



樂適-次氯酸抗菌液

<批號：2020.02.12>

皮膚致敏性試驗-人體細胞株活化(h-CLAT)法

報告書

試驗委託者： 徑成佳企業有限公司
檢驗單位： 台灣檢驗科技股份有限公司
超微量工業安全實驗室
報告書號碼： UG/2020/30165A-01

- 備註：**
- 1.檢驗報告僅就委託者之委託事項提供檢驗結果，不對產品合法性做判斷。
 - 2.對本報告書內容、格式及外觀之任何未經授權的變更、偽造及竄改行為皆屬違法，違法者將會被依法追訴。
 - 3.本報告書的測試結果僅對試驗的試驗物質負責。
 - 4.報告書分開使用無效。
 - 5.本測試報告之所有檢驗內容，均依委託事項執行檢驗，如有不實，願意承擔完全責任。

目錄

試驗進度表	3
地址資訊	3
簽署頁	4
摘要	5
實驗設計	5
數據分析	7
試驗結果	8
結論	9
參考文獻	9
試驗物質照片	10

試驗進度表

樂適-次氯酸抗菌液

<批號：2020.02.12>

皮膚致敏性試驗-人體細胞株活化(h-CLAT)法

報告編號：	UG/2020/30165A-01
收樣日：	2020.03.05
實驗起始日：	2020.03.16
實驗完成日：	2020.04.13
報告完成日：	視試驗主持人簽名日期而定
執行試驗人員姓名：	賴郁婷

地址資訊

試驗機構

名稱：台灣檢驗科技股份有限公司，超微量工業安全實驗室
地址：24890 新北市五股區新北產業園區五權七路 38 號，台灣

試驗主持人

名稱：劉錦誠
地址：24890 新北市五股區新北產業園區五權七路 38 號，台灣

試驗委託者

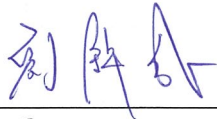
名稱：徑成佳企業有限公司
地址：台南市龍崎區崎頂里 200 號
電話：04-24820716

簽署頁

樂適-次氯酸抗菌液

<批號：2020.02.12>

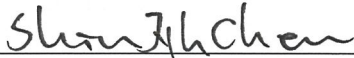
皮膚致敏性試驗-人體細胞株活化(h-CLAT)法



報告簽署人 劉錦誠
台灣檢驗科技股份有限公司

2020.05.13

日期



實驗室負責人 陳新智
台灣檢驗科技股份有限公司

2020.05.13

日期

*報告簽署人為此次試驗之試驗主持人

摘要

本研究執行皮膚致敏性試驗-人體細胞株活化(h-CLAT)法的目的，是為了評估由徑成佳企業有限公司所提供“樂適-次氯酸抗菌液”造成皮膚致敏性之可能性。試驗中評估試驗物質對人體細胞株造成的反應皆依循 OECD 442E 規範所述執行。CD86 和 CD54 細胞表面標記的表現程度，與其他資訊合併考量後，利用整合測試與評估方法(IATA)，可區分試驗物質為皮膚致敏物（即 UN GHS 第 1 類）或非致敏物。在第一次測試中，THP-1 細胞與試驗物質 1000 µg/mL 劑量反應後，細胞存活率為 88.67%，其 CD86 表現量為 91.39%，CD54 為 87.51%；第二次測試中，細胞存活率為 88.43%，其 CD86 表現量為 73.57%，CD54 為 101.74%。依據試驗結果顯示，在此試驗體系下，試驗物質“樂適-次氯酸抗菌液”於此試驗劑量的範圍內顯示為陰性結果。

實驗設計

1. 試驗體系

- A. 細胞株：Human monocytic leukaemia cell line, THP-1 cells. The original source was supplied by Food Industry Research and Development Institute，細胞株編號：BCRC 60430 (ATCC TIB-202TM).
繼代代數：10 代以內。
- B. 組織型態：圓形
- C. 培養性質：懸浮
- D. 培養條件：在含有 5±1% 二氧化碳的 37±1°C 濕潤環境下，於含 10% 胎牛血清，4.5 g / L 葡萄糖，10 mM HEPES，1.0 mM 丙酮酸鈉和 0.05 mM 2-mercaptoethanol 的 RPMI-1640 培養液中培養。

2. 試劑

	試劑名稱	廠牌	貨號	序號
A.	100X L-Glutamine solution	HyClone	SH30034.01	AE29355338
B.	100X Penicillin-Streptomycin solution	HyClone	SV30010	J190006
C.	10X Phosphate buffer solution (PBS)	BIOMAN SCIENTIFIC CO.,LTD	PBS105000	19112705
D.	100X Sodium pyruvate solution	HyClone	SH30239.01	AE29421237
E.	1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	SIGMA	237329	BCBS4201V
F.	2-Mercaptoethanol for molecular biology	SIGMA	M3148	BCBV8182
G.	BSA(Albumin from bovine serum)	UniRegion Bio-Tech	BSA001	SLBQ6644V

