

# 皮膚過敏性





## ⑥ 皮膚過敏性

### 👉 研究目的

藉由得到試驗物對皮膚過敏性之危害分級資訊，提供建構植物保護產品外觀之標示與建議安全使用方法，研究結果應提供農藥等植物保護產品對引起皮膚過敏性反應的科學佐證資料。

### 👉 皮膚過敏性毒性分級與危害級別

根據聯合國全球化學品統一分類和標籤制度 (Globally Harmonized System of classification and labelling of chemicals, GHS) 第 10 版 (United Nations, 2023)，首先根據皮膚過敏性之危害性 (hazard) 有無分為 Category 1 及未分級 (無分級) (No Category)，Category 1 為指出該試驗物為致敏物質 (sensitizer)，具有潛在皮膚過敏性；No Category 則指出該試驗物為非致敏物質 (non-sensitizer)，顯示以現行試驗方式無法證明物質對人體具有潛在皮膚過敏性危害可能性。另外又可依據過敏性的效價 (potency) 強弱，將 Category 1 依程度分級為次分類 Category 1A 或 1B，Category 1A 為指出物質具有強烈皮膚過敏性，為強致敏物質；Category 1B 為指出物質具強致敏物質以外的其他致敏物質，有關皮膚過敏性危害級別及標示依據 GHS 原則整理如表 6-1。

表 6-1、皮膚過敏性分級及標示

類型	危害級別	警示語	警告訊息	圖示符號
皮膚過敏性	具皮膚過敏性 (Category 1) 並依據過敏性效價 (potency) 強弱含次分類 sub-category 1A (強致敏物質) 以及 sub-category 1B (其他致敏物質)	警告 (warning)	造成皮膚過敏	Category 1 ! Warning
	未分級 (無分級) (No Category)	不須標示		不須標示



## 👉 皮膚過敏性評估及危害分類流程

傳統上評估農藥包括原體或成品之皮膚過敏性會進行天竺鼠加佐劑最大化試驗 (GPMT)、天竺鼠無佐劑過敏檢測法 (BT) 或小鼠局部淋巴結細胞增殖分析法 (LLNA) 等體內試驗，為考量實驗動物福祉等緣由，目前國際提倡以導入健康危害途徑 (Adverse Outcome Pathway, AOP) 概念針對不同關鍵事件採取非動物的替代試驗進行化學品的過敏性評估，為 (1) 有效確認試驗物質過敏性的危害分級、(2) 提高對人體預測準確性及 (3) 對於不同理化性質化學品適用性 (application domain) 等考量，目前相關動物替代的試驗方法均不建議單獨使用以完全取代動物試驗，而是利用 IATA 或者 DA 等策略，可能同時使用多種方式並結合其他與試驗化學物結構資料及相關已知之毒理學數據，才可有效作為最後判定其分級的依據，並達到監管機關對於化學品風險評估及管理策略的需求。針對一般化學品評估建議採取 IATA 方式，評估現有的資訊及試驗結果，如果針對現行所搜集到資料比如人體暴露資料、體內試驗、體外試驗、理化性質或電腦模擬評估等結果，已可充分供評估物質之分類結果則可直接進行危害標示，有需要才得進行額外試驗，但以一般來說新申請農藥產品在未執行測試時，大多缺乏上述資料，因此為求管理之分類及標示 (classification and labeling, C&L) 需求，須要求申請者進行額外試驗之過敏性評估。農藥之過敏性評估會根據試驗物為原體或者成品 (formulation) 之不同建議採取不同評估模式。以一般化學農藥而言，原體農藥主要為含有高純度之有效成分單一物質，因此在考量科學性與動物福利為前提時，建議可根據最新公佈之 OECD Guideline 497 指引，以定義方法策略同時採取不同替代試驗進行皮膚過敏性評估，而以成品農藥的製劑產品而言，考量過去以 DA 預測皮膚過敏性相關驗證能力的探討研究，大多以單一化學物為主，而非混合物，並且成品農藥主要為成分複雜之混合物，相關產品會含有農藥有效成分及多種其他成分如佐劑，因此建議優先採取體內試驗，並且在考量動物福祉而言建議優先使用小鼠 LLNA 分析法，倘若無法適用 LLNA 分析法才進行天竺鼠相關之過敏性試驗，有關皮膚過敏性評估及危害分類流程建議如下：



