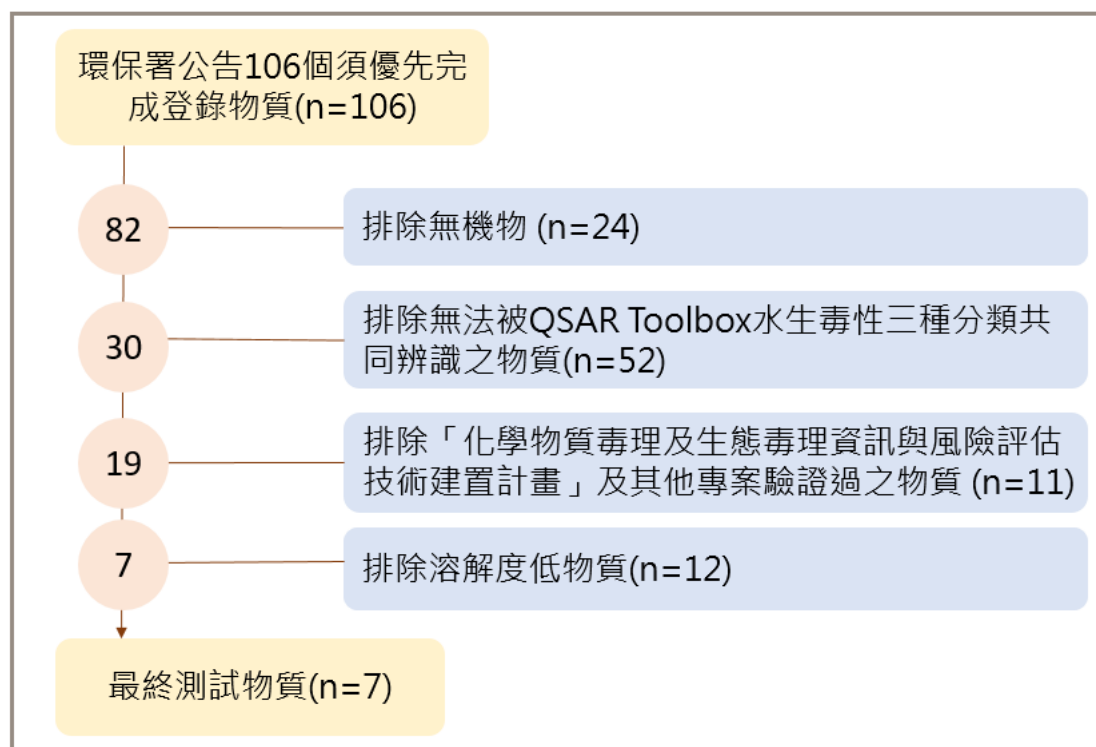


圖 4.2-1 國內優先指定登錄 106 個化學物質之物質分類結果示意圖



註：24 個無機物組別涵蓋 21 個無機化學物質、1 個聚合物及 2 項石油化學物質

圖 4.2-2 最終 7 個測試化學物質篩選流程

4.2.2 測試終點與模式選擇

近年來國際社會已逐步推廣替代測試方法，許多先進國家或管理組織亦致力於替代測試之發展及應用，如 2020 年 6 月 ECHA 發布的技術報告中闡述，建議可於 REACH 法規中使用過往之數據、證據權重法 (WOE)、體外試驗 (*in vitro*)、電腦模擬 (*in silico*) 等非動物試驗方法。然而國際上普遍認為，部分替代測試方法其單一數據難以替代完整之動物試驗，通常需使用 2 種以上不同的替代測試結果來提供更完備的證據，而整合型測試評估方法 (IATA) 及證據權重法可於較完善的證據下，進行更有效益的替代。許多毒理及生態毒理之替代測試試驗已逐步為各國所採納應用，我國應因應國情選擇適宜之替代測試方法，將其適當地調修後應用於毒理及生態毒理資訊，以符合動物福祉的精神來評估化學物質的危害及風險。

替代測試建議方法驗證作業如圖 4.2-3 (毒理) 及圖 4.2-4 (生態毒理)，執行成果如下說明，包含驗證化學物質的篩選與相關替代測試方法之介紹。其中針對後者將以毒理及生態毒理學毒性資訊作為探討標的，並擇定常用的 QSAR 模型，進行五大原則驗證資料之收集 (如明確的測試終點、明確的演算法、適用範圍、內部/外部驗證等)，涵蓋 OCDE QSAR Toolbox、ECOSAR、T.E.S.T、Danish QSAR database 及 VEGA，作為方法驗證對象。最後，對於生態毒理測試終點，透過國外已廣泛使用且符合替代測試精神之斑馬魚胚胎急毒性 (體外試驗) 和本年驗證之 QSAR 模型，整合成整合型測試評估方法。預計以 3 項生態毒理項目，包含：魚類短期急毒性、水蚤短期毒性及水藻類之毒性，再藉由斑馬魚胚胎急毒性試驗進一步驗證，藉以篩選預測生態毒性。據此建立替代測試 QSAR 模型評估工具及整合型測試評估方法之作業範例。

針對毒理測試終點，選定 7 個已完成登錄之新化學物質及 7 個既有化學物質作為驗證目標，並透過 OECD QSAR Toolbox 及 Danish QSAR Database 電腦模擬模式來預測毒理資訊，根據《既有化學物質標準登錄資料撰寫指引》中，9 種毒理學測試終點涵蓋急毒性 (吞食、吸入、皮膚)、皮膚刺激或腐蝕性、眼睛刺激性、皮膚敏感性、重複劑量毒性 (吞食、吸入、皮膚)、基因毒性、基礎毒物動力學、致癌性及生殖/發育毒性，其中眼睛刺激性、基礎毒物動力學及致癌性不在 Danish QSAR Database 的範疇中，並且針對之新化學物質屬於標準登錄第 1 級至 2 級，重複劑量毒性與生殖/發育毒性並不在登錄要求中，故針對 5 項標準登錄一級所需之

毒理測試終點進行預測能力評估，著重於預測模式準確性的驗證，透過預測值與實驗值相比較，以分級準確率研析 QSAR 模型推估毒性之效能，並提出我國化學物質登錄中毒理資訊電腦模擬預測之適用性建議。

對於生態毒理測試終點，以 QSAR 對相同 7 個新化學物質及 7 個既有化學物質進行 3 項生態毒理測試終點預測，包含魚類短期急毒性、水蚤短期毒性及對水藻毒性（圖 4.2-5）。

另因單一證據難以完整替代毒性資訊，使用 QSAR 電腦預測模式及斑馬魚胚胎毒性試驗來整合成整合型測試評估方法，冀望提升替代測試方法之預測性。由上述所選定之 7 個既有化學物質挑選出至少 5 個進行斑馬魚胚胎毒性及常規成魚急毒性試驗，並與 QSAR 電腦模擬預測模式所得之結果整合比對（圖 4.2-5）。藉由比較 QSAR 模式預測及整合型測試評估方法所推估之毒性，以評估替代方法之效能，並提出我國化學物質登錄之 QSAR 模式及整合型測試評估方法適用性建議。

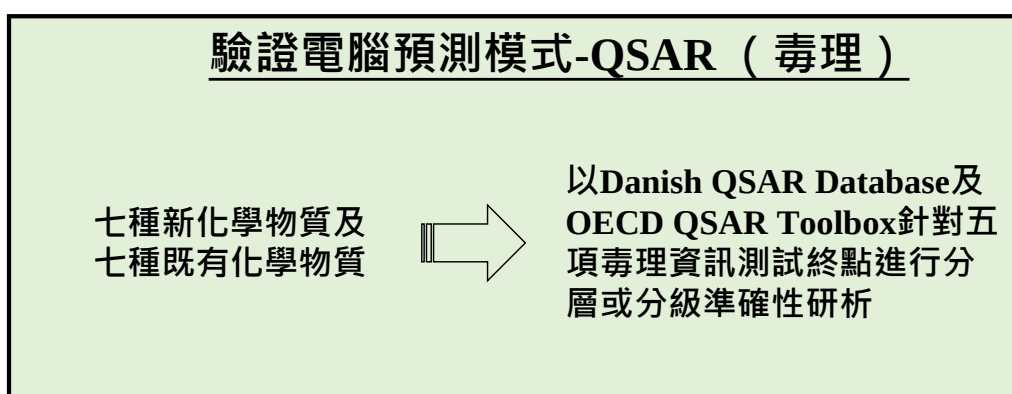


圖 4.2-3 毒理電腦模擬替代測試方法之驗證流程



圖 4.2-4 生態毒理電腦模擬替代測試方法之驗證流程

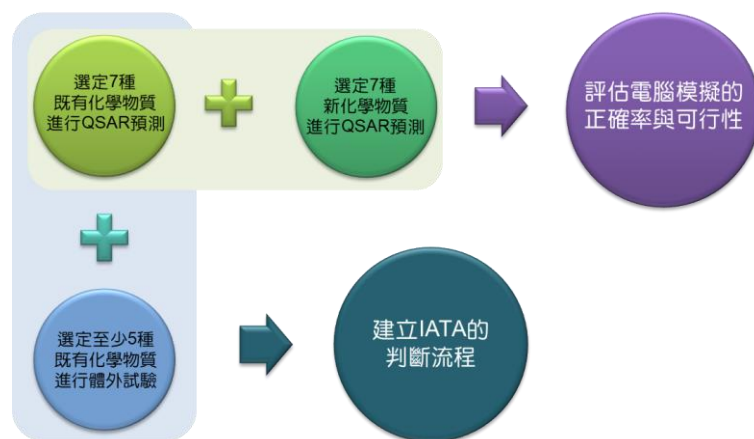


圖 4.2-5 利用電腦模擬與體外模式建立判斷流程

4.2.3 毒理電腦模擬方法之執行方法及驗證流程

為評析 OECD QSAR Toolbox 及 Danish QSAR Database 用於預測化學物質毒理資訊的可信度，工作整合流程架構如圖 4.2-6。實驗數據來源為登錄人提交資料，接下來執行 OECD QSAR Toolbox 及 Danish QSAR Database 預測 7 個新化學物質及 7 個既有化學物質的毒理測試終點，預測結果與蒐集的實驗數據比對，並以是否落在相同毒性分級來作為評估 QSAR 模型預測能力的依據。

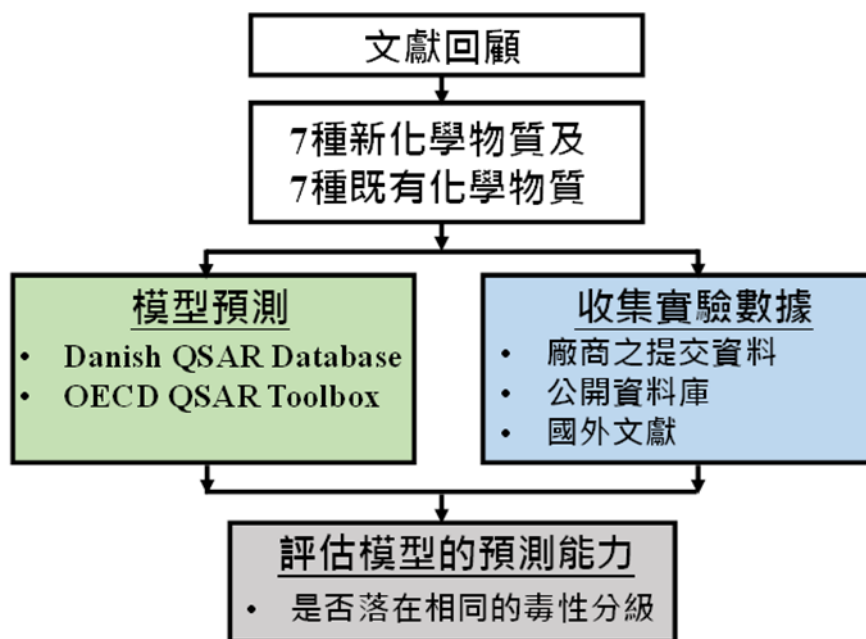


圖 4.2-6 毒理資訊之 QSAR 模型驗證方法流程架構

一、驗證流程及方法介紹

目標以 QSAR 模型（即 Danish QSAR Database 及 OECD QSAR Toolbox）對 7 個已登錄之新化學物質及 7 個既有化學物質的毒理測試終點進行驗證，而根據《既有化學物質標準登錄資料撰寫指引》，標的物質為標準登錄第 1 級，需要驗證 9 種毒理學測試終點中 5 種廠商已提交之測試終點，包含急毒性（吞食、吸入、皮膚）、皮膚刺激或腐蝕性、眼睛刺激性、皮膚敏感性、基因毒性，將這些實驗值與 OECD QSAR Toolbox 及 Danish QSAR Database 的預測值進行比對。

使用已登錄之新化學物質毒理資訊，確保其實驗值都遵守 OECD 測試指引所獲得，同時記錄該化學物質的中英文名字、CAS No.、分子量與測試終點濃度，並將收集到的實驗數據單位統一。在模式預測部分，所選用的 QSAR 模型為 OECD QSAR Toolbox 及 Danish QSAR Database。在使用 QSAR 模型皆有納入模型驗證之考量，如訓練集所含化學物質的數量必須大於/等於 10 個或 5 倍的描述符數量、明確的測試終點、明確的演算法、適用範圍、內部/外部驗證等。依據模型預測的結果報告來判斷化學物質是否在適用範圍中，QSAR Toolbox 無法判定化學物質是否在適用範圍中。預測方法簡介如下：

(一) OECD QSAR Toolbox

OECD QSAR Toolbox 操作過程分成五大步驟

1. 步驟一：定義目標物質，輸入目標化學物質辨識資訊，例如：物質名稱 CAS 編號、SMILES 或繪製物質分子結構，以此選擇需要的物質。
2. 步驟二：根據物質的身分或結構得到物質資訊，該程序分析目標物質結構，提供不同分析方法之下適當的分類規則。
3. 步驟三：選取目標物質適用的數據庫，從現有數據庫搜尋目標物質在欲預測的測試終點是否已經有登錄認可的實驗數據。
4. 步驟四：根據一個最適當的分類規則做為納入結構相似物的依據，識別可能與目標化學物質歸為一類的化學物質。
5. 步驟五：通過交叉參照 (read across)、趨勢分析 (trend analysis)、QSAR 模型或自動化 / 標準化流程來預測填補缺失的數據，預測選定的測試終點，選取 1 種方法填補數據。交叉參照使用的時機為目標物質僅發

現極少具有實驗結果的類似物，則可用於定性（qualitative）或定量（quantitative）測試終點進行預測。趨勢分析使用的時機為目標物質若鑑定出許多具有實驗結果的類似物，則用定量（quantitative）測試終點進行預測。QSAR 模型使用的時機為目標物質如果未發現具有實驗結果的類似物或未有建立證據權重的案例，最後，自動化 / 標準化流程目前可以對水生毒性（aquatic toxicity）及皮膚過敏（skin sensitization），包含了交叉參照及趨勢分析，藉由這些方法，建立預測性更好的模型以及更顯著的結果。

（二）Danish QSAR database

直接將化學物質的 CAS 編號或 SMILES 輸入到 Danish QSAR database 中的 QSAR 模式中，所選用的資料庫及方法如下：Leadscope、SciQSAR 及試驗組合法。

二、分級依據

（一）急毒性

急毒性是指物質經口腔或皮膚服用單一劑量或在 24 小時內服用多劑量，或經呼吸暴露 4 小時後，所出現的危害反應。

物質可按照表 4.2-2 所列的分級標準，根據吞食、皮膚或吸入途徑的急毒性劃入 5 種毒性分級中。急毒性用 LD₅₀（口服及皮膚）或 LC₅₀（吸入）表示或用急毒性估計值（acute toxicity estimate, ATE）表示。

（二）皮膚刺激性 / 腐蝕性

皮膚腐蝕是指對皮膚造成不可逆損傷之結果，即施用測試物質達到 4 小時後，由表皮到真皮可查覺之壞死現象。腐蝕反應特徵有：潰瘍、出血、有血的結痂，並且在觀察期 14 天結束時，皮膚、完全脫髮區域和結痂之處因漂白而褪色。應考慮通過組織病理學來評估可疑之病變。皮膚刺激則是指施用測試物質達到 4 小時後對皮膚造成可逆損傷之結果。

表 4.2-3 為物質分類標準包括指導如何在進行皮膚腐蝕和刺激動物測試之前使用評估資料，亦包括腐蝕和刺激之危害級別。同時，測試之前應考慮決定化學品腐蝕和刺激潛能之多種因素，如固態物質（粉末）

變濕時或與濕皮膚或黏膜接觸時可能變成腐蝕物或刺激物。首先應分析包括單一或重複暴露之現有人類經驗和數據，以及動物觀察和數據，因為該等提供了皮膚效應直接相關的資訊。在一些情況下，可能由結構相關化合物取得足夠資訊以做出分類決定，並且極端之 pH 值可能表示有皮膚效應，特別是在緩衝能力已知時，儘管關聯性並不差。一般來說，此種試劑預期會對皮膚產生顯著效應，假設某種化學物質經皮膚接觸具有高度毒性，則皮膚刺激性/腐蝕性研究可能不可行，因為測試物質所給予的藥劑量會遠高於中毒劑量，結果便可能導致動物死亡。如果使用之稀釋物和試驗的（動物）物種皆為相同，並已在急毒性研究中觀察皮膚刺激性及腐蝕性，而且是在極限劑量下觀察，就不需再進行附加測試，已經驗證及公認之活體外替代測試也可以用來幫助進行分類。

表 4.2-2 急毒性危害分級和定義

暴露途徑	第 1 級	第 2 級	第 3 級	第 4 級	第 5 級
吞食 (mg/kg)	5	50	300	2000	5000*
皮膚 (mg/kg)	50	200	1000	2000	
氣體 (ppm)	100	500	2500	20000	*
蒸氣 (mg/L)	0.5	2.0	10	20	
粉塵和霧滴 (mg/L)	0.05	0.5	1.0	5	

* 第 5 級的標準意圖在鑑別急毒性較低，但在某些情況下可能對脆弱族群造成危險的物質。這些物質預期會有 2,000 mg/kg~5,000 mg/kg 體重的吞食或皮膚的 LD₅₀，以及其吸入途徑之等效劑量。第 5 級的具體標準為：

- (1) 如果現有的可靠的資料證明該物質其 LD₅₀（或 LC₅₀）在第 5 級的數值範圍內，或者在其他動物或人類毒性反應中證實對人類健康有急性影響，則需將該物質歸為此級別。
- (2) 物質被歸為此級，是經過資料的外插、估計或測量，若沒有充分理由將物質劃入更具危害級別，並且：
 - 現有的可靠的資料證明對人類有顯著的毒性反應；或
 - 當以吞食、吸入或皮膚途徑測試，直到第 4 級的數值時，觀察到任何死亡；或者
 - 當測試直到第 4 級的數值時，專家判斷確認有顯著的毒性臨床徵兆（腹瀉、毛髮豎立或不修邊幅者除外）；或者
 - 專家判斷確認，在其他動物研究中，有可靠資料指出可能出現有意義的急性反應。

表 4.2-3 皮膚腐蝕性與刺激性潛力之階層式測試和評估

步驟	參數		結果		結論
1a	已有人體或動物經驗	→	具有腐蝕性	→	歸類為腐蝕性
	↓				
	不具腐蝕性則進行步驟 1b				
1b	已有人體或動物經驗	→	刺激性	→	歸類為刺激性
	↓				
	不具刺激性或無數據則進行步驟 1c				
1c	已有人體或動物經驗	→	不具腐蝕性或刺激性	→	不進行進一步之測試，不分類
	↓				
	無數據則進行步驟 2a				
2a	結構－活性相關或結構－性質相關 (SAR/SPR)	→	腐蝕性	→	歸類為腐蝕性
	↓				
	不具腐蝕性或無數據則進行步驟 2b				
2b	結構－活性相關或結構－性質相關 (SAR/SPR)	→	刺激性	→	歸類在刺激性
	↓				
	不具刺激性或無數據則進行步驟 3				
3	具緩衝作用之 pH 值	→	pH ≤ 2 或 pH ≥ 11.5	→	歸類為腐蝕性
	↓				
	不是 pH 極端值或無數據則進行步驟 4				
4	有動物皮膚數據指出無須進行動物測試	→	是	→	可能無須進一步測試就可認定是腐蝕/刺激性
	↓				
	無跡象或無數據則進行步驟 5				
5	有效與公認之皮膚腐蝕之體外測試	→	陽性反應	→	歸類為腐蝕性
	↓				
	陰性反應或無數據則進行步驟 6				
6	有效與公認之皮膚刺激之體外測試	→	陽性反應	→	歸類為刺激性
	↓				
	陰性反應或無數據則進行步驟 7				
7	皮膚刺激之活體測試 (單隻實驗動物)	→	腐蝕性反應	→	歸類為腐蝕性
	↓				
	陰性反應則進行步驟 8				
8	皮膚刺激之活體測試 (3 隻實驗動物)	→	非刺激性反應	→	歸類為刺激性
	↓				
	陰性反應則不需要進一步測試，不分類。並進行步驟 9				
9	進行人體貼膚測試且合乎理論時	→	刺激性反應	→	歸類為刺激性
	↓				
	以上皆否，則屬於非刺激性反應，不需要進一步測試，不分類。				

使用該化學品前應取得所有上述中之資訊，以確定活體內皮刺激測試之需要，雖然取得資訊可能藉由評估 1 種層次內單一變項，例如有極端 pH 值之苛性鹼應視為皮膚腐蝕性物質，但考慮到現有的全部資訊，並確定整體證據權重仍然很有價值。當一些參數而不是所有參數都有資料時更是如此，一般來說，首要的重點應放在現有之人類經驗和數據上，其次則是動物經驗和測試數據，最後才是其他來源之資訊，但是依個案情況應對仍是必要的。

(三) 眼睛刺激性

眼睛刺激性指在眼睛前段表面施加測試物質之後，對眼睛產生在施用 21 天內完全可逆之變化。而嚴重眼睛損傷則是指在眼睛前段表面施加測試物質之後，對眼睛造成在施用 21 天內並不完全可逆之組織損傷，或嚴重之視覺物理衰退。

表 4.2-4 為眼睛刺激性測試應使用分層測試和評估方案，將先前已有之有關嚴重眼睛損傷或眼睛刺激性之資訊（包括與以往人類或動物經有有關資料）以及對結構-活性關係或結構-性質關係之考慮和有效活體體外驗證結果結合起來，以避免不必要之動物測試。

(四) 皮膚過敏性

皮膚過敏性物質為皮膚接觸後會引起過敏反應之物質，過敏性包括兩階段，第 1 階段為個人暴露於過敏原導致特定化的免疫系統記憶，第 2 階段為誘發期，即過敏的個人暴露於過敏原產生細胞媒介或抗體媒介之過敏反應。

表 4.2-5 為皮膚過敏性的危害級別分類，在主管機關未要求次級分類或次級分類數據不充分的情況下，皮膚過敏性物質應歸類為第 1 級，若已掌握充分數據且主管機關有要求，將皮膚過敏性物質在分級為 1A 次級別、強過敏性物質，或 1B 次級別、其他過敏性物質。

表 4.2-4 嚴重眼睛損傷和眼睛刺激之測試和評估政策

步驟	參數		結果		結論
1a	過去人類或動物經驗之相關數據		嚴重眼睛損傷	→	第一級
	↓		眼睛刺激	→	第二級
	沒有或不知道則進行步驟 1b				
1b	過去人類或動物經驗之相關數據	→	皮膚腐蝕	→	未對眼睛效應做評估： 視為第一級
	↓				
	無或不知道則進行步驟 1c				
1c	過去人類或動物經驗之相關數據	→	皮膚刺激	→	未對眼睛效應評估： 視為第二級
	↓				
	無或不知道則進行步驟 2a				
2a	結構－活性相關或結構－性質相關（SAR/SPR）	→	皮膚刺激	→	未對眼睛效應評估： 視為第二級
	↓				
	無或不知道則進行步驟 2b				
2b	結構－活性相關或結構－性質相關（SAR/SPR）	→	眼睛刺激	→	未對眼睛效應評估： 視為第二級
	↓				
	無或不知道則進行步驟 2c				
2c	結構－活性相關或結構－性質相關（SAR/SPR）	→	皮膚腐蝕	→	未對眼睛效應評估： 視為第一級
	↓				
	無或不知道則進行步驟 3a				
3a	pH 值／酸性或鹼性儲備物	→	pH $\geq$ 11.5 或 $\leq$ 2 （考慮酸或鹼儲備物）	→	第一級
3b	2<pH<11.5（不具有酸鹼緩衝潛力）則進行步驟 4				
4	其他資訊顯示出物質為皮膚腐蝕物	→	是	→	未對眼睛效應做評估： 視為第一級
	↓				
	否則進行步驟 5				
5	可獲得有效之體外測試以評估嚴重眼睛損傷	→	對眼睛具有嚴重損害	→	第一級
	↓				
	不具有嚴重眼睛刺激物則進行步驟 6				
6	可獲得有效之眼睛刺激體外測試				
	嚴重眼睛刺激性體外測試為陰性反應則進行步驟 8				
	缺乏任何體外測試則進行步驟 7				
6a	眼睛刺激體外測試	→	具眼睛刺激	→	第二級
	↓				
	不具眼睛刺激的特性				
7	實驗評估皮膚腐蝕潛在能力（參考皮膚刺激性級腐蝕性測試策略）	→	皮膚腐蝕	→	未對眼睛效應做評估： 視為第一級
	↓				
	不具腐蝕性				
8	單隻兔子眼睛測試	→	嚴重損害眼睛	→	第一級
	↓				
	不具嚴重損害				
9	單隻或 2 隻以上之兔子	→	眼睛刺激性	→	第二級
	不是眼睛刺激物不分類				

表 4.2-5 皮膚過敏性物質的危害級別與次級別

級別	皮膚過敏性物質
第 1 級	符合下列事項之一的物質歸類為皮膚過敏性物質。 — 如果有人類證據，有較多人在皮膚接觸此物質後會造成過敏。 — 如果適當的動物試驗結果為陽性。
1A 次級別	顯示在人類的過敏發生率高之物質，及/或在動物身上有較大的可能性，可以假設有可能對人體有嚴重過敏。反應的嚴重程度亦可考慮在內。
1B 次級別	顯示在人類身上有低至中度的過敏發生率之物質；及/或在動物身上有低至中度的可能性，可以假定可能對人體造成過敏。反應的嚴重程度亦可考慮在內。
1. 1A 次級別的人類證據 — 陽性反應$\leq 500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (HRIPT、HMT-誘發閾值) — 診斷性貼佈試驗數據，顯示特定人群對於較低程度的暴露，會出現反應相當發生率的過敏反應。 — 其他流行病學研究顯示對於較低程度的暴露，會出現相當發生率的過敏性接觸性皮炎。 2. 1B 次級別的人類證據 — 陽性反應$> 500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (HRIPT、HMT-誘發閾值) — 診斷性貼佈試驗數據，顯示特定人群對於較高程度的暴露，會出現低但發生率不容忽視的過敏反應。 — 其他流行病學研究，顯示對於較高程度的暴露，會出現低但發生率不容忽視的過敏性接觸性皮炎。 3. 動物測試 — 對於級別 1，使用輔劑的試驗方法進行皮膚過敏性試驗時，至少需有 30%的試驗動物出現反應才能視為陽性結果。對於未使用輔劑的試驗方法，天竺鼠試驗須有 15%出現反應才能視為陽性結果。 — 對於級別 1，局部淋巴試驗的刺激指數≥ 3 可視為陽性結果。OECD TG 406 與 OECD TG 429 中有描述皮膚過敏性試驗法。	

(五) 基因毒性

基因毒性是指用於改變 DNA 之結構、訊息量、分離試劑或過程，包括此等通過干擾正常複製過程造成 DNA 損傷或以非生理方式（暫時性）改變 DNA 複製之試劑或過程。

表 4.2-6 為生殖細胞致突變性物質危害級別分類標準，此分類系統提供了兩種不同之生殖細胞致突變性物質級別，以權衡可用之相關證據，為進行分類，需參考受試動物實驗之生殖細胞和/或體細胞中致突變效應，和/或基因毒性效應實驗中所獲得之測試結果。活體外測試之突變效應或生殖毒性效應亦須列入考慮。

此為 1 種基於危害分類之系統，化學品之分類係基於其引起生殖細胞突變的內在能力，該方案並不意味著對化學品進行（定量）的風險評估，應以操作優良、經充分確效之測試為主。對測試結果應有專家進行評估，而且分類時應考慮所有現存證據。

表 4.2-6 生殖細胞致突變性物質危害級別分類標準

生殖細胞致突變性物質危害級別分類標準
第 1 級：已知會引起人類生殖細胞具遺傳性突變或被認為可能引起人類生殖細胞遺傳性突變之化學品 第 1A 級：已知會引起人類生殖細胞可遺傳突變之化學品 標準：人類流行病學研究已得到陽性證據者 第 1B 級：應認為可能引起人類生殖細胞可遺傳突變之化學品 標準： 一 哺乳動物活體內之遺傳生殖細胞致突變性測試得到陽性結果者 一 哺乳動物活體內之體細胞致突變性測試得到陽性結果，並具證據顯示該物質有引起生殖細胞突變之可能。舉例來說，此種支持性證據可來自活體內生殖細胞致突變性/生殖毒性試驗，也可經由證明該物質或其代謝物有能力影響生殖細胞之遺傳物質；或測試之陽性結果顯示在人類生殖細胞中產生了致突變效應，而無須顯示是否遺傳給後代；例如，在暴露於該化學物質之人群中精細胞中非整數倍之頻率上升。 第 2 級：由於可能對人類生殖細胞引起可遺傳突變而引起人們關注之化學品 標準： 哺乳動物測試獲得陽性證據，和/或有時從部分體外試驗中具陽性證據者，此等證據來自 一 哺乳動物活體內之體細胞致突變性測試 一 其他活體內之體細胞基因毒性測試具陽性結果並具有其他活體外致突變性測試證據。 備考：應考慮將其活體外哺乳類細胞之致突變性測試具陽性結果者，而其化學結構活性和已知具生殖細胞致突變能力相關者，應歸類為第 2 級致突變性物質。

4.2.4 毒理項目電腦模擬結果研析

表 4.2-7 為 QSAR Toolbox 及 Danish QSAR 在各項毒理測試終點中，在模型適用範圍內化學物質數量的評估。結果指出，Danish QSAR Database 在大鼠口服急毒性、皮膚刺激腐蝕性、皮膚過敏性及基因毒性的適用範圍內化學物質數量分別為 12、11、13、13 個。Danish QSAR Database 無眼睛刺激性毒理測試終點，故無法計算在該測試終點的適用範圍內化學物質數量。