H.	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	SIGMA	34943	I1270
I.	Fetal bovine serum	HyClone	SH30084.03	GC13475273
J.	FITC Mouse anti-human CD86	BD	555657	8115611
K.	Globulins Cohn fraction II, III human lyophilized powder	SIGMA	G2388	SLBN9874V
L.	D-(+)-Glucose	SIGMA	V900392	WXBC7591V
M.	HEPES,Free Acid	HyClone	SH30237.01	AE29396369
N.	Isotype Reagent Mouse IgG1/FITC	Dako	X092701	20058363
O.	Lactic Acid	SIGMA	L6661	MKBZ2817V
P.	Monoclonal Mouse Anti-Human CD54	Dako	F7143	20063145
Q.	Propidium iodide	SIGMA	P4170	MKBX7912V
R.	RPMI 1640 medium	Hyclone	SH30027.01	AE29421191
S.	0.25% Trypsin solution	HyClone	SH30042.01	J190021

3. 儀器

	儀器	廠牌	型號	儀器號碼:
A.	Balance	OHAUS	PA214C	BAL-17
B.	Biological safety cabinet	NuAire	NU-543-600	BSC-07
C.	CO ₂ Incubator	ASTEC	SCA-165DS	INB-01
D.	Microscope	OLYMPUS	CKX41	MIS-02
E.	Centrifuge	EPPENDORF	5804R	CEN-07
F.	Water bath	KANSIN	WB212-B2	WAB-02
G.	CytoFLEX™ Flow Cytometer	Beckman	CytoFLEX	流式細胞儀-01

4. 試驗物質及對照組製備

A. 試驗物質

試驗物質的製備以無菌操作技術並在無菌環境下完成。試驗物質為液體，直接與細胞培養液稀釋後，與試驗體系反應。

B. 對照組

- (1) 陽性對照組：8 µg/mL 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene.
- (2) 陰性對照組：2 mg/mL Lactic Acid.
- (3) 空白對照組：細胞培養液 (含 10% 胎牛血清，4.5 g / L glucose，10 mM HEPES，1.0 mM sodium pyruvate 和 0.05 mM 2-mercaptoethanol 的 RPMI-1640 培養液)

5. 皮膚致敏性試驗-人體細胞株活化(h-CLAT)法

- (1) THP-1 細胞培養於 5±1% CO₂ 的 37±1°C 環境下，以含 10%胎牛血清，0.05 mM 2-mercaptoethanol，100 units/mL 青黴素和 100 µg/ mL 鏈黴素的 RPMI-1640 培養液培養。
- (2) 以 0.2×10⁶ cells/mL 的密度接種 THP-1 細胞於培養皿中預培養 48 小時。
- (3) 測試當日，收集培養皿中的細胞，並以培養液調整細胞濃度為 2×10⁶ cells/mL。

- (4) 將 500 μ L 細胞懸浮液分注於 24 孔盤 (1 \times 10⁶ 細胞/孔) 中。
- (5) 再以 1:1 (v/v) 的比例, 添加 500 μ L 試驗物質溶液或對照組與細胞混合。
- (6) 將 24 孔盤放置在 37 \pm 1 $^{\circ}$ C, 5 \pm 1% CO₂ 條件下, 反應 24 \pm 0.5 小時。
- (7) 24 \pm 0.5 小時後, 將細胞轉移至試管中, 離心收集細胞, 進行 PI 與 CD86、CD54 表面標記染色。
- (8) 以 600 μ L blocking solution(含有 0.01%(w/v) globulin)阻閉細胞非特異性表面, 並在 4 $^{\circ}$ C 下反應 15 分鐘。
- (9) 之後將細胞分成三等份, 每份 180 μ L。
- (10) 離心後, 以 50 μ L 連結 FITC 的 CD86、CD54 表面標記抗體 (FITC-labelled anti-CD86、anti-CD54 antibody) 或同種小鼠 IgG1(isotype) 抗體, 於 4 $^{\circ}$ C 染色反應 30 分鐘。
- (11) 用 200 μ L 緩衝液洗滌 3 次後, 將細胞重新懸浮於 400 μ L 含 20 μ L PI 溶液 (最終 PI 濃度為 0.625 μ g/mL)。
- (12) 使用流式細胞儀, 分析 CD86 和 CD54 的表現程度與細胞存活率。
- (13) 至少需分析 10,000 個活細胞 (PI 陰性)。使用以下公式計算細胞活力:

$$\text{Cell Viability (\%)} = \frac{\text{Number of living cells}}{\text{Total Number of acquired cells}} \times 100(\%)$$