#### ■ 原體 (Technical concentrate) :

- (1) 評估農藥試驗物是否符合 OECD Guideline 497 建議評估策略包括三取二 (2o3) 或者綜合測試策略 (ITS) 囊括動物替代試驗方法之適用範圍內，如是則因應動物福祉鼓勵先進行替代試驗，並進入流程 (2)；如否則進行體內試驗，進入流程 (4)。
- (2) 考量試驗可能所需資源成本以及分級能力，建議先以 ITS 策略評估農藥試驗物之潛在過敏性可能，因此須依據 OECD TG442C、TG442E 以及使用電腦模擬方法工具包括 Derek Nexus、OECD QSAR Toolbox 及其他與指引建議方式具預測能力等同性以上評估工具進行皮膚過敏性評估，並進行皮膚過敏性危害等級分類，倘若試驗物在測試前評估未符合 ITS 建議的測試適用性範圍中，或者測試後之結果顯示未符合相關定義方法囊括替代試驗的可接受標準，則進入流程 (3)。
- (3) 以 2o3 策略評估農藥試驗物之潛在過敏性可能，因此須依據 OECD TG442C、TG442D 以及 TG442E 進行皮膚過敏性評估，並進行皮膚過敏性危害等級分類，倘若試驗物在測試前評估未符合 2o3 建議的測試適用性範圍中，或者測試後之結果顯示未符合相關定義方法囊括替代試驗的可接受標準，則進入流程 (4)。
- (4) 依據 OECD TG429、TG442A 或 TG442B 採取小鼠 LLNA 分析法之體內試驗進行皮膚過敏性評估，並進行皮膚過敏性危害等級分類，倘若試驗物在測試前評估未符合小鼠 LLNA 分析法建議的測試適用性範圍中，則進入流程 (5)。
- (5) 依據 OECD TG406 採取天竺鼠 GPMT 或 BT 分析法之體內試驗進行皮膚過敏性評估，並進行皮膚過敏性危害等級分類。

#### ■ 成品 (Formulation) :

- (1) 依據 OECD TG429、TG442A 或 TG442B 採取小鼠 LLNA 分析法之體內試驗進行皮膚過敏性評估，並進行皮膚過敏性危害等級分類，倘若試驗物在測試前評估未符合小鼠 LLNA 分析法建議的測試適用性範圍中，則進入流程 (2)。
- (2) 依據 OECD TG406 採取天竺鼠 GPMT 或 BT 分析法之體內試驗進行皮膚過敏性評估，並進行皮膚過敏性危害等級分類。



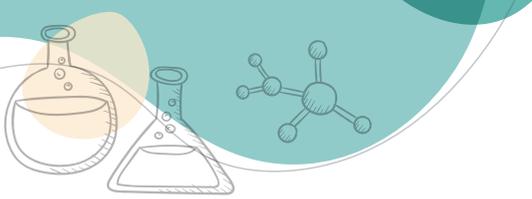
7. 皮膚過敏性體外測試 - 健康危害途徑：樹突細胞激活關鍵事件 (*In vitro* Skin Sensitisation assays addressing the Key Event on activation of dendritic cells on the Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation)

7.1 OECD 指引編號：Test No. 442E (2023)

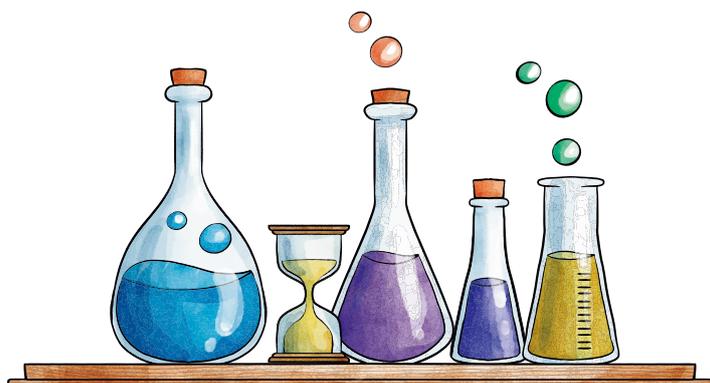
7.2 試驗原則：以體外方法 (*in vitro*) 評估化學品暴露之皮膚過敏性反應，主要原理為透過已知的人體皮膚過敏性健康危害途徑 (Adverse Outcome Pathway, AOP) 機制，針對其中的第三關鍵事件 (KE3)：樹突細胞 (dendritic cells) 激活關鍵事件，藉由樹突細胞的活化，此活化反應可藉由評估皮膚致敏物能誘導樹突細胞表面功能蛋白的改變，以及趨化因子 (chemokines) 和細胞激素 (cytokines) 基因轉錄 (genomic transcripts) 的變化，造成樹突細胞膜表面標誌物 (surface markers) 的表現增加，而可了解試驗物質是否具有皮膚致敏性。目前 OECD TG442E 指引基於上述機制之測試方法包括：人類細胞株活化測試 (Human Cell Line Activation Test; h-CLAT)、U937 細胞活化測試 (U937 cell line activation Test; U-SENS™)、IL-8 報導基因試驗 (Interleukin-8 reporter gene assay, IL-8 LUC assay) 以及過敏性基因快速檢測 (genomic allergen rapid detection, GARD™) 等 4 種測試方法，本試驗結果不得作為分類唯一依據，需要結合皮膚過敏性評估 OECD Guideline 497 指引之定義方法 (defined approaches, DA) 囊括其他試驗結果一併評估。

7.3 試驗體系：h-CLAT 為使用單核白血病細胞株 (human monocytic leukaemia cell line, THP-1)，並偵測細胞表面標誌物 (surface markers) CD86 和 CD54 的量化改變；U-SENS™ 為源自組織細胞性淋巴瘤細胞株 (human histiocytic lymphoma cell line, U937)，並偵測細胞表面標誌物 (surface markers) CD86 的量化改變；IL-8 LUC assay 使用 THP-G8 細胞 (THP-1 衍生細胞株)，檢測 IL-8 和 GAPDH 相關螢光素酶量化改變；GARD™ 使用白血病細胞株 SenzaCell，並以指定儀器：NanoString nCounter® 檢測皮膚過敏性特異性基因組 (GARD™skin Genomic Prediction Signature, GPS) 的表現。

