

動物替代測試：斑馬魚胚胎在化學物質生態毒性的現況與展望

王應然／成功大學環境醫學研究所特聘教授。

協助撰稿 | 李艷林、陳姿羽、薛建豐、曾家琪、張嘉育。

前言：動物實驗在臺灣

每年農曆7月中旬左右，全臺灣醫學研究中心的中央廣播總是會傳來動物中心慰靈公祭的召喚，邀請有犧牲實驗動物的研究人員前往祭拜，除了感謝動物們的奉獻，也讓研究人員心中因殺生稍存的不安獲得救贖。慰靈公祭已經是全臺灣生物醫學從業人員的共同記憶，從研究生、研究助理、臨床醫師、研究員到教授，誠心地在供桌前雙手合十或舉香致意，也成為每年的例行公事。第一線實際操刀的研究人員壓力最大，調皮的研究生偶爾在舉香祭拜同時口中喃喃暗念：「冤有頭債有主，不干我的事，都是指導教授叫我殺的」。然而，戲謔背後隱藏的嚴肅議題，讓人不禁自問——還要多久的未來，我們才能解決大量犧牲實驗動物的科學研究？

美國總統林肯（Abraham Lincoln）曾說：「我贊同動物均有其權利，如同人類均有人權」。近兩百年

來，西方世界對道德的深度思考，不斷地將人類生命意義擴伸至其它生物，時至今日，絕大部分文明國家都已系統性地立法，並以正義與平等的立基點來規範人類應如何對待動物，以保障動物的生存權。臺灣作為地球村的一份子，亦追隨國際腳步於1998年頒立動物保護法，並陸續修增訂條文。實驗動物在《動物保護法》的定義是指「為科學應用目的而飼養或管領之動物」，須具備易標準化地飼養、可大量繁殖、不太昂貴、壽命長短恰當與非保育類及瀕危動物等五大要點，且牠們成為實驗動物的首要條件是因為「先天性或是經由人類誘導產生的疾病或是某種特定生命現象，可作為人類了解該種疾病或該特定生命現象的機制」。

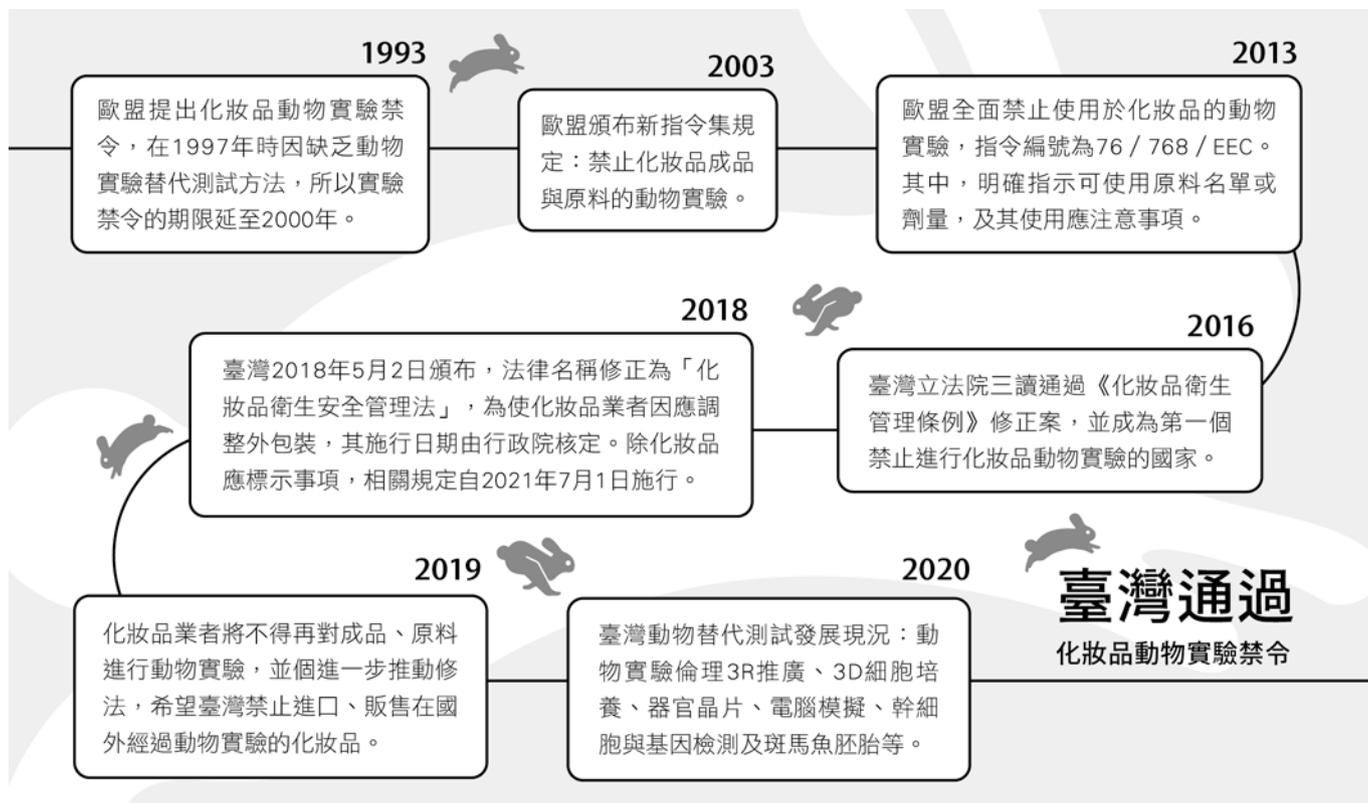
然而，在發展科技、醫藥進步、生活便利的同時，「人類究竟還要犧牲多少實驗動物」、「實驗動物作為疾病預測模式的準確性為何」