新化學物質及既有化學物質毒理資訊驗證結果如下，14 個化學物質（7 個已登錄之新化學物質及 7 個既有化學物質）比對結果的統計資料如圖 4.2-7 至圖 4.2-11 所示，定義之有效樣本數為 14 個物質在 QSAR 模式預測時，同時具有實驗值及預測值的化學物質，並符合模型適用範圍的樣本數量。分級準確率為在有效樣本（同時具有實驗值及預測值及在模型適用範圍內）的物質中 QSAR 結果與實驗值比較的正確率，以百分比呈現。

表 4.2-7 待預測化學物質在各 QSAR 模型適用範圍內之數量

測試終點	QSAR 模型	
	QSAR Toolbox	Danish QSAR Database
大鼠口服急毒性	_*	12/14 ^a
皮膚刺激腐蝕性	_*	11/14 ^b
皮膚過敏性	_*	13/14 ^b
基因毒性	_*	13/14 ^c
眼睛刺激性	_*	_**
結果顯示：適用範圍內的化學物質數量/化學物質總數量 *無法評估，僅能判定為內插法或 read-across **該模型無此測試終點 a: ACDLAB 模組 b: Leadscope 模組 c: Case Ultra 模組		

圖 4.2-7 為大鼠口服急毒性的驗證結果，其中有兩項既有化學無實驗值可以進行比較，另外有兩項新化學物質不在 Danish QSAR Database 的適用範圍內，其餘皆屬於模型無法辨識的化學物質，共計 QSAR Toolbox 3 個、Danish QSAR Database 8 個。在整體模式驗證方面，其在 QSAR Toolbox 及 Danish QSAR Database 的分級準確率分別為 72.73% (n=11) 及 33.33% (n=6)。QSAR Toolbox 對於大鼠口服急毒性的分級準確率良好，在新化學物質及既有化學物質的分級準確率為 66.67% (n=6) 及 80.00% (n=5)。Danish QSAR Database 對新化學物質的分級準確率為新化學物質 100.00% (n=1) 及既有化學物質 20.00% (n=5)，其中有部分化學物質預測值鄰近分級標準，僅因些微差距導致分級差異。舉例來說，物質 N 在 Danish QSAR Database 模式中的大鼠口服急毒性預測值為 260 mg/kg 鄰近於分級標準的 300 mg/kg；物質 B 在 QSAR Toolbox 模式中的大鼠口服急毒性的預測值為 2,050 mg/kg 鄰近於分級標準的 2,000 mg/kg，上述兩個物質雖然分級不同，但其實估計數值是相近的，因此建議在使用 QSAR 模型進行分級時，預測值若接近分級標準，可考慮使用多種 QSAR 模型或其他替代方法進行分級評估。如果特定 QSAR 預測的準確率不佳，建議可限制或避免使用在國內化學品的預測。

圖 4.2-8 為皮膚刺激腐蝕性的驗證結果，其中有兩項既有化學無實驗值可以進行比較，另外有 1 個新化學物質及 2 個既有化學物質不在 Danish QSAR Database

的適用範圍內，其餘皆屬於模型無法辨識的化學物質，共計 QSAR Toolbox 3 個 Danish QSAR 8 個。Danish QSAR Database 在皮膚刺激腐蝕性的部分提供的預測值為陰性及陽性，並無更細的分級，而 QSAR Toolbox 則是提供紅斑分數及水腫分數，可以細分到第 2 級及第 3 級皮膚刺激性。在整體模式驗證上，結果顯示其分級準確率為 33.33%~36.36%。QSAR Toolbox 在新化學物質與既有化學物質的分級準確率為 50.00% (n=6) 及 20.00% (n=5)，Danish QSAR Database 在新化學物質與既有化學物質的分級準確率為 0.00% (n=2) 及 50.00% (n=4)。

圖 4.2-9 為皮膚過敏性的驗證結果，其中有兩項既有化學無實驗值可以進行比較，另外有 1 個新化學物質不在 Danish QSAR Database 的適用範圍內，其餘皆屬於模型無法辨識的化學物質，共計 QSAR Toolbox 3 個及 Danish QSAR Database 7 個。在皮膚過敏性的測試終點中，Danish QSAR Database 及 QSAR Toolbox 的預測值皆為陰性及陽性。在整體模式驗證上，結果顯示其分級準確率為 72.73%~85.71%。其中 QSAR Toolbox 及 Danish QSAR Database 對於新化學物質的分級準確率良好，分別為 83.33% (n=6) 及 100.00% (n=2)，對既有化學物質則是 60.00% (n=5) 及 80.00% (n=5)，在皮膚過敏性方面，無論是哪種模型對於新化學物質皆具有較高的預測能力，但實際樣本數量不夠多，未來需要進一步確認。

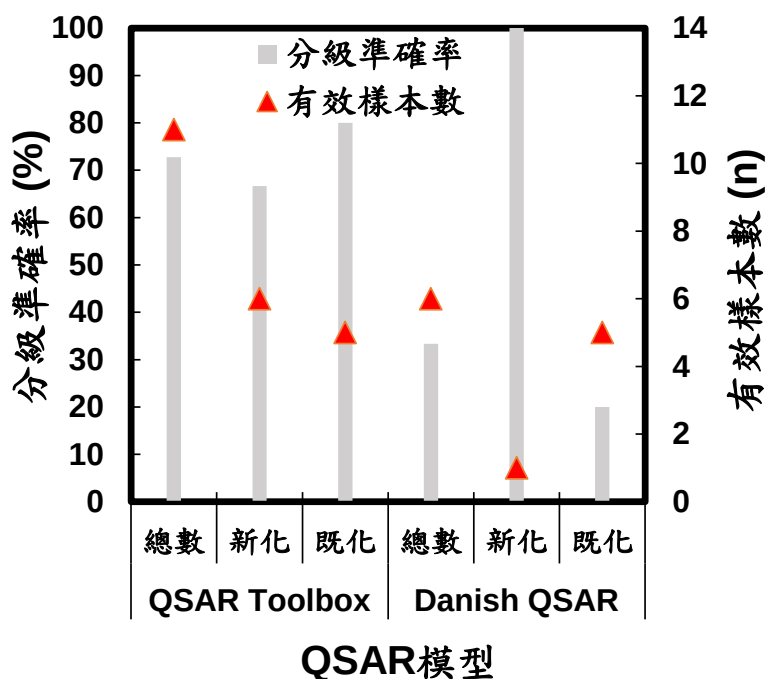


圖 4.2-7 大鼠口服急毒性之分級準確率及有效樣本數

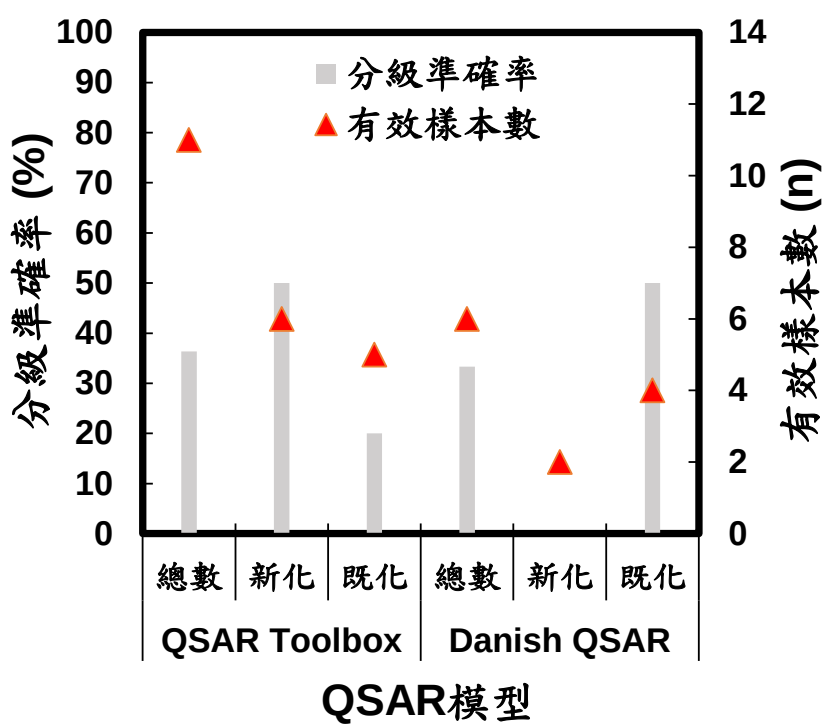


圖 4.2-8 皮膚刺激腐蝕性準確率及有效樣本數

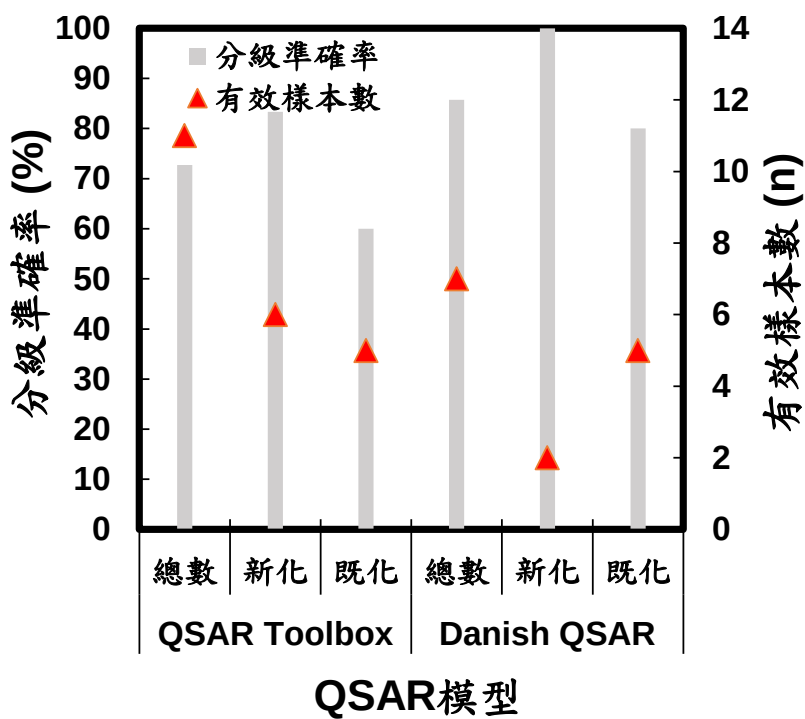


圖 4.2-9 皮膚過敏性之分級準確率及有效樣本數

圖 4.2-10 為基因毒性的驗證結果，其中有兩項既有化學無實驗值可以進行比較，另外有 1 項新化學物質不在 Danish QSAR Database 的適用範圍內，其餘皆屬於模型無法辨識的化學物質，共計 QSAR Toolbox 3 個及 Danish QSAR Database 7 個。在基因毒性的測試終點中，Danish QSAR Database 及 QSAR Toolbox 的預測值皆為陰性及陽性。在整體模式驗證上，結果顯示在 QSAR Toolbox 及 Danish QSAR 的分級準確率分別為 90.91% (n=11) 及 100.00% (n=7)。結果指出無論是 QSAR Toolbox 還是 Danish QSAR Database 對於基因毒性皆有良好的表現。整體來說，新化學物質比既有化學物質有稍高的分級準確率，但目前樣本數量有限，可以討論但不易定下結論，QSAR Toolbox 在既有化學物質的分級準確率為 80.00% (n=5)。

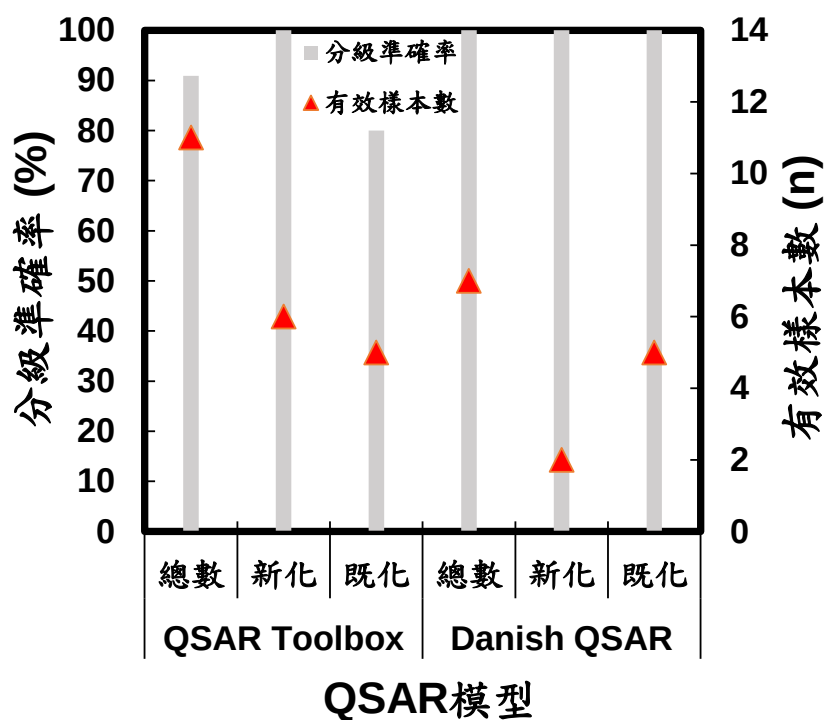


圖 4.2-10 基因毒性之分級準確率及有效樣本數

圖 4-2-11 為眼睛刺激性的驗證結果，Danish QSAR Database 沒有這項測試終點，QSAR Toolbox 有 1 個化學物質無法辨識，且 3 個既有化學物質無實驗值進行比較，共計 4 個化學物質為無效樣本。QSAR Toolbox 上分別對於眼睛刺激性分級的四個標準進行預測，涵蓋角膜混濁分數、虹膜炎分數、結膜充血分數及結膜水腫分數。在模式驗證上，結果顯示其分級準確率為 50.00% (n=10)。在新化學物質及既有化學物質的分級準確率分別為 66.67% (n=6) 及 25.00% (n=4)。

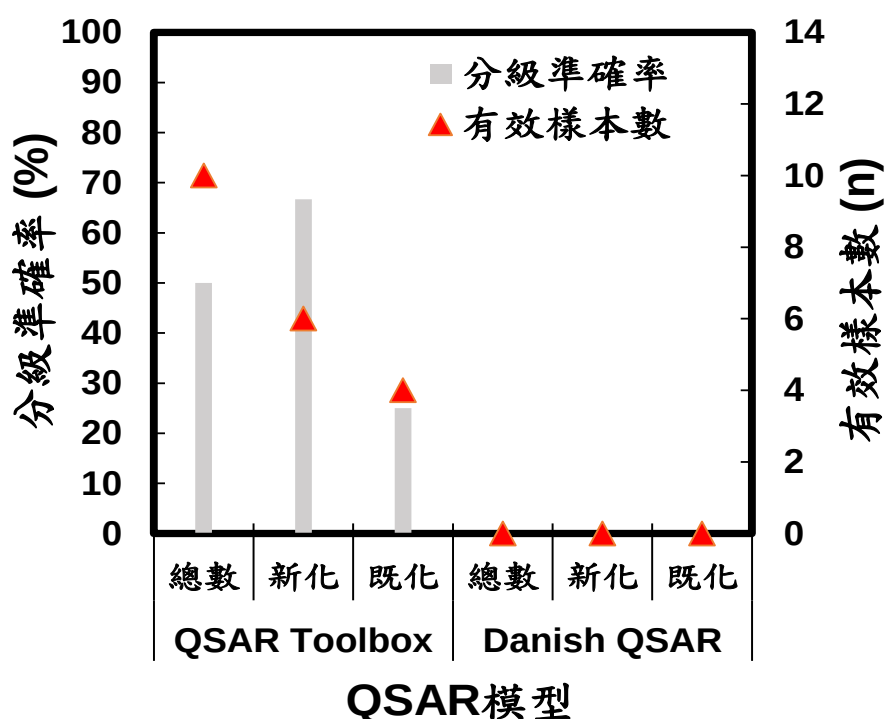


圖 4.2-11 眼睛刺激性之分級準確率及有效樣本數

從預測結果來看，皮膚過敏性及基因毒性皆具有良好的表現，分別為 72.73%~85.71%及 90.91%~100.00%，未來可針對這些毒理測試終點進行更進一步的擴充驗證更多化學物質，以利於建議電腦模式於替代測試的發展與推廣。比較新化學物質及既有化學物質，可以明顯看到 QSAR Toolbox 與 Danish QSAR Database 預測新化學物質在皮膚過敏性及基因毒性有較良好的分級準確率，在 QSAR Toolbox 預測皮膚過敏性及基因毒性的分級準確率分別為 83.33% (n=6) 及 100.00% (n=6)，既有化學物質的分級準確率則分別為 60.00% (n=5) 及 80.00% (n=5); 在 Danish QSAR 預測皮膚過敏性及基因毒性的分級準確率分別為 100.00%

(n=2) 及 100.00% (n=2)，既有化學物質的分級準確率則分別為 80.00% (n=5) 及 100.00% (n=5)，惟目前評估的化學物質數量仍屬有限，未來可繼續擴充。

整體來看，在皮膚過敏性、基因毒性及皮膚刺激腐蝕性，QSAR Toolbox 與 Danish QSAR Database 的預測能力相似，大鼠口服急毒性則是 QSAR Toolbox (72.73%，n=11) 高於 Danish QSAR Database (33.33%，n=6)。另一方面，目前結果顯示 QSAR Toolbox 在眼睛刺激性的分級準確率僅有 50.00%，可能因驗證物質數不足，目前使用 14 種化學物質尚無法有明確的結論，建議可進一步蒐集與研析其它可預測這兩項毒理終點的 QSAR 模型並嘗試擴充驗證更多的化學物質。

4.2.5 生態毒理項目電腦模擬之執行方法及驗證流程

為了評析 QSAR 模型用於預測化學物質生態毒理資訊的能力，工作整合為流程架構如圖 4.2-12 所示。實驗數據的來源為登錄人提交資料及公開資料庫，接下來執行 OECD QSAR Toolbox、Danish QSAR Database、VEGA、ECOSAR、T.E.S.T. 預測 7 個登錄之新化學物質及 7 個既有化學物質的生態毒理測試終點，預測結果與蒐集的實驗數據比對，並以是否落在相同毒性分級來作為評估 QSAR 模型預測能力的依據。

一、驗證流程及方法介紹

目標以 QSAR 模型對 7 個登錄之新化學物質及 7 個既有化學物質的水生急毒性進行預測，而根據《新化學物質及既有化學物質資料登錄指引》，水生急毒性的測試終點為魚類 96 小時 LC₅₀、水蚤 48 小時 EC₅₀ 及藻類 72 或 96 小時 EC₅₀，因此會著重於這些測試終點的實驗值進行蒐集，再與 QSAR 預測值進行比對。

蒐集實驗數據：使用已登錄之新化學物質的水生急毒性資訊，並確保其實驗值都是遵守 OECD 水生急毒性測試指引所獲得，同時記錄該化學物質的中英文名字、CAS No.、分子量與測試終點濃度，並把收集到的實驗數據單位統一為 mg/L。

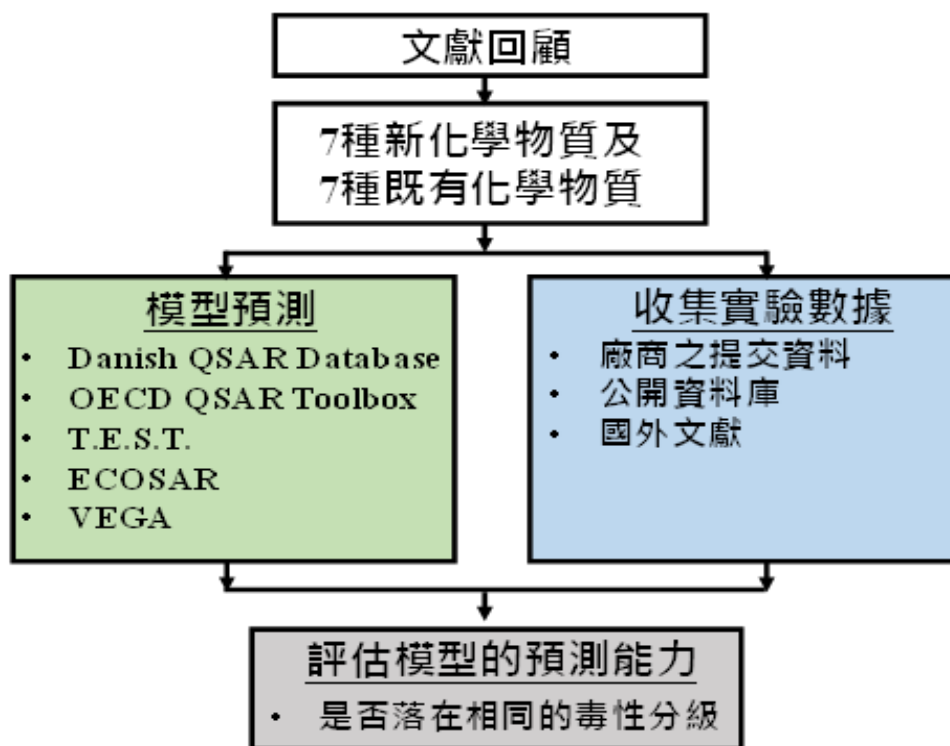


圖 4.2-12 生態毒理之 QSAR 模型驗證方法流程架構

使用既有評估水生急毒性的 QSAR 模型對 7 個登錄之新化學物質及 7 個既有化學物質進行預測，QSAR 模型分別為 OECD QSAR Toolbox、Danish QSAR database、VEGA、T.E.S.T.及 ECOSAR。使用 QSAR 模型皆有納入模型驗證之考量，如訓練集所含化學物質的數量必須大於/等於 10 或 5 倍的描述符數量、明確的測試終點、適用範圍、明確的演算法及內部/外部驗證等。依據模型預測結果報告來判斷化學物質是否在模型適用範圍中，舉例來說，ECOSAR 預測報告中會顯示出毒性終點數據高過待預測物質水溶解度之數值、 K_{ow} 是否在適用範圍內、是否可分類為模型之任何一種類化學物質種類，預測毒性終點數值超過其水溶解度、 K_{ow} 不在適用範圍、無法分類為任一種化學物質，則視為不在模型適用範圍內。既有 QSAR 模型的預測方法於下方介紹。

(一) OECD QSAR Toolbox

同 4.2.2 小節，對水生急毒性測試終點進行評估，測試終點主要會以魚類 96 小時 LC_{50} 、水蚤 48 小時 LC_{50} 及藻類 72 或 96 小時 EC_{50} 進行物質的預測評估，參考先前大量數據庫資料對照驗證 OECD QSAR Toolbox 的預測成果。由於自動化 / 標準化流程目前可以對水生毒性 (aquatic toxicity)

及皮膚過敏 (skin sensitization) 進行檢測，流程會有一定的演算方式，可以提升預測一致性和結果的可重複性，在水生毒理的預測方面，都會以自動化 / 標準化流程的方式對化學物質進行預測。

(二) Danish QSAR database

同 4.2.2 小節，改為對水生急毒性測試終點進行評估。

(三) ECOSAR

14 個化學物質進行 ECOSAR 的分類，再進行預測。

(四) T.E.S.T.

直接將化學物質的 CAS No. 輸入至 T.E.S.T. 的介面，並輸入目標預測終點與模型即可計算測試終點預測值。T.E.S.T. 對生態毒理進行預測的模型分別為分層方法 (Hierarchical method)、單模型方法 (Signal-model method)、群體貢獻方法 (Group contribution method)、最近鄰法 (Nearest neighbor method) 及共識方法 (Consensus method)。

(五) VEGA

需要輸入化學物質的 SMILES 字串，並輸入目標預測終點與模型，即可計算測試終點預測值。VEGA 對生態毒理的預測模型主要為 2 種魚類急毒性模型 (Combase 及 EPA)、兩種水蚤急毒性模型 (EPA 及 DEMETRA) 及藻類急毒性模型 (Combase)。

二、分級依據

水生急毒性 (即急性水生毒性) 是指物質本身的性質，可對在水中短時間接觸該物質的生物體造成傷害，使用魚類 96 小時 LC_{50} (OECD TG 203)、甲殼綱物種 48 小時 EC_{50} (OECD TG 202) 及藻類物種 72 小時或 96 小時 EC_{50} (OECD TG 201) 進行決定。

表 4.2-8 為水生急毒性分級的標準，該水生急毒性選用 3 個指標中最敏感 (即最毒或數值最小) 進行代表。由於所選新化學物質多為標準登錄第 1 級，不需要繳交魚類急毒性資訊，同時因新興化學物質較難搜尋公開資料庫之數據，因此僅既有化學物質可進行魚類水生急毒性資料驗證。

表 4.2-8 水生急毒性分級標準

水生急毒性級別	測試終點	分級標準
水生急毒性 1 級	魚類 96 小時 LC ₅₀	<1 mg/L
	甲殼綱物種 48 小時 EC ₅₀	<1 mg/L
	藻類物種 72 小時或 96 小時 EC ₅₀	<1 mg/L
水生急毒性 2 級	魚類 96 小時 LC ₅₀	>1 mg/L and ≤ 10 mg/L
	甲殼綱物種 48 小時 EC ₅₀	>1 mg/L and ≤ 10 mg/L
	藻類物種 72 小時或 96 小時 EC ₅₀	>1 mg/L and ≤ 10 mg/L
水生急毒性 3 級	魚類 96 小時 LC ₅₀	>10 mg/L and ≤ 100 mg/L
	甲殼綱物種 48 小時 EC ₅₀	>10 mg/L and ≤ 100 mg/L
	藻類物種 72 小時或 96 小時 EC ₅₀	>10 mg/L and ≤ 100 mg/L
若 LC ₅₀ 或 EC ₅₀ >100 mg/L 則代表對於該物質毒性有結論但不足以分類。		

4.2.6 生態毒理項目電腦模擬之結果研析

表 4.2-9 為各模型在在各項生態毒理測試終點中，在適用範圍內化學物質數量的評估，魚類水生急毒性的部分僅針對 7 種可比較的既有化學物質進行計算。結果指出，在水蚤、藻類及魚類水生急毒性中，在 Danish QSAR Database 的適用範圍內化學物質數量分別為 12、8 及 4 個。VEGA 在適用範圍內的化學則較少，依序分別為 4-9 個、11 個及 4-7 個。T.E.S.T.無法進行藻類水生急毒性的預測，故無法計算在該測試終點的適用範圍內化學物質數量。

新化學物質及既有化學物質使用 QSAR 模型預測生態毒理驗證結果如下，對 14 個化學物質（7 個已登錄之新化學物質及 7 個既有化學物質）的統計資訊如圖 4.2-13~圖 4.2-15，對於 QSAR Toolbox 在魚類水生急毒性測試終點，有效樣本數為 20 個物質（含 7 個標的既有化學物質與前期 13 個化學物質），有效樣本的定義為符合模型適用範圍，並同時具有實驗值及預測值的化學物質。分級準確率為有效樣本物質（在模式適用範圍內且同時具有實驗值及預測值）之 QSAR 結果與實驗值比較的正确率，以百分比呈現。

圖 4.2-13 為藻類水生急毒性之驗證結果，在 QSAR 模型中，T.E.S.T.模型無法對藻類進行預測，其餘 4 種 QSAR 模型的有效樣本數介於 3~9 之間，其中有 2 個新化學物質及 4 個既有化學物質不在 Danish QSAR Database 模型適用範圍中，不

在 VEGA 及 ECOSAR 適用範圍的物質數量分別為 2 個新化學物質及 1 個既有化學物 (VEGA) 及 2 個新化學物質 (ECOSAR)，其餘皆為無法辨識或無實驗值比較之化學物質，各模型無效樣本數統計為 QSAR Toolbox 有 5 個、Danish QSAR Database 有 11 個、VEGA 有 6 個及 ECOSAR 有 6 個。在整體模式驗證方面，其分級準確率介於 33.33%~62.50%，有部分預測值與實驗值相比，因數值鄰近分級標準而產生分級準確率不佳的情形，如物質 A 在 QSAR Toolbox 模式中藻類 96 小時 EC_{50} 值為 8.270 mg/L 與實驗值之第三級相近（第三級標準為 >10 mg/L），但卻分類為第 2 級。物質 A 在 ECOSAR 模式中的藻類 96 小時 EC_{50} 值（9.700 mg/L）也有同樣的現象發生。

圖 4-2-14 為水蚤水生急毒性之驗證結果，有效樣本數介於 3~11 之間，其中不在 Danish QSAR Database 適用範圍的物質數量為 1 個新化學物質及 1 個既有化學物質，VEGA DEMETRA 則是 4 個新化學物質及 6 個既有化學物質，VEGA COMBASE 為 3 個新化學物質及 2 個既有化學物質、ECOSAR 則為 2 個新化學物質。整體驗證結果顯示其分級準確率介於 14.29%~100.00% 之間。VEGA 在水蚤水生急毒性的預測能力偏低〔33.33%（VEGA DEMETRA）及 14.29%（VEGA COMBASE）〕，T.E.S.T. 的各模組分即準確率介於 36.36%~54.55% 之間，Danish QSAR 與 ECOSAR 的分級準確率較好，分別為 100.00%（n=6）及 66.67%（n=9）。

圖 4-2-15 為魚類水生急毒性之驗證結果，所選物質中之有效樣本數為 7 個，皆來自於既有化學物質，無法比較 7 個新化學物質的主因是新化學物質多為標準登錄一級，不需要登錄魚類水生急毒性之資料，故無實測資料。在既有化學物質部分，Danish QSAR Database 及 VEGA COMBASE 各有 3 個既有化學物質不在模型適用範圍內。另外，上年度【化學物質毒理及生態毒理資訊與風險評估技術建置計畫】所使用電腦模擬模式較少，亦驗證了 13 個既有化學物質〔包含氯化二癸基二甲基銨（Cas No. 7173-51-5）、4-(1,1,3,3-四甲基丁基)苯酚（Cas No. 140-66-9）、N-1,3-二甲基丁基-N'-苯基-1,4-伸苯基二胺（Cas No. 793-24-8）、2-苯基苯酚（Cas No. 90-43-7）、1,2,4-三甲基苯（Cas No. 95-63-6）、二苯基酮（Cas No. 119-61-9）、苯甲醛（Cas No. 100-52-7）、己二酸二(2-乙基己)酯（Cas No. 103-23-1）、對苯二甲酸（Cas No. 100-21-0）、1-溴丙烷（Cas No. 106-94-5）、乙二醛（Cas No. 107-22-2）、2-(2-甲氧基乙氧基)乙醇（Cas No. 111-77-3）及正丙醇（Cas No. 71-23-8）〕。