7.4 分類性能：可鑑別皮膚過敏性類別，包括 Category 1 及未分級 (無分級) (No Category)，本指引的任一方法皆無法鑑別次分類 1A 及 1B。



7.5 適用範圍：液體(liquid)、固體(solid)等多種型態之純物質(substance)、成分已知的混合物(mixture)以及多成分組成物質(Multi-constituent substance)。測試之化合物須為可溶解或呈穩定懸浮液體(如膠狀或無沉澱或無分層的懸浮液)，並且由於 h-CLAT 試驗方法檢測  $\text{Log } K_{ow} > 3.5$  的試驗物傾向產生偽陰性結果，因此在此條件下的陰性結果不予採用，然而當使用  $\text{Log } K_{ow} > 3.5$  的試驗物獲得了陽性結果，仍可辨別為皮膚致敏物。本指引不適用原半抗原(pro-hapten)、前半抗原(pre-hapten)，因試驗體系使用的細胞株的代謝能力有限，無法檢測需要生物轉化後產生過敏性的物質。另外基於相關試驗系統條件，自發螢光物質可能干擾流程中的細胞毒性測試、無法溶解的試驗物、組成不明的混合物皆可能導致錯誤的結果。





## 參考文件(OECD TG442E) (2023 年版本)

### ■ 試驗流程簡述：

#### h-CLAT

- (1) 測試劑量：人類細胞系激活測試的初始劑量為基於細胞存活率 75% ( $CV_{75}$ ) 決定測試劑量範圍，測試須涵蓋細胞存活率 75% 劑量，以細胞存活率 75% 的劑量為中心至少測試 4 個劑量(相隔劑量差 1.2-2 倍，依據藥品的特性可進行微調)，若無求出  $CV_{75}$ ，以最高濃度 5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (溶劑為 Saline) 或 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (溶劑為 DMSO) 開始試驗。
- (2) 執行試驗使用的 THP-1 細胞如細胞株 TIB-202™ 可於有品質的細胞庫如 ATCC (American Type Culture Collection) 取得。THP-1 細胞株須至少解凍後 2 週，而繼代天數可達 2 個月但繼代代數不可超過 30 代，且陽性對照組(如 2,4-二硝基氯苯 2,4-dinitrochlorobenzene, DNCB 和硫酸鎳  $\text{NiSO}_4$  藥物組別) 或陰性對照組(乳酸 lactic acid, LA) 的試驗結果須符合確認標準，並依建議有 2 重複的一致結果，才能開始執行試驗物的劑量分析試驗 (dose finding assay) 和正式鑑定試驗。
- (3) 劑量分析試驗 (dose finding assay)：主要目的為求出  $CV_{75}$ 。 $CV_{75}$  代表測試組與溶劑 / 載體對照組相比的細胞存活率 75% 結果。此  $CV_{75}$  值用來決定後續 CD86/CD54 表現偵測(正式試驗)的試驗物濃度範圍選擇。初始試驗物可先配置成 100  $\text{mg}/\text{mL}$  (適用溶解於生理鹽水或完全培養基) 或 500  $\text{mg}/\text{mL}$  (適用溶解於 DMSO) 的高濃度原液 (stock)，使最終細胞暴露濃度不可超過建議閾值 (5000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溶於生理鹽水；1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溶於 DMSO)。進行序列稀釋濃度，預期監測到涵蓋細胞存活率 75% ( $CV_{75}$ ) 以下的細胞毒殺劑量。過程為利用與細胞核染劑 propidium iodide (PI) 染劑結合，再以流式細胞儀分析量化，並用公式求出 75% 細胞存活率的劑量，以此  $CV_{75}$  劑量作為後續正式試驗的測試劑量基準，正式試驗劑量範圍為  $1.2 \times CV_{75}$  至  $0.335 \times CV_{75}$ 。
- (4) 試驗細胞收集後須培養於 24 孔盤，細胞總量  $1 \times 10^6/\text{well}$ ，依續加入試驗物後的總體積為 1 mL。試驗物選擇的溶劑依溶解特性溶於培養基 (complete medium) 或 DMSO。每次試驗應設置陰性與陽性對照組，對照組濃度選擇依指引建議，選擇接近  $CV_{75}$  但未達毒殺的濃度(如 DNCB：2.5-4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；LA：1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )，測試組和所有對照組皆為 1 重複操作。



