



团 体 标 准

T/CSBM 0068—2026

基于 ARE-Nrf2 荧光素酶的皮肤致敏 单一化合物体外细胞试验方法

Test method for skin sensitization of single substances using an in
vitro cell-based ARE-Nrf2 luciferase assay

2026-05-25 发布

2026-11-01 实施

中国生物材料学会
中国标准出版社

发 布
出 版

目次

前言 III

引言 IV

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 3

5 原则 4

6 基于 ARE-Nrf2 荧光素酶的皮肤致敏体外细胞试验方法 4

7 类似或修改方法的确立 6

附录 A(资料性) 参考化学品 9

附录 B(资料性) 荧光测量的质量控制 10

参考文献 11

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由中国生物材料学会提出。

本文件由中国生物材料学会标准工作委员会归口。

本文件起草单位：华南理工大学、新型生物材料与高端医疗器械广东研究院、广东省医疗器械质量监督检验所、广州科睿生物医药技术有限公司、沈阳沈化院测试技术有限公司、浙江省食品药品检验研究院。

本文件主要起草人：黄黎珍、郝丽静、胡相华、张炫、桑晶、万延斌。

引言

皮肤致敏性评价是化学品及相关产品原材料安全性评估的重要组成部分,在生物医学材料及医疗器械等领域均具有重要意义。长期以来,动物实验是主流评价方式,但其在种属差异和 3R 原则背景下的局限性愈发突出。鉴于此,开发和应用基于人体细胞的皮肤致敏体外评价方法已成为国内外研究的焦点和发展趋势。随着转化毒理学和替代毒性测试技术的进步,毒性测试方法体系不断拓宽,引入了众多新的毒理学终点。然而,在实际应用中,体外毒理学测试方法常面临类似或优化方法的开发与验证难题。

本方法属于皮肤致敏不良结局路径(Adverse Outcome Pathway, AOP)中关键事件(角质形成细胞活化)的检测方法之一,主要用于体外筛查和机制相关评价。由于该方法仅反映皮肤致敏过程中的特定关键生物学事件,其结果应作为综合评价的一部分使用。在实际应用中,应结合其他相关证据进行综合分析,在必要时可结合体内试验数据(如 LLNA)进行风险评估。根据 OECD 整合测试与评价策略(Integrated Approaches to Testing and Assessment, IATA)及相关定义方法如“三选二”(OECD TG 497),该类方法通过整合多来源证据进行综合判断,主要基于单一化学物质建立,因此皮肤致敏性评价不宜依赖单一试验方法。

与传统动物实验相比,本方法具有灵敏度高、实验周期短、操作流程标准化程度高、样品用量少及试验成本较低等优势,适用于在常规细胞培养与荧光素酶检测条件下开展皮肤致敏性筛查与方法验证。

需要说明的是,本方法主要适用于成分明确的单一化合物的皮肤致敏性评价。对于以浸提液作为受试样品的评价情形,其适用性尚需进一步研究验证。

本文件与 T/SHSOT 004.3—2024《体外毒性试验标准方法的优化 第 3 部分:皮肤致敏性测试的体外 ARE-Nrf2 荧光素酶试验方法》在技术原理上具有一致性,均基于 ARE-Nrf2 荧光素酶报告基因技术。本文件在 T/SHSOT 004.3—2024 框架基础上,进一步明确了适用范围(成分明确的单一化合物),纳入了具有国内自主知识产权的 EndoSens 模型,并补充了方法在皮肤致敏性评价中的应用边界和定位。两个文件可配套使用,互为补充。

本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,可能涉及与 EndoSens 细胞相关的专利的使用(专利号:CN108103098B;PCT:US12173283B2)。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺,他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下,就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得:

专利持有人:华南理工大学

联系人:黄黎珍

地址:广东省广州市番禺区广州大学城华南理工大学 B6-216 室

邮政编码:510006

电话:020-81182331

请注意除上述专利外,本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

基于 ARE-Nrf2 荧光素酶的皮肤致敏 单一化合物体外细胞试验方法

1 范围

本文件提供了基于 ARE-Nrf2 荧光素酶的皮肤致敏体外细胞试验的基本原则、方法的开发和优化、方法确立的方法。

本文件适用于基于 ARE-Nrf2 荧光素酶的单一化合物皮肤致敏体外细胞试验标准方法的类似或优化方法的开发、验证和实施。

本文件不适用于成分未明确的混合物、UVCB 物质、浸提液等复杂样品。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