- (14) 根據幾何平均螢光強度 (MFI), 以下列公式計算與陽性對照或試驗物質反應後的細胞, 其 CD86 和 CD54 的相對螢光強度 (RFI):

$$\text{RFI (\%)} = \frac{\text{MFI of treated cells} - \text{MFI of treated isotype control cells}}{\text{MFI of vehicle ctrl cells} - \text{MFI of vehicle isotype ctrl cells}} \times 100(\%)$$

6. 品質要求

- (1) 在每次試驗中皆同時進行陽性對照組及陰性對照組。
- (2) 空白對照組的細胞存活率應高於 90%
- (3) 空白對照組: CD86 和 CD54 的 RFI 值, 皆不應超過陽性標準 (CD86 RFI \geq 150% 和 CD54 RFI \geq 200%)。
- (4) 對於培養液和空白對照組, CD86 和 CD54 與 isotype 的 MFI 比率均應 > 105%。
- (5) 在陽性對照組中, CD86 和 CD54 的 RFI 值均應符合陽性標準 (CD86 RFI \geq 150%, CD54 RFI \geq 200%), 細胞存活率應大於 50%。
- (6) 試驗組的細胞存活率應 > 50%。

數據分析

依據預測模型, 如果滿足以下條件中的至少一個, 則將人體細胞株活化試驗結果視為陽性, 否則為陰性。

- CD86 之 RFI 等於或大於 150% (細胞存活率 \geq 50%);
- CD54 之 RFI 等於或大於 200% (細胞存活率 \geq 50%)。

試驗結果

1. 細胞存活率 (%)

	組別	實驗 1	實驗 2	實驗 3	平均值	標準差
測試 1	陰性對照組	92.13	93.10	91.85	92.36	0.54
	陽性對照組	57.00	55.17	53.49	55.22	1.43
	UG/2020/30165 1000 µg/mL	93.00	91.29	81.73	88.67	4.96
測試 2	陰性對照組	94.94	94.46	93.25	94.22	0.71
	陽性對照組	60.17	59.91	58.89	59.66	0.55
	UG/2020/30165 1000 µg/mL	89.86	87.65	87.77	88.43	1.01

2. CD86 的相對螢光強度(RFI, %)

	組別	實驗 1	實驗 2	實驗 3	平均值	標準差
測試 1	陰性對照組	73.73	58.29	72.40	68.14	6.98
	陽性對照組	465.76	462.69	492.63	473.69	43.45
	UG/2020/30165 1000 µg/mL	84.33	90.36	99.47	91.39	6.22
測試 2	陰性對照組	74.30	63.38	88.57	75.42	10.31
	陽性對照組	1010.96	1287.70	1044.44	1114.37	123.32
	UG/2020/30165 1000 µg/mL	76.41	97.41	88.98	87.51	8.53

3. CD54 的相對螢光強度(RFI, %)

	組別	實驗 1	實驗 2	實驗 3	平均值	標準差
測試 1	陰性對照組	188.89	175.86	87.22	150.66	45.17
	陽性對照組	593.33	387.95	577.78	519.69	93.37
	UG/2020/30165 1000 µg/mL	60.00	75.00	85.71	73.57	10.55
測試 2	陰性對照組	110.00	68.33	57.14	78.49	22.74
	陽性對照組	2783.33	1834.62	1575.00	2064.32	519.35
	UG/2020/30165 1000 µg/mL	122.22	96.90	86.11	101.74	15.14

結論

在第一次測試中，THP-1 細胞與試驗物質 1000 µg/mL 劑量反應後，其 CD86 表現量為 91.39%，CD54 為 73.57%。在第二次測試中，CD86 為 87.51%，CD54 為 101.74%。依據試驗結果顯示，在此試驗體系下，試驗物質“樂適-次氯酸抗菌液”於此試驗劑量的範圍內顯示為陰性結果。

參考文獻

1. *In Vitro* Skin Sensitisation: human Cell Line Activation Test (h-CLAT). OECD guideline for the testing of chemicals. TG 442E (2016.06).
2. SGS SOP: EOMP-USL-0003 Operating procedures and analysis of the Balance. Version 1.3
3. SGS SOP: EOMP-USL-0027 Operating procedures of the biosafety cabinet and laminar flow, UV-lamp verification and aerobic plate counts. Version 2.5
4. SGS SOP: EOMP-USL-0029 Operating Procedures of Microplate Spectrophotometer-BioTek EON. Version 1.1
5. SGS SOP: EOMP-USL-0035 CO₂ incubator Operating procedures. Version 1.0
6. SGS SOP: EOMP-USL-0036 Operating Procedures of MilliQ. Version 1.0
7. SGS SOP: EOMP-USL-0037 Manual of freezer-refrigerators. Version 1.0
8. SGS SOP: EOMP-USL-0038 Microorganism incubator operating Procedures Version 1.0

試驗物質照片

UG/2020/30165



UG/2020/30165