- (5) 細胞暴露試驗物後培養於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 和潮濕的大氣下 (≥ 95% humidity) 24 小時 ±0.5 小時，達試驗物暴露時間後收細胞進行流式細胞儀上機試驗 (flow cytometry) 前之清洗、進行免疫染色前之封閉 blocking 以防止抗體與組織或 Fc 受體之非特異性結合及染標有 FITC 螢光物質之 CD86 和 CD54 表面標誌抗體，染標前各孔須分選同量細胞進行同型對照 / 分型對照 (isotype control) 染色。
- (6) 抗體作用合適時間 (如 30 分鐘) 後並移除，再與能分析細胞存活力的細胞核染劑 propidium iodide (PI) 結合，並使用流式細胞儀系統 (flow cytometry) 量化分析。
- (7) 求出 CD86 和 CD54 的相對螢光強度 (Relative Fluorescence Intensity; RFI) 作為判別試驗物於單次運行的過敏屬於陽性或陰性結果。RFI 公式為測試組相對於溶劑對照組的平均螢光強度數值 (Mean Fluorescence Intensity, MFI)，且各組皆須先扣除自身的同型抗體對照 / 分型對照螢光背景值。
- (8) 單次試驗的陽性結果為至少一個濃度的 RFI 不可小於 150%，陰性結果為最高的濃度 RFI 須小於 150%。且供判定結果的組別 (例如高濃度組) 其細胞存活率應大於 50%，避免有細胞毒性的干擾影響結果判定。
- (9) 單次運行試驗的其他數據範圍要符合允收標準。如培養基對照組和溶劑對照組的細胞存活率應要大於 90%，且 CD86 及 CD54 不可有陽性反應 (陽性判定標準為 CD86 RFI ≥ 150% 和 CD54 RFI ≥ 200)；流式細胞儀系統量化的平均螢光強度數值 (Mean Fluorescence Intensity, MFI) 中，溶劑中 CD86 或 CD54 對照組相對於其同型抗體對照組 (isotype control) 的比值要大於 105%；陰性結果須符合單次試驗測試的最高劑量濃度其細胞存活率小於 90%，否則該次試驗結果應不被採用。但以下狀況除外：當試驗物使用 5,000 μg/mL (以生理鹽水或 Medium 為溶劑)、1,000 μg/mL (以 DMSO 為溶劑) 或最高可溶劑量作為最大測試濃度時，雖細胞存活力 >90% 時其陰性結果應可被採用。
- (10) 預測致敏與否至少須進行 2 次獨立試驗，測試組的表面標誌 CD86 或 (和) CD54 在 2 次試驗結果有一致的陽性反應，則可判定試驗物有過敏性 (POSITIVE)；若不一致，須進行第 3 次試驗，若 3 次獨立試驗中有 2 次獨立試驗測試結果有陽性反應，則可判定試驗物有過敏性。不符合以上的陽性反應判定則分類為無致敏性結果 (NEGATIVE)，詳細判定流程如圖 6-11。