等，依然是動物保護團體和科學研究單位不斷拉扯的話題。

動物替代測試的落實現況

近年來，實驗動物福祉與使用倫理受到關注，減少實驗動物使用與推廣替代方法也逐漸成為世界趨勢。動物在實驗過程中經歷疼痛、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。目前許多替代測試的方案已被提出，除了用來克服動物實驗相關的缺點，也將不合乎道德或具有爭議性的實驗程序盡量避免與排除，如「減量（reduction）、精緻化（refinement）與取代（replacement）」構成的3Rs概念，便是利用不同的方法以及替代物種來執行這些實驗。這三大概念提供替代方法的發展，不僅應用在藥物的開發檢驗，也廣泛使用在化學物質的測試中。

動物替代的概念首先在1957年由



圖一：替代測試在國際上的緣起，以及臺灣的替代測試發展現況。

KUBOTA 新款桌上型泛用離心機S300系列

【外觀設計時尚】
【內杯混用新設計】
【使用者為中心的設計】

S300T
桌上型泛用離心機

S300TR
桌上冷凍離心機

Swing Rotor
最高轉速：4,000rpm
最大離心力：2,610xg
最大處理量：15mlx24
99個記憶程式

雙鷹企業有限公司 TEL：(02)2278-3223
FAX：(02)8512-3975
www.deagle.com.tw
◎ 新北市三重區重新路五段646號4樓

動物福利大學聯合會（Universities Federation for Animal Welfare）創辦人滬姆（Charles W. Hume）和英國動物學家盧榭爾（William Russell）提出，且盧榭爾和3Rs共同創立者波爾契（Rex Burch）也提出一些使用更人道的動物實驗方法。替代方法的主要精神在於，使用動物研究時應構思是否可以其它試驗方式替代活體動物，而國際上正在嘗試將此精神落實於化妝品產業以及化學品登記。以化妝品產業為例，歐盟從1993年開始提出化妝品禁用動物試驗以來，歷經20年努力終於在2013年3月正式通過強制執行禁用動物實驗作為化妝品原料及產品的毒性測試。臺灣亦在2016年經立法院三讀通過《化粧品衛生管理條例》修正案，明定2019年11月起實施化妝品動物實驗禁令，臺灣化妝品業者在5年的緩衝期後，將不得再對成品、原料進行動物實驗。圖一簡述替代測試發展的重要里程碑，隨著法規修訂，臺灣也必須陸續引進更多替代測試方法。

在化學品登記方面，歐盟自2008年起，要求每年化學品產量或進口量達規定標準的製造商或進口商，需向歐盟《化學品註冊、評估、許可與限制法案》（Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals, REACH）主管機關歐洲化學總署（European Chemicals Agency, ECHA）註冊，並依進口或製造生產噸數分級執

行相關毒理及生態毒理測試報告。REACH最新法規中規範，脊椎動物應作為最後的試驗動物方法，這樣的規範促使符合3Rs的原則與精神，因此於未來必須盡可能地考量使用非動物方法來滿足所需要的訊息要求（information requirement）以及危害分類（hazard classification），僅在無法以非動物方法收集到足夠可靠數據的情況下才能進行動物試驗。