表 4.2-9 待預測化學物質在各生態毒理終點預測模型適用範圍中的數量

測試終點	QSAR 模型											
	QSAR Toolbox	Danish QSAR	VEGA DEMETRA	VEGA ProtoQSAR	VEGA COMBASE	VEGA EPA	T.E.S.T. Hierarchical	T.E.S.T. Nearest neighbor	T.E.S.T. Consensus	T.E.S.T. Single model	T.E.S.T. Group contribution	ECOSAR
水蚤 48hr EC ₅₀	-*	12/14	4/14	-**	9/14	-**	14/14	14/14	14/14	14/14	14/14	12/14
藻類 72 or 96hr EC ₅₀	-*	8/14	-**	11/14	-**	-**	-**	-**	-**	-**	-**	12/14
魚類 96hr LC ₅₀	-*	4/7	-**	-**	4/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7	7/7
結果顯示：適用範圍內化學物質數量 / 化學物質總數量 *無法評估，僅能判定為內插法或 read-across **該模型無此測試終點												

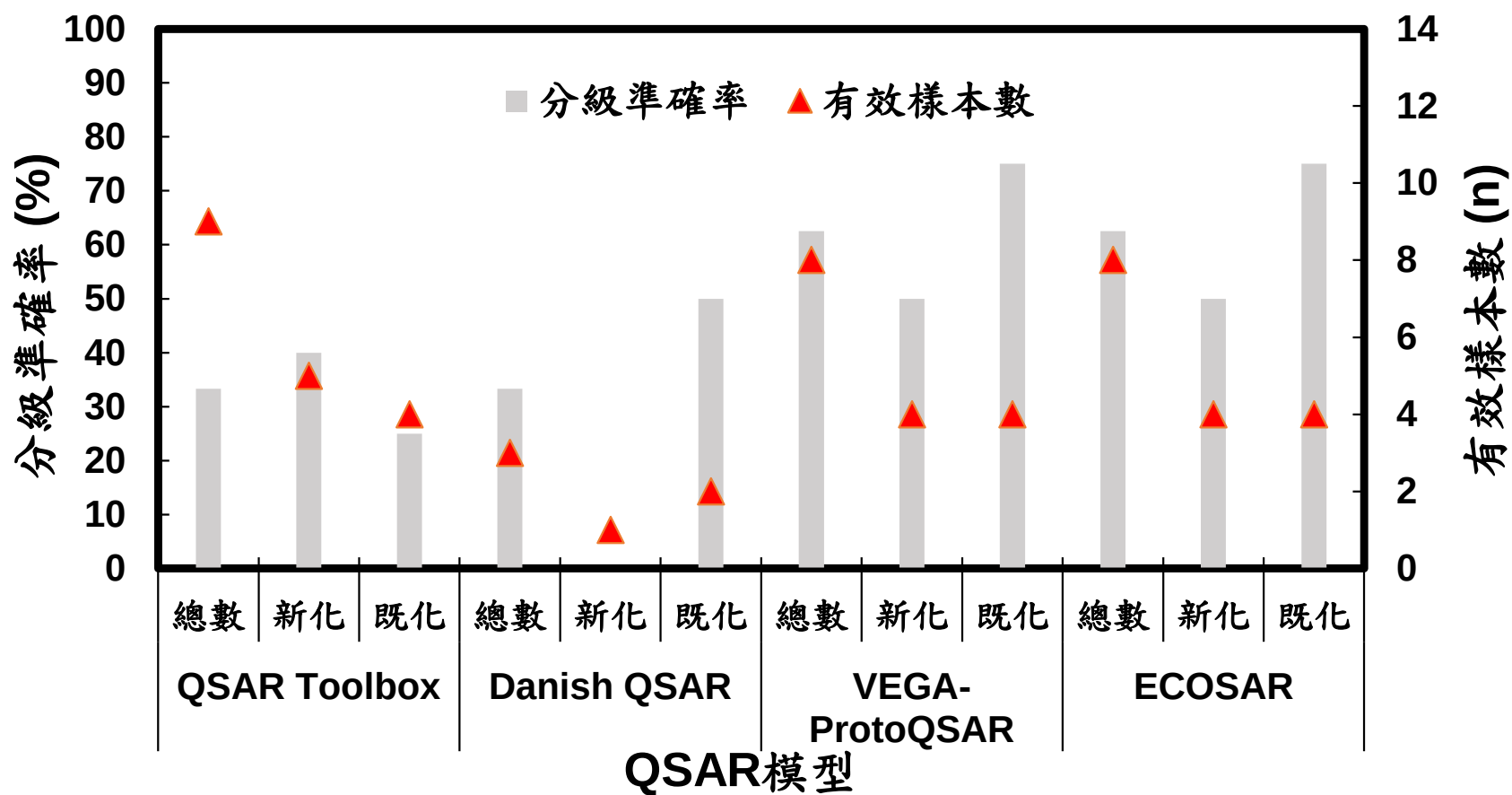


圖 4.2-13 藻類水生急毒性之分級準確率及有效樣本數

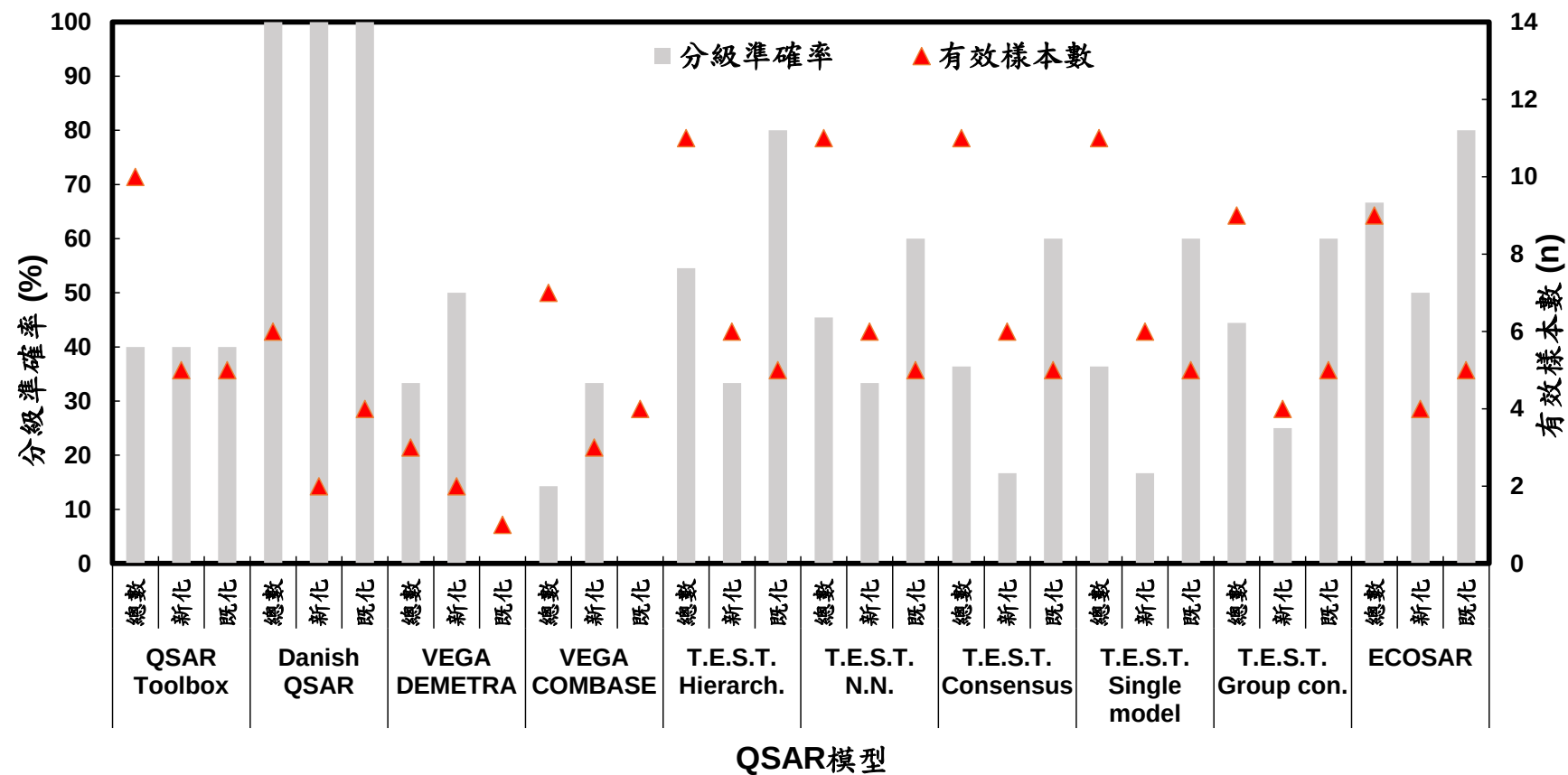


圖 4.2-14 水蚤水生急毒性之分級準確率及有效樣本數

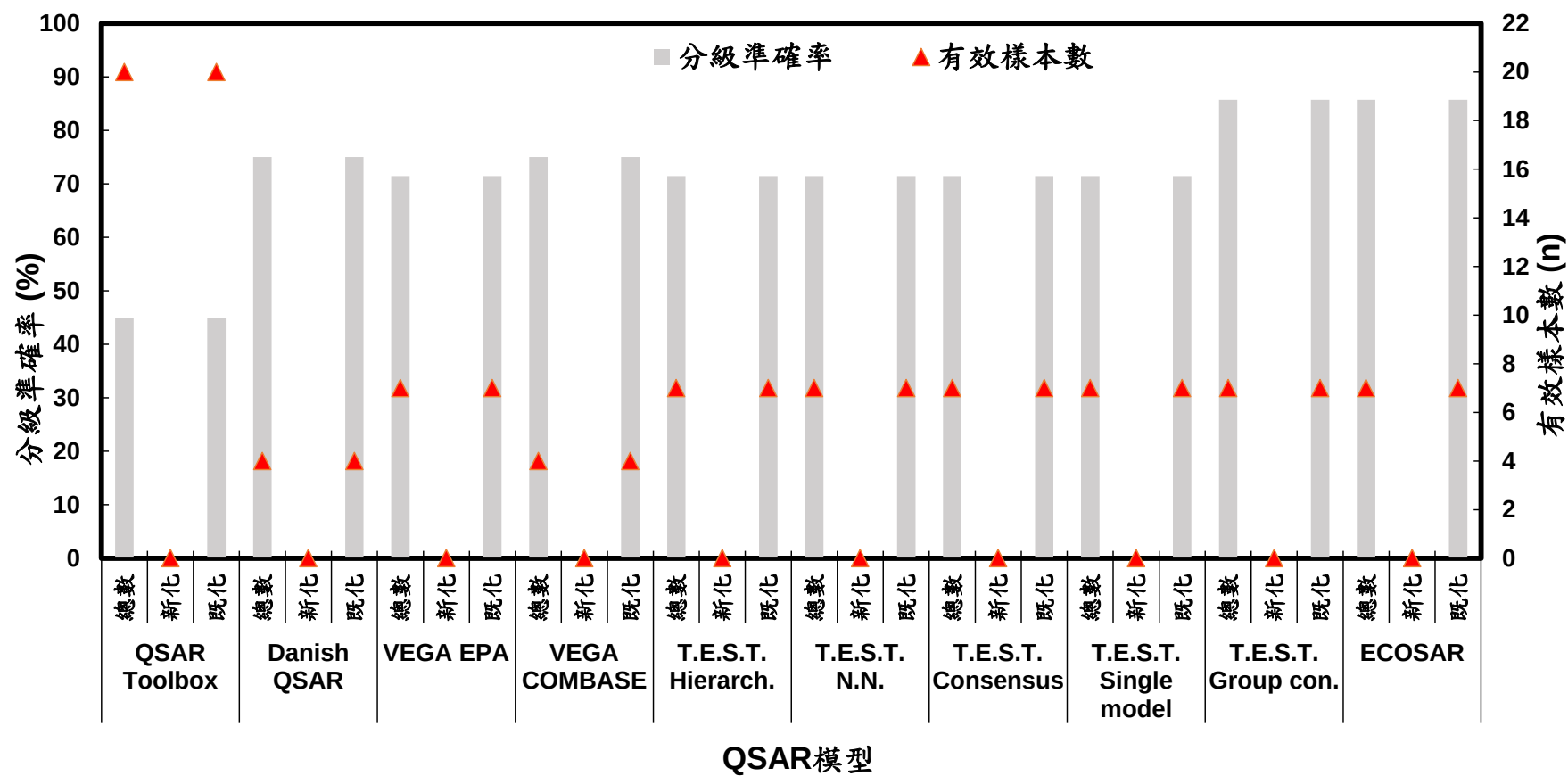


圖 4.2-15 魚類水生急毒性之分級準確率及有效樣本數

結果顯示其分級準確率介於 45.00%~85.71%之間，除 QSAR Toolbox 外，其他模式都有良好的預測表現（71.43%~85.71%），尤其在 ECOSAR 及 T.E.S.T.-Group contribution 的準確率可達 85.71%。ECOSAR 及 T.E.S.T.-Group contribution 唯一分級錯誤的物質 H，預測值皆>100 mg/L，但其實驗值為 100 mg/L（被列為水生急毒性第三級）。

QSAR Toolbox 為較需要使用者判斷的預測模型，無法定義出該物質不在適用範圍內。報告中使用 QSAR Toolbox 分析的無效樣本為無實驗值及無法建立交叉參照或趨勢分析相關性。例如既有化學物質中的鄰甲酚（CAS No. 95-48-7）及 2-呋喃甲醇（CAS No.98-00-0）在非脊椎動物的短期毒性（7.1）無實驗值可比對；新化學物質中的物質 E 及物質 G，實驗值雖可自登錄人的繳交資訊取得，但在非脊椎動物的短期毒性（7.1）與對水生藻類及藍綠藻的毒性（7.2）中無法建立趨勢分析相關性，因此無法獲得預測值。上述情況都是登錄人在使用 QSAR Toolbox 可能遇到的問題，也建議可由較具相關背景的人員來操作相關模式，按照物質特性逐步釐清 QSAR Toolbox 不適用的原因。

整體來說，3 項水生急毒性的分級準確率介於 14.29%~100.00%之間，水生急毒性的預測能力為魚類（45.00%~85.71%）>水蚤（14.29%~100.00%）>藻類（33.33%~62.50%）。建議在使用 QSAR 模型進行分級時，預測值若接近分級標準，可考慮使用多種 QSAR 模型或其他替代方法進行分級評估。魚類水生急毒性目前僅使用既有化學物質的數據進行比較，需要更多數據進一步驗證。其中 T.E.S.T.-Group contribution 及 ECOSAR 對於既有化學物質魚類水生急毒性的預測能力表現良好（皆為 85.71%，n=7），擬規劃作為 IATA 之基礎模型之一，

4.3 QSAR 模型之驗證所需資訊及範本

QSAR 模式的準確率與其模式設計或分類是否精確息息相關，因此也需有對應文件來檢視模式設計的相關資訊。依照「既有化學物質標準登錄資料撰寫指引」，在使用 QSAR 模型作為登錄資訊時，應同時繳交佐證文件說明標的物質與近似物質具有高度關聯性。表 4.3-1 為參考既有化學物質標準登錄資料撰寫指引及 QSAR 模型報告格式（QSAR Model Reporting Format, QMRF）所建構之模型驗證範本。該範本使用 ECOSAR 預測酯類物質的魚類急毒性 96 小時 LC₅₀。

表 4.3-1 QSAR 模型驗證範本 (1/3)

QSAR 模型報告格式	
1. QSAR identifier	1.1. QSAR identifier (title): 魚類急毒性酯類 96 小時 LC₅₀ 毒性預測模型 (ECOSAR) 1.2. Other related models: 無 1.3. Software coding the model: ECOSAR Version 1.11
2. Source	2.1. Reference(s) to scientific papers and/or software package: 略 2.2. Date of publication: 略 2.3. Identification of the model developer(s)/authors: 略 2.4. Contact details of the model developer(s)/authors: 略 2.5. Indication of whether the model is proprietary or non-proprietary: 略
3. Type of model	3.1. Type of model 線性迴歸的 QSAR 模型
4. Dependent variable:	4.1. Species Endpoint (including exposure time) 4.1.1. Endpoint (including exposure time) 急性魚類 96 小時 LC₅₀：在 96 小時暴露期後預計會導致 50%魚類死亡的濃度。 4.1.2. Units of measurement LC₅₀ 值以 mg/L 表示。 4.1.3. Reference to specific experimental protocol(s) OECD TG 203: Fish, acute toxicity test 4.2. Number of descriptors used as independent variables: 使用辛醇-水分配係數的對數 (Log K_{ow}) 作為預測魚類 96 小時 LC₅₀ 的自變量，通過輸入該化學物質的 CAS No.或 SMILES 符號，根據化學結構計算獲得。

表 4.3-1 QSAR 模型驗證範本) (2/3)

QSAR 模型報告格式
4.3. Identification of descriptors (names, symbols): 辛醇/水分配係數的對數，Log K_{ow} (或 Log P) 4.4. Explicit algorithm for generating predictions from the descriptors: 魚類急性毒性酯類 96 小時 LC₅₀ 毒性預測模型中，Log K_{ow} 需小於 5，在此限制下， 魚類(LC₅₀) = -0.592(Log K_{ow}) + 0.3467；該方程的 LC₅₀ 之單位以毫摩爾/升 (mmol/L) 表示。 ECOSAR 將 LC₅₀ 值乘以化合物的分子量，將 LC₅₀ 之單位從 mmol/L 轉換為 mg/L。 4.5. Goodness-of-fit statistics 酯類有機物其魚類 96 小時 LC₅₀ 的 QSAR 相關係數 (R²) 等於 0.7801 4.6. Information on the applicability domain of the model 此 QSAR 可用於 Log K_{ow} 值小於 5 的酯類有機化合物毒性定量急性 LC₅₀ 估計值；該模型內含 44 個不同的化學物質和 75 個實驗值數據點，若化學品 Log K_{ow} 值大於 5、分子量大於 1000 g/mol、混合物或未知化學品、無機物、異構體、複合有機物、水解不穩定反應物時，不適 用此模型；此外如果預測的毒性超過水溶性，則在沒有有機載體溶劑的情況下預計不會觀察 到急性毒性。 4.7. Information on the mechanistic basis/interpretation of the model ECOSAR 類別分組根據毒性和各種類型的藥理特性之間的相似關係進行分組。
5. Development of the model
5.1. Explanation of the method (approach) used to generate each descriptor: 5.1.1. Calculation of Log K_{ow} 為了估計 Log K_{ow}，ECOSAR 使用 Syracuse Research Corporation 開發的 KOWWIN；其 公式為 Log K_{ow} = Sum (fini) + Sum (cjni) + 0.229，其中 Sum (fini) 是 fi (每個原子/片段的係數) 乘以 ni (原子/片段在結構中出現的次數) 的總和，並且 (cjni) 是 cj (每個校正因子的係數) 乘以 nj (校正因子在分子中出現 (或應用) 的次數) 5.2. Selection of descriptors 5.2.1. Indication of initial number of descriptors screened 無
5.2.2. Explanation of the method (approach) used to select the descriptors and develop the model from them: 使用 K_{ow} 和預測急性毒性是根據美國 EPA、OPPT 新化學計畫的經驗和需要推導出計算 對魚類急性毒性最簡單方法的實驗確定 5.2.3. Indication of final number of descriptors included in the model: 一個描述符：Log K_{ow} 5.3. Information on experimental design for data splitting into training and validation sets. 無

表 4.3-1 QSAR 模型驗證範本 (3/3)

QSAR 模型報告格式	
5.4. Availability of the training set	訓練集中化學品都含化學品名稱、CAS No.、應變量數據，而模型的開發使用了各種酯類有機化合物的總共 75 個毒性數據點，這些數據點的 Log K _{ow} 值都小於 5，而此模型已去除 CBI 值，以免造成和測試集化學品重複；而 ECOSAR 內之數據點在 pH 7、總有機碳含量不應超過 2 mg/L 與水硬度約在 150 mg/L CaCO ₃ 的實驗條件下進行
6. Validation of the model	
6.1. Statistics obtained by leave-one-out cross-validation	無
6.2. Statistics obtained by leave-many-out cross-validation	無
6.3. Statistics obtained by Y-scrambling	無
6.4. Statistics obtained by external validation	R ² _{pred} 為 0.7
6.5. Definition of the applicability domain of the model	化學品 Log K _{ow} 小於 5 且分子量小於 1000 g/mol，且其不為 ECOSAR 無法預測的化學品類型，如異構體、混合物等等
6.6. Availability of the external validation set	測試集化學品含化學品名稱、CAS No.、應變數
7. Applications of the model	
	污染預防和毒物辦公室（OPPT）已使用此 QSAR 協助驗證魚類 96 小時 LC ₅₀ 值的測量毒性測試數據。該 QSAR 將僅預測基線毒性或僅與麻醉相關的毒性。
8. Miscellaneous information	
	ECOSAR 類計畫是 OPPT 所採用方法的電腦模擬版本，用於評估 TSCA 新化學品的環境毒性。它是在 TSCA 監管限制範圍內開發的，是一種實用的 QSAR 方法，運用化學品的相似性來預測化學品的水生毒性，其計算大多基於辛醇/水分配係數（K _{ow} ）

4.4 體外試驗結合定量結構活性關係篩選預測生態毒性之效能評估

因應新化學物質發展迅速，許多國際組織與政府單位主導開發新測試方法學（NAMs），主要發展目標包括建置大量且快速的評估方法、動物測試替代方法、生化與生理代謝預測推估，以及複雜環境介質內的混合物風險評估技術等，運用大量科學證據與數學演算方法，強調取得快速、準確且符合動物福祉的風險評估結果。

當前毒性測試方法大多以 OECD 所規範之體內測試方法為基礎建立及標準化新方法，儘管這些方法發展快速，還是有許多化學物質的數據尚待填補，因此需要更健全之方法來解決這些數據空缺的問題以及新化學物質資料的建構。整合型測試評估方法（IATA）的框架是基於健康危害路徑（AOP）為發想，由毒性途徑的概念演變而來，毒性途徑指的是當細胞反應達到某一強度時，雖會對健康造成不良影響，但毒性途徑不一定包含引發毒性反應之分子起始事件或毒性反應造成最終健康危害。健康危害路徑與毒性途徑差不多，只是健康危害路徑的危害，並不侷限於負面細胞反應，也可能是器官系統性的傷害。

許多新興的非動物測試方法，尚未能探討誘發毒性之機制，在決策應用上，由於其適用範圍的不確定性，單一新方法的檢測結果無法全然代表物質毒性，因此需要一個客觀的整合框架來瞭解新方法在預測不良反應中個體生物學和毒理學相關性（Tollefsen, Scholz et al., 2014）。

目前替代測試方法的應用主要可分為兩方向：體外試驗（*in vitro*）與電腦模擬（*in silico*），為了建立更完整水生生物急毒性之 IATA 架構，需要加入有魚類急毒性的數據之物質，因此改選定具有較完善資訊的 7 個既有化學物質，驗證電腦模擬和體外試驗等替代測試方法之可行性，並據以提出替代測試資料於登錄資料繳交及其分級分類之適用性建議，以及回饋至相關指引文件之修訂。

蒐羅參考國內外相關文獻，並就各主要工作項目提出執行規劃，包含目標化學物質與關切替代測試方法的選定，針對後者規劃將以國際上普遍對於替代測試資料接受度較高之水生生物急毒性資訊做為探討標的，並擇定國外已廣泛使用且符合替代測試精神之斑馬魚胚胎急毒性試驗及 QSAR Toolbox 與 ECOSAR 等電腦模擬預測模式做為方法可行性驗證之目標對象。

一、整合型測試評估方法的定義與發展

根據 OECD 準則，整合型測試評估方法是結合各種測試的整合性方法，用於識別化學物質的危害、表徵或對化學物質進行安全性評估。整合型測試評估方法整合及加權現有的相關資訊，也可藉由現有資訊產生新數據，並提供化學物質可能潛在之危害和如何對其進行風險管理措施的決策。整合型測試評估方法評估並整合不同來源的數據，如物理化學特性、電腦模擬（*in silico*）、分群（*grouping*）、交叉參照（*read-across*）、體外試驗（*in vitro*）、體內試驗（*in vivo*）和人類生理資訊等等，得到關於化學物質之危害及其風險之結論（OECD, 2017）。

基於 3Rs 原則，整合型測試評估方法的優勢在於將實驗的任何先決條件例如：問題建立、監管可能性和實際限制等納入考慮範圍，蒐集並結合各種充足的數據，有效率辨別必要之動物測試。自 90 年代初以來類似概念已經出現，像是整合型測試策略（Integrated testing strategy, ITS），然而，ITS 有個弊端，如果一物質已有明確規定之方法，人們即會預設立場認為如果經由專家所測試出來的結果會與法規一致，進而不進行專家驗證。而整合型測試評估方法與 ITS 最大不同之處在於，即使一物質已有明確規定之方法，仍需要專家進一步重複驗證。整合型測試評估方法已有明確規定之方法有被賦予定義，在 OECD 整合型測試評估方法（IATA）的指引中，對於一系列已有明確規定之方法稱為定義方法（DA），定義方法是一組固定的數據，而這組數據的算法通常是為了預測物質毒性（OECD, 2017）。

整合型測試評估方法為測試新化學物質提供一個框架如圖 4.4-1，而該框架基於證據權重法來衡量和整合有關化學危害和暴露的數據資料，並且得出相關毒性結論。為測試新化學物質，在整合型測試評估方法（IATA）組成要件當中，健康危害路徑（AOP）提供物質可能引起之分子起始事件、中間關鍵事件至健康危害因果關係的毒性路徑，而化學物質之物化特性、藥物動力學特性及暴露資訊，這些資訊決定檢測物質的試驗，包含一種至多種方法整合並得出物質之毒性資料，即定義方法、體內試驗體外試驗、無標準化試驗、電腦模擬、分群和交叉參照及新測試方法學等等，最後根據證據權重整合來自整合型測試評估方法（IATA）中不同要件의證據，解釋和權衡並得出結論，

而該結論可為決策提供依據。而各種證據可以為現有資訊，也可以由測試策略生成的新資訊（Browne, Noyes et al., 2017, OECD 2020）。

而其中，整合型測試評估方法(IATA)所使用的常見元素如表 4.4-1 所示，使用的元素為電腦模擬方法與體外試驗測試以及定量結構活性關係。

二、目標化學物質的選定

本章 4.2 節所篩選的 7 個既有化學物質，至少挑選 5 個可由 QSAR 模型進行魚類水生急毒性之既有化學物質進型 IATA 之方法建立。

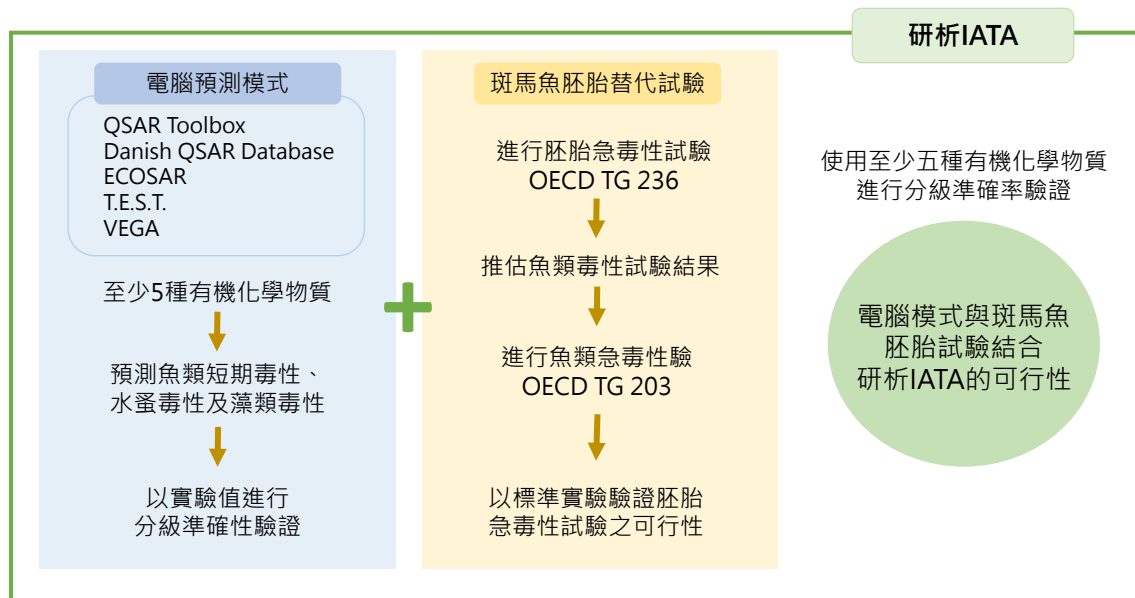


圖 4.4-1 整合型測試評估方法（IATA）的概念與基本框架

表 4.4-1 整合型測試評估方法（IATA）的可能元素

一般項 General terms	
<i>Ex vivo</i> method	（生物）體外方法
<i>In chemico</i> assay	化學試驗測定
<i>In silico</i> approach	電腦模擬方法
<i>In vitro</i> assay	體外試驗測定
<i>In vivo</i> method	體內試驗方法
New approach methodology (NAM)	新測試方法學
Non-guideline method	無標準化之測試準則
Test guideline method	測試準則方法
合併單一方法 Combinations of individual methods	
Defined Approach (DA)	已被定義之方法（標準法）
Grouping and read-across	分群及交叉參照
方法 / 方法學 / 技術例子 Examples of methods / methodologies / technologies	
3D-organoids	3D 類器官培育
Absorption, distribution, metabolism, excretion (ADME) models	藥物動力學模組（吸收、分佈、代謝、排泄）
Biokinetic model	體內動力學模組
Cell-based assay	細胞內分析試驗法
Chemical structure information	化學物質結構資訊
High Content Imaging (HCI)	高通量顯微影像擷取暨分析
High Content Screening (HCS)	高內涵篩選實驗
High Throughput Screening (HTS)	高通量篩選實驗
High Throughput Toxicokinetics (HTTK)	高通量毒物動力學
<i>In vitro</i> to <i>in vivo</i> extrapolation (IVIVE)	體外到體內外推估
Machine learning	機器學習
Metabolite identification	代謝體剖析
Omics (including e.g. genomics, proteomics, metabolomics, transcriptomics)	組學（例如包含基因組學、蛋白組學、代謝組學、轉錄組學等）
Organ-on-a-chip	器官晶片
Physicochemical properties	物理及化學特性
Physiologically based toxicokinetic (PBTK) model	以生理學為基礎之毒理動力學模組
Prediction model	電腦預測模組
Quantitative AOP model	定量健康危害途徑
Quantitative structure-activity relationship (QSAR)	定量結構活性關係
Reporter gene assays	報告基因分析
Reverse Toxicokinetics (RTK)	反向毒物動力學
Structure-activity relationship (SAR)	結構活性關係