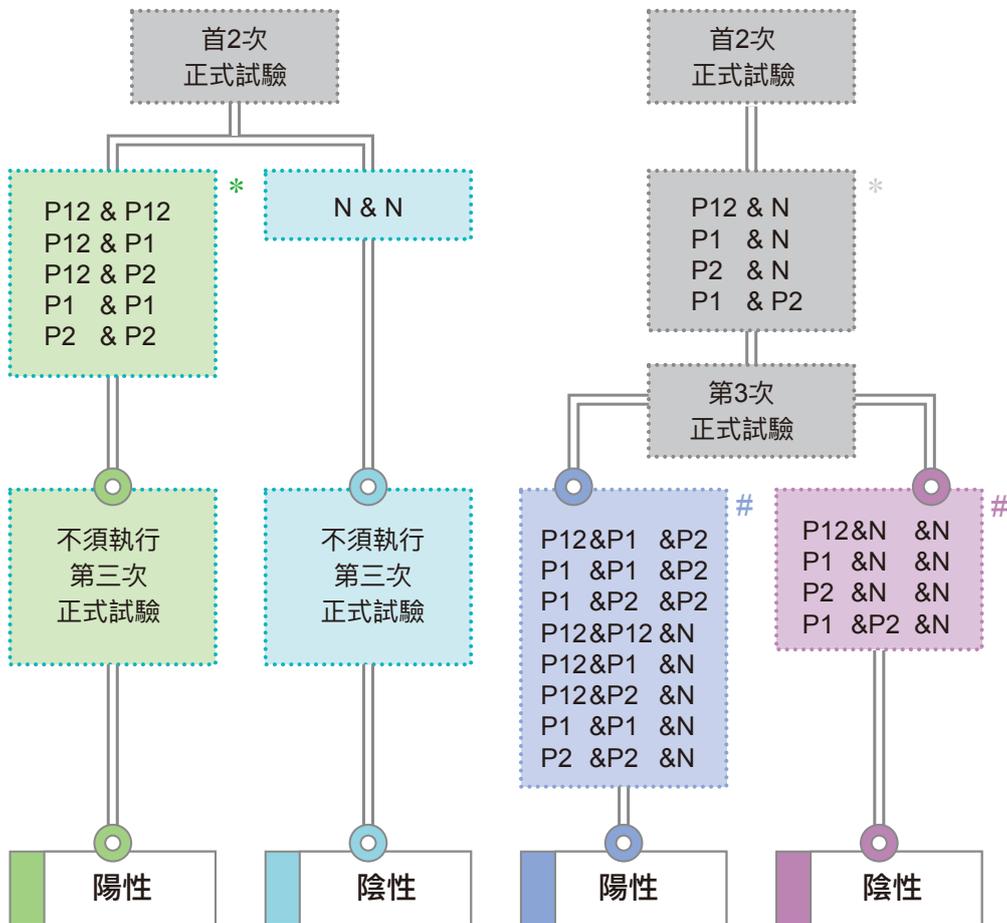


圖 6-11、h-CLAT 試驗結果的預測判定模型

P1：本次試驗只有 CD86 表現為陽性結果。

P2：本次試驗只有 CD54 表現為陽性結果。

P12：本次試驗 CD86 和 CD54 表現皆為陽性結果。

N：本次試驗 CD86 和 CD54 表現皆無陽性結果。

\*：方框顯示了前 2 次試驗結果的相關組合與獲得它們的順序無關。

#：方框顯示了基於前 2 次試驗獲得的結果和第 3 次試驗結果的相關組合，與獲得它們的順序無關。

- (11) 每次試驗須計算陽性 (CD86 RFI  $\geq$  150% 和 CD54 RFI  $\geq$  200) 的有效濃度數值 (EC<sub>150</sub> 及 EC<sub>200</sub>)，以進一步納入整合性測試與評估方法 (Integrated Approach to Testing and Assessment, IATA) 之過敏性分類之判定。第二次以上的獨立試驗中，試驗物劑量須視第一次獨立試驗的結果進行



調整，至少須重複第一次的 2 個劑量濃度，可依試驗設計執行至少 4 個序列稀釋濃度(其中須包含細胞存活力 70% 的濃度和 EC<sub>150</sub> 或 EC<sub>200</sub> 的濃度範圍)。細胞存活力 = (活細胞數 / 總細胞數) × 100。此外須以下面的公式(對數線性內插值；log-linear interpolation)： $\text{Log CV}_{75} = \frac{[(75-c) \cdot \text{Log}(b) - (75-a) \cdot \text{Log}(d)]}{(a-c)}$  進一步計算 CV<sub>75</sub> 的濃度，有關 Log CV<sub>75</sub> 計算示意圖如圖 6-12。

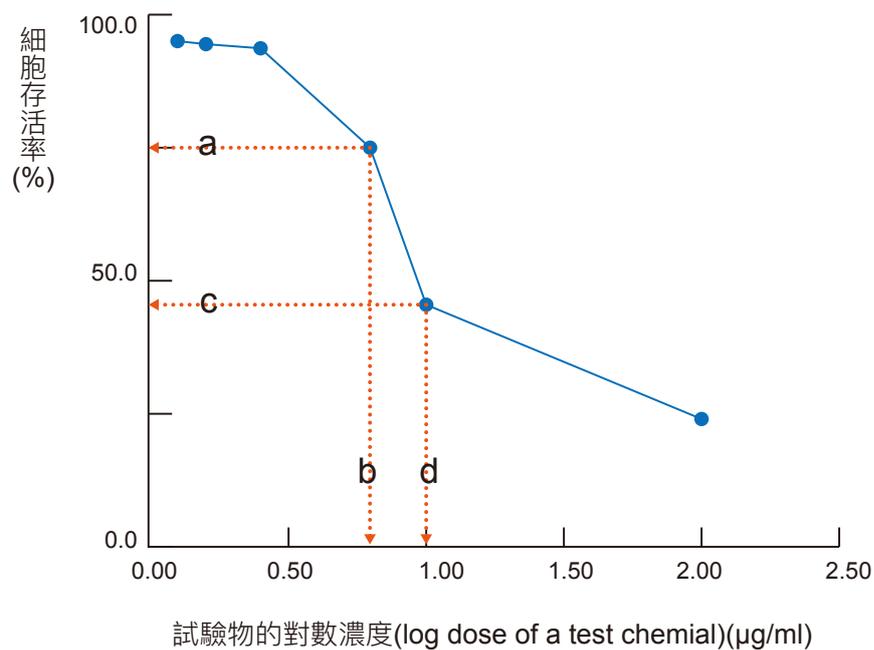
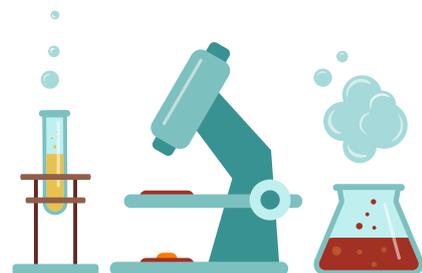


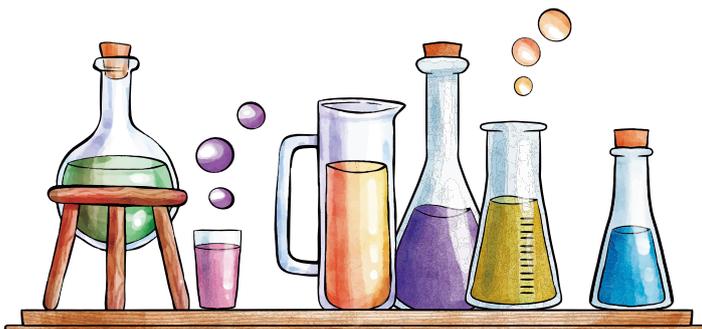
圖 6-12、h-CLAT 試驗 Log CV<sub>75</sub> 計算示意圖