臺灣環保署則在2014年12月發布《新化學物質及既有化學物質資料登錄辦法》，並於2019年修正發布此辦法，要求業者製造或輸入「新化學物質」或「既有化學物質」需先登錄，提交該物質的毒理與生態毒理資料，包含急毒性、皮膚刺激性/腐蝕性、眼睛刺激性、皮膚過敏性、基因毒性、基礎毒物動力學、重複劑量毒性、生殖/發育毒性以及致癌性試驗等。雖然規定毒理、生態毒理資訊應以經濟合作暨發展組織（Organization for Economic Cooperation and Development, OECD）或環保署環境檢驗所的測試規範為主，也開始推動獎勵措施，希望化學物質登錄時應「優先採用動物實驗替代方案」，但尚未正式入法。

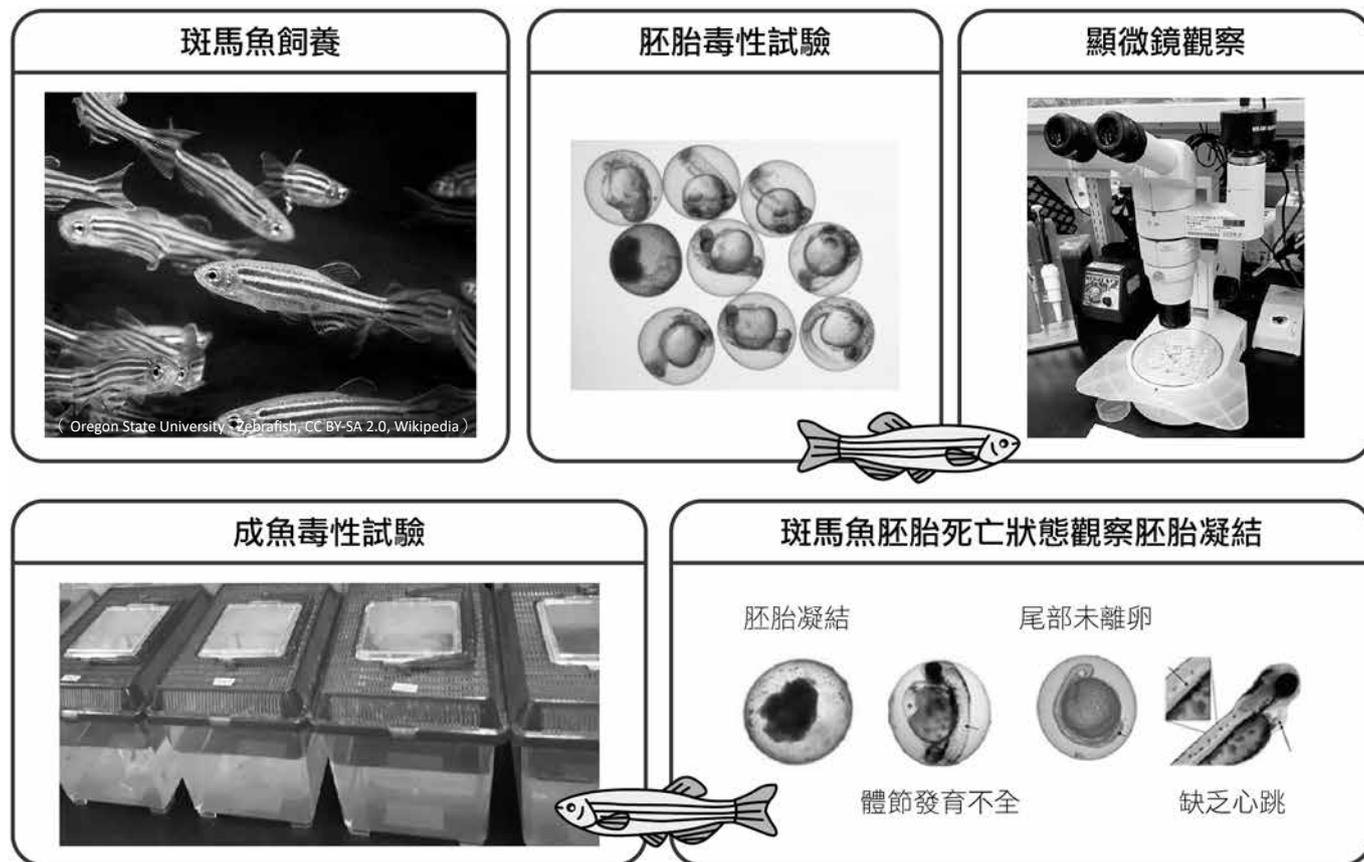
目前，全球已有超過十個國家成立活體動物實驗替代方案的「3R中心」或類似單位，國際間亦有多種不同新技術正在研發當中，例如化學試驗（in chemico）、細胞/組織體外試驗（in vitro）、離體試