三、魚類急毒性試驗替代測試方法－斑馬魚胚胎急毒性試驗介紹

根據估計，每年有超過 5 百萬條實驗魚被拿來做為廢水檢測試驗的評估工具 (Norberg-King et al., 2018)，近年來為了符合 3Rs 原則，致力於提倡使用斑馬魚胚胎毒性試驗作為魚類急毒性的替代測試，用胚胎替代成年魚的使用，減少成魚的使用量，因為胚胎試驗具有以下優點，操作快速又便宜、胚胎透明方便觀察毒物造成的型態改變、胚胎發展快速，更重要的是，斑馬魚胚胎在受精後 120 小時被認為不具備完整的感知能力 (Pereira et al., 2019)，根據歐洲法規，在胚胎受精後 120 小時之前的生命階段所進行的試驗處置不會受到法規約束，因為斑馬魚胚胎前 120 小時還不能獨立進食，且對此階段的胚胎進行實驗時被認為不會有痛苦或違反動物福祉之疑慮 (Strähle et al., 2012)，因此為具有高度潛力發展為可快速且大量進行篩檢之替代測試方法，例如 OECD 已於 2013 年公告斑馬魚胚胎急毒性試驗方法之測試規範 (OECD, 2013)。

雖然斑馬魚胚胎已有 ISO 標準和 OECD 測試規範，並在科學界已有多項研究支持斑馬魚胚胎可替代成魚急毒性試驗之方法，但歐盟 REACH 法規到 2017 年還未明確訂定以斑馬魚胚胎作為生態毒理資料繳交之規定，且各國仍需再各自驗證此方法在其國內之適用性。因此為評估斑馬魚胚胎急毒性試驗於我國化學物質資料登錄之適宜性，以提升相關替代測試方法之應用，針對 5 個化學物質進行斑馬魚胚胎急毒性試驗，並參考文獻資料，建立斑馬魚胚胎急毒性試驗數據轉換為成魚急毒性資料之公式，數據轉換結果再與相關文獻中的實際值進行比較，以驗證斑馬魚胚胎試驗作為魚類急毒性試驗替代方法之可行性，相關試驗步驟流程將遵照「OECD TG 236 魚類胚胎急毒性試驗 (Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test)」之規範辦理。

四、研析整合型測試評估方法策略的可信度及適用性

應用 QSAR 模型，包含：ECOSAR、T.E.S.T、Danish QSAR database 及 VEGA 推估生態毒性，並透過結合體外試驗定量結構活性關係之整合型測試評估方法，以 QSAR 推估 3 項生態毒理項目，包含：魚類短期急毒性、水蚤短期毒性及水藻類毒性，再藉由斑馬魚胚胎急毒性試驗進一步驗證，藉以篩選及預測生態毒性。據此建立替代測試 QSAR 模型評估工具可行性評估及整合型測試評估方法策略之作業範例。

五、水生毒性之替代測試 IATA 架構與執行內容

如圖 4.4-2 所示，水生毒性替代測試 IATA 架構基於動物分層測試原則，依序進行電腦模擬方法、動物替代試驗預測化學物質水生毒性。首先採用 ECOSAR 及 T.E.S.T. Group contribution，以電腦模擬方式先預測物質毒性，初步篩選出 $96\text{h LC}_{50} > 100\text{ mg/L}$ 之物質，根據中華民國國家標準 CNS 15030 的規範，將其定義為現有資訊不需進行分類的物質；而 $96\text{h LC}_{50} \leq 100\text{ mg/L}$ 之物質以 ECOSAR 分類法進行化學物質分類，接續使用動物試驗，基於近年來有許多文獻建議可以使用魚類胚胎毒性試驗做為魚類急毒性試驗之替代試驗，因此在此以魚類胚胎毒性試驗代表動物體內試驗，得到 96h LC_{50} 後經由各作用機制類別換算推估至魚類毒性試驗 96h LC_{50} ，依照此數據轉換結果進行物質之毒性分級，分為急毒性第 1 級、急毒性第 2 級及急毒性第 3 級。

驗證此 IATA 的方式，則是以物質魚類急毒性試驗相關文獻中的實際值與上述資料核對其毒性推估能力，建立此 IATA 之前，須建立各物質種類的魚類胚胎試驗轉換魚類急毒性試驗公式，收集文獻數據，以簡單線性迴歸之方法建立。後續章節將展示 7 個既有化學物質執行 IATA 之流程，並呈現研析 IATA 之結果及效能。

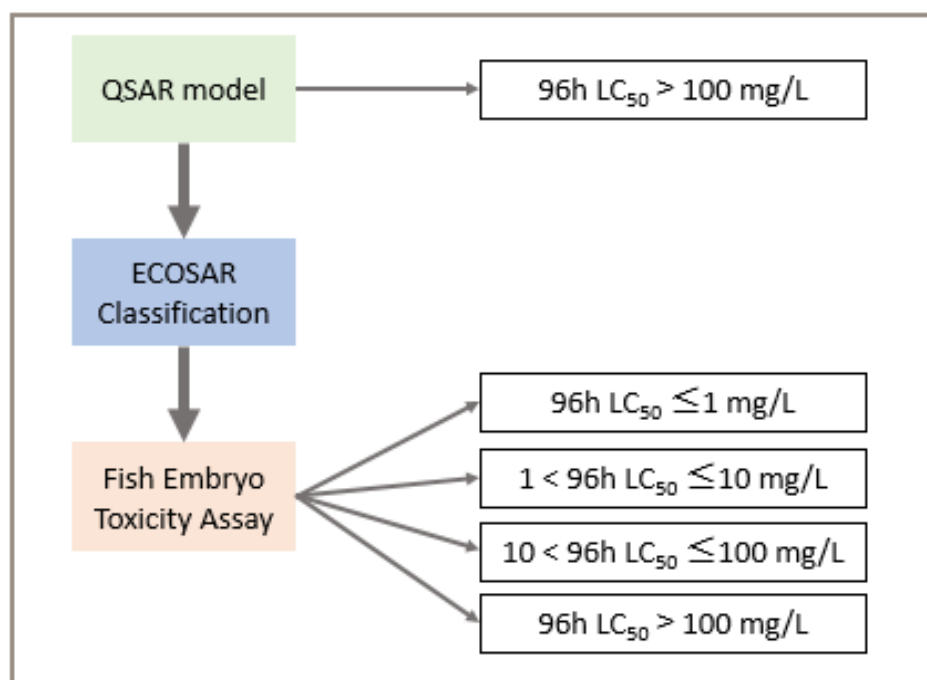


圖 4.4-2 水生毒性之替代測試 IATA 架構

六、水生毒性之替代測試 IATA 執行效能呈現

收集胚胎急毒性與魚類急毒性試驗之物質毒性數據，探討兩方法之間關係，建立在 ECOSAR 分類之下，各分類於胚胎毒性試驗與魚類急毒性試驗毒性數據之間關係，並建立在測試物質之分類於兩試驗之間的簡單線性迴歸關係式，如表 4.4-2 所示，物質被分類為中性有機物類、酚類、脂肪族胺類及酯類在胚胎試驗與魚類試驗間呈現高度相關，可建立轉換關係式，而苯甲醇類、醛類及聚醛類由於樣本數不足而無法建立兩試驗關係式。

依照此線性迴歸關係之結果，中性有機物類、酚類、脂肪族胺類及酯類物質將採用個別建立的簡單線性迴歸模型，預期將提升胚胎毒性試驗推估魚類急毒性試驗數據之功效。由於脂肪族胺類及酯類樣本數太少，未來仍需增加樣本數避免極端狀況誤判，同時也提高斑馬魚胚胎與成魚之間相關性。

斑馬魚胚胎急毒性轉換成魚急毒性的斜率無法完全吻合（斜率不為 1），推測原因可能是兩者生理構造差異造成，胚胎發育尚未完全導致對毒性的反應不同。研究回顧胚胎急毒性與成魚急毒性的關係，斜率大多接近 1（文獻為 1.00~1.13），但有部分化學物質屬於神經毒性，對胚胎幾乎沒有影響，因此胚胎毒性閾值明顯高於成魚（以胚胎急毒性轉換會高估 LC_{50} ，造成毒性低估）。除了所採用之 7 個既有化學物質，另納入 13 個先前於「化學物質毒理及生態毒理資訊與風險評估技術建置計畫」中已驗證之物質，擴大樣本數研析 IATA 之效能，此 20 個物質之 QSAR 模式、胚胎毒性試驗及魚類急毒性試驗之毒性數據結果皆列於表 4.4-3。

表 4.4-2 胚胎毒性試驗與魚類急毒性試驗之簡單線性迴歸與統計值

	N	Equation	R ²
Neutral Organics	23	$\log LC_{50} (AFT) = 0.7575 * \log LC_{50} (FET) + 0.491$	0.7155
Phenols	12	$\log LC_{50} (AFT) = 0.8293 * \log LC_{50} (FET) - 0.058$	0.7642
Aliphatic Amines	3	$\log LC_{50} (AFT) = 1.231 * \log LC_{50} (FET) - 1.088$	0.9984
Esters	4	$\log LC_{50} (AFT) = 1.269 * \log LC_{50} (FET) - 0.308$	0.9722
Benzyl Alcohols	1	-	-
Aldehydes (Mono)	2	-	-
Aldehydes (Poly)	1	-	-

表 4.4-3 20 個化學物質分別在 QSAR 模式、胚胎毒性試驗及魚類急性毒性試驗之 LC₅₀

CAS No.	ECOSAR LC ₅₀ (mg/L)	T.E.S.T. LC ₅₀ (mg/L)	FET LC ₅₀ (mg/L)	AFT LC ₅₀ (mg/L)	Classification by ECOSAR
111-76-2	1881.356	745.602	1239.762	1760.000	Neutral Organics
95-48-7	16.909	45.080	65.029	24.000	Phenols
108-94-1	491.475	105.159	1235.832	527.000	Neutral Organics
108-91-8	33.287	47.466	140.854	38.471	Aliphatic Amines
111-15-9	117.695	479.844	50.136	42.200	Esters
98-00-0	697.058	372.966	242.827	1356.000	Benzyl Alcohols
108-95-2	38.351	73.053	110.933	29.000	Phenols
7173-51-5	1.219	NA	0.320	0.327	Neutral Organics
140-66-9	0.116	6.490	6.233	1.367	Phenols
793-24-8	0.864	0.120	5.270	11.670	Neutral Organics
90-43-7	3.164	2.300	2.470	4.467	Phenols
95-63-6	3.359	21.400	591.800	95.965	Neutral Organics
119-61-9	13.964	14.170	55.013	31.983	Neutral Organics
100-52-7	8.601	21.600	1.377	48.677	Aldehydes (Mono)
103-23-1	0.013	0.032	122.210	357.510	Esters
100-21-0	2261.391	NA	>10000	>10000	Neutral Organics
106-94-5	72.845	29.040	814.100	498.900	Neutral Organics
107-22-2	21.574	11.340	140.120	856.180	Aldehydes (Poly)
111-77-3	71001.688	7671.950	>10000	7500.000	Neutral Organics
71-23-8	1497.633	432.750	4183.000	3176.900	Neutral Organics

水生毒性之替代測試 IATA 如圖 4.4-3 測試策略圖所示，建立的整合型測試策略經由以下流程預測化學物質的毒性：(1) 使用兩種 QSAR model (ECOSAR、T.E.S.T.) 預測物質毒性，若物質於兩者毒性分級不一致，直接進行 ECOSAR 分類；若物質於兩者毒性分級一致，且預測為「低毒性 ($LC_{50} > 100 \text{ mg/L}$)」，則被歸類為「對魚類低毒性」；若物質於兩者毒性分級一致，且預測為「可能有毒性 ($LC_{50} \leq 100 \text{ mg/L}$)」，則需要進入下一個評估階段。(2) 被 ECOSAR 分類法分類為苯甲醇類、醛類 (Aldehydes (Mono)) 及聚醛類 (Aldehydes (Poly)) 物質，因為缺乏有效轉換關係式，直接進行魚類急毒性試驗；而被分類為中性有機物類、酚類、脂肪族胺類及酯類物質，則可操作胚胎急毒性試驗，並參照表 4.4-2，根據個別的胚胎和成魚毒性轉換公式推估成魚急毒性。(3) 根據測試結果，若 $LC_{50} > 100 \text{ mg/L}$ ，則會被歸類為「對魚類低毒性」，若物質 $LC_{50} \leq 100 \text{ mg/L}$ ，則根據水生急毒性標準對物質進行分類。

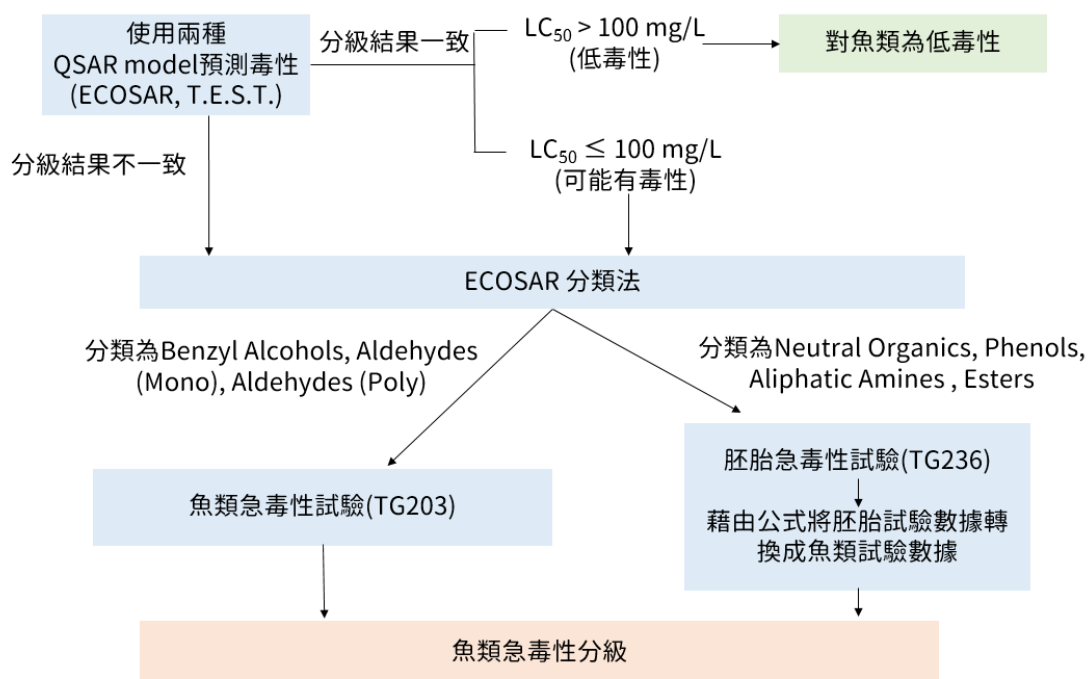


圖 4.4-3 水生毒性之替代測試 IATA 測試策略圖

執行水生毒性之替代測試 IATA, 20 個化學物質之 LC_{50} 皆列於表 4.4-3 中, 首先使用兩種 QSAR 模式 (ECOSAR、T.E.S.T.) 預測物質毒性, 15 個物質於兩種 QSAR model 的分級結果皆一致, 且 CAS No. 111-76-2、108-94-1、111-15-9、98-00-0、111-77-3 及 71-23-8 等 6 個物質的 96h LC_{50} 皆大於 100 mg/L, 被歸類為「對魚類低毒性」。接著使用 ECOSAR 分類法對其餘 14 個可能有毒性之物質進行分類, 分類為苯甲醇類、醛類 (Aldehydes (Mono)) 及聚醛類 (Aldehydes (Poly)) 物質, 直接進行魚類急毒性試驗獲得物質之毒性結果; 而分類為中性有機物類、酚類、脂肪族胺類及酯類物質, 可以操作胚胎急毒性試驗, 並參照表 4.4-2, 根據個別的胚胎和成魚毒性轉換公式獲得 LC_{50} , 根據水生急毒性分級標準將物質進行分級, IATA 分級結果與魚類試驗分級結果對照表如表 4.4-4 所示。

最後進行水生毒性之替代測試 IATA 的驗證, 以 20 個測試物質的魚類急毒性試驗水生急毒性分級結果與 IATA 分級結果比對其毒性推估能力, 在 20 個測試物質當中, 有 17 個物質正確預測成功, 預測準確度為 85%。並且在 20 個化學物質中有 18 項化學物質是使用 IATA 替代測試方法去進行毒性推估。

綜合上述, 得以下結論及適用性建議

1. IATA 方法具有符合動物福祉之精神, 在 20 項化學物質中有 18 項化學物質可以進行 QSAR 結合 FET 方法之 IATA 流程。兩種 QSAR 模型預測結果一致且為對魚類低毒性 (即無法分級), 或是被 ECOSAR 分類法分類為中性有機物類、酚類、脂肪族胺類及酯類之物質可以胚胎急毒性實驗進行替代測試。使用 IATA 擴充至預測 20 個化學物質的毒性, 與成魚實驗值相比, 分級準確率為 85%。
2. 該 IATA 方法適用於 ECOSAR 分類法分類為酚類、脂肪族胺類、酯類及中性有機物類之物質, 其餘類別物質因為樣本數過低無法建立迴歸關係。建議更進一步的收集其他類別物質的斑馬魚成魚急毒性實驗及斑馬魚胚胎急毒性實驗之數據, 以擴充該 IATA 之分析能力。

表 4.4-4 水生毒性之替代測試 IATA 與 AFT 試驗分級結果

CAS Number	AFT 分級	IATA 分級	預測結果
111-76-2	對魚類低毒性	對魚類低毒性	一致
95-48-7	急毒性第 3 級	急毒性第 3 級	一致
108-94-1	對魚類低毒性	對魚類低毒性	一致
108-91-8	急毒性第 3 級	急毒性第 3 級	一致
111-15-9	急毒性第 3 級	對魚類低毒性	不一致
98-00-0	對魚類低毒性	對魚類低毒性	一致
108-95-2	急毒性第 3 級	急毒性第 3 級	一致
7173-51-5	急毒性第 1 級	急毒性第 2 級	不一致
140-66-9	急毒性第 2 級	急毒性第 2 級	一致
793-24-8	急毒性第 3 級	急毒性第 3 級	一致
90-43-7	急毒性第 2 級	急毒性第 2 級	一致
95-63-6	急毒性第 3 級	對魚類低毒性	不一致
119-61-9	急毒性第 3 級	急毒性第 3 級	一致
100-52-7	急毒性第 3 級	急毒性第 3 級	一致
103-23-1	對魚類低毒性	對魚類低毒性	一致
100-21-0	對魚類低毒性	對魚類低毒性	一致
106-94-5	對魚類低毒性	對魚類低毒性	一致
107-22-2	對魚類低毒性	對魚類低毒性	一致
111-77-3	對魚類低毒性	對魚類低毒性	一致
71-23-8	對魚類低毒性	對魚類低毒性	一致

第五章 評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性

章節摘要

本章主要說明評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性。

5.1 節為替代測試方法應用於化學品分類及標示全球調和制度，5.2 節為中華民國國家標準分類（CNS），5.3 節為化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性，5.4 節為替代測試方法應用於危害分級分類之適用性建議。

5.1 替代測試方法應用於化學品分類及標示全球調和制度

5.1.1 化學品分類及標示全球調和制度（GHS）概況

多年來許多國家或組織制定各種法律或命令，要求應製備標示化學品之物質安全資料表相關資訊，且應傳達至各相關化學品的使用者，以提供化學品安全使用資訊。鑒於可取得之化學品數量種類龐大，只靠任一單位之個別法規恐無法有效管理所有化學品，且為了提供資訊給化學品使用者，使其全盤瞭解化學品的危害與安全使用資訊，並能在使用時採取適當的保護措施，因此採用《化學品分類及標示全球調和制度（GHS）》以進行化學品的分類和標示，此舉也為化學品的貿易及管理需求提供發展的基礎。

國際組織在 50 年代初期就已開始進行化學品分類和標示的工作。《全球統一制度文件》的第 1 版（也稱為紫皮書）於 2002 年 12 月由聯合國（全球）化學品分類和標示統一制度小組委員會通過，並獲得批准由聯合國危險貨物運輸和全球化學品統一分類標示制度小組委員會提供。在 2003 年 7 月經聯合國經濟社會委員會（United Nations Economic and Social Council）正式採用，且授權將其翻譯成聯合國官方語言以利全世界使用。在 2005 年出版的《紫皮書》修訂版，專家委員會對 GHS 進行一系列調修，包括有關分類和標示的各種修訂規定及使用預防性說明和象形圖的新指南。GHS 可提供國際上通用且易理解的危害通識系統，不僅提昇對人類健康及環境之保護，並可節省跨國企業製作標示及物質安全資料表的費

用與時間，各國於 2008 年展開實施 GHS；APEC 會員在自願性的基礎上展開推動施行 GHS，我國自 2006 年起已透過跨部會推動方案，於 2008 年起分階段展開 GHS 分類標示及建立物質安全資料表。

GHS 並非法律、規定或法定標準，而是全球性的「協定」。隨著 GHS 不斷發展，聯合國每兩年發布一次新版本，而最新修訂本第 9 版 GHS 已於 2021 年發佈。當國家（或立法區域）採用 GHS 時，各國可自行決定採用哪種版本以及哪種「元件建構」（GHS 類別和子類別術語），然而這樣做的結果是國家與國家之間法規相似，但不盡相同（Marketing, 2020）。

GHS 包括下列要項：（一）依據其健康、環境和物理性危害，提供物質及混合物一致的分類標準；（二）一致的危害通識要項，包括標示和安全資料表的要求。對於奈米物質之危害預防，由趨勢來看，首先著重於風險分級管理及物質安全資料表資料掌握。安全資料表（SDS）是提供物質的物理性質（熔點、沸點、閃燃點等）、毒性與健康危害效應、反應性、存放與安置、洩漏處理、防護措施等相關數據的文件檔案。2006 年，歐盟根據 REACH 法規建立了 GHS 的物質安全資料表，各國也陸續跟進推動 GHS 化學品管理。我國與歐盟及美日等國的物質安全資料表格式基本上一致，包括 16 個項目，唯一差異處只是語言不同（勞動部勞動及職業安全衛生研究所，2014）。

2018 年 12 月，GHS 委員會對《化學品分類及標示全球調和制度》進行修訂，包括新的分類標準、危害通報要素、化學品在承受壓力下分級分類的決策邏輯、使用體外 / 離體數據和非動物測試之新規定來評估皮膚腐蝕性和刺激性的方法、對特定目標器官毒性訂定分類標準，還有其它雜項增新修訂等，故於 2019 年提出第 8 版。隨後在第十屆會議（2020 年 12 月 11 日）上，委員會通過一系列修正後於 2021 年提出 GHS 第 9 版，包括修訂第 2.1 章（爆炸物）以便更好地解決爆炸危險、分類和標示附件 1 中的彙總表、防範說明的修訂和進一步合理化以及更新參考 OECD 測試指南附件 9（水生環境危害指南）和 10（水介質中金屬和金屬化合物的轉化 / 溶解指南）中的化學品測試指引。

5.1.2 國際將替代測試方法應用於化學品全球調和制度

於 2002 年 9 月 4 日在約翰尼斯堡通過的《執行計劃》(Plan of Implementation) 中提及，永續發展世界高峰會議(World Summit on Sustainable Development, WSSD) 鼓勵各國盡快執行全球統一制度，期許該系統能在 2000 年之前全面運作。隨後於 2008 年，聯合國經濟及社會理事會請尚未採取行動的國家，通過適當的國家程序或立法，採取必要步驟，按照 WSSD 執行計劃的建議實施 GHS；它還邀請各區域委員會、聯合國會員、專門機構和其他有關組織促進全球統一制度的實施，並酌情修訂其國際法律。另外通過有關運輸安全、工作場所安全、消費者保護或環境保護文書以便實施 GHS。近年為實現動物試驗 3Rs 原則所發展的替代測試也正蓬勃發展中，2019 年的《化學品全球調和制度指南》第八版，便將體外數據和非動物試驗測試的替代方法來評估皮膚腐蝕性和刺激性，其它替代測試是否適合應用於 GHS 也在評估進行中。隨後 2021 年修訂的第 9 版 GHS 並未特別對替代測試進行更新。

最新版《化學品全球調和制度指南》第 9 版所認可採行動物替代測試方法，以皮膚刺激性 / 腐蝕性替代測試為例，皮膚腐蝕是指對皮膚產生不可逆的損害，意即暴露於某種化學物質或混合物後，會發生從表皮到真皮明顯可見的壞死狀態，皮膚刺激是指接觸物質或混合物後對皮膚產生可逆損害。GHS 為了進行分類，收集了所有有關皮膚腐蝕/刺激的可用資訊和相關信息，並評估了其在充分性和可靠性方面的質量，只要有可能，分類應基於使用國際認可和接受的方法（如 OECD 測試準則或等效方法）生成之數據。隨後將可用資訊組織分配到各個級別中，並以結構化和順序的方式進行決策。當資訊符合標準時，將直接進行分類。但是若可用資訊在層級中得出不一致或矛盾的結果，則根據該層級中證據的權重對物質或混合物進行分類。在某些情況下，當來自不同層級的資訊得出不一致或矛盾的結果或單獨的數據不足以得出分類結論時，將使用證據權重方法。以下舉 GHS 中皮膚刺激性 / 腐蝕性的替代測試為例。GHS 將物質分配到危害類別中的以下 3 個級別之一：

1. 第 1 級（皮膚腐蝕）
2. 第 2 級（皮膚刺激）
3. 第 3 級（輕度皮膚刺激）

這些級別適用於希望具有多個皮膚刺激類別的主管部門（例如：用於農藥分類）。在有人類數據做分類的情況下，應給予有關皮膚腐蝕 / 刺激的現有可靠、高質量之人類數據高權重，並且應作為評估的第一線，因為這會提供與皮膚影響直接相關的資訊。現有的人類數據可能來自一次或多次接觸，例如在職業、消費者、運輸或緊急情況下的情景以及在有證據可查的病例報告和觀察中進行的流行病學和臨床研究。當前可用的單個體外/離體測試方法可以解決皮膚刺激或皮膚腐蝕問題，但不能在單個測試中解決兩個測試終點問題，因此僅基於體外 / 離體測試結果進行分類時可能需要來自多種方法的數據。

分類可以基於非動物測試方法，並在逐案的基礎上適當考慮可靠性和適用性。這些方法包括預測定性結構與活性關係的計算機模型（SAR）、定量結構活性關係（QSAR）和計算機專家系統，並使用類比和分類方法進行交叉參照。在分層方法中，現有的人和動物數據構成最高層，其次是體外 / 離體數據和動物中其他現有的皮膚數據，然後是其他資訊來源。當同一層內的數據不一致或衝突，則該層的結論由權重證據法確定。如果來自幾層的資訊與所得到的分類不一致或衝突，則來自較高層的足夠質量之資訊通常會比來自較低層的資訊具有更高的權重。進一步討論將在報告中提及。

為進行危害分級分類，要求製造商、進口商或下游用戶收集和評估與物質或混合物危險特性相關之現有可用資訊：若無則應進行符合 REACH 法規、OECD 良好實驗室操作規範要求及國際程序驗證的國際認可方法之生態毒理學和毒理學測試，以確保數據之品質及可信度；若要進行動物測試，應符合動物試驗 3Rs 原則；目前已開發許多替代方法，使用非動物系統代替動物，以減少試驗動物數量，或改進程序以減輕它們對研究中動物的痛苦或壓力，此乃因 ECHA、利益相關者和許多其他監管機構都認可並執行 3Rs 原則。替代方法也可以考慮化學特性、(Q) SAR 預測和模型，以及使用包括基因組學和蛋白質組學在內的當前或新技術，對細胞或組織進行的體外測試。此外，可以通過「交叉參照」方法使用類似物的測試數據資訊，或者使用「類別」方法對一組物質使用物質的毒理學特性進行預測；申請廠商必須提供足夠的資訊和適當的理由來支持這些預測。僅當用盡所有其他生成資訊的方法並且沒有足夠的可靠性和質量的數據時，才可以根據 REACH 第 13 條第 3 款所述的測試方法進行測試，以生成新的化學品資訊，但仍禁止對人類和非人類靈長類動物進行測試。在考慮進行體內測試之前要評估的資訊包括：

1. 測試數據
2. 是否按照法規（REACH、CLP、GHS）進行
3. 歷史人類數據
4. QSAR
5. 來自體外方法的數據

使用類似物質或混合物的相關資訊來預測所考慮的目標物質或混合物的危險特性（如交叉參照），目前尚無體外測試或 QSAR 預測能夠完全取代毒理學研究對化學品在人類健康危害上多個測試終點的影響，包括長期接觸或多代接觸後的健康影響。此外應針對化學品相關的暴露途徑（口服、皮膚和吸入）及該物質在市場上的形式或物理狀態（可合理地預期使用該物質）進行研究以獲取資訊。當可用的測試數據僅是支持性、矛盾性、模稜兩可的或無法輕鬆地與標準法規進行比較時，應採用專家判斷的證據權重方法：從其他來源獲得的相關數據（如科學上有效的臨床或流行病學案例研究）可用於分類和標記。對環境危害，用於分類（水生急性和慢性）的數據主要基於使用高度標準化的測試規程在 3 種不同水生營養階層上確定毒性危害終點。魚、甲殼綱和藻類或其他植物可用作替代品，代表每個營養級的一系列物種和分類群。物質或混合物的環境宿命資訊（降解和生物蓄積）與毒性數據結合使用，以確定慢性毒性（Verbueken, Bars et al., 2018）。

GHS 工作的前提是應統一現有系統，以便開發一個單一的、全球統一的系統，以解決化學品、標示和安全數據表的分類問題。然現實會面臨的困難有法規文本不統一、危害分類不統一、SDS 要求及標示要求不統一等情形，故及時更新法規動態，瞭解投放市場具體需求及提供合規的 SDS 和標示是必要的工作。

接續說明最新版 GHS 與我國現行的 CNS 15030 化學品分類及標示之發展，並研討 GHS 與中華民國國家標準分類於替代測試方法之差異，進一步研提以替代測試方法進行危害分級分類之原則或必需資訊，據此評估並調適化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性。

5.1.3 替代測試方法應用於化學品分類及標示全球調和制度

2018 年 12 月，GHS 委員會對 GHS 進行修訂，包括新的分類標準、危害通報要素、化學品在承受壓力下分級分類的決策邏輯、使用體外/離體數據和非動物測

試之新規定來評估皮膚腐蝕性和刺激性的方法、對特定目標器官毒性訂定分類標準，還有其它雜項增新修訂等，而後於 2019 年提出《化學品分類及標示全球調和制度》第 8 版，此版強調替代測試在化學品對皮膚和眼睛危害分類上的重要性，利用分層方式將化學品做危害分類，簡述如下。