- a：細胞存活力超過 75% 的最小值。
- c：細胞存活力低於 75% 的最大值。
- b, d：b 和 d 分別代表 a 點和 c 點的對數濃度。





- (12) 試驗限制說明：本試驗測試辛醇 - 水分配係數  $\text{Log } K_{ow} > 3.5$  的試驗物傾向產生偽陰性結果，因此此條件下的陰性結果不予採用，然而若為陽性結果仍可辨別為皮膚致敏物。考量 h-CLAT 體系使用的細胞株的代謝能力有限，無法評估 pre-haptens (能被氧化的化學純物質；在低氧試驗環境下容易導致試驗呈現陰性結果) 和 pro-haptens (須經過肝臟酵素如 P450 活化之代謝物才有過敏性的物質)。此外有自體螢光 (fluorescent) 的測試化學物是否適用於本試驗方法，須進一步評估藥品不可與本試驗方法中偵測細胞表面 CD86 和 CD54 表現的染標螢光抗體有相同的螢光光譜 (如 FITC) 或偵測細胞存活力的染標螢光相同光譜 (如 propidium iodide; PI)。若仍必要測試上述有限制的試驗物，須於限制規範內說明和結合其他於 IATA 框架內的資訊來源結果。若已有案例得知某特殊分類的試驗物證實不適用於 h-CLAT 試驗方法時，則不應使用本試驗方法進行試驗的評估。





(13) 流程圖(h-CLAT) (圖 6-13) :