驗（ex vivo）、電腦模擬預測（in silico）及器官晶片等，有些已被某些國家管理機構接受，有些也正積極開發中。

化學物質生態毒性動物替代測試

傳統生態毒理試驗包含魚類短/長期毒性試驗等。減少使用活體成魚實驗的方式之一，是以魚類胚胎毒性試驗替代成魚毒性試驗。OECD在2013年公告，斑馬魚的胚胎可作為魚類急性毒性試驗的替代測試（OECD TG 236）方法；利用這些體外授精魚卵進行生態毒性試驗被歸類為體外測試，原因是因為魚卵中的胚胎為發育狀態，其痛覺和知覺器官尚未發育完全，所以不會有承受痛苦的問題。和其他魚類比起來，斑馬魚的胚胎在實驗上具有以下優點：

1. 卵膜透明，可以很清楚地看到胚胎的發育狀況；
2. 魚卵不具黏滯性，可移動性佳，對於要搬移胚胎至特殊設計孔盤的實驗來說相當方便，只要用吸取管輕輕吸起胚胎即可移動位置；
3. 斑馬魚的可得性高，作為生物科技常用動物模型之一，因為具有高度科學研究價值，所以供應量穩定；
4. 照顧上容易上手，一條雌性斑



圖二：傳統魚類急毒性試驗和斑馬魚胚胎急毒性試驗示意圖，右下部分為斑馬魚胚胎之死亡判定標準，讀者可以試著判斷哪隻胚胎是存活的。

馬魚的產卵量大約為 100~200 顆，可為實驗設計提供大量的樣本數。

圖二是傳統魚類急毒性試驗和斑馬魚胚胎急毒性試驗示意圖。使用斑馬魚胚胎做實驗也是被動物保護團體所推薦的，一般而言，斑馬魚胚胎應用在物質毒性試驗研究上，有受精後五天內不被視為活體的共識，因此並無動物實驗可能帶來的不良觀感。科學家研究分析了斑馬魚胚胎和成魚毒性間的相關性，發現工業用和中性有機化學物質在斑馬魚胚胎和成魚毒性間的相關性是

最高的，也就是說，對於常用化學物質的生態毒性試驗，使用斑馬魚胚胎可以具有代表性。不過，2019 年波爾克（Anita Birke）等人發現，具麻醉性物質在魚類胚胎毒性推估成魚毒性之下的效果不佳，因此未來還需要針對此類型的物質做更深入的探討。

此外，單一的體外試驗並無法完全取代動物試驗的結果，通常至少需要兩種不同的體外測試結果，因此OECD公告應用於體外試驗的「整合型測試評估方法（Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA）」指導文件，提供化學品利用體外試驗而進

行的分類或危害分級。而ECHA也一直致力於促進非動物方法（non-animal approaches）的發展和使用，包括不牽涉新的體內測試方式的所有方法。

毒性試驗於化學工業的機會與挑戰

傳統毒理學以動物試驗為主，並以描述性方法呈現結果，然而隨科技和人道關懷的發展，21世紀的毒性試驗提倡的是終止體內動物試驗，並整合電腦演譯推估方法、系統生物學、高通量體外毒性測試等來做毒性機轉的探討和評估。憑藉

著生物技術、基因遺傳學、計算機科學與電腦軟體設計技術的進步，未來動物的體內實驗可望被取代，且能利用其它方法解釋複雜毒性反應的根本原因。

圖三為動物實驗、魚類毒性和預測毒理學之比較，為增進動物福祉、減少動物實驗，科學家們不斷努力尋找可行的替代方法，以及電腦模式日漸被人們重視。替代測試和預測毒理學將會是未來的研究趨勢。這些方法的廣泛運用提供對新化學品做大量篩選的機會，讓人們可以設計出更安全且具永續性的產品、填補已上市但毒性資訊不足的化學品資料、強化交互比對法

(read-across) 在物質及作用機轉分類上的科學證據，並藉此提供資訊讓科學家設計出優質化、危害最小的產品。

毒性替代測試策略需要一整套的測試方法來涵蓋不同的毒性機轉和重要的毒性終點，透過以機轉為基礎的體外高通量篩選，我們可以預測化學物質可能導致的活體疾病危害。一般在分層測試的策略中，經常會先採用人類細胞株先進行標準的體外細胞毒性測試，再以嚴謹的斑馬魚胚胎及活體測試做驗證，如此便能更透徹地瞭解化學物質干擾生物系統機轉的機制，在完整評估化學物質毒性上扮演重要角色。因