一、GHS 對腐蝕刺激皮膚物質的分類準則

GHS 第 8 版物質對皮膚的危害分類區分成以下三個級別。第 1 級為皮膚腐蝕，指對皮膚產生不可逆轉的損害，亦即暴露於某種物質或混合物後會發生從表皮到真皮之肉眼可視的壞死。此類別可以進一步分為三個子級別（1A、1B 和 1C），當管理機構需要多個腐蝕標準時可以使用。如果主管機關不要求進行子級別或數據不足以進行子級別，則腐蝕性物質應分類為第 1 級。當數據足夠時，並且在主管機關要求的情況下，可以將物質分類為三個子級別 1A、1B 或 1C 之一。第 2 級為皮膚刺激，指在接觸某種物質或混合物後對皮膚產生可逆損害。第 3 級為輕度皮膚刺激，該類別適用於希望具有多個皮膚刺激類別的主管機關（例如：用於對農藥進行分類）。

表 5.1-1 即是 GHS 利用分層方式來對化學品進行危害分類，以現有人類和動物數據構成最高層，其次是體外 / 離體數據和其他現有動物皮膚數據，然後是其他資訊來源。如果來自同一層級數據的資訊不一致和 / 或相互衝突，則該層級的結論由證據權重方法確定。如果來自多個層級的資訊與最終分類不一致和 / 或相互衝突，則較高層級中具有足夠品質的資訊通常比較低層級的資訊具有更高權重。利用分層方法將可用資訊編列到各個級別 / 層中，並以結構化和順序的方式進行決策。當資訊始終符合標準時，將直接進行分類。但是，在同一層級中得出不一致和或矛盾的結果，則根據該層級中證據權重對進行分類。

第一層是基於人類數據及標準動物數據進行分類。第 1 級的皮膚腐蝕類別中另外具有三個子級別：子級別 1A 須遵照 3 分鐘的暴露和 1 小時觀察的試驗條件評估是否具有腐蝕性反應；子級別 1B 描述了是否具有腐蝕反應須取決於超過 3 分鐘且最多 1 小時的暴露以及觀察最多 14 天的試驗條件；以及 1C 子級別則為評估腐蝕反應是否發生於暴露時間 1 到 4 小時以及觀察到 14 天的試驗條件。考量動物福祉，如一定需要進行腐蝕性的動物測試，應按照子級

別的時間上限予以測量（階層式測試），避免直接進行 4 小時的腐蝕性測試，例如：當物質具有腐蝕潛勢時，應先使用 1 隻試驗動物進行進行 3 分鐘的前導敷貼測試，若已達腐蝕性反應，則不可再延長時間進行測試。第 2 級皮膚刺激級別指為物質測試長達 4 小時後對皮膚產生可逆性損傷，通常分為皮膚紅腫與水腫兩個指數。主管機關也可採納較輕微的第三類分類（皮膚輕度刺激）。有幾個標準可用於區分第 2 級與第 3 級。它們的主要區別在於皮膚反應的嚴重程度，第二級的主要標準是 3 隻測試動物中至少有 2 隻具有紅斑/結痂或水腫的平均評分為 ≥ 2.3 和 ≤ 4.0 。對於第三類，3 隻測試動物中至少有 2 隻的平均評分 ≥ 1.5 和 < 2.3 。

表 5.1-1 GHS 利用分層方式在皮膚腐蝕或刺激危害分類上對化學品進行分類

層級	參數	結果	總結
1	人類數據或標準動物數據 ↓ 無資料或無法決定 ↓	→決定→	評估與較低層的一致性： 1. 若較低層的數據建議較嚴格分類與有錯誤分類的疑慮則移到第6層 2. 否則根據最高結論層的分類得出結論
2	體外/離體動物數據 ↓ 無資料或無法決定 ↓	→決定→	
3	其他現有的動物皮膚數據 ↓ 無資料、可決定但無法分類或無法決定 ↓	→決定→	
4	極端pH值（ $\text{pH} \leq 2$ 或 ≥ 11.5 ）和酸/鹼儲量（acid / alkine reserve） ↓ 無資料、沒有極端pH值、極端pH值沒有數據支持低/無酸/鹼儲量或無法決定 ↓	→決定→	
5	非測試方法 ↓ 無資料或無法決定 ↓	→決定→	
6	證據評估的總體權重 ↓ 無資料或無法決定 ↓	→決定→	分類結論 腐蝕或刺激的分類 (根據應用適當類別或亞類別)
7	無可能分類		

第二層是基於體外 / 離體數據的分類，可選擇不同的體外 / 離體測試方法，但目前尚無法在同一測試中評估刺激性及腐蝕性兩個終點。因此，僅基於體外 / 離體測試結果的分類可能需要來自一種以上方法的數據。目前國際驗證和接受的體外 / 離體測試方法尚無法進行第 3 級的分類。

由於測試的使用相對複雜，利用現有資訊、電腦模擬或物質特性等評估物質對皮膚的效應可有效避免重複進行不必要測試。流程建議以現有資訊判斷物質是否有腐蝕性的潛勢，若判斷有其可能，則可優先使用 OECD TG 430、TG 431 或 TG 435 進行測試，結果若符合其判斷原則，則將物質歸入第 1 級皮膚腐蝕性，有需求時也可依照測試方法進一步判斷 1A、1B 或 1C 的次分類。反之，如果現有資訊可以排除腐蝕性，則可優先根據 OECD 測試指引 TG 439 進行了測試，若結果符合其判斷原則，應考慮將物質歸類為第 2 級皮膚刺激物。目前體外方法尚無法進行第 3 級的分類，因此如需進行第 3 級的分類，且體外資訊顯示未達第 1 級或第 2 級的分類標準，則需要額外資訊來區分第 3 級和有結論但不足以分類兩個級別。

第三層為基於其他現有動物皮膚數據的分類，如果一種物質通過皮膚途徑的測試顯示具有高毒性，例如：皮膚途徑的急毒性測試，考量不進行體內皮膚腐蝕 / 刺激研究，因為進行刺激性 / 腐蝕性試驗的物質用量可能超過毒性劑量，進一步可能導致動物死亡。

第四層為依照化學性質分類，對皮膚的影響可能因極端的 pH 值導致，例如 ≤ 2 和 ≥ 11.5 。通常此類物質會對皮膚產生顯著影響。在沒有任何其他資訊的情況下，如果一種物質的 pH 值 ≤ 2 或 pH 值 ≥ 11.5 ，則該物質被視為具有腐蝕性（第 1 級）。然而，如果酸/鹼儲量顯示該物質可能不具有腐蝕性，不論其 pH 值低或高，皆需要通過其他數據證實，如：適當的體外 / 離體試驗驗證。緩衝能力和 pH 值可以通過，如：OECD TG 122 等測試方法來確定。

第五層為基於非測試方法的分類。此類方法包括預測定性的結構關係推估（SAR）、定量結構關係推估（QSAR）、電腦專家系統或使用模擬和分群方法進行交叉參照（Read-Across）。非測試方法可進行「不需要分級」的判斷，但使用時需要注意模式或方法的適用性和可靠性。

GHS 第 8 版和過往對皮膚腐蝕/刺激物質分類的主要不同處在將經驗證可行的替代測試方法移至分層更高處，取代 SAR 逕行將物質先做分類，以期達 3Rs 原則。

二、GHS 對嚴重眼損傷/眼刺激物質的分類準則

GHS 將物質對眼睛的危害分類區分成二類：嚴重眼損傷（Serious eye damage）和眼刺激（Eye irritation），其定義如下：

1. 嚴重眼損傷是指眼睛暴露於某種物質或混合物後，在眼內產生組織損傷或視力嚴重的物理衰退，無法完全可逆。
2. 眼睛刺激是指在眼睛暴露於某種物質或混合物後發生的完全可逆的眼睛變化。

GHS 第 8 版在對嚴重眼損傷/眼刺激物質的分類中，重點同樣著重在利用分層方式，將現有人類數據擺在優先分類依據，其次是現有的動物數據，再來是體外數據，最後是其他資訊來源。當數據滿足標準時，可直接產生分類結果。在某些情況下，物質或混合物的分類是根據層級內的證據權重進行。在總證據權重方法中，將所有可用於判斷嚴重眼損傷/眼刺激的資訊綜合考量，包括經過驗證的體外測試結果、相關的動物數據以及人類數據，例如：流行病學和臨床研究以及具良好品質的病例報告和觀察記錄。

在眼睛危害的物質分類標準（classification criteria for substances）中，可將物質分為第 1 級（嚴重眼睛損傷）或第 2 級（眼睛刺激），如表 5.1-2 和表 5.1-3 所示：

表 5.1-2 嚴重眼損傷（類別 1） / 對眼的不可逆影響

級別	分類原則
Category 1 類別 1：嚴重眼損傷（1 類） /對眼的不可逆影響	物質會造成： (a) 至少對一隻動物的角膜、虹膜或結膜造成影響，且預計不能逆轉或通常在 21 天的觀察期內沒有完全逆轉；和/或 (b) 在 3 隻測試動物中的至少 2 隻中，陽性反應為：(i) 角膜混濁 ≥ 3 ；和/或 (ii) 虹膜炎 > 1.5 ；計算方式為在滴注測試材料後 24、48 和 72 小時分級（grading）後的平均分數。

表 5.1-3 對眼睛類別的可逆影響

級別	分類原則
有可能引起可逆轉眼刺激的物質	
Category 2/2A 類別 2A	在 3 隻測試動物中至少有 2 隻產生以下陽性反應的物質： (a) 角膜混濁 ≥ 1；和 / 或 (b) 虹膜炎 ≥ 1；和 / 或 (c) 結膜發紅 ≥ 2；和 / 或 (d) 結膜水腫（結膜水腫）≥ 2 計算方式為在滴注測試材料後 24、48 和 72 小時分級後的平均分數，並且通常在 21 天的觀察期內完全逆轉。
Category 2B 類別 2B	在 2A 類中，當上述影響在觀察 7 天內完全可逆時，眼睛刺激物被認為對眼睛有輕度刺激（2B 類）。

依照各國主管機關需求，可將「眼睛刺激」只分類為整體級別 2（overall Category 2）；或使用子級別，將物質區分為 2A 級（Category 2A）和 2B 級（Category 2B）。目前歐盟僅使用眼睛刺激第 2 級，而不使用子級別，而臺灣的化學物質登錄則參採第 2 級的子級別。當需要參考不使用子級別國家所作分級時，可使用實驗數據重新進行子級別的分類。當資料無法取得或難以判斷時，可評估使用較保守的子級別。

現有之人類和動物數據應作為第一線評估，因可提供與眼睛影響直接相關的資訊。在考慮對嚴重眼睛損傷 / 眼睛刺激進行任何測試之前，必須評估可能的皮膚腐蝕，以避免測試皮膚腐蝕性物質對眼睛的局部影響。GHS 第 8 版提出評估嚴重眼損傷 / 眼刺激的分層方法，根據步驟將化學品分類，如表 5.1-4 示。

分層方法提供了在儘量減少動物實驗的前提下，如何彙整現有資訊並以證據權重進行危害評估和危害分類的方法。雖然可以透過評估分層內的單一資訊來進行危害判斷，但應當資訊彼此衝突時，應避免進行過度的資訊排除，而以綜合考量及整體資訊的證據權重來做出分類決定。

表 5.1-4 嚴重眼損傷 / 眼刺激的分層評估

層級	參數		結果		總結
1a	現有人或動物嚴重眼睛損傷 ¹	→	嚴重眼損傷	→	分類成嚴重眼損傷
		→	眼刺激	→	分類成眼刺激 ²
	陰性數據 / 不足數據 / 無數據	↓			
1b	現有的人類或動物皮膚腐蝕數據	→	皮膚腐蝕	→	被認為會造成嚴重的眼睛損傷
	陰性數據 / 不足數據 / 無數據	↓			
1c	現有的人或動物嚴重的眼睛損傷/眼睛刺激數據 ¹	→	現有數據顯示該物質不會造成嚴重的眼睛損傷或眼睛刺激	→	未分類
	沒有數據 / 不足數據	↓			
2	其他，現有皮膚 / 眼睛數據動物 ³	→	有數據；其他現有數據表明該物質可能會嚴重損害眼睛或刺激眼睛	→	可能被認為會對眼睛造成嚴重傷害或對眼睛有刺激性 ²
	沒有數據 / 不足數據	↓			
3	現有的離體 / 體外眼數據 ⁴	→	陽性：嚴重眼損傷	→	分類成嚴重眼損傷
		→	陽性：眼刺激	→	分類成眼刺激 ²
	沒有數據 / 不足數據	↓			
4	基於 pH 的評估(與考慮化學物質的酸 / 鹼儲量 ⁵)	→	pH ≤ 2 或 ≥ 11.5 與高酸/鹼儲量或沒有數據顯示酸/鹼儲量	→	分類成會造成嚴重眼損傷
	不是 pH 極端值，沒有 pH 數據或有極端 pH 但數據顯示低 / 無酸 / 鹼儲量	↓			
5	經驗證的結構活性關係 (SAR) 方法	→	嚴重眼損傷	→	被認為會造成嚴重眼損傷
		→	眼刺激	→	被認為對眼睛有刺激性 ²
		→	皮膚腐蝕	→	被認為會造成嚴重眼損傷
	沒有數據 / 不足數據	↓			
6	總體證據權重 ⁶	→	嚴重眼損傷	→	被認為會造成嚴重眼損傷
		→	眼刺激	→	被認為對眼睛有刺激性 ²
7	未分類				

註：1. 現有的人類或動物數據可以來自單次或多次暴露，例如在職業、消費者、運輸或緊急應變場景中；或根據經驗證和國際公認的測試方法進行的動物研究有意生成的數據。儘管事故或毒物中心數據庫中的人類數據可以提供分類證據，但沒有事故本身並不是不分類的證據，因為暴露通常是未知或不確定的；

2. 歸入適當的適用類別；

3. 應仔細審查現有的動物數據，以確定是否可以通過其他類似資訊獲得足夠的嚴重眼損傷/眼刺激證據。眾所周知，並非所有的皮膚刺激物都是眼睛刺激物。在作出此類決定之前，應先行專家判斷；

4. 應評估使用經過驗證的方案與分離出之人動物組織或其他非以組織為基礎經過驗證試驗研究所得的證據。用於識別眼睛腐蝕物和嚴重刺激物（即嚴重眼損傷）的國際公認的、經過驗證的測試方法的例子包括 OECD TG 437（牛角膜混濁和通透性（BCOP））、OECD TG 438（離體雞眼（ICE）和 OECD TG 460（螢光素）滲漏（FL））。目前沒有經過驗證且國際公認可用於識別眼睛刺激的體外測試方法。經過驗證的皮膚腐蝕體外測試之陽性測試結果將可歸類為會導致嚴重眼損傷的結論；

5. 單獨測量 pH 值可能就足夠了，但最好評估酸/鹼儲量（緩衝能力）。目前，沒有經過驗證的國際公認可評估該參數之方法；

6. 應考慮有關物質的所有可用資訊，並對總體證據權重做出決定。當某些參數的可用資訊存在衝突時尤其如此。包括皮膚刺激資訊在內的證據權重可能會導致對眼睛刺激的分類。在總證據權重中也應考慮適用且經驗證後的體外測試之陰性結果。

5.1.4 化學品全球調和制度關於奈米物質分級分類的發展

世界衛生組織（World Health Organization, WHO）在 2017 發表《WHO guidelines on protecting workers from potential risks of manufactured nanomaterials》提供幾項建議，以保護工人免受人造奈米材料（MNM）的潛在風險，該指引涉及對 MNM 健康危害和暴露的評估、控制、健康監測和工人培訓，其中提出的 11 項建議之一是根據全球化學品統一分類和標示系統在安全數據表上為 MNM 分配危害類別，建議基於經濟合作與發展組織所開發的 MNM 特定檔案來確定幾種類型奈米材料的危害等級，包括富勒烯、單壁奈米碳管、多壁奈米碳管、奈米銀粒子、二氧化矽等，然基於奈米物質的標準試驗和替代測試仍在發展驗證中，使得奈米材料無法有足夠的資訊來提供有關健康和安全的數據評估，例如奈米材料的處理和儲存等，故 GHS 目前尚未將奈米物質歸類在特定危害分類中。

2019 年 5 月，北歐部長理事會發布工作文件《GHS 分類標準對奈米材料的適用性》（The applicability of the GHS classification criteria to nanomaterials），GHS 為危險物質和混合物的分類提供基礎，並且該標準已應用於 5 種 GHS 危險類別的 4 種不同的人造奈米物質。這些被選擇進行分類的奈米物質包括單壁奈米碳管（single wall carbon nanotubes, SWCNT）（具有高比表面積的生物持久性奈米纖維）、奈米二氧化矽（奈米粒子，水溶性較高，比表面積較高的金屬氧化物）、奈米銀顆粒（高密度純金屬元素）及奈米氧化鋅顆粒（比表面積相對較低的金屬氧化物）；分類中使用的 5 個危害終點是急性毒性（口服、皮膚和吸入），眼睛損傷 / 刺激，皮膚過敏，特定標的器官毒性反覆暴露（specific target organ toxicity repeated exposure, STOT RE）（口服、皮膚與吸入）和生殖細胞致突變性。經合組織人造奈米材料工作組（OECD / WPMN）已經開發研究許多奈米材料數據，這些數據可作為該項目的一部分進行評估。其他資訊來源包括 NanoReg 計畫、NanoSafety Cluster 計畫、相關的 REACH 物質註冊和網頁文獻搜索。在四個方面評估了測試數據：測試方法的適用性、全球統一制度標準和擬議分類的適用性、識別數據差距和不確定性以及是否需要修訂 GHS 標準或進一步的指導（Aravantinou, Andreou et al., 2017）。

鑒於奈米物質的物化性質及生物安全性與一般化學品有所差異，因此後續應持續蒐研化學品全球調和制度是否對於奈米物質有不同分級分類相關的標準。

5.2 中華民國國家標準（CNS）分類

5.2.1 國家標準分類簡介

「標準化」是 19 世紀末、20 世紀初興起之活動，世界上首先倡導實施工業標準化的國家是德國，繼之為英、美、法、蘇、日等 20 餘國。在各國推行標準化過程中，有些國家由政府之主管機構推行，如日本、韓國、蘇聯等國。也有國家由半官方或民間團體推行，如英、法、奧等國。另有許多國家由政府和半官方或民間團體共同推行，如美國、荷蘭、瑞士等。

標準是一種技術規範，明白規定產品的品質、尺寸、成分等特性，及試驗方法、標示包裝等各項。標準之層級區分有：國際標準（由國際標準化或標準組織所制定及採行）；區域標準（由區域標準化或標準組織所制定及採行）；國家標準（由國家標準機構所制定及採行）；團體標準（由各行業或專業團體制定及採行）；公司標準（由各公司企業制定及採行）。

為制定及推行共同一致之標準，並促進標準化，謀求改善產品、過程及服務之品質、增進生產效率、維持生產、運銷或消費之合理化，以增進公共福祉，我國於民國 35 年公布《標準法》全文 9 條，民國 86 年修正公布全文 19 條。中華民國國家標準（CNS）採自願性方式實施。國內外任何利害關係人（自然人或法人）均可針對與本身有關之產品、程序或服務，提出制定或修訂 CNS 要求之提議。但經各該目的事業主管機關引用全部或部分內容為法規者，從其規定。國家標準由經濟部中央標準局主管辦理，規範之項目（標準法第 5 條）如下：

1. 產品之種類、等級、性能、成分、構造、形狀、尺度、型式、品質、耐久度或安全度及標示。
2. 產品之設計、製圖、生產、儲存、運輸或使用等方法，或其生產、儲存或運輸過程中之安全及衛生條件。
3. 產品包裝之種類、等級、性能、構造、形狀、尺度或包裝方法。
4. 產品、工程或環境保護之檢驗、分析、鑑定、檢查或試驗方法。
5. 產品、工程技術或環境保護相關之用詞、簡稱、符號、代號、常數或單位。
6. 工程之設計、製圖、施工等方法或安全條件。
7. 其他適合一致性之項目。

中華民國國家標準依其專門技術領域或行業別共分為 26 類(21 個類號)，如表 5.2-1 所示。最新之標準分類可參閱經《經濟部標準檢驗局編印之文件》(經濟部標準檢驗局，2020)，亦可至中華民國國家標準(CNS)網路服務系統(Aravantinou, Andreou et al., 2020)檢索標準文件。

中華民國國家標準可能會遭遇的問題如下：部分標準更新緩慢，無法符合現況需求；我國標準與國際標準接軌有所落差；我國之標準種類過多且重複性高以及國內標準之制定常參考國外標準，可能導致忽略功能性及國內需求，故瞭解中華民國國家標準在化學品及替代方法上的規範有其必要性。

表 5.2-1 中華民國國家標準分類項目

類別	項目	類別	項目
A 類	土木工程及建築	M 類	礦業
B 類	機械工程	N 類	農業、食品
C 類	電機、電子工程	O 類	木業
D 類	機動車及航太工程	P 類	紙業
E 類	軌道工程	Q 類	環境保護
F 類	造船工程	R 類	陶業
G 類	鐵金屬冶煉	S 類	日常用品
H 類	非鐵金屬冶煉	T 類	衛生及醫療器材
J 類	核子工程	X 類	資訊及通訊
K 類	化學工業	Z 類	工業安全、品質管制、物流及包裝、一般及其他
L 類	紡織工業		

5.2.2 我國標準分類和國際標準分類的異同

國際標準化組織 ISO 源於 1926 年成立的國家標準化協會的國際聯盟（International Federation of the National Standardizing Associations, ISA），ISA 的活動因於 1942 年的第 2 次世界大戰而停止，但其活動內容由聯合國標準化協會聯合會（UNSCC）作為臨時機關繼續開展工作。1946 年，UNSCC 於倫敦召開會議，決定成立新的國際組織，旨在促進國際間的合作和工業標準的統一，並於 1947 年正式成立。在瑞士日內瓦擁有中央事務局，負責電氣、電子領域之外的國際標準化業務，制定和發行 ISO 標準（Verbueken, Bars et al., 2018）。

我國早期在推動危害標示時，也曾訂定國家標準方式（原 CNS 6864 危險物標示）以使各相關部會於法規中有統一的標準，而後在新增修訂相關國家標準需要時，為考量「工作場所與運輸之 GHS 相關內容是否需整合在同一個標準內」，並為使能與國際通用的工作場所 GHS 紫皮書和聯合國運輸橘皮書兩者能共同接軌，經跨部會協調後決議分成兩套標準，將原來的 CNS 6864 更改名稱為《危險物運輸標示》，其適用範圍明確定義為運輸場合；其餘如工作場所等則直接引用新增之標準，即 CNS 15030 化學品分類及標示當作其規範，CNS 15030 於民國 95 年 10 月 12 日由經濟部標準檢驗局正式公告，適用於所有具危害性的化學品，適用對象包括消費者、勞工、運輸勞工和緊急應變人員，其化學品的分級分類是參考 2005 年聯合國 GHS 之規定所訂。我國職業安全衛生法規定雇主使勞工製造、處置或使用之化學品，須符合國家標準 CNS 15030 化學品分類，具有健康危害者，應評估其危害及暴露程度，劃分風險等級，並採取對應之分級管理措施。在這本節中我們將會討論我國標準分類和國際標準分類的異同，如何將這些差異和國際法規銜接以減少資源人力的耗費是我們工作目標之一。

5.2.3 研析我國國家標準分類應用替代方法之適用性

為配合聯合國 2008 年推動 GHS 時程及各國推動之進展，臺灣 GHS 制度實施採用分階段公告適用的彈性機制，分別於 2009 年 2 月 3 日、2011 年 1 月 7 日及 2013 年 12 月 23 日公告三階段適用的危害物質共計 3,171 種。其他危害性化學品，則自 2016 年 1 月 1 日起全面實施 GHS 制度，並給予業者 1 年（2016 年 1 月 1 日至 12 月 31 日）之緩衝期。

GHS 在化學品危害分類上分為物理、健康和環境三大方面，其中環境危害分類包括水環境之危害物質和臭氧層之危害物質，CNS 15030 依循 GHS，最後一項環境危害分類中的臭氧層危害物質（CNS 15030-28）已於 2015 年 9 月 23 日加入危害分類項目，因此目前臺灣 CNS 15030 共 28 項分類國標與 GHS 同步。

亞太經合會(APEC)2019 年對亞太地區會員體進行 GHS 之執行現況調查，依據其調查結果提出後續 GHS 執行建議，以利 APEC 會員體間的 GHS 實施更調和與聚斂，包括：在 2021 年前採行聯合國第七版之化學品全球分類及標示調和制度（GHS）、針對未來 GHS 版本之更新執行自動審查程序、對於危害子級別分類允許採用元件架構原則給予彈性，以及針對個別危害分類及濃度限值做進一步討論（Aravantinou, Andreou et al., 2020）。我國推動的化學品國家標準分類與替代測試方法是否能與國際化學品管理制度接軌非常重要，除在學術上能與國際交流溝通、累積研究能量外，產業若能依循國家標準進行化學品分類及標示，將能順利進行國際貿易、擴大產能，而為動物試驗 3Rs 原則所推行的替代方法是國際趨勢，故發展研究我國國家標準分類應用替代方法之適用性是未來將行之路。

CNS 15030 所公告之化學品分類及標示-腐蝕/刺激皮膚物質及嚴重損傷 / 刺激眼睛物質同 GHS 採分層方式來對化學品進行危害分類評估。無論是 GHS 或 CNS 15030 皆以現有人類或動物試驗的相關數據為第一分類步驟，其次是經驗證的優質替代測試方法：在 CNS 15030 中將結構-活性相關或將結構-性質相關 [SAR/structure property relationships (SPR)] 放在分層方法較前面的步驟幫化學品分類，而 GHS 則將現有的離體 / 體外數據分層步驟擺在 SAR 的位階更高端處，此乃因隨科技進步，已有更多更可靠的離體 / 體外試驗被發展和驗證。

我國 CNS 15030 是參考 GHS 第四版所制訂，其它替代測試仍在研究發展中，於 2020 年我國公布的《既有化學物質標準登錄資料撰寫指引建議之測試規範》已認可數個替代測試來對皮膚刺激性 / 腐蝕性、眼睛刺激性、皮膚過敏性和基因毒性進行毒性評估，故未來若修訂 CNS 15030 可考慮納入上述替代測試方法。

5.3 化學品替代測試方法與現行分級分類制度之相容性

2020 年 6 月 ECHA 發表文件《The use of alternatives to testing on animals for the REACH Regulation》統計對於皮膚腐蝕/刺激替代測試數量，大多數體外研究是根

據 OECD TG 439（體外皮膚刺激：重建人表皮測試方法）或 TG 431（體外皮膚腐蝕：重建人表皮 RHE 測試方法）進行，從 2016 年至 2019 年 7 月期間，進行了大約 2,050 項體外研究，多數研究是針對每年 1 噸至 100 噸之間的登錄物質進行（大約 1,950 項研究），超過 65% 為根據 OECD TG 439 的皮膚刺激性研究，其次是使用 OECD TG 431 皮膚腐蝕規範，另外根據 OECD TG 430（體外皮膚腐蝕：經皮電阻測試）或 TG 435（體外膜屏障測試方法）進行的研究少於 100 項。

對於嚴重眼損傷 / 眼刺激的替代測試方面，大多數體外研究是根據 OECD TG 437、TG 438 或 TG 492 進行。在 2016 年至 2019 年 7 月期間，大約進行了 1,700 項體外研究，約有 1,150 研究是對登錄噸數級距在 1 噸至 100 噸之間的物質進行。牛角膜不透明度和滲透性測試方法（OECD TG 437）是最常用的檢測方法（約 900 項研究），其次是使用重建的人類角膜樣上皮測試方法（OECD TG 492/約 600 項研究），第三則是離體雞眼測試方法（OECD TG 438/約 230 項研究）。

上述資訊清楚說明登錄人遵循歐盟調整後的資訊要求，並僅在特殊情況下進行體內研究。在 GHS 指引中，已被認可的皮膚腐蝕 / 刺激替代測試包含 OECD TG 430、TG 431、TG 435 和 TG 439。眼睛刺激性的替代方法（OECD TG 437、TG 438 和 TG 460。TG 492）雖未直接列入 GHS，但 GHS 判斷標準是根據 OECD 或其他國際認可測試準則，預計將來也有機會被 GHS 納入判斷準則。我國 CNS 15030 的替代方法修訂可優先參考 GHS 或 REACH 法規，以期跟上國際腳步和潮流。

5.4 替代測試方法應用於危害分級分類之適用性建議

綜合上述，得結論如下：

1. GHS 已在 2021 年公告第 9 版，臺灣經濟部標檢局 CNS 15030 主要根據 GHS 第 4 版訂定，修訂公布日期為 2015 年 1 月，對於化學物質的檢驗方式及替代方法，建議於化學物質登錄相關法規或指引納入同步參考國際最新分類方法。
2. GHS 在第 8 版修訂中強調替代測試在化學品對皮膚和眼睛危害分類上的重要性，利用分層方式來對化學品進行危害分類，以現有人類和動物數據構成最高層，其次是體外/離體數據和其他現有動物數據，以期達 3Rs 原則。而部分危害分類的替代測試尚未被納入接受，例如：皮膚過敏性的體外測

試。相較於其他國際法規如 REACH 而言，GHS 對替代測試的採用相對保守，推測可能因其宗旨為推出全球統一且認可的危害分類標準，故對尚在新興發展的替代測試仍持續評估妥適性。

3. 奈米物質的危害分類在 GHS 尚未被明確規範，且相關的常規和替代方法仍待進一步驗證和研究，國際間並無統一的評估策略。建議可持續觀察歐盟或美國對奈米物質的標準測試和替代方法規定，逐步調整我國奈米物質的評估方法。

第六章 計畫經濟效益分析

一、導入國際化學品新興替代測試方法

(一) 蒐研國際化學品替代測試進展，建立優先採納之替代測試方法清單

目前替代測試方法是國際上的共同趨勢，其涵蓋符合動物福祉之重要精神，並且包含具備快速、大量和節省成本多項優點。本年度已蒐研國際替代測試發展，建議優先採納之替代測試方法清單，並且研析國際上認可替代測試方法之確效性及所需成本，加速國內與國際接軌，並且協助國內替代測試方法之發展。

(二) 我國化學物質登錄指引替代測試方法修正建議

目前我國於既有化學物質標準登錄資料撰寫指引，建議登錄者可藉由替代測試方法來滿足毒理及生態毒理項目，然大部分替代測試方法無法完整替代動物試驗，故需提供更完善之登錄建議，並藉由研析替代測試方法之使用性原則，針對毒理和生態毒理資訊提出我國化學物質登錄指引替代測試方法修正建議，以促進業者與政府之溝通，加速替代測試方法之發展。

(三) 研析傳統測試方法與替代測試方法之經濟效能差異

大多數替代測試方法符合人道精神、快速、大量和節省成本多項優點，因此若能落實發展替代測試，將能大幅度解決業者之測試能量不足和測試費用高昂的困境，但目前測試方法之費用尚未明朗，因故估算測試方法費用（表 6-1 至 6-10），其包含毒理資訊項目：急毒性：吞食、急毒性：吸入、皮膚刺激性 / 腐蝕性、眼睛刺激性、皮膚過敏性、基因毒性；生態毒理資俊項目：非脊椎動物之短期毒性、對水生藻類及藍綠藻的毒性、非脊椎動物之長期毒性、脊椎動物之長期毒性。