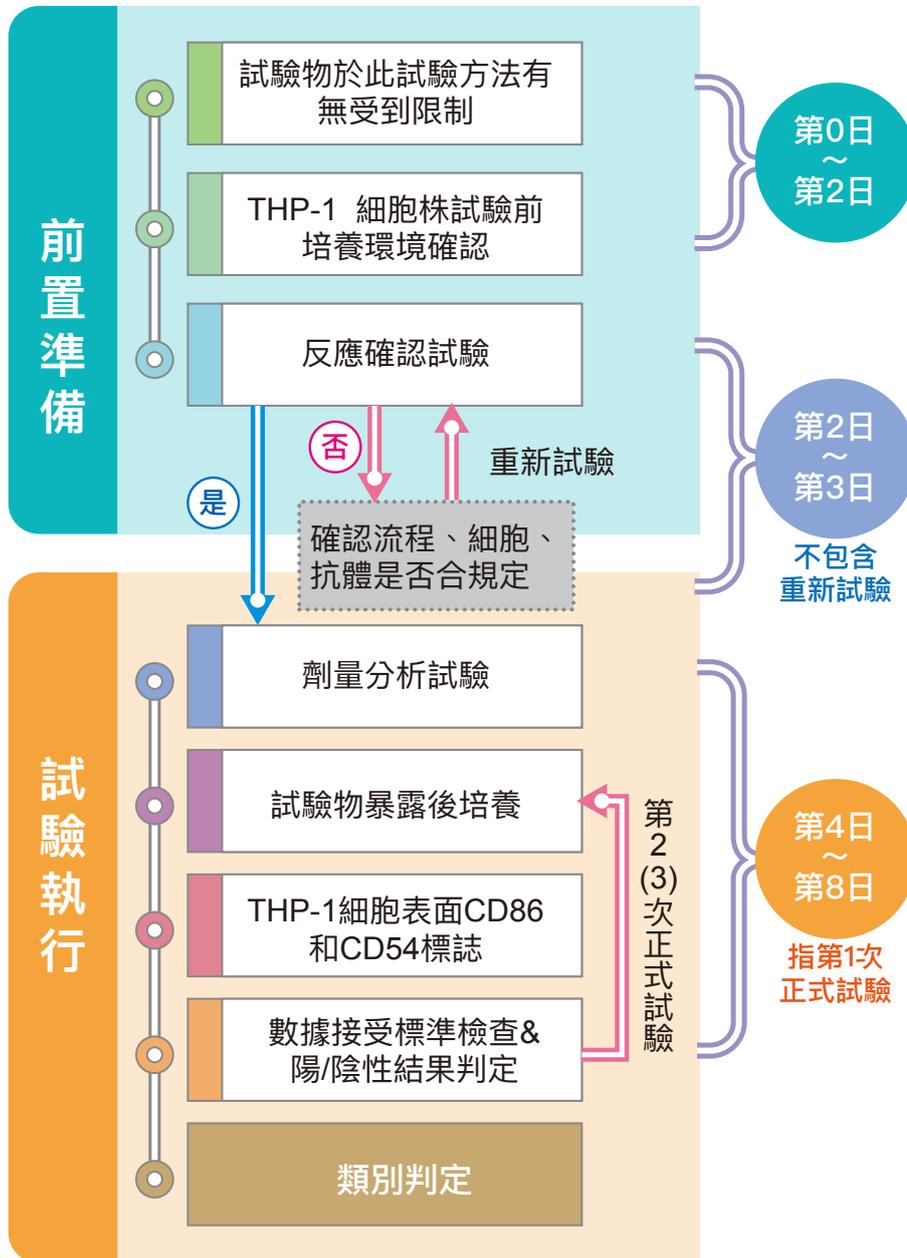


圖 6-13、OECD TG442E 皮膚過敏性體外試驗 – h-CLAT 流程圖



## 👉 皮膚過敏性試驗總比較

表 6-12、各試驗適用性與可識別之皮膚過敏性分級總比較

試驗指引	試驗體系	試驗時間	測試化學物限制		提供危害分級能力
			適用	限制	
TG 406 (體內試驗)	天竺鼠 (約 60 隻)	最高約至 35 天	均適用 (固體 / 液體 / 純物質 / 混合物)， 以及多組成物質	對動物可能造成最多傷害，並 須使用最多數量動物，根據動 物福利考量建議不優先使用	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Category 1 (含次分類 1A、1B)</li> <li>• No Category</li> </ul>
TG 429 (體內試驗)	小鼠 (約 30 隻)	最高約至 21 天	均適用 (固體 / 液體 / 純物質 / 混合物)， 以及多組成物質	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 須具備可操作放射性物質實驗室</li> <li>2) 部分物質如金屬可能產生偽陰性結果</li> <li>3) 部分物質如界面活性劑可能產生偽陽性結果</li> <li>4) 針對農藥產品相較天竺鼠試驗更容易產生陽性結果</li> <li>5) 較不適用於含有複雜化學分子官能基物質</li> <li>6) 較不適用物質難溶或不溶於適當之媒介物</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Category 1 (含次分類 1A、1B)</li> <li>• No Category</li> </ul>
TG 442A (體內試驗)	小鼠 (約 30 隻)	最高約至 21 天	均適用 (固體 / 液體 / 純物質 / 混合物)， 以及多組成物質	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 部分物質如金屬可能產生偽陰性結果</li> <li>2) 部分物質如界面活性劑可能產生偽陽性結果</li> <li>3) 較不適用於含有複雜化學分子官能基物質</li> <li>4) 較不適用物質難溶或不溶於適當之媒介物，或不適用於可能影響 ATP 測定之物質</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Category 1 (無法分辨次分類)</li> <li>• No Category</li> </ul>
TG 442B (體內試驗)	小鼠 (約 30 隻)	最高約至 21 天	均適用 (固體 / 液體 / 純物質 / 混合物)， 以及多組成物質	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 部分物質如金屬可能產生偽陰性結果</li> <li>2) 部分物質如界面活性劑可能產生偽陽性結果</li> <li>3) 較不適用於含有複雜化學分子官能基物質</li> <li>4) 較不適用於物質難溶或不溶於適當之媒介物</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Category 1 (無法分辨次分類)</li> <li>• No Category</li> </ul>



試驗指引	試驗體系	試驗時間	測試化學物限制		提供危害分級能力
			適用	限制	
TG442C (化學試驗)	人工合成胜肽蛋白質	約為 2 天	液體、固體等多種型態之純物質、成分已知的混合物，以及多組成物質	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) DPRA 及 ADRA 無法分辨過敏性效價 (無法判別次分類)，kDPRA 只能鑑別出強致敏物質</li> <li>2) 原半抗原 (pro-hapten)、前半抗原 (pre-hapten) 可能得到偽陰性結果</li> <li>3) 當試驗化學物在檢測吸收光譜會顯著吸收且與胜肽有相同滯留時間 (出現共沖提 (co-elution)) 現象則結果應不採用</li> <li>4) 不適用於組成未知或變動複雜的混合物</li> <li>5) 較不適用於物質難溶或不溶於適當之媒介物</li> <li>6) 試驗化學物可能與胜肽反應產生沉澱</li> <li>7) 少數只與特定蛋白如組胺酸 (histidine) 結合的致敏物則可能產生偽陰性結果</li> </ol>	DPRA、ADRA ● Category 1 (無法分辨次分類) ● No Category  kDPRA ● 次分類 1A ● 非次分類 1A (可能為 1B 或 No Category)
TG442D (體外試驗)	人角質細胞 (HaCaT)	最高約至 5 天	液體、固體等多種型態之純物質、成分已知的混合物，以及多組成物質	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 相關方式皆無法評估出過敏性效價 (無法分辨次分類)</li> <li>2) 原半抗原 (pro-hapten)、前半抗原 (pre-hapten) 可能得到偽陰性結果</li> <li>3) 不適用於組成未知或變動複雜的混合物</li> <li>4) 較不適用於物質難溶或不溶於適當之媒介物</li> <li>5) 對辛醇 - 水分配係數 (Log Kow) 大於 7 的物質因普遍難溶於介質，不建議以此方式測試</li> <li>6) 壓力化學物質 (chemical stressors) 如咪唑啉基脲 (imidazolidinyl urea) 因具有嚴重潛在刺激性，進而引起垂死細胞發出訊號而可能產生偽陽性結果</li> <li>7) 會干擾螢光酶的化學品可能會混淆細胞檢測螢光酶的活性，因此也不適用於相關試驗</li> </ol>	● Category 1 (無法分辨次分類) ● No Category



