



樂適-次氯酸抗菌液

皮膚致敏性試驗-ARE-Nrf2 冷光酶(KeratinoSens™ assay)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-02

- 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	6
數據分析	8
試驗結果	8
結論	8
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

皮膚致敏性試驗-ARE-Nrf2 冷光酶(KeratinoSens™ assay)法

報告編號：	UG/2020/30165A-02
收樣日：	2020.03.05
實驗起始日：	2020.03.24
實驗完成日：	2020.04.22
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：	譚雅萍

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

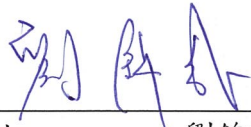
名稱：劉錦誠
地址：24890 新北市五股區新北產業園區五權七路 38 號，台灣

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

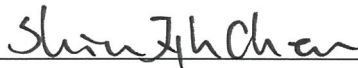
樂適-次氯酸抗菌液 皮膚致敏性試驗-ARE-Nrf2 冷光酶(KeratinoSens™ assay)法



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-ARE-Nrf2 冷光酶(KeratinoSens™ assay)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”產品造成皮膚致敏性之可能性。試驗中評估試驗物質對 KeratinoSens™細胞（用 ARE-Nrf2 冷光酶穩定轉染的 HaCaT 人角質形成細胞）造成的反應皆依循 OECD 442D 規範所述執行。KeratinoSens™細胞冷光酶活性的反應倍數，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。本測試中，試驗物質 400 µg/mL 劑量，對 KeratinoSens™細胞為>70%細胞存活率，此劑量對冷光酶活性的平均反應倍數為 1.16 倍。依據試驗結果顯示，在此試驗體系下，試驗物質“FNG 寶特布 (含印刷)”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 KeratinoSens™ cell line (HaCaT human keratinocytes stably transfected with ARE-Nrf2 luciferase)，原始來源由 Givaudan Schweiz AG 提供。

細胞株編號：20171116-1D-28-05；繼代代數：14 代以內。

B. 組織型態：上皮狀

C. 培養性質：黏著依附

D. 培養條件：在含有 5±1% 二氧化碳的 37±1°C 環境，於含 10% 胎牛血清，500µg/ml 遺傳黴素的 DMEM 培養液中培養。

2. 試劑

	Reagent	Brand	Cat No.:	Lot No.:
A.	10X Phosphate buffer solution (PBS)	BIOMAN	PBS105000	19112705
B.	DMEM+GlutaMAX	Gibco	10567-014	21220457
C.	Fetal bovine serum	HyClone	SH30071.03	GC13475273
D.	Geneticin	Gibco	10131-027	2067028
E.	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	J.T.Baker	4095-04	0000176105
F.	trans-Cinnamaldehyde	Sigma	239968	STBG0250V
G.	0.25% Trypsin solution	HyClone	SH30042.01	J190010

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.	Microplate Spectrophotometer	BioTek™	Eon	MPS-02
		Molecular Devices	SpectraMaxR iD3	MPS-03

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：64 μ M Cinnamaldehyde .
- (2) 陰性對照組：含 10% 胎牛血清的 DMEM 培養液

5. 皮膚致敏性試驗-ARE-Nrf2 冷光酶(KeratinoSens™ assay)法

- (1) 將 KeratinoSens™ 細胞分配到 96 孔板 (10,000 細胞/孔) 中。取三重複執行冷光酶活性測試，另取三重複執行細胞存活率測試。
- (2) 24 小時後，除去培養液，每孔加入 200 μ L 的試驗物質溶液或對照組。
- (3) 將反應後的孔板放置在 37 \pm 1°C，5 \pm 1% CO₂ 條件下，培養 48 小時。
- (4) 冷光酶活性測試：將曝露 48 小時後的細胞用磷酸鹽緩衝液清洗，並在室溫下，加入細胞裂解液到每個孔中反應 20 分鐘。
- (5) 將反應後的細胞孔板置於冷光儀中讀取數值，其程序為：(i) 向每個孔中添加 50 μ L 冷光素，(ii) 等待 1 秒鐘，(iii) 整合冷光酶活性 2 秒。
- (6) 冷光酶活性反應通過下式計算

$$\text{Fold induction} = \frac{L_{\text{sample}} - L_{\text{blank}}}{L_{\text{negative}} - L_{\text{blank}}}$$

L_{sample} 是測試組中的冷光讀值

L_{blank} 是空白對照組中無細胞且無反應的冷光讀值

L_{negative} 是陰性對照組中的平均冷光讀值

- (7) 細胞存活率測試：曝露 48 小時後，將培養液替換為 MTT 溶液反應 4 小時。
- (8) 除去 MTT 溶液，並於每個孔中添加 10% SDS 溶液來裂解細胞。
- (9) 震蕩後，用分光光度計測量 OD₆₀₀ 之吸光度。
- (10) 細胞存活率通過下式計算

$$\text{Viability}(\%) = \frac{V_{\text{sample}} - V_{\text{blank}}}{V_{\text{negative}} - V_{\text{blank}}} \times 100(\%)$$

V_{sample} 是測試組中 MTT 吸光度的讀值

V_{blank} 是空白對照組中無細胞且無反應的 MTT 吸光度讀值

V_{negative} 是陰性對照組中的平均吸光度讀值

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) 用陽性對照得出的螢光素酶活性感應值應高於 1.5。
- (3) 陰性對照的冷光值讀數之平均變異係數應低於 20%。

數據分析

如果試驗物質溶液的螢光素酶感應倍數高於 (>) 1.5 並且細胞存活率高於 (>) 70%，則 KeratinoSens™ 預測評定為陽性結果；反之 KeratinoSens™ 預測則被評定陰性結果。

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
陰性對照組	101.595	99.372	95.022	98.66	3.34
陽性對照組	119.865	123.731	135.621	126.41	8.21
UG/2019/30165, 400 µg/mL	110.295	112.421	127.695	116.80	9.49
UG/2019/30165, 200 µg/mL	107.395	116.191	105.558	109.71	5.68
UG/2019/30165, 100 µg/mL	109.812	113.968	118.221	114.00	4.21

2. 冷光酶活性之反應倍數

組別	實驗 1	實驗 2	實驗 3	平均值	標準差
陰性對照組	0.96	1.13	1.06	1.05	0.09
陽性對照組	2.16	1.89	2.17	2.08	0.16
UG/2019/30165, 400 µg/mL	1.55	0.99	0.95	1.16	0.33
UG/2019/30165, 200 µg/mL	1.09	0.93	0.87	0.96	0.11
UG/2019/30165, 100 µg/mL	0.79	0.92	0.95	0.89	0.09

結論

本測試中，試驗物質 400 µg/mL 劑量，對 KeratinoSens™ 細胞產生 >70% 細胞存活率，此劑量對冷光酶活性的平均反應倍數為 1.16 倍。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