針對急毒性：吞食、急毒性：吸入、皮膚刺激性 / 腐蝕性毒理項目、皮膚刺激性 / 腐蝕性、眼睛刺激性、皮膚過敏性、基因毒性而言，替代測試方法與傳統測試方法的費用相仿，並且能夠以非動物的方式推估濃度範圍，以達到減量及精緻化（優化）的目的。

表 6-1 急毒性：吞食之替代測試方法評估

毒理資訊項目	體內或外試驗	是否為替代測試方法	測試指引	使用動物數量	費用	動物福祉
急毒性：吞食	體內	否	【OECD TG 401】急性吞食毒性 *OECD已於2002年刪除	<25	\$\$\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
急毒性：吞食	體內	是	【OECD TG 420】急性吞食毒性-固定劑量法	5-7	\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
急毒性：吞食	體內	是	【OECD TG 423】急性毒性級別法	7	\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
急毒性：吞食	體內	是	【OECD TG 425】急性吞食毒性-上下增減劑量法	6-9	\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
*\$標示為台幣五萬 *灰底標示為傳統測試方法						

表 6-2 急毒性：吸入之替代測試方法評估

毒理資訊項目	體內或外試驗	是否為替代測試方法	測試指引	使用動物數量	費用	動物福祉
急毒性：吸入	體內	否	【OECD TG 403】急性呼吸毒性	30-50	\$\$\$\$\$\$\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
急毒性：吸入	體內	否	【OECD TG 436】急性呼吸毒性-急性毒性級別法	6	\$\$\$\$\$\$\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
急毒性：吸入	體內	是	【OECD TG 433】急性吸入毒性-固定劑量法	5	\$\$\$\$\$\$\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
*\$標示為台幣五萬 *灰底標示為傳統測試方法						

表 6-3 皮膚刺激性 / 腐蝕性之替代測試方法評估

毒理資訊項目	體內或外試驗	是否為替代測試方法	測試指引	使用動物數量	費用	動物福祉
皮膚刺激性 / 腐蝕性	體內	否	【OECD TG 434】急性皮膚刺激腐蝕	6	\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
皮膚刺激性 / 腐蝕性	體外	是	【OECD TG 430】體外皮膚腐蝕：透皮電阻試驗	< 3	\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
皮膚刺激性 / 腐蝕性	體外	是	【OECD TG 431】體外皮膚腐蝕人體皮膚模型試驗	0	\$\$\$\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
皮膚刺激性 / 腐蝕性	體外	是	【OECD TG 435】皮膚腐蝕：體外膜阻隔試驗法	0	\$\$\$\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
皮膚刺激性 / 腐蝕性	體外	是	【OECD TG 439】體外皮膚刺激重組人表皮試驗	0	\$\$\$\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
*\$標示為台幣五萬 *灰底標示為傳統測試方法						

表 6-4 眼睛刺激性之替代測試方法評估

毒理資訊項目	體內或外試驗	是否為替代測試方法	測試指引	使用動物數量	費用	動物福祉
眼睛刺激性	體內	否	【OECD TG 405】急性眼睛刺激腐蝕	6	\$	☐ 減量 ☐ 替代 ☐ 精緻化
眼睛刺激性	體外	是	【OECD TG 437】牛角膜混濁和通透性試驗	0	\$	☒ 減量 ☐ 替代 ☐ 精緻化
眼睛刺激性	體外	是	【OECD TG 438】離體雞眼試驗	0	\$	☒ 減量 ☐ 替代 ☒ 精緻化
眼睛刺激性	體外	是	【OECD TG 460】螢光素滲漏測試方法：鑑別眼睛腐蝕與嚴重刺激物	0	\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
眼睛刺激性	體外	是	【OECD TG 491】i)誘導嚴重眼部損傷的化學物質 ii)不需要分類至眼刺激或嚴重眼部損傷的化學物質之體外短期暴露試驗方法	0	\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
眼睛刺激性	體外	是	【OECD TG 492】重建人類角膜樣上皮細胞(RhCE)檢測方法，用於識別不需要分類和標記為眼睛刺激或嚴重眼睛損傷的化學品	0	\$\$\$\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
*\$標示為台幣五萬 *灰底標示為傳統測試方法						

表 6-5 皮膚過敏性之替代測試方法評估

毒理資訊項目	體內或外試驗	是否為替代測試方法	測試指引	使用動物數量	費用	動物福祉
皮膚過敏性	體內	否	【OECD TG 406】天竺鼠最大化試驗和貼布試驗	15-30	\$\$\$\$\$	☐ 減量 ☐ 替代 ☐ 精緻化
皮膚過敏性	體外	是	【OECD TG 442C】化學皮膚過敏：直接豚鼠反應性分析	0	\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
皮膚過敏性	體外	是	【OECD TG 442D】皮膚過敏體外試驗：ARE-Nrf2螢光酶測試法	0	\$\$\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
皮膚過敏性	體外	是	【OECD TG 442E】皮膚過敏體外試驗：人類細胞株活化試驗	0	\$\$\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
皮膚過敏性	體內	是	【OECD TG 429】皮膚過敏性：局部淋巴結試驗	15-30	\$	☒ 減量 ☐ 替代 ☒ 精緻化
*\$標示為台幣五萬 *灰底標示為傳統測試方法						

表 6-6 基因毒性之替代測試方法評估

毒理資訊項目	體內或外試驗	是否為替代測試方法	測試指引	使用動物數量	費用	動物福祉
基因毒性	細菌	是	【OECD TG 471】細菌回復突變試驗	0	\$	☐ 減量 ☒ 替代 ☐ 精緻化
基因毒性	體外	是	【OECD TG 473】體外哺乳動物染色體異常試驗	0	\$	☐ 減量 ☒ 替代 ☐ 精緻化
基因毒性	體外	是	【OECD TG 490】利用胸腺嘧啶核苷激酶基因進行體外哺乳動物細胞基因突變試驗	0	\$	☐ 減量 ☒ 替代 ☐ 精緻化
基因毒性	體外	是	【OECD TG 476】體外哺乳動物細胞基因突變試驗	0	\$	☐ 減量 ☒ 替代 ☐ 精緻化
基因毒性	體外	是	【OECD TG 487】體外哺乳動物微核試驗	0	\$	☐ 減量 ☒ 替代 ☐ 精緻化
基因毒性	體內	否	【OECD TG 474】哺乳動物紅血球微核試驗	30	\$	☐ 減量 ☐ 替代 ☐ 精緻化
基因毒性	體內	否	【OECD TG 475】-哺乳動物骨髓染色體異常試驗	45	\$	☐ 減量 ☐ 替代 ☐ 精緻化
基因毒性	體內	是	【OECD TG 489】體內試驗：鹼性彗星試驗分析	25	\$	☒ 減量 ☐ 替代 ☒ 精緻化
*\$標示為台幣五萬 *灰底標示為傳統測試方法						

表 6-7 非脊椎動物之短期毒性之替代測試方法評估

毒理資訊項目	體內或外試驗	是否為替代測試方法	測試指引	使用動物數量	費用	動物福祉
非脊椎動物之短期毒性	體內	是	【OECD TG 202】蚤類急性活動抑制試驗	100	\$	☐ 減量 ☒ 替代 ☐ 精緻化
*\$標示為台幣五萬 *灰底標示為傳統測試方法						

表 6-8 對水生藻類及藍綠藻的毒性之替代測試方法評估

毒理資訊項目	體內或外試驗	是否為替代測試方法	測試指引	使用動物數量	費用	動物福祉
對水生藻類及藍綠藻的毒性	-	是	【OECD TG 201】藻類生長抑制試驗	$5 \times 10^3 - 10^4$	\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
*\$標示為台幣五萬 *灰底標示為傳統測試方法						

表 6-9 非脊椎動物之長期毒性之替代測試方法評估

毒理資訊項目	體內或外試驗	是否為替代測試方法	測試指引	使用動物數量	費用	動物福祉
非脊椎動物之長期毒性	體內	是	【OECD TG 211】Daphnia magna生殖試驗	60~120	\$\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
*\$標示為台幣五萬 *灰底標示為傳統測試方法						

表 6-10 非脊椎動物之長期毒性之替代測試方法評估

毒理資訊項目	體內或外試驗	是否為替代測試方法	測試指引	使用動物數量	費用	動物福祉
魚類之長期毒性	體內	否	【OECD TG 215】魚類幼魚成長試驗	60 隻魚	\$\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
魚類之長期毒性	體內	否	【OECD TG 210】魚類早期毒性試驗	480 顆胚胎	\$\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
魚類之長期毒性	體內	否	OECD TG 212】魚類胚胎-卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗	60 隻魚	\$	☒ 減量 ☒ 替代 ☒ 精緻化
*\$標示為台幣五萬 *灰底標示為傳統測試方法						

對於生態毒理而言，我國建議非脊椎動物之短期毒性、對水生藻類及藍綠藻的毒性資訊項目，使用蚤類急性活動抑制試驗和藻類生長抑制試驗，這兩項已符合替代的精神，並且其有助於推估非脊椎動物之長期毒性，並且其測試方法之價格是相對便宜，故從經濟考量上，非脊椎動物之長期毒性應先由非脊椎動物之短期毒性進行推估，若有特殊目的，才建議進一步進行非脊椎動物之長期毒性相關試驗。最後，針對脊椎動物之長期毒性，非脊椎動物之結果亦能夠用於填補脊椎動物試驗數據。

綜合以上的經費研析，目前初步估算替代測試方法之測試費用與傳統測試方法相仿，但卻能達到試驗動物減量、替代、精緻化（優化）的精神，隨著未來自動化流程、高通量篩選的發展成熟，將能大幅度減少人力和時間花費，因此替代測試方法值得期待，建議持續關注高通量方法能夠為化學物質危害評估所帶來的經濟效益。

二、替代測試方法完備我國化學物質登錄所需之毒理及生態毒理資訊

（一）電腦模擬模式試行及驗證，奠定以電腦模式進行化學物質登錄之基礎

本年度藉由評估工具的試行及驗證，可逐步建立我國未來使用電腦模式進行化學登錄之基礎，預期可大幅降低業者完成毒理及生態毒理項目登錄作業所需之預算。

（二）建立結合電腦模擬模式與體外試驗之整合型測試評估方法，以減少實驗動物之使用

基於 3Rs 原則，參照 OECD 指引進行整合型測試評估方法的建立。整合型測試評估方法的優勢在於將實驗的任何先決條件納入考慮，例如：問題建立、監管可能性和實際限制等，並收集與結合各種充足的數據，有效辨別出必要的動物測試。藉由整合型測試評估方法的建立，有效降低我國未來使用電腦模式進行化學登錄之門檻，預期可大幅降低業者完成生態毒理項目登錄所需之實驗動物。

第七章 結論與建議

7.1 結論

- 一、3T3 中性紅細胞毒性試驗、細胞傳感器微生理計體外試驗及 BALB/c3T3 細胞轉化體外試驗方法，目前已被歐盟替代方法驗證中心及美國環保署驗證和接受。3T3 中性紅細胞毒性試驗為吞食急毒性之體外測試方法，可用於評估進行動物實驗的必要性；眼睛刺激性雖有體外測試方法，但實務上不易執行且費用昂貴，納入其他國際認證的體外測試方法可使登錄人在非動物試驗的選擇更多元，建議納入細胞傳感器微生理計體外試驗；致癌性測試需耗費大量時間、金錢及試驗動物，建議納入 BALB/c3T3 細胞轉化試驗作為評估資訊。
- 二、以不同 QSAR 模式完成 14 種選定之化學物質毒理及生態毒理效應數值推估。毒理測試終點部分，皮膚過敏性（72.73%~85.71%）及基因毒性（90.91%~100.00%）對 14 種化學物質皆有良好的預測表現。在生態毒理部分，T.E.S.T. Group contribution method 及 ECOSAR 在魚類水生急毒性中有高達 85.71%的分級準確率。
- 三、建立符合動物福祉的整合型測試評估方法（IATA），物質危害判斷原則如下：
(1) ECOSAR 及 T.E.S.T. Group contribution method 所預測的 LC_{50} 皆大於 100 mg/L 時，判斷為低毒性物質；(2) 若 2 種 QSAR 模式皆預測 LC_{50} 小於 100 mg/L 時，以 ECOSAR 分類法進行分類，屬於酚類、脂肪胺類及酯類的物質進行胚胎急毒性實驗，其他則進行傳統魚類試驗；(3) 若 2 種 QSAR 模式預測不一致時，直接使用 ECOSAR 分類法以判斷所需執行的測試種類。以此 IATA 預測 20 種化學物質的毒性，與單一成魚實驗值相比，分級吻合度為 85%。
- 四、GHS 第 8 版修訂中強調替代測試在化學品對皮膚和眼睛危害分類上的重要性，將已驗證可行之替代測試方法調整至分層更高處，若我國化學物質危害分級依循 GHS 第 8 版的分類原則，將可大幅提高替代測試的利用率。

7.2 建議

- 一、建議後續可將 3T3 中性紅細胞毒性試驗、細胞傳感器微生理計體外試驗方法及 BALB/c3T3 細胞轉化體外試驗納入優先採納之替代測試方法清單。
- 二、應持續積極參與我國 3R 中心建立之相關會議，滾動修正推動策略及跨部會合作機制。替代測試資訊整合方面，建議逐步盤點已繳交之既有化學物質標準登錄資訊，研析替代測試資料繳交狀況，綜整供相關部會參考。
- 三、建議規劃體外替代測試繳交方法撰寫指引，尤其著重於毒性及關注化學物質管理法規費收費標準所列之指定項目，以替代測試繳交皮膚刺激性/腐蝕性及眼睛刺激性，強化登錄人以替代測試進行繳交的意願。另建議持續關注 GHS 更新，摘錄其替代測試精神，持續增進我國替代測試的接受度。
- 四、許多替代測試方法的單一數據無法取代動物試驗，但能成為證據權重的一環，故應持續評估國際接受的整合型測試評估方法 (IATA)，相關策略及精神可逐步納入指引中進一步說明，鼓勵登錄人在進行動物試驗前，可藉由適合的判斷流程進行毒性篩選，有效提高資訊填補效率，並達到減少動物使用之目的。
- 五、T.E.S.T. Group contribution method 及 ECOSAR 對於既有化學物質的魚類水生急毒性預測能力表現良好，且經由適用性之檢驗，T.E.S.T. Group contribution method 的外部驗證參數 (R_{PD}^2) 為 0.686，高於標準的 0.6；ECOSAR 的外部驗證參數 (R^2) 介於 0.7915~0.9312 之間，高於標準的 0.7，建議可列為 IATA 之基礎模型之一。
- 六、IATA 方法經判斷適用於 ECOSAR 分類法中酚類、脂肪胺類及酯類物質，但對於苯甲醇類及醛類等類別的物質，因本年度樣本數不足而無法建立回歸關係。除中性有機物因分類邏輯不同而初步排除，應持續蒐集其他類別物質之斑馬魚成魚及胚胎的急毒性數據，以擴充 IATA 適用範圍。
- 七、奈米物質的危害分類在 GHS 尚未被明確規範，且相關的常規和替代方法仍待進一步驗證和研究，國際間並無統一的評估策略。建議可持續觀察歐盟或美國對奈米物質的標準測試和替代方法規定，逐步調整我國奈米物質的評估方法。

參考文獻

【中文】

1. 勞動部勞動及職業安全衛生研究所，2014，奈米科技職場安全衛生管理措施探討。
2. 農業藥物毒物試驗所，2014，農藥登記之毒理試驗報告內容要求指引。
3. 經濟部標準檢驗局，2020，中華民國國家標準分類目錄。
4. 衛生福利部食品藥物管理署，2020，健康食品安全評估方法。
5. 衛生福利部食品藥物管理署，2020，化粧品產品資訊檔案製作指引。
6. 環保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。
7. 環保署毒物及化學物質局，2015，新化學物質及既有化學物質資料登錄工具說明。

【英文】

1. Ahlers J, Nendza M, and Schwartz D. 2019. Environmental hazard and risk assessment of thiochemicals. Application of integrated testing and intelligent assessment strategies (ITS) to fulfil the REACH requirements for aquatic toxicity. *Chemosphere*, 214: 480-90.
2. Benfenati E, Manganaro A, and Gini G. 2013. VEGA-QSAR: AI Inside a Platform for Predictive Toxicology.
3. Browne P, Noyes PD, and Casey WM, et al. 2017. Application of Adverse Outcome Pathways to U.S. EPA's Endocrine Disruptor Screening Program. *Environ Health Perspect*, 125(9): 096001.
4. Chakravarti SK, Saiakhov RD, and Klopman G. 2012. Optimizing Predictive Performance of CASE Ultra Expert System Models Using the Applicability Domains of Individual Toxicity Alerts. *J Chem Inf Model*, 52(10): 2609-2618.
5. Contrera JF, Matthews EJ, and Daniel Benz R. 2003. Predicting the carcinogenic potential of pharmaceuticals in rodents using molecular structural similarity and E-state indices. *Regul Toxicol Pharmacol*, 38(3): 243-259.

6. Dean J, Twerdok L, Andersen K, Bailey P, Hamilton R. 1999. The murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the interagency coordinating committee on the validation of alternative methods (ICCVAM) and the national toxicology program center for the evaluation of alternative toxicological methods (NICEATM). NIH Publication 99: 4494
7. Derelanko MJ, Auletta CS. 2014. Handbook of toxicology: CRC press
8. Doke SK, and Dhawale SC. 2015. Alternatives to animal testing: A review. Saudi Pharm J, 23: 223-9.
9. EPA, U.S., Ecological Structure Activity Relationships (ECOSAR) Predictive Model.
10. EPA, U.S. Toxicity Estimation Software Tool (TEST).
11. ECHA. 2006. Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. Official Journal of the European Union 396: 1-849
12. ECHA. 2016. How to use alternatives to animal testing to fulfil your information requirements for REACH registration.
13. ECHA. 2016. Practical guide: How to use and report (Q)SARs.
14. ECHA.2020. The use of alternatives to testing on animals for REACH
15. EPA. 2021. Alternative Test Methods and Strategies to Reduce Vertebrate Animal Testing.
16. ECVAM. 2020. EURL ECVAM Status Report - Non-animal Methods in Science Regulation.

17. Hansch C. 1969. Quantitative approach to biochemical structure-activity relationships. *Acc Chem Res*, 2(8): 232-239.
18. Haque E, and Ward AC. 2018. Zebrafish as a model to evaluate nanoparticle toxicity. *Nanomaterials*, 8: 561.
19. Häne BG, Jäger K, and Drexler HG. 1993. The Pearson product-moment correlation coefficient is better suited for identification of DNA fingerprint profiles than band matching algorithms. *Electrophoresis*, 14(1): 967-972.
20. Huang, H. J., Lee, Y. H., Hsu, Y. H., Liao, C. T., Lin, Y. F., & Chiu, H. W. 2021. Current Strategies in Assessment of Nanotoxicity: Alternatives to In Vivo Animal Testing. *Int J Mol Sci*. 22(8):4216.
14. ISO 10993-18, 2020. Biological evaluation of medical devices-Part 18: Chemical characterization of medical device materials within a risk management process
15. Jia Q, Zhao Y, Yan F, and Wang Q. 2018. QSAR model for predicting the toxicity of organic compounds to fathead minnow. *Environ Sci Pollut Res Int*, 25(35):35420-35428.
16. Kimber I, Weisenberger C. 1989. A murine local lymph node assay for the identification of contact allergens. *Archives of toxicology* 63: 274-82
17. Könemann H. 1981. Quantitative structure-activity relationships in fish toxicity studies Part 1: Relationship for 50 industrial pollutants. *Toxicology*, 19(3): 209-221.
18. Lombardo A, Roncaglioni A, and Benfenati E, et al. 2014. Optimizing the aquatic toxicity assessment under REACH through an integrated testing strategy (ITS). *Environ Res*, 135: 156-64.
19. Magnusson B. 1969. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Dermatol*. 52: 268-76
20. Meylan WM, and Howard PH. 1995. Atom/fragment contribution method for estimating octanol-water partition coefficients. *J Pharm Sci*, 84(1): 83-92.
21. Meylan WM. and Howard PH. 1995. Atom/fragment contribution method for estimating octanol–water partition coefficients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84(1): 83-92.

22. National food institute, T.U.o.D., Danish QSAR Database.
23. Neely WB, Branson DR, and Blau GE. 1974. Partition coefficient to measure bioconcentration potential of organic chemicals in fish. *Environ Sci Technol*, 8(13): 1113-1115.
24. Nendza M, Muller M, and Wenzel A. 2017. Classification of baseline toxicants for QSAR predictions to replace fish acute toxicity studies. *Environ Sci Process Impacts*, 19: 429-37.
25. Norberg-King TJ, Embry MR, Belanger SE, Braunbeck T, Butler JD, Dorn PB, et al. 2018. An international perspective on the tools and concepts for effluent toxicity assessments in the context of animal alternatives: Reduction in vertebrate use. 37:2745-2757
26. OECD. 2005. Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment.
27. OECD. 2006. Report on the Regulatory Uses and Applications in OECD Member Countries of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models in the Assessment of New and Existing Chemicals.
28. OECD. 1998. Test No. 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages.
29. OECD. 2001. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method.
30. OECD. 2002. Test No. 401: Acute Oral Toxicity.
31. OECD. 2004. Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test.
32. OECD. 2008. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure.
33. OECD. 2009. Test No. 403: Acute Inhalation Toxicity.
34. OECD. 2009. Test No. 436: Acute Inhalation Toxicity – Acute Toxic Class Method.
35. OECD. 2010. Test No. 429: Skin Sensitisation
36. OECD. 2010. Test No. 442A: Skin Sensitization
37. OECD. 2011. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.
38. OECD. 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.

39. OECD. 2017. Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment.
40. OECD. 2017. Test No. 460: Fluorescein Leakage Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants.
41. OECD. 2018. Test No. 433: Acute Inhalation Toxicity: Fixed Concentration Procedure.
42. OECD. 2018. Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage.
43. OECD. 2018. Test No. 442B: Skin Sensitization
44. OECD. 2019. 203: Fish, Acute Toxicity Test.
45. OECD. 2019. Test No. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage
46. OECD. 2020. Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA).
47. OECD. 2020. Overview of Concepts and Available Guidance related to Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA).
48. OECD. 2020. Test No. 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage.
49. OECD. 2020. Test No. 491: Short Time Exposure In Vitro Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage.
50. OECD. 2021. Guideline No. 497: Defined Approaches on Skin Sensitisation
51. OECD. 2021. Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion.
52. OECD. 2021. Test No. 406: Skin Sensitisation
53. OECD, Guidance related to Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). 2020.

54. OECD, Series on Testing and Assessment No. 255: Guidance Document on the Reporting of Defined Approaches (DAs) to Be Used within IATA.
55. OECD, Series on Testing and Assessment No. 307: Report on considerations from case studies on Integrated Approaches for Testing and Assessment (IATA).
56. OECD, Developments in Delegations on the Safety of Manufactured Nanomaterials-Tour de Table , Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials , No.97
57. Parker GA. 2017. Immunopathology in toxicology and drug development: Springer
58. Pereira AC, Gomes T, Ferreira Machado MR, Rocha TL. 2019. The zebrafish embryotoxicity test (zet) for nanotoxicity assessment: From morphological to molecular approach. *Environmental Pollution* 252:1841-1853.
59. Raies AB, Bajic VB. 2016. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci*, 6(2): 147-72.
60. Raunio H. 2011. In silico toxicology–non-testing methods. *Front Pharmacol*, 2: 33.
61. Rovida C, Alepee N, and Api AM et al. 2015. Integrated Testing Strategies (ITS) for Safety Assessment. *ALTEX*, 32(1): 25-40.
62. Richards FF, Barnes WT, and Lovins RE et al., 1969. Quantitative approach to the sequential degradation of proteins and peptides. *Nature*, 221(5187): 1241-1244.
63. Strähle U, Scholz S, Geisler R, Greiner P, Hollert H, Rastegar S, et al. 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments--a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reprod Toxicol* 33:128-132.
64. Strickland J, Stack F, Burns T, Allen D, Casey W, Stokes W. 2012. Evaluation of Two Nonradiolabeled Murine Local Lymph Node Assays (LLNA) for Potency Categorization of Substances Causing Allergic Contact Dermatitis in Humans. Nonradiolabeled LLNA Potency NICEATM-ICCVAM SOT

65. Strickland J, Zang Q, and Kleinstreuer N et al. 2016. Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. *J Appl Toxicol* 36(9): 1150-1162.
66. Su LM, Liu X, Wang Y, and Li JJ et al. 2014. The discrimination of excess toxicity from baseline effect: Effect of bioconcentration. *Science of The Total Environment*, 484: 137-145.
67. Science E. 2007. Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) for Pesticide Regulatory Purposes.
68. Wedebye EB, Dybdahl M, and Nikolov NG et al. 2015. QSAR screening of 70,983 REACH substances for genotoxic carcinogenicity, mutagenicity and developmental toxicity in the ChemScreen project. *Reprod Toxicol*, 55: 64-72.
69. Tollefsen KE, Scholz S, and Cronin MT et al. 2014. Applying Adverse Outcome Pathways (AOPs) to support Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA). *Regul Toxicol Pharmacol*, 70(3): 629-640.
70. United Nations. 2019. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals. Eighth revised edition.
71. Use of International Standard ISO 10993-1, "Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process", US FDA, 2020
72. Wahlkvist H. 1999. Predictive testing for contact allergy Comparison of some guinea pig and mouse protocols including dose-response designs
73. Wilkinson PJ. 2006. Development of an in vitro model to investigate repeat ocular exposure. University of Nottingham
74. Qiang Gu, Elvis Cuevas, Syed F. Ali, Merle G. Paule, Victor Krauthamer, Yvonne Jones, and Yongbin Zhang 2019. An Alternative In Vitro Method for Examining Nanoparticle-Induced Cytotoxicity.
75. Hung-Jin Huang , Yu-Hsuan Lee , Yung-Ho Hsu, Chia-Te Liao, Yuh-Feng Lin, and Hui-Wen Chiu 2021. Current Strategies in Assessment of Nanotoxicity: Alternatives to In Vivo Animal Testing.
76. OECD. 2021 Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test
77. OECD. 2016 Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test

78. OECD. 2016 Test No. 476: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xprt genes
79. OECD. 2016 Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test
80. OECD. 2016 Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay
81. OECD 2016 Test No. 490: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene

【網頁】

1. <https://norecopa.no/global3R>
2. 勞動部勞動及職業安全衛生署。GHS 背景－緣起。
<https://ghs.osha.gov.tw/CHT/intro/GHS-background.aspx>
3. 勞動部勞動及職業安全衛生署。GHS 背景－發展歷史。
<https://ghs.osha.gov.tw/CHT/intro/history.aspx>
4. 黃瑋翰。化學品管理法令的展望。
<https://toxicdms.epa.gov.tw/edm/EpaperContent/2697>
5. 國際化學品政策宣導網。APEC 會員體持續推動 GHS 版本及作法調合。
<https://www.chemexp.org.tw/content/law/LawDetail.aspx?id=3477>
6. 國家標準（CNS）網路服務系統。
<https://www.cnsonline.com.tw/>
7. Alternative Methods Accepted by US Agencies, 2020. NTP.
<https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/niceatm/accept-methods/index.html>
8. Draize Test. https://en.wikipedia.org/wiki/Draize_test
9. ECHA. <https://echa.europa.eu/registration-statistics>
10. IRCCS, I.d.R.F.M.N., VEGA QSAR: Try out VEGA QSAR and its features.
<https://www.vegahub.eu/portfolio-item/vega-qsar/>
11. Leadscope Predictive Data Miner.
https://www.leadscope.com/lse_product.php
12. Marketing, Q. 2020 年各國實施 GHS 情況（2020）。
<https://tw.usequantum.com/ghs-global-implementation-status-2020/>
13. <https://ghs.osha.gov.tw/ENG/intro/ghsComparisons.aspx>

14. The role of testing in CLP. <https://echa.europa.eu/testing-clp>
15. The applicability of the GHS classification criteria to nanomaterials.
<http://norden.diva-portal.org/smash/get/diva2:1315194/FULLTEXT02.pdf>
16. 台美檢驗科技股份有限公司。健康食品 安全性試驗
<https://www.superlab.com.tw/cro/health-food/toxic-test/>
17. 台美檢驗科技股份有限公司。基因毒理研究
<https://www.superlab.com.tw/cro/genotoxicity/>

附件一 歷次審查會議紀錄

檔號：
保存年限：

行政院環境保護署毒物及化學物質局 函

地址：臺北市大安區大安路二段132巷35弄1號
聯絡人：崔君至
電話：(02)2325-7399#55345
電子郵件：chunchih.tsui@epa.gov.tw

受文者：如行文單位

發文日期：中華民國 110年11月23日

發文字號：環化評字第 1101022869 號

速別：普通件

密等及解密條件或保密期限：

附件：會議紀錄

主旨：檢送110年11月15日「整合化學品動物替代測試檢驗量能
及發展新興替代測試應用支援計畫」期末報告審查會議
紀錄，請查照。

正本：李俊福委員、吳章甫委員、童俊維委員、劉宗榮委員、顏瑞泓委員、瑞昶科技
股份有限公司

副本：

局長 謝燕儒

行政院環境保護署毒物及化學物質局
「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代
測試應用支援計畫」期末報告審查會議紀錄

- 一、會議時間：110年11月15日（星期一）上午10時
- 二、會議地點：視訊會議(<https://meet.google.com/ytk-cdne-xdu>)
- 三、主持人：陳淑玲副局長
紀錄：謝泊諺
- 四、出（列）席人員：如會議簽名單
- 五、主席致詞：（略）
- 六、執行團隊報告：（略）
- 七、審查意見：

（一）李俊福委員

- 1. 前期研究成果雖散列於第4.2.6節及4.4節中，但仍建議綜合彙整重點列於適當章節中（如第1.5節或第2章）。
- 2. 國際認可之替代測試方法未納入我國測試規範中，應具體明確說明國內執行能力與相關配套措施不足之處，並提供建議。
- 3. 我國化學品登錄可使用之優先替代測試方法，其適用範圍及限制應列為未來工作重點，而經適用性研析後應有更新替代機制。
- 4. 我國接受生態毒理替代測試方法較為欠缺，尤其在魚類短期毒性和水生生物蓄積方面，亟待導入國際認可之方法。
- 5. 未來發展跨部會替代合作，除提出3點：(1)加速資料整理與進行評估，(2)繳交資料之統合，及(3)替代測試與法規橋接等重點外，應再提出具體做法建議，並將其列於第7.2節中。