此，秉持呼應3Rs動物試驗原則，我們可以有策略地遵循分層毒性評估來預測毒性。第一層先利用定量結構－活性關係 (quantitative structure-activity relationship, QSAR) 與交互比對法等化學資訊學評估新產品並建立假說和推測可能的毒性機轉，先行剔除不適合的化學品；第二層可針對特定問題和需求，選擇適當的體外生物試驗以得知終點結果，希望找到毒性最少且永續性的化學品；接下來通常會進入到第三層，需要體內試驗或整合各類預測工具 (如電腦模擬、高通量篩選) 結果以獲得法規許可而上市應用。

毒理學實驗	動物實驗	哺乳類動物的應用，如小鼠餵食實驗和兔子眼睛實驗。
	替代方法	體外培養人體細胞或器官，以替代動物毒性試驗，可減少動物大量犧牲的數量。
生態毒理學實驗	魚類毒性	水生動物之魚類急慢性毒，飼養時間長，且毒性試驗亦需耗費大量的測試物質。
	替代方法	蒐集斑馬魚胚胎以替代成魚急毒性試驗，發育5天內的胚胎不算活體，且一次可大量產卵，減少犧牲的成魚。
21世紀毒理學	屬統計學的應用，其中，「定向結構－活性關係」是結合統計學和毒理學所創造出的新科學領域。	

圖三：動物實驗、魚類毒性和預測毒理學比較，以及目前公認可行的替代方法。

結語

以目前的科學進展，非動物方法仍無法完整預測較複雜動物的毒理測試項目，如毒物動力學、重複劑量毒性、生殖 / 發育毒性以及致癌性試驗等。不過，這些替代方法依然可提供有關化學物質對生物體或其部分影響的資訊，且這樣的訊息和概念可用於設定安全暴露值和排定化學品的危害優先順序，至少在原則上也可作為化學品管理系統組成的一部分。斑馬魚的胚胎除了可以作為魚類急性毒性試驗的替代測試 (OECD TG 236) 方法外，也逐漸在發育毒性替代試驗受重視；更重要的是，斑馬魚胚胎是介於細胞

株與活體動物測試間的橋樑，擁有足夠的生物複雜度和高通量篩選的優勢，勢必在未來的毒性替代試驗發展中取得一定地位。

真正能改變實驗動物現況最實際的方式，就是透過不斷的教育訓練以及價值觀念的推廣。因應重大的變革，從來沒有簡單的答案。臺灣在這一波動物實驗替代的風潮中應密切關注國際上該領域的科學發展，讓政府決策單位、科學界和相關利益團體瞭解如何根據不同的規定熟悉並使用這些新開發的方法。姑且不論臺灣已公告實施化妝品動物實驗禁令，5年的緩衝期稍縱即逝，2019年修正發布的《新化學物

質及既有化學物質資料登錄辦法》指定106種既有化學物質應於2~3年內完成標準登錄資料提交，其中有關毒及生態毒理資如何納入替代測試的精神來迎合國際趨勢已迫在眉睫。面對如此嚴峻的挑戰，我們準備好了嗎？

延伸閱讀

1. W.M.S. Russell and R.L. Burch, *The Principles of Humane Experimental Technique*, 1992.
2. OECD, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2*, 2013.
3. 〈107年度實驗動物人道管理年報〉·行政院農業委員會·2019年。



新世代西方墨點效能提升液

Western Blot Blocking & Enhancer Solution

1



**可立即應用在
Western blot實驗**

2



**能一次涵蓋繁瑣步驟
大幅節約實驗時間**

3



**可增強信號
並減少抗體用量**

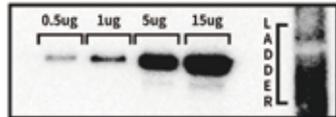
4



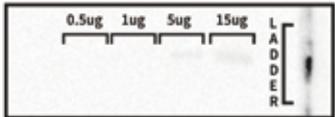
**不含蛋白質成份
可長期保存**

減少實驗步驟，節省一半時間且有不凡的訊號加強效果

**IE NEO
One-Step
Protocol
MAX 2.5 Hr
Strong signal**



**Traditional
Protocol
MIN 4.5 Hr
Weak signal**





東京未來式
Tokyo Future Style Taiwan, Inc.

現正提供免費樣品
歡迎聯絡詢問

介紹頁面
QR CODE



TEL:(02)2578-5958
FAX:(02)2578-9826
tw.tokyofuturestyle.com