試驗指引	試驗體系	試驗時間	測試化學物限制		提供危害分級能力
			適用	限制	
TG442E (體外試驗)	單核白血 病細胞株 (THP-1) ; 組織細胞性 淋巴瘤細胞 株 (U937) ; 白血病細胞 株 (Senza Cell)	最高約 至 4 天	液體、固 體等多種 型態之純 物質、成 分已知的 混合物， 以及多組 成物質	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 相關方式皆無法評估出過敏性效價 (無法分辨次分類)</li> <li>2) 原半抗原 (pro-hapten)、前半抗原 (pre-hapten) 可能得到偽陰性結果</li> <li>3) 不適用於組成未知或變動複雜的混合物</li> <li>4) 較不適用於物質難溶或不溶於適當之媒介物</li> <li>5) h-CLAT 對於 Log K<sub>ow</sub> 大於 3.5 的物質可能產生偽陰性結果，因此陰性結果會判定為無法確定</li> <li>6) 會干擾螢光酶的化學品可能會混淆細胞檢測螢光酶的活性，因此也不適用於相關試驗</li> <li>7) 高細胞毒性的物質會影響結果的判定，因此通常也不在適用性範圍內</li> <li>8) IL-8 Luc Assay 對於界面活性劑可能產生偽陽性結果，而對於酸酐 (anhydrides) 類物質可能產生偽陰性結果</li> <li>9) GARD™ skin 對於未知精確分子量物質可能引起不適當的輸入濃度，導致結果錯誤分級</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Category 1 (無法分辨次分類)</li> <li>• No Category</li> </ul>
Guideline 497 (定義方法)	2o3	視所組 合試驗 而定	使用之化學或體外試驗等適用物質範圍，應參照個別指引最新版本的適用範圍	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) 2o3 無法評估出過敏性效價 (無法分辨次分類)</li> <li>2) 使用之化學或體外試驗等限制性，應參照個別指引最新版本的適用範圍中，一般來說特定類別化學物 (例如金屬、無機化合物、UVCB 物質和複雜之混合物) 可能不在特定方法的適用範圍內；電腦模擬方法則應參照個別使用工具軟體可接受的適用領域 (AD)</li> <li>3) 試驗結果倘若處於邊緣區間可能影響最後定義方法判讀的有效性</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Category 1 (無法分辨次分類)</li> <li>• No Category</li> </ul>
	ITS	視所組 合試驗 而定	使用之化學、體外試驗或電腦模擬試驗工具等適用物質範圍，應參照個別指引最新版本或個別軟體最新更新的適用範圍	<ol style="list-style-type: none"> <li>3) 試驗結果倘若處於邊緣區間可能影響最後定義方法判讀的有效性</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Category 1 (含次分類 1A、1B)</li> <li>• No Category</li> </ul>



## 📖 參考文獻

1. 廖俊麟、羅彥鈞、李懿庭、蔡建任。2022。農藥之皮膚過敏性評估與動物替代新穎策略。臺灣農藥科學 13：79-106。
2. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2010. Test no. 429 : Skin sensitisation. local lymph node assay, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 20 pp.
3. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2010. Test no. 442A : Skin sensitization, local lymph node assay : DA, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 16 pp.
4. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2014. The adverse outcome pathway for skin sensitisation initiated by covalent binding to proteins, Part 1 : Scientific evidence, OECD series on testing and assessment, No. 168, OECD, Paris, France. 105 pp.
5. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2016. Guidance document on the reporting of defined approaches and individual information sources to be used within integrated approaches to testing and assessment (IATA) for skin sensitization, OECD series on testing and assessment, No. 256, OECD, Paris, France. 317 pp.
6. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2018. Test no. 442B : Skin sensitisation, local lymph node assay : BrdU-ELISA or -FCM, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 36 pp.
7. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2022. Test no. 406 : Skin sensitisation, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 11 pp.
8. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2022. Test no. 442D : *In vitro* skin sensitisation, ARE-Nrf2 Luciferase test method, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 49 pp.
9. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2023. Test no. 442E : *In vitro* skin sensitisation, *In vitro* skin sensitization assays addressing the key event on activation of dendritic cells on the adverse outcome pathway for skin sensitization, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 95 pp.



10. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2023. Guideline no. 497 : Defined approaches on skin sensitisation, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 53 pp.
11. Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). 2023. Test No. 442C : *In chemico* skin sensitization, Assays addressing the adverse outcome pathway key event on covalent binding to protein, OECD guidelines for testing of chemicals, section 4, OECD, Paris, France. 75 pp.
12. The EU Reference Laboratory for alternatives to animal testing (EURL ECVAM). 2017. GARDTMs skin Assay Protocol. Available at :  
<https://tsar.jrc.ec.europa.eu/system/files/Published/GARDskin%20Assay%20Protocol%20TSAR.pdf>
13. United Nations. 2023. Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS), 10th ed. United Nations, New York, U.S.A. 592 pp.
14. Y. Kimura. 2021. Setsuya Aiba. IL-8 LUC assay protocol ver.025E. Department of Dermatology, Tohoku University Graduate School of Medicine.