（二）吳章甫委員

- 1. 第1頁請檢視中英對照之正確性。
- 2. 第2-13頁及第3-101頁，請簡要提及勞動部替代測試現況。

3. 第2-33頁建議增加美國作法之說明。
4. 第3-95頁請說明定量結構活性關係(Quantitative Structure Activity Relationships, QSAR)在奈米物質之應用性。
5. 第3-115頁建議提供各部會作法比較表。
6. 第4-30頁（即第4.2.4節）：(1)請說明若分級準確率不佳，對後續應用之意義；(2)模型開發單位是否有相關說明。
7. 第4-55頁請說明斜率不為1之意義。
8. 第6-1頁建議增加對成本是否更低之論述。

（三）童俊維委員

1. 皮膚與眼睛刺激性之 QSAR 預測準確度通常很高，在研究中表現不佳的原因可加入討論。
2. QSAR 預測數值接近閾值時應加入其他方法，建議加入討論。
3. 定量結構活性關係工具箱(QSAR Toolbox)的化學品分析，不適用的規則是什麼？建議加入說明。

（四）劉宗榮委員

1. 報告中「取代、減量及精緻化」(Replacement, Reduction, and Refinement, 3Rs)的 refinement 翻譯成精緻化，但未來 3R 辦公室使用的名稱是「優化」，可考慮在第1頁中英文對照表中加註。
2. 第3-23頁，表3.2-1之參考文獻(Reference)不全。
 - (1) 上述表中僅列出認可的替代方法，則所有的體內試驗都不列出。
 - (2) 毒理資訊項目「6.8生殖/發育毒性」所列之體外試驗方法中，OECD TG 455、458及456係測試內分泌干擾素的方法，應無法代替生殖/發育毒性。
 - (3) 表3.2-4我國接受的替代方法中，生態毒理資訊項目「7.9魚類之長期毒性」，魚類胚胎卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗可用以替代嗎？
3. 第3-61頁（二）基因毒性之三項試驗介紹，所列出的4種方法都沒錯（細菌基因突變分析、OECD TG 473體外哺

乳細胞基因毒性分析、OECD TG 490體外哺乳細胞基因毒性分析、OECD TG 474動物體內基因毒性分析)，但表3.2-27的哺乳細胞基因毒性分析項下僅列出 L5178Y TK+/-小鼠淋巴瘤細胞株就值得商榷，如此一來體外基因毒性所看的都是「突變」，故此處應加入或直接以 OECD TG 473的體外哺乳細胞染色體異常分析來取代。

4. 第3-67頁（三）基因毒性的替代測試方法：體外哺乳細胞微核試驗，所有文字敘述都正確，但缺少染色體數目改變；第3-73頁（四）基因毒性替代方法使用建議，即提到「染色體數目畸變」。
5. 從行政管理上來看，替代方法用在化學物質登錄是世界趨勢，但由管理階層在最後的產品上市許可（如藥品、化妝品等）來看，替代方法仍在研擬階段，因此對於替代方法的應用仍應謹慎評估。

（五）顏瑞泓委員

1. 計畫執行單位的期中回覆不明確：藥品以動物進行安全性評估是非臨床試驗的一部分，所以實驗上也更貼近臨床試驗的需求要項，因此較難與其他制度比較，所述何義？
2. 國內各產品主管機關不同，請說明對於資料要求是否有橫向連繫，替代測試方案是否可為各管理單位所採納。
3. QSAR 模型測試與生態毒理的結果，請問要如何決定是否可以採納，或是什麼條件可以採用、何種模型適合？報告中整合型測試評估方法(Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA)架構，為何分級準確率達85%即可接受？
4. 表3.2-3及表3.2-4我國登錄資料接受之毒理項目替代測試方法，是指為哪個法規所接受？

（六）毒物及化學物質局

1. 危害分類之建議中，部分用詞涉及其他部會應更中性，並著重於本局業務。

2. 請確認「Oral」翻譯為「吞食」是否適當？

八、計畫執行單位回覆

- (一) 部分動物測試方法雖屬體內試驗，但仍符合3Rs 原則中的減量和精緻化（優化），故仍列入第3-23頁之表中。
- (二) 魚類胚胎卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗(OECD TG 212)，無法完全替代魚類早期毒性試驗(OECD TG 210)，因所涵蓋的生命周期較少，但可作為 OECD TG210或其他慢性毒性試驗的篩選測試，有助於選擇測試濃度範圍，減少重複測試的可能性。
- (三) 皮膚刺激性/腐蝕性與眼睛刺激性的分級準確率表現不如預期，可能原因為標的化學物質的篩選方式是以生態毒理終點設計，較不適用於毒理終點，且僅有14個樣本，若改善篩選方法或加入更多樣本可望改善分級準確率。
- (四) QSAR 模型預測值接近分級閾值時，可能導致預測不準確，建議後續使用第2種 QSAR 模型或體外試驗以確認預測值。
- (五) 在 QSAR Toolbox 中無效樣本為無實驗值及無法建立物質特性（分群）與毒性之相關性的情況。
- (六) 第4.4節旨在驗證使用 IATA 之預測能力較單一替代測試方法為佳，然替代測試方法之採納標準及條件仍須持續蒐集更多相關資訊及數據，由專家學者經證據權重研議後擬定。
- (七) 報告所提危害分類之建議，將修正為：依 CNS 15030規定不足以分類時，建議參考化學品全球調和制度 (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS)進行評估。
- (八) 「Oral」翻譯為「吞食」係參考自新化學物質及既有化學物質資料登錄辦法附表文字，目前食入、口服等用法亦屬常見翻譯，但吞食可強調非自願之攝入方式，例如：強制胃管餵食，在實驗動物中較可含括所有經口給藥方式，且各部會化學安全相關法規及安全資料表均採「吞

食」。後續修正時將備註說明，並強調以上皆為常用說法。

九、會議結論：

本計畫期末報告經委員審查為「修正後通過」，並授權本局複審，請委辦單位依委員意見補充與修正，俟本局核可後，提送成果報告，以辦理後續驗收事宜。

十、散會：中午12時

檔號：
保存年限：

行政院環境保護署毒物及化學物質局 函

地 址：臺北市大安區大安路二段132巷35弄1號
聯 絡 人：崔君至
電 話：(02)2325-7399#55345
電子郵件：chunchih.tsui@epa.gov.tw

受文者：如行文單位

發文日期：中華民國 110年9月9日

發文字號：環化評字第 1101018252 號

速別：普通件

密等及解密條件或保密期限：

附件：會議紀錄

主旨：檢送110年9月2日「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試應用支援計畫」期中報告審查會議紀錄，請查照。

正本：李俊福委員、吳章甫委員、童俊維教授、劉宗榮委員、顏瑞泓委員、瑞昶科技股份有限公司

副本：

局長 謝燕儒

行政院環境保護署毒物及化學物質局
「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試
應用支援計畫」期中報告審查會議紀錄

- 一、會議時間：110年9月2日（星期四）下午2時
- 二、會議地點：視訊會議 (<https://meet.google.com/isx-prmn-xcb>)
- 三、主持人：許仁澤組長
紀錄：崔君至
- 四、出（列）席人員：如會議簽名單
- 五、主席致詞：（略）
- 六、執行團隊報告：（略）
- 七、審查意見：

（一） 李俊福委員

- 1. 請摘要彙整前期研究之重要成果。
- 2. 第3.2節，最近國際認可之替代測試方法有部分納入我國持續更新之清單中，有些則未納入（如 OECD TG249），其取捨依據為何？
- 3. 表3.2-19，國際認可之替代測試方法（尤其經美國環境保護署及歐盟參考實驗室認可）為何有未納入我國之測試規範者？
- 4. 將優先納為我國使用的替代測試方法，為何仍需進行適用性研析（第3-55頁）？其應針對未納入之測試方法。
- 5. 針對奈米物質人體健康風險與生態毒理，替代測試方法的說明較不具體、充實（僅有3D 細胞培養模型與斑馬魚），應再加強說明，表2.3-7所列之方法可參考。
- 6. 其他部會對替代測試方法的研發較不積極。
- 7. 選擇之7種新化學物質（A 至 G），何謂單一組成？若不知其活性官能基，如何得知定量結構活性關係(quantitative structure-activity relationships, QSAR)驗證的正確性？

(一) 吳章甫委員

1. 第2-6頁，是否可提供中心屬性資訊（如政府或民間）？
2. 第3-28頁3.2.3節，各方法綜合評論部分可再強化，包括使用性建議宜更明確，並搭配相關論述。如第3-32頁、第3-35頁及第3-51頁，是否可舉例哪些法規目的可搭配哪些方法？
3. 第3-77頁，跨部會綜合評論與建議是否可提供更多內容？
4. 第4-33頁，工具比對結果之綜合評論與建議是否可提供更多內容？
5. 第4-57頁，我國國家標準分類應用替代方法適用性之綜合評論與建議，是否可提供更多內容？

(一) 童俊維委員

1. 整理工作分析 QSAR 許多相關毒性終點的應用，對於未來執行替代測試方法相當有幫助，然測試物質不明，無法瞭解預測正確與否及其原因，建議可揭露相關資訊，以利瞭解計畫執行成效。
2. 報告中提到許多模型可免費使用，然而並非常用軟體的所有 QSAR 模型都符合經濟合作暨發展組織(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)指引，建議可補充說明每個模型是否符合指引資訊，以利日後施行，不宜以軟體為單位闡述是否符合 OECD 指引的方法。
3. 需闡明每個測試物質是否落在適用域中，才能釐清預測不準係因模型不準確或未落入適用域；若為預測不準確的物質，可進一步分析何種類型物質不適用於何種模型，方有助於日後以 QSAR 進行評估。

(一) 劉宗榮委員

1. 此計畫涵蓋面非常廣，所以不易深入探討每種毒理測試項目（6種，如圖3.4-4），遑論探討不同物種（化學品、奈米物質等）。
2. 由於化妝品是目前唯一明定不能使用動物做毒性測試者，故可參考文獻較多，現就此計畫的基因毒性檢視：由表3.2-16

可知，僅標準登錄第三級及第四級需繳交體內基因毒性，然第3-42頁：「若前述兩類試驗結果已確認測試物質具有基因毒性，無須再進行動物實驗；前述試驗結果為陰性，再進行動物體內基因毒性分析。」又於第3-51頁，基因毒性替代測試方法使用建議：「建議登錄者若無特殊科學或法規目的時，應先考量使用體外基因毒性試驗，當結果為陽性時才進一步執行動物試驗。」請說明2段論述不同之原因。

3. 化妝品基因毒性測試基本使用 OECD TG471、OECD TG490、OECD TG473及 OECD TG487。報告第3-44頁至第3-50頁，對於以上4種測試都有說明，但在第3-49頁，體外哺乳動物微核測試(OECD TG487)的說明則不夠精準，未說明此測試2個測試目的：染色體結構及數目改變(clastogenicity and aneugenicity)。請於期末報告中補充說明。

(一) 顏瑞泓委員

1. 前期規劃擬調和替代測試在各部會的可利用性，未在報告中呈現是否已進行。是否可對產品類別蒐集其所需之毒理資料再進行比對，如藥品(pharmaceutical products)、農藥及環境用藥(pesticide products)、動物用藥(veterinary drugs)、化妝品(cosmetics products)、食品添加物(food additives)、飼料添加物(feed additives)、工業化學品(industrial chemicals)、醫療產品(medical products)、其他產品(Others)、健康食品等，尤其與局內相關的環境用藥部分。

2. 毒性試驗(toxicity studies)項目，已完成皮膚及眼刺激性替代測試，請說明哪些測試項目已完成化學物質毒理及生態毒理推估及驗證。

3. 環境毒理之非目標生物試驗應為鳥類或魚類，較切合實際。是否需考量地域特性？如半致死濃度(median lethal concentration, LC₅₀)選用歐美國家之虹鱒及呆頭魚(fathead minnow)資料，其機制是否適用不同魚種，魚種選擇有無原則。

4. 建立1式優先採納替代測試方法清單，建議我國採納之

替代測試方法包括急毒性吞食、眼睛刺激性及致癌性，其原因或論述理由不夠明確。

5. 替代測試方法很多，但替代測試完備登錄系統採用 QSAR，為何未考慮採用離體或體外數據。

八、計畫執行單位回覆說明

(一) 本年度工作優先盤點新化學物質及既有化學物質資料登錄指引中毒理及生態毒理之替代測試方法，研析並提出建議以提供化學物質登錄使用，後續將持續蒐集國際替代測試方法。

(二) 替代測試方法選取及建議原則為補充系統不足或缺乏之處，例如 OECD TG442C、OECD TG442D 及 OECD TG442E 為皮膚過敏性體外測試，並經國際確效及認證，依據 3R 原則(replacement, reduction and refinement)應優先推薦使用體外測試方法。

(三) 以往研究重要成果包括：以6種既有化學物質進行斑馬魚胚胎替代測試，與 QSAR 工具箱(QSAR Toolbox)及評估專案介面套裝軟體(Estimation Program Interface Suite, EPI Suite)等電腦模擬預測模式方法之可行性驗證作業，將彙整摘要至期末報告。

(四) 截至西元2021年，國際間共有25個國家成立49個 3R 中心，依據每個中心成立之時程及目的各有不同之屬性，可區分為民間機構或政府監管單位、3R 試驗研發推廣中心或方法確效認證中心，將於期末報告補充說明。

(五) 基因毒性之替代方法原則為以體外測試優先，應至少完成細菌基因突變分析、體外哺乳類細胞基因毒性分析，若前述2類試驗結果皆為基因毒性陰性，則無須再進行動物實驗；反之，則必須參酌動物實驗數據。

(六) 各部會近年皆致力於替代測試議題，包括衛生福利部、行政院農業委員會及行政院環境保護署等，各司其職並協

調合作；將持續評估環境用藥之替代測試方法是否納入蒐研。

(七) 國內外化學物質登錄之生態毒理項目，目標生物主要為藻類、水蚤及魚類，現階段化學物質登錄並未要求繳交鳥類資訊，亦缺乏此方面資訊。試驗魚種多依照指引所列模式生物進行選擇，後續將補充相關資訊。

(八) 現階段完成以 QSAR 模擬14個化學物質之皮膚與眼睛刺激性、急毒性及基因毒性，部分物質可能受限於其物質特性而無法適用特定模組，但已就可行範圍內評估。

(九) 優先採納替代測試方法清單為3T3中性紅細胞毒性試驗、細胞傳感器微生理計體外試驗方法及 BALB/c3T3細胞轉化體外試驗。目前吞食急毒性無體外測試方法，3T3中性紅細胞毒性試驗尚未成為分級分類之標準試驗，但可為動物實驗之前試驗，亦可避免非必要之動物試驗。眼睛刺激性雖有體外測試方法，但實務上不易執行，因此仍推薦細胞傳感器微生理計體外試驗方法。致癌性實驗常耗費大量時間、經費及試驗動物，若以 BALB/c3T3細胞轉化體外試驗為致癌性前驅試驗，可有效篩選化學物質是否必須進行動物試驗。

(十) 後續隨時關注國際最新替代測試方法，研析並探究新測試方法之原理，依據國內法規不足之處，提出科學性建議以填補制度缺口。

(十一) 美國環境保護署已接受 OECD TG236為生態毒理水生急毒性之替代測試方法，但歐盟化學總署並未接受該測試方法。由於在不同制度，替代測試有不同評估方式及流程，所有替代測試接受與否皆仰賴該國主管機關的評估，因而可能有所差異。

(十二) 各 QSAR 模型之可使用範圍皆已盤點，期末報告將重新具體呈現實驗數據並詳細說明預測不準確或不在工具適用範圍內。

(十三) 新化學物質登錄多已申請資料保密，本年度試行之7項新化學物質將於期末審查會議補充說明其結構及物質

資訊。

九、會議結論：

（一）本計畫期中報告符合契約書規定，審查後同意通過，請依契約書規定辦理第2期款請款事宜。

（二）會議紀錄納入計畫後續執行，並於期末報告修正及說明。

十、散會：下午3時30分。

檔號：
保存年限：

行政院環境保護署毒物及化學物質局 函

地 址：臺北市大安區大安路二段132巷35弄1號
聯 絡 人：崔君至
電 話：(02)2325-7399#55345
電子郵件：chunchih.tsui@epa.gov.tw

受文者：如行文單位

發文日期：中華民國 110年5月21日

發文字號：環化評字第 1101008903 號

速別：普通件

密等及解密條件或保密期限：

附件：會議紀錄

主旨：檢送110年5月19日「整合化學品動物替代測試檢驗量能
及發展新興替代測試應用支援計畫」第1次工作進度報告
會議紀錄，請查照。

正本：瑞昶科技股份有限公司

副本：

局長 謝燕儒

行政院環境保護署毒物及化學物質局
「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試應
用支援計畫」第1次工作進度報告 會議紀錄

一、會議時間：110年5月19日（星期三）上午11時00分

二、會議地點：視訊會議

三、主持人：許仁澤組長

紀錄：崔君至

四、出（列）席人員：如會議簽名單

五、主席致詞：（略）

六、執行團隊報告：（略）

七、綜合討論與意見：

- （一）建議報告編排順序調整由替代測試方法之發展開始論述，再擴及化學物質登錄及危害判斷應用；國際上仍持續發展動物替代測試議題，須持續蒐集相關資訊。
- （二）第4章內容包含毒理及生態毒理，請確認推估模型之使用情形、圖表及報告內容之一致性；第4-28頁之物質 B 分類結果，皮膚刺激與腐蝕性有誤，亦請修正。
- （三）後續應逐步建立替代測試登錄審查能量，規劃讓多方專家、教授及委員參與計畫，以獲得專業意見及精進方案。
- （四）我國替代測試最新技術開發應著重於推估模組之應用，後續以建立替代方法撰寫及審查指引為目標，局內同仁亦應參與及具備電腦模擬預測推估之能力。
- （五）請加強替代測試方法之實際應用面，除目前已規劃5個新化學物質外，可挑選毒理及生態毒理資訊較為完整之106種既有化學物質，做為模組測試之標的物。
- （六）請持續瞭解與評估國內規劃設置3R 中心及立法增補修正相關條文之進展，並廣為諮詢熟知相關進展的專家學者，提供本局規劃後續替代測試發展策略之建議與協助。

- (七) 倘工作執行進度受嚴重特殊傳染性肺炎 (COVID-19) 疫情影響，請及早提出調整或計畫變更需求。

八、執行單位回覆

- (一) 現階段以開發新穎動物替代測試方法為首要目標，包含電腦模擬預測模式之確效、斑馬魚胚胎體外試驗及整合型測試評估方法之開發，以協助國內化學物質登錄制度運作並與國際接軌，後續將持續蒐研國際最新替代測試資訊，提出我國替代測試方法之整合規劃。
- (二) 將擴大請益專家學者，評估及建立我國替代測試執行及審查量能，並深入瞭解各部會對動物實驗及3R 中心之進度及看法，規劃後續替代測試發展策略。
- (三) 將持續評估疫情是否影響工作進度並適時回報。

九、會議結論：

- (一) 本計畫第1次工作進度報告符合契約書規定，審查後同意通過，請依契約書規定辦理第1期款請款事宜。
- (二) 會議紀錄納入計畫後續執行，並於期中報告修正及說明。

十、散會：中午12時整。

檔號：
保存年限：

行政院環境保護署毒物及化學物質局 函

地 址：臺北市大安區大安路二段132巷35弄1號
聯 絡 人：崔君至
電 話：02-23257399#55345
電子郵件：chunchih.tsui@epa.gov.tw

受文者：如行文單位

發文日期：中華民國 110年3月9日

發文字號：環化評字第 1101003648 號

速別：普通件

密等及解密條件或保密期限：

附件：會議紀錄、會議簽名單

主旨：檢送110年3月3日「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試應用支援計畫」啟動會議紀錄，請查照。

正本：瑞昶科技股份有限公司

副本：本局副局長室、主任秘書室、綜合規劃組、危害控制組（均含附件）

局長 謝燕儒

行政院環境保護署毒物及化學物質局
「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試應
用支援計畫」工作啟動會議
會議紀錄

一、會議時間：110年3月3日（星期三）上午10時

二、會議地點：視訊會議（<https://meet.google.com/zrh-tfxiugg>）

三、主持人：謝局長燕儒
紀錄：崔君至

四、出（列）席人員：（詳如會議簽名單）

五、主席致詞：（略）

六、報告事項：

（一）評估管理組說明計畫辦理期程、工項及查核時間點：（略）

（二）瑞昶科技股份有限公司報告：（略）

七、綜合指（裁）示事項：

（一）發展動物替代測試方法為國際必然趨勢，亦為國內動保團體、立法委員及檢測機構等利害關係人高度關切之議題。本局歷年辦理替代測試相關計畫及業務推動，業與動保團體及立法委員建立良好聯繫並獲得肯定，後續計畫執行與推動成果應持續讓相關單位瞭解及意見參與。

（二）請持續瞭解國內其他部會主管法規納入動物替代測試的相關規範，並適時與本科技計畫之其他部會執行團隊交流，共享成果及建立合作共識。

（三）業者採用替代測試方法繳交登錄資訊並通過審查之案件，應持續研析並統計其運用的3R原則（Replacement, Reduction, and Refinement）。

（四）我國替代測試發展進程及策略，建議納入中長期發展規劃，以利爭取經費。

（五）使用電腦模擬建立化學物質毒理及生態毒理之推估，請就外部驗證參數之運用及相關參考統計資料之品質，提出選

取之作業規範，以確保模擬結果之可靠性。另請將整體推估流程建立標準化作業程序，以順利將推估技術移轉本局。

(六) 計畫各項重要時間點請務必掌握，相關意見請團隊納入執行，並依計畫期程辦理後續事宜。

八、散會：上午11時30分。

附件二 歷次審查意見答覆說明

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期末報告會議審查意見答覆說明

李委員俊福

審查意見	回覆說明
1. 前期研究成果雖散列於第 4.2.6 節及 4.4 節中，但仍建議綜合彙整重點列於適當章節中（如第 1.5 節或第 2 章）。	前期研究成果已摘錄並列入成果報告第 1-10 頁。
2. 國際認可之替代測試方法未納入我國測試規範中，應具體明確說明國內執行能力與相關配套措施不足之處，並提供建議。	國內化學物質替代測試評估制度尚未完全建立，且缺乏相關專業人員培訓或認證制度，除持續關注國際最新發展外，也需要與其他部會合作或共同開發。我國 3R 中心建置進度仍在討論階段，由於相關制度發展變數較多且無法在短期完成規劃，建議持續關注與參與我國 3R 中心建立，並在化學物質登錄制度中同步進行滾動式修正。
3. 我國化學品登錄可使用之優先替代測試方法，其適用範圍及限制應列為未來工作重點，而經適用性研析後應有更新替代機制。	已建議 3 項替代測試可列入指引中，並提供相關測試建議納入的原因、特色與其他資訊。建議供登錄人實際使用前仍需要評估使用原則，例如在何種情形下適用該替代測試，替代測試通常依靠證據權重來完整解釋危害，這些判斷邏輯皆需要持續建立輔導使用文件，並放入登錄指引中供登錄人參考，因此建議持續發展相關工作。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期末報告會議審查意見答覆說明

李委員俊福（續）

審查意見	回覆說明
4. 我國接受生態毒理替代測試方法較為欠缺，尤其在魚類短期毒性和水生生物蓄積方面，亟待導入國際認可之方法。	國際認可之魚類短期毒性替代方法有魚類胚胎急毒性試驗(OECD TG 236)及魚細胞株急性：Rtgill-W1 鱒魚細胞株試驗(OECD TG 249)；而國際認可之水生生物蓄積替代方法有使用凍存鱒魚肝細胞的固有清除體外判定試驗(OECD TG 319A)及使用鱒魚肝 S9 亞細胞組分的固有清除體外判定試驗(OECD TG 319B)。另已逐步模擬魚類胚胎急毒性試驗並獲得初步成果，但其他方法仍屬於新興方法目前尚無著墨。考量不同替代測試方法使用情境不同，例如 OECD TG 319 通常會與電腦模擬模式共同使用，不建議直接在指引中列入相關方法，仍應妥善評估其適用性後再建議登錄人使用。
5. 未來發展跨部會替代合作，除提出 3 點：(1)加速資料整理與進行評估，(2)繳交資料之統合，及(3)替代測試與法規橋接等重點外，應再提出具體做法建議，並將其列於第 7.2 節中。	相關建議已補充至第 7.2 節（7-2 頁）。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期末報告會議審查意見答覆說明

吳委員章甫

審查意見	回覆說明
1. 第 1 頁請檢視中英對照之正確性。	已於成果報告中檢視中英對照之正確性。
2. 第 2-13 頁及第 3-101 頁，請簡要提及勞動部替代測試現況。	已補充說明勞動部目前在新化學物質與化學局共同審查，並於新化學物質及既有化學物質資料登錄工具說明共同建議登錄人可使用的替代測試方法，相關內容補充至第 2-12 頁及第 3-103 頁。
3. 第 2-33 頁建議增加美國作法之說明。	美國 TSCA 在對奈米及替代測試的規定及政策上，主要是根據美國有毒物質控制法案(Toxic Substances Control Act, TSCA)第 8(a)節及《重要新用途通知》(Significant New Use Notice, SNUN)，美國 EPA 認為要全面瞭解奈米技術之環境應用和影響，需要全球科學家 and 政策制定者的共同努力，故 EPA 目前正與國內和國際的利益相關者合作，期待解決奈米材料研究及應用需求，並建議可參考國際標準化組織(ISO) 和經濟合作與發展組織(OECD)等奈米及其替代測試方法的研究成果，在化學品替代測試及奈米替代測試的研究和發展上，歐盟似乎比美國投入更多的關注和資源。相關內容在第 2-33 頁已有部分說明，也建議未來可持續蒐集奈米管理的各國資訊。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期末報告會議審查意見答覆說明

吳委員章甫（續）

審查意見	回覆說明
4. 第 3-95 頁請說明定量結構活性關係 (Quantitative Structure Activity Relationships, QSAR) 在奈米物質之應用性。	奈米物質的電腦模型測試包含分子對接研究(molecular docking)、QSAR 和分子動力學模擬 (molecular dynamics simulations) 等。QSAR 模型常被應用於篩選藥物設計與奈米材料等領域，收集大量數據以統計的方式，建立分子結構與物化特性之間的關係曲線，可將 QSAR 運用在篩選藥物分子，接著以分子嵌合與分子模擬預測藥物的結合位置，以及結合過程中的自由能變化。
5. 第 3-115 頁建議提供各部會作法比較表。	各部會在取代、減量與精緻化（優化）的施行現況與比較彙整列於圖 3.4-3，各領域接受替代測試的情況列於圖 3.4-4，另在圖 3.4-5 中預擬化學物質登錄所蒐集的資料在各領域可接受的情況。
6. 第 4-30 頁（即第 4.2.4 節）：(1)請說明若分級準確率不佳，對後續應用之意義；(2)模型開發單位是否有相關說明。	(1)在未來有較多驗證數據後，若特定 QSAR 預測準確率不佳，建議可限制或避免使用在國內化學品的預測，相關說明已加註於第 4-31 頁。 (2)模型開發單位僅提供模型的可靠性參數，如 QSAR 模型的驗證量化指標 R^2 （測試集中實驗值與預測值的相關係數）需要大於 0.6 且 Q^2 （留一法交叉驗證相關係數）必須大於 0.5，該模型的預測結果才可以被採用。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期末報告會議審查意見答覆說明

吳委員章甫（續）

審查意見	回覆說明
7. 第 4-55 頁請說明斜率不為 1 之意義。	斑馬魚胚胎急毒性轉換成魚急毒性的斜率不為 1，推測原因可能是兩者生理構造差異所致，胚胎發育尚未完全，導致對毒性的反應不同。研究回顧胚胎急毒性與成魚急毒性的關係，雖然斜率大多數接近於 1（文獻中為 1.00~1.13），但有部分化學物質屬於神經毒性，對胚胎幾乎沒有影響，因此胚胎毒性閾值明顯高於成魚（以胚胎急毒性轉換會高估 LC_{50} ，造成毒性低估）。相關說明補充於第 4-55 頁。
8. 第 6-1 頁建議增加對成本是否更低之論述。	適當應用替代測試方法能夠符合人道精神，並若能結合高通量和高含量篩選系統，將能達到快速、高通量和節省成本等多項優點。因此若能逐步發展替代測試，將能解決目前業者測試能量不足和測試費用高昂的困境，但目前不論單一替代測試方法或結合高通量之成本費用皆尚未明朗，相關說明已補充於第 6-6 頁，建議可持續關注高通量測試的發展。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期末報告會議審查意見答覆說明

童委員俊維

審查意見	回覆說明
1. 皮膚與眼睛刺激性之 QSAR 預測準確度通常很高，在研究中表現不佳的原因可加入討論。	Danish QSAR 的內部驗證資料顯示一致性 (Concordance) 為 0.806、靈敏度 (Sensitivity) 為 0.795、專一性 (Specificity) 為 0.817，所以模型本身應該是合格的。 從皮膚刺激性/腐蝕性的結果上可觀察到 Danish QSAR 整體的分級準確率為 33.3%，新化學物質及既有化學物質的分級準確率為 0.0% 及 50.0%。QSAR Toolbox 的整體分級準確率為 36.4%，在新化學物質及既有化學物質的分級準確率為 50.0% 及 20.0%。眼睛刺激性僅能被 QSAR Toolbox 預測，其整體分級準確率為 50.0%，新化學物質與既有化學物質的分級準確率分別為 66.7% 及 25.0%。 分析以上數據，Danish QSAR 對於新化學物質的預測能力較弱，但 QSAR Toolbox 則沒有這樣的狀況，使用 QSAR Toolbox 的預測效果與使用者的經驗有關，關於目前整體預測準確率較低的原因，推測可能因使用的化學物質數量僅有 14 種，可能還無法大規模的確認預測的準確率，在未來如有機會可以擴充驗證並蒐集文獻以研析相關終點目前預測準確率與是用的化學品資訊。相關討論已加入第 4-36 頁。
2. QSAR 預測數值接近閾值時應加入其他方法，建議加入討論。	加入 QSAR 模型預測值接近分級閾值時，可以使用更多的方法（如其他 QSAR 模型或體外試驗）的討論，補充於成果報告第 4-31 頁及第 4-45 頁。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期末報告會議審查意見答覆說明

童委員俊維（續）

審查意見	回覆說明
3. 定量結構活性關係工具箱 (QSAR Toolbox)的化學品分析，不適用的規則是什麼？建議加入說明。	QSAR Toolbox 為較需要使用者判斷的預測模型，無法定義出該物質不在適用範圍內。報告中使用 QSAR Toolbox 分析的無效樣本為無實驗值及無法建立交叉參照或趨勢分析相關性。如既有化學物質中的鄰甲酚(CAS No. 95-48-7)及 2-呋喃甲醇(CAS No.98-00-0)在非脊椎動物的短期毒性(7.1)無實驗值提供比對，新化學物質中的物質 E 及物質 G，實驗值來自登錄人的繳交資訊，但在非脊椎動物的短期毒性(7.1)與對水生藻類及藍綠藻的毒性(7.2)中無法建立趨勢分析相關性，因此無法獲得預測值。相關說明補充於第 4-45 頁。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期末報告會議審查意見答覆說明

劉委員宗榮

審查意見	回覆說明
1. 報告中「取代、減量及精緻化」(Replacement, Reduction, and Refinement, 3Rs)的 refinement 翻譯成精緻化，但未來 3R 辦公室使用的名稱是「優化」，可考慮在第 1 頁中英文對照表中加註。	已將 3Rs 的 refinement 於中英文對照表及報告全文中加註「優化」，與未來 3R 辦公室所使用的名稱一致。
2. 第 3-23 頁，表 3.2-1 之參考文獻 (Reference)不全。 (1) 上述表中僅列出認可的替代方法，則所有的體內試驗都不列出。 (2) 毒理資訊項目「6.8 生殖/發育毒性」所列之體外試驗方法中，OECD TG 455、458 及 456 係測試內分泌干擾素的方法，應無法代替生殖/發育毒性。 (3) 表 3.2-4 我國接受的替代方法中，生態毒理資訊項目「7.9 魚類之長期毒性」，魚類胚胎卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗可用以替代嗎？	已於表 3.2-1 的結尾 (3-24 頁) 加入完整參考文獻。 (1) 替代測試的定義為所有符合 3Rs 原則 (減量、替代和優化) 之測試皆可為替代方法。部分替代測試方法，如急性毒性：吞食的固定劑量法和上下增減劑量法，雖仍為體內測試，但符合 3Rs 原則的減量和優化，因此列於表 3.2-1，希望登錄人在沒有非動物評估方法時，仍應優先採用動減量方法。 (2) 根據既有化學物質標準登錄資料撰寫指引第一版，要求登錄人繳交的生殖毒性資訊包含：生殖/發育毒性篩選、胎兒期發育毒性及兩代生殖毒性等資訊。目前內分泌干擾的評估方法無法取代生殖/發育毒性資訊，也尚未被我國登錄制度所要求/接受。2021 年釋出的 REACH 修法草案中，規劃在物質註冊資料中要求業者繳交內分泌干擾性質相關的測試、證據權重或文獻資料等，目前尚不清楚其在登錄資料中的實際位階，初步於報告的表 3.2-1 國際認可之毒理替代方法中列出內分泌干擾的測試方法，並暫列於生殖/發育毒性欄位，而表 3.2-2 我國登錄可接受之毒理資料，未列內分泌干擾的測試方法，建議未來持續評估。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期末報告會議審查意見答覆說明

劉委員宗榮（續）

審查意見	回覆說明
	(3) 根據既有化學物質標準登錄資料撰寫指引第一版，建議 7.9 項魚類的長期毒性可使用魚類胚胎卵黃囊吸收階段的短期毒性試驗(OECD TG 212)，以符合動物減量的精神，但因評估的生命階段差異，仍無法完整取代魚類早期毒性試驗(OECD TG 210)，若無法由該測試獲得清楚的危害時，建議考量 OECD TG 210 或其他慢毒性試驗的必要性。
3. 第 3-61 頁（二）基因毒性之三項試驗介紹，所列出的 4 種方法都沒錯(細菌基因突變分析、OECD TG 473 體外哺乳細胞基因毒性分析、OECD TG 490 體外哺乳細胞基因毒性分析、OECD TG 474 動物體內基因毒性分析)，但表 3.2-27 的哺乳細胞基因毒性分析項下僅列出 L5178Y TK+/-小鼠淋巴瘤細胞株就值得商榷，如此一來體外基因毒性所看的都是「突變」，故此處應加入或直接以 OECD TG 473 的體外哺乳細胞染色體異常分析來取代。	OECD TG 470 觀察細胞的基因突變，也能觀察到部分的染色體損傷，例如：大範圍缺失(large deletions)、染色體重新排列(chromosome rearrangements)或有絲分裂重組(mitotic recombination)等，但無法完整看到所有基因毒性的變異，因考量登錄人繳交登錄資料時僅需繳交一項，故選擇可同時觀察到部分染色體變異及基因突變的 OECD TG 470 作為代表進行分析說明，修正稿中亦在表 3.2-27 中備註說明，基因毒性的體外測試亦可選擇 OECD TG 473 進行。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期末報告會議審查意見答覆說明

劉委員宗榮（續）

審查意見	回覆說明
4. 第 3-67 頁（三）基因毒性的替代測試方法：體外哺乳細胞微核試驗，所有文字敘述都正確，但缺少染色體數目改變；第 3-73 頁（四）基因毒性替代方法使用建議，即提到「染色體數目畸變」。	已在第 3-67 及 3-68 頁中補充說明微核測試有潛力觀察到染色體數目改變中的非整倍體現象，並加註以下說明：體外哺乳動物細胞微核試驗(OECD TG 487)用於檢測間期(Mitosis phase)細胞內，細胞質的微核發生。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)或細胞分裂後期染色體因紡錘體損傷而無法被分配到兩極相關，故可評估試驗物對細胞是否有染色體斷裂 (clastogenicity)，也具有觀察染色體數目變異/非整倍性(aneugenicity)的能力，但測試規範中也說明，當不具有特殊技術時，例如：螢光染色體原位雜交技術(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)，微核測試無法區分誘導染色體斷裂物質與造成染色體數量變化的物質，登錄人仍須注意。
5. 從行政管理上來看，替代方法用在化學物質登錄是世界趨勢，但由管理階層在最後的產品上市許可（如藥品、化妝品等）來看，替代方法仍在研擬階段，因此對於替代方法的應用仍應謹慎評估。	現行我國優先採用各國化學物質管理端已接受的替代測試，如歐盟 REACH 等，另外在建議登錄人使用替代測試前，先行釐清相關測試的適用範圍與使用方式，審慎評估可行之替代方法進而積極推動。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期末報告會議審查意見答覆說明

顏委員瑞泓

審查意見	回覆說明
1. 計畫執行單位的期中回覆不明確：藥品以動物進行安全性評估是非臨床試驗的一部分，所以實驗上也更貼近臨床試驗的需求要項，因此較難與其他制度比較，所述何義？	雖然非臨床測試的測試內容類似，但藥品的非臨床試驗制度相較於其他制度更為複雜，也可能因為藥品在未來臨床測試的用途、使用對象、使用頻率等，而要求不同且多元的測試進行安全性評估，例如：除了常規測試外，常常需要額外證明物質對於特定標的器官的危害，所需使用的動物測試超出 OECD 測試規範的應用範圍，因此化學物質登錄的資訊項目無法代表藥品對動物測試的需求。
2. 國內各產品主管機關不同，請說明對於資料要求是否有橫向連繫，替代測試方案是否可為各管理單位所採納。	我國已開始推動成立 3R 中心，相關部會亦逐漸建立跨部會交流機制，後續將持續積極參與動物試驗替代方法之跨領域整合。
3. QSAR 模型測試與生態毒理的結果，請問要如何決定是否可以採納，或是什麼條件可以採用、何種模型適合？報告中整合型測試評估方法 (Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA) 架構，為何分級準確率達 85% 即可接受？	依據 OECD 所提出 QSAR 模型用於法規的 5 大驗證原則：1. 明確的測試終點、2. 明確的演算法、3. 模型的適用範圍、4. 模型的合適度、穩健性和預測性、5. 機制闡述。 QSAR 應用指南指出每個 QSAR 模型的驗證量化指標 R^2（測試集中實驗值與預測值的相關係數）需要大於 0.6 且 Q^2（留一法交叉驗證相關係數）必須大於 0.5，該模型的預測結果才可以被採用。 依據 OECD 提出的 IATA 6 項監管原則，涵蓋 1. 明確的測試終點、2. 明確的目的、3. 基本原理的描述、4. 單個資料來源的描述、5. 如何整合各個資料來源地描述、6. 必須考慮已知的不確定性。 第 4.4 節旨在驗證使用 IATA 之預測能力較單一替代測試方法為佳，然替代測試方法之採納標準及條件仍須持續蒐集更多相關資訊及數據，由專家學者經證據權重研議後擬定。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期末報告會議審查意見答覆說明

顏委員瑞泓（續）

審查意見	回覆說明
4. 表 3.2-3 及表 3.2-4 我國登錄資料接受之毒理項目替代測試方法，是指為哪個法規所接受？	成果報告中所羅列之替代測試方法，皆為新化學物質及既有化學物質資料登錄辦法所接受之測試項目。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期末報告會議審查意見答覆說明

毒物及化學物質局

審查意見	回覆說明
1. 危害分類之建議中，部分用詞涉及其他部會應更中性，並著重於本局業務。	已於成果報告調整措辭。
2. 請確認「Oral」翻譯為「吞食」是否適當？	「Oral」翻譯為「吞食」係參考自新化學物質及既有化學物質資料登錄辦法附表文字，目前食入、口服等用法亦屬常見翻譯，但吞食可強調非自願之攝入方式，例如：強制胃管餵食，在實驗動物中較可含括所有經口給藥方式，且各部會化學安全相關法規及安全資料表均採「吞食」。於表 3.2-1 備註說明以上皆為常用說法。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期中報告會議審查意見答覆說明

李委員俊福

審查意見	回覆說明
1. 請摘要彙整前期研究之重要成果。	前期成果包含 13 個既有化學物質之生態毒理電腦模擬，定量結構活性關係工具箱 (QSAR Toolbox) 魚類水生急毒性之測試結果及數據已列入第 4.2.6 中合併討論。前期亦完成此 13 個物質體外試驗結合定量結構活性關係之篩選測試，整合型測試評估方法結果已列於第 4.4 節討論。
2. 第 3.2 節，最近國際認可之替代測試方法有部分納入我國持續更新之清單中，有些則沒有（如 OECD TG 249），其取捨依據為何？。	許多替代測試方法指引於歐美先進國家，已充分驗證其效力，並接受為替代測試方法，如：魚類細胞急性毒性 RTgill-W1 細胞株試驗 (Fish Cell Line Acute Toxicity - The RTgill-W1 cell line assay, OECE TG 249)，可用於填補毒理及生態毒理資訊。我國是否接受特定替代測試方法須考量該測試方法是否適合我國發展，考量依據包含：是否已進行本土驗證、國情及特定方法的執行量能等，因此建議長期規劃考量。
3. 表 3.2-19 國際認可之替代測試方法（尤其經美國環保署及歐盟參考實驗室認可）為何有未納入我國之測試規範中？	許多國際新興替代測試除可信度外，需要同步考量國內行能力及相關配套措施，例如：危害分類方法及 IATA 策略是否充足；因此決定納入前需要多方評估。
4. 已優先將納為我國的替代測試方法為何仍需進行適用性研析（3-55 頁），其應針對未納入之測試方法。	既有化學物質標準登錄資料撰寫指引第一版建議登錄人優先選擇符合動物福祉的替代測試方法，並列出相關替代測試方法的建議列表，但尚未清楚闡述替代測試方法的適用性，登錄人繳交資訊時仍有可能出現疑問，例如單一測試方法是否足以供後續評估等。許多替代測試方法需要數項資訊共同整併後，才能得出適當結論，因此需持續研析國際新興 IATA 策略，期能在指引中清楚敘明。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期中報告會議審查意見答覆說明

李委員俊福（續）

審查意見	回覆說明
5. 針對奈米物質人體健康風險與生態毒理，替代測試方法的說明較不具體、充實（僅有 3D 細胞培養模型與斑馬魚），應加強表 2.3-7 中所列之方法可參考。	奈米物質毒理的標準測試方法仍在發展中，ECHA 於 2019 年 12 月公布奈米形式物質的登錄和鑑定方法，其於環境中的溶解度和分散度穩定性測試之指導文件於 2020 年公布。OECD 目前也尚未公布奈米物質的替代測試標準方法，故奈米的替代測試方法不論是體外(<i>in vitro</i>)或計算機模擬方法(<i>in silico</i>)仍待進一步驗證和研究。另已補充說明評估奈米物質的應用技術，包括幹細胞研究、組織工程學、分子對接研究(<i>molecular docking</i>)及分子動態模擬(<i>molecular dynamics simulation</i>)等。
6. 選擇 7 種新化學物質（A 至 G），何謂單一組成？不知其活性官能基如何得知定量活性結構關係 (<i>quantitative structure-activity relationships, QSAR</i>)驗證的正確性？	單一組成化學物質通常指對於雜質有一定限制的純物質。依照新化學物質及既有化學物質資料登錄辦法所述，登錄物質其單一雜質成分含量不得超過該化學物質之重量 10%；多重雜質成分總量不得超過該化學物質之重量 20%。新化學物質資料多為登錄人繳交資料，考量其保密性，不建議直接公開其結構式及細部資訊，於審查會議簡報中提供相關資訊。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期中報告會議審查意見答覆說明

吳委員章甫

審查意見	回覆說明
1. 2-6 頁是否可提供中心屬性資訊(如政府或民間)？	已完成蒐集世界各國國際 3Rs 中心之屬性及隸屬單位和成立年份等相關資訊。
2. 3-28 頁 3.2.3 各方法綜合評論部分可再強化，包括使用性建議宜更明確，並搭配相關論述。如 p.3-32 頁、p.3-35 頁、p.3-51 頁是否可舉例哪些法規目的可搭配哪些方法？	已強化毒理項目研析並納入相關資訊，以 3-28 頁的急毒性項目進行簡易說明。目前我國既有化學物質標準登錄資料撰寫指引建議可使用固定劑量法(OECD TG 420)、急性毒性級別法(OECD TG 423)與上下增減劑量法(OECD TG 425)來獲得急毒性資訊，三種方法皆屬於動物減量的替代測試方法，測試邏輯稍有不同，如 OECD TG 420 主要係以觀察物質造成的急毒性徵兆為主，避免造成動物死亡或極大的痛苦。考量動物福祉，應盡量選擇避免動物痛苦的試驗方法，強化動物實驗精緻化的精神。
3. p.3-77 頁跨部會綜合評論與建議是否可提供更多內容？	已補充農藥及環境用藥的分析及相關建議，請參考 3.4 節說明。
4. p.4-33 頁工具比對結果之綜合評論與建議是否可提供更多內容？	已對於各 QSAR 模型之比對加入更多的討論，並補充如模型適用範圍等資訊，請參考第四章資訊。
5. p.4-57 頁我國國家標準分類應用替代方法適用性之綜合評論與建議是否可提供更多內容？	目前 GHS 已更新至第 9 版，已對於替代測試方法危害分類適用性提出研析與建議。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期中報告會議審查意見答覆說明

童委員俊維

審查意見	回覆說明
1. 各種定量活性結構關係模型之適用性不同，甚至有些不符合經濟合作暨發展組織（Organization for Economic Cooperation and Development, OECD）指引，請檢視工具之適用性。	已於表 4.1-1 補充 ECHA 公開的 QSAR 指引彙整資料，完成 5 種 QSAR 模型應用於 7 項測試終點，但部分模式可能不適用於特定項目，因此針對各測試終點進行不同的模組應用，T.E.S.T. Group contribution 及 ECOSAR 進行 IATA 適用性驗證。
2. 模擬實驗數據是預測不準確或不在工具適用範圍內應詳加說明。	已補充各模型適用範圍表，排除不在適用範圍內之資料，重新進行分級準確率比較。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期中報告會議審查意見答覆說明

劉委員宗榮

審查意見	回覆說明
1. 此計畫所涵蓋的面非常廣，所以對每一種毒理測試項目（6 種，圖 3.4-4）不容易深入探討，更不要說還要針對不同的物種（化學品、奈米物質等）。由於化粧品是目前唯一不能使用動物做毒性測試，所以可以參考的文獻較多，現就此計畫的基因毒性做檢視：表 3.2-16（3-42 頁）只有第三、四級需要繳交體內基因毒性。“若…確認測試物質具有基因毒性，無須再進行動物實驗；前述試驗結果為陰性，再進行動物體內基性分析”。但是在基因毒性替代測試方法使用建議（3-51 頁），“當結果為陽性時才進一步執行動物實驗”，請說明二者不同之原因。	國內目前在化粧品領域已禁止進行動物試驗，對於化學品登錄而言有較多的參考資訊。未來藉由參考化粧品替代測試方法之應用現況，有助於推動化學物質登錄的替代測試方法施行。已修改 3-42 頁（現為 3-61 頁）關於基因毒性的繳交邏輯，與 3-51 頁（現為 3-74 頁）頁一致。
2. 化粧品基因毒性測試基本使用 OECD TG 471、OECD TG 490、OECD TG 473 及 OECD TG 487。報告的 3-44 到 3-50 頁對以上這 4 種測試都有敘述。但是（3-49 頁）體外哺乳動物微核測試（OECD TG 487）的敘述不夠精準，因為未說明此測試的兩個測試目的：染色體結構及數目改變（clastogenicity and aneugenicity）。請於期末報告中說明即可。	已對體外哺乳動物微核測試(OECD TG 487)之試驗目的進行更詳細的描述。體外哺乳動物微核測試藉由人類周邊血的淋巴球初代細胞或嚙齒動物的細胞株進行測試，在暴露物質後觀察細胞微核發生的情況。微核可能因無著絲點染色體片段 (acentric chromosome fragments)，或細胞分裂後期因紡錘體損傷因而導致染色體無法被分配到兩極等情況產生，故該測試可藉由評估物質是否導致染色體斷裂 (clastogenicity) 和非整倍體 (aneugenicity) 來判定其基因毒性潛力。其他資訊請參考 3.2.3 節。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期中報告會議審查意見答覆說明

顏委員瑞泓

審查意見	回覆說明
1. 本計畫進行前期規劃，調和替代測試在各部會的可利用性。是否已進行此部份工作？未在計畫進度中呈現。是否可對產品類別去搜集其需求之毒理資料再進行比對，藥品（Pharmaceutical products）、農藥及環境用藥（Pesticide products）、動物用藥（Veterinary drugs）、化粧品（Cosmetics products）、食品添加物（Food additives）、飼料添加物（Feed additives）、工業化學品（Industrial chemicals）、醫療產品（Medical products）、其他產品(Others)健康食品等。尤其與化學局相關的环境用藥的部份。	已新增農藥及環境用藥分析並補充相關建議。藥品部分與其他制度相當不同，藥品以動物進行安全性評估，是非臨床試驗的一部分，所以實驗設計上也更貼近臨床試驗的需求要項，因此較難與其他制度比較。工業化學品應可用化學物質登錄進行包含。目前尚未蒐集到動物用藥及食品添加物等所需繳交的毒性資訊。
2. 毒性試驗（Toxicity studies）試驗項目，已完成皮膚及眼刺激性，替代測試，而完成之化學物質毒理及生態毒理推估及驗證，是那些測試項目？	使用 14 種化學物質（包含 7 種新化學物質及 7 種既有化學物質）進行毒理及生態毒理項目的電腦模式推估及驗證，因新化學物質多為標準登錄第一級，優先針對第一級的測試終點進行驗證，涵蓋急毒性、皮膚刺激/腐蝕性、皮膚過敏性、眼睛刺激性、基因毒性及藻類、水蚤與魚類的水生急毒性。結果顯示，QSAR 模式對皮膚過敏性、基因毒性及魚類水生急毒性具有良好的分級準確率。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代 測試應用支援計畫」期中報告會議審查意見答覆說明

顏委員瑞泓（續）

審查意見	回覆說明
3. 環境毒理之非目標生物試驗，鳥類、魚類。是否需考量地域特性，以 LC ₅₀ 中選用之資料為歐美國家使用虹鱒及呆頭魚（Fathead minnow）其機制是否適用不同魚種，魚種選擇有無原則。	魚類急毒性測試物種選擇 OECD TG 203 建議的斑馬魚，由於地域性魚種的毒性資訊較難蒐集，目前沒有特別選擇臺灣代表魚種。依照過往資訊，地域性魚種結果的確可能與指引建議魚種的結果產生差異，但因目前處於判斷流程建立的環節，需要借重指引建議魚種在國際豐富的毒性資訊，待方法逐步建立後可考量以本土魚種進行驗證的可能性。
4. 建立 1 式優先採納替代測試方法清單。建議我國採納之替代測試方法，急毒性吞食、眼睛刺激性、致癌性，其原因或是論述理由不夠明確。	已於第 3.2.5 節補充優先採納替代測試方法的選擇原因及論述。
5. 替代測試方法很多，但替代測試完備登錄系統採用定量活性結構關係（QSAR），為何未考慮離體/體外數據。	定量活性結構關係具備快速篩選、便宜等多項優點，並且在數據充足的情況下，已被證實能推估可能危害性作為證據權重的一部分，亦能夠作為後續試驗的起始劑量參考依據。體外數據部分，本年度對魚類急毒性的體外測試方法進行驗證並採納相關資訊進行 IATA 的建立。考量相關成本，目前無法對所有毒理及生態毒理項目的體外數據進行驗證或蒐集，建議後續可持續完善相關評估。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試 應用支援計畫」第 1 次工作進度報告會議審查意見答覆說明

審查意見	回覆說明
1. 替代測試計畫應跳脫於其他化學物質登錄相關計畫，成為一獨立之計畫。報告編排順序應調整為替代測試方法之應用、化學物質登錄及危害判斷。	已改善編排順序並調修論述方式，依序為國際動物替代測試方法、替代測試方法應用於化學物質登錄及化學品之危害分類判斷。
2. 第四章的論述包含毒理及生態毒理，推估模型的使用情形不一致，請確認並修正之。第 4-28 頁物質 B 分類，皮膚刺激與腐蝕性有誤亦請修正之。	已修正推估模型使用情形不一致的情形，第 4-28 頁物質 B 皮膚刺激與腐蝕性之分類經確認後並已修正。
3. 動物替代測試議題於國際之間仍持續發展中，替代測試最新技術開發著重於推估模組應用，相關資訊蒐集須持續進行。	推估模組皆為經 OECD 驗證之 QSAR 模型，包含 OECD QSAR Toolbox、ECOSAR、T.E.S.T、Danish QSAR database 及 VEGA 共 5 種模式，廣泛使用不同模式進行驗證及技術開發。
4. 科技部計畫之內容需與其他相關計畫有所區隔，不僅提供登錄制度所需之資訊及方法外，應輔助並完備化學物質登錄制度。	替代測試計畫以開發新穎之動物替代測試方法為首要目標，包含各種電腦模擬預測模式確效、斑馬魚胚胎體外試驗及整合型測試評估方法開發，以協助國內化學物質登錄制度運作並與國際接軌。此外，亦研析其他部會制度及相關研究計畫，期能精進化學物質登錄的替代測試應用。
5. 計畫下一階段應逐步建立替代測試方案及登錄審查能量，並規劃讓多方專家、教授及委員參與計畫，以獲得專業意見及精進方案，使計畫更加完善。	本年度主要工作為研析替代測試方法、提出替代測試清單及指引調修意見，不包含案件審查，故難以對於替代測試審查委員名單或審查原則提出建議。待完成指引中與替代測試相關之修正意見後，可視實際需求邀請專家學者一併討論替代測試方法清單。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試 應用支援計畫」第 1 次工作進度報告會議審查意見答覆說明

審查意見	回覆說明
6. 除目前計畫中已規劃 5 個新化學物質之外，可挑選毒理及生態毒理資訊較為完整之 106 種既有化學物質作為模組測試之標的物。	已使用 7 種新化學物質及 7 種既有化學物質作為驗證目標物，透過 OECD QSAR Toolbox、ECOSAR、T.E.S.T、Danish QSAR database 及 VEGA 共 5 種電腦模擬模式預測毒理及生態毒理資訊，並使用其中 7 種既有化學物質進行斑馬魚胚胎試驗。
7. 科技部 3R 中心設置已逐步規劃中，且已修正相關法條須瞭解並進一步評估。許多專家學者對於科技部計畫有所涉獵及著墨，可請該專家學者提供意見或協助處理相關事宜。	將持續協助主管機關關注 3R 中心設置及推動相關業務。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試 應用支援計畫」評選會議審查意見答覆說明

劉委員宗榮

審查意見	回覆說明
1. 計畫內容符合毒物及化學物質局公告的計畫內容。	依工作項目確實執行，以達成計畫目標。
2. 「以體外試驗結合定量結構活性關係」是否實際執行體外試驗再加上 QSAR 來預測生態毒性之效能？另外，此生態毒理為何？	進行斑馬魚胚胎試驗（體外試驗）及 5 種 QSAR 模型（電腦模擬預測模式），研析整合型測試評估方法(Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA)預測生態毒理之效能。選定之生態毒理項目為水生急毒性，其定義為在水蚤、藻類及成魚毒性試驗中，取最低 LC ₅₀ 或 EC ₅₀ 的數值，判定為此化學品之 LC ₅₀ 或 EC ₅₀ 。
3. 建議此計畫之結果必先副知其他主管機構。	配合化學局參與跨部會科技計畫之研商會議，提出計畫成果與相關部會討論。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試 應用支援計畫」評選會議審查意見答覆說明

童委員俊維

審查意見	回覆說明
1. 工作內容符合計畫需求。	依工作項目確實執行，以達成計畫目標。
2. 部分 QSAR 模型不適用特定終點，選擇欲測試之 5 種化學物質需有代表性。	毒理預測採用 OECD QSAR Toolbox 及 Danish QSAR Database，可涵蓋登錄資訊 9 項毒理測試項目之 7 項（不含致癌性及毒物動力學）；生態毒理項目使用 5 種 QSAR 模型，包括 OECD QSAR Toolbox、Danish QSAR Database、ECOSAR、T.E.S.T. 及 VEGA 進行水生急毒性之評估。測試物質由已登錄的新化學物質案件挑選 7 種新化學物質，皆以適用 QSAR 之有機化學物質為毒理預測及生態毒理 IATA 研析之基礎。
3. IATA 整合的成效，除今年以 5 種物質測試，日後可再擴充測試品項才能有更好的定論。	IATA 已被認為可望增進預測能力的替代測試方法，未來有機會將持續進行擴充驗證。使用 7 種 QSAR 可預測之化學物質進行 IATA 流程建立與初步研析，做為後續擴充測試之基礎。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試 應用支援計畫」評選會議審查意見答覆說明

吳委員章甫

審查意見	回覆說明
1. 建議事前善加規劃 5 種待測試之化學物質篩選依據。	測試物質由已登錄的新化學物質案件挑選 7 種新化學物質，皆以適用 QSAR 之有機化學物質為毒理預測及生態毒理 IATA 研析之基礎。 由於新化學物質登錄之毒理及生態毒理項目大多提供實測數據，可利用有實測值的項目驗證 IATA 之確效性，據以推估預測缺乏資料的項目。
2. 建議善加規劃經濟效益分析之作法。	藉由研析國際替代測試方法及發展本土具優勢之替代測試，據以協助推動國內動物替代測試之使用率，經濟效益分析將著重於推動相關替代測試可減少的動物使用量、測試經費或時間。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試 應用支援計畫」評選會議審查意見答覆說明

顏委員瑞泓

審查意見	回覆說明
1. 化學品國內管理單位不同，應分別針對化學品特性。	化學物質製造的各種成品皆有主管機關及法規明確規範並加以管理，藉由跨部會科技計畫之合作，共同推動化學物質由源頭至各項成品皆落實使用動物替代測試。
2. 國內實驗室量能其量能需加以評估。	於 109 年「化學物質毒理及生態毒理資訊與風險評估技術建置計畫」中，已訪查大專院校實驗室與瞭解其測試資源及潛力，以及參考經濟部關於國內檢測機構之執行量能調查結果，羅列毒理及生態毒理測試評估終點與可進行測試機構家數。本年依投標須知補充規定所列之工作項目，係著重於技術方法可行性研析及清單建立、相關預測模式驗證與危害分級方式，未包含檢驗量能盤點，惟持續關注經濟部針對檢測機構之調查及國家衛生研究院「非動物性替代方法資訊網」對於替代測試相關資源之盤點結果。
3. 應掌握國內提收報告單位對替代測試之認知與瞭解。	配合化學局參與跨部會科技計畫之研商會議，與相關部會交流討論。
4. 5 種化學物質如何挑選？	測試物質由已登錄的新化學物質案件挑選 7 種新化學物質，皆以適用 QSAR 之有機化學物質為毒理預測及生態毒理 IATA 研析之基礎。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試 應用支援計畫」評選會議審查意見答覆說明

許委員仁澤

審查意見	回覆說明
1. 請釐清計畫主持人。	由本公司陳柏霖博士擔任計畫主持人。
2. 請研析跨部會 3Rs（替代、減量、精緻化）測試合作機制。	蒐研相關部會（如：衛生福利部及農業委員會）近年研究結果，並於計畫執行期間透過跨部會科技計畫研商會議，協調合作分工及配合推動我國 3Rs 制度。
3. 請研析我國發展定量結構活性推估工具箱（quantitative structure-activity relationship, QSAR Toolbox）預測模型之可行性。	歷年執行相關計畫工作已詳細研析並試行歐美廣泛使用之成熟模式，例如：評估專案介面套裝軟體 (Estimation Program Interface Suite, EPI Suite) 及經濟合作暨發展組織 (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) QSAR Toolbox，本(110)年擴充驗證，同時增加 4 種 QSAR 模型，包括丹麥 QSAR 資料庫(Danish QSAR Database)、生態結構活性關係 (Ecological Structure Activity Relationships, ECOSAR)、毒性推估軟體工具 (Toxicity Estimation Software Tool, T.E.S.T.) 及全球架構下之化學品特性推估線上模型 (Virtual models for property Evaluation of chemicals within a Global Architecture, VEGA) 等，做為發展我國 QSAR 預測模型之研究基礎。

「整合化學品動物替代測試檢驗量能及發展新興替代測試 應用支援計畫」評選會議審查意見答覆說明

許委員仁澤（續）

審查意見	回覆說明
4. 說明盤查我國動物替代測試檢驗量能之作法。	於 109 年「化學物質毒理及生態毒理資訊與風險評估技術建置計畫」中，已訪查大專院校實驗室與瞭解其測試資源及潛力，以及參考經濟部關於國內檢測機構之執行量能調查結果，羅列毒理及生態毒理測試評估終點與可進行測試機構家數。本年依投標須知補充規定所列之工作項目，係著重於技術方法可行性研析及清單建立、相關預測模式驗證與危害分級方式，未包含檢驗量能盤點，惟持續關注經濟部針對檢測機構之調查及國家衛生研究院「非動物性替代方法資訊網」對於替代測試相關資源之盤點結果。

- * 本報告係受託單位或計畫主持人個人之意見，僅供本局施政之參考，不代表本局立場。
- * 本報告之著作財產權屬行政院環境保護署毒物及化學物質局所有，非經行政院環境保護署毒物及化學物質局同意，任何人均不得重製、仿製或其他之侵害。