OECD TG 442D: 体外皮肤致敏试验(In Vitro Skin Sensitisation)

OECD Series on Testing and Assessment No.34: 危害评估用新方法或更新方法的验证及国际认可指导文件(Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment)

3 术语和定义

OECD Series on Testing and Assessment No.34 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

可接受标准 acceptance criteria

一组明确定义参数,用于评估研究结果是否可被接受,并描述体外方法的特定特征。

注:可接受标准需作为体外方法的重要组成部分进行详细规定,涵盖测试系统(例如,细胞传代次数、生长曲线)、其性能(例如,阳性对照、阴性对照、溶剂对照)的定义,以及分析终点的确定值(如线性、准确性、范围)和数据分析方法(如线性拟合)。

3.2

一致性 concordance

衡量测试方法性能的指标,用于评估该方法产生分类一致结果的能力。

注:在某些语境下,一致性与准确性互换使用。

3.3

再现性 reproducibility

采用相同测试方案对相同物质进行测试所获得结果之间的一致性。

3.4

准确性 accuracy

检测值与标准值或已知真值之间的接近程度。

3.5

可靠性 reliability

在规定条件下,某程序在实验室内、实验室之间以及随时间推移,能够重复执行并持续获得可接受结果的能力。

3.6

灵敏度 sensitivity

体外方法性能的衡量指标之一,表示所有被评估的阳性测试物在特定毒理学终点被正确识别为阳性的比例。

3.7

特异性 specificity

体外方法性能的衡量指标之一,表示所有被评估的阴性测试物在特定毒理学终点被正确识别为阴性的比例。

3.8

相关性 relevance

某程序对于特定目的而言,其意义和实用性。

3.9

细胞毒性 cytotoxicity

对机体所有细胞共有的结构和功能产生的毒性作用。

注:例如对 DNA、染色体、线粒体、细胞骨架和各种膜的影响。也称为一般细胞毒性或基础细胞毒性。

3.10

阳性对照 positive control

在测试系统中,使用已知能引起预期反应的物质进行处理的单独部分,用于证明测试系统在实际测试条件下能够产生特异性响应。

3.11

阴性对照 negative control

在测试系统中,使用已知不会引起预期反应的物质或条件进行处理的单独部分,用于评估试验过程中是否存在非特异性反应、背景信号或假阳性结果。

3.12

性能标准 performance standards; PS

针对类似或改进体外方法设定的具体参数要求,旨在证明其对于特定目的具有足够的可靠性和相关性,从而符合体外方法验证的原则。

3.13

变异系数 coefficient of variation; CV

衡量一组复制数据变异程度的统计量,通过将标准差除以平均值计算得出。

注:通常以百分比表示(即结果乘以 100%)。

3.14

1.5 倍插值浓度 interpolated concentration resulting in a 1.5 fold luciferase induction; EC1.5

引起荧光素酶基因诱导表达达到 1.5 倍时的受试物浓度。

3.15

细胞活性 cell viability

测量细胞群整体生理状态和活性的参数。

注:细胞活性的评估方法和终点多样,例如通过检测细胞线粒体脱氢酶还原活性(如 MTT 法)来反映细胞的代谢活性,其结果通常与细胞总数量相关。

3.16

运行 run

在同一次试验设置下测试一个或多个化学品,并且阴性和阳性对照同时进行的一次完整试验过程。

[来源:OECD TG 442D,有修改]

3.17

测试 test

针对单一测试化学品在一次运行内完成规定的浓度系列处理,并获得荧光素酶活性和细胞活性等可用于判定的数据集合的过程。

[来源:OECD TG 442D,有修改]

3.18

合格的运行 qualified run

一次运行符合方法的阳性对照和阴性对照的可接受标准,符合相应的 SOP 设定的要求;否则被视为不合格的运行。

3.19

合格的测试 qualified test

在一个合格的运行内,一次测试符合测试规定的可接受标准,符合相应的 SOP 设定的要求;否则被视为不合格的测试。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ARE:抗氧化反应元件(Antioxidant Response Element)

BLR:实验室间的再现性(Between Laboratory Reproducibility)

DMSO:二甲基亚砷(Dimethyl Sulfoxide)

FBS:胎牛血清(Fetal Bovine Serum)

Imax:与溶剂对照相比荧光素酶活性的最大诱导倍数(Maximal Induction)

LLNA:小鼠局部淋巴结试验(Local Lymph Node Assay)

MTT:3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]

Nrf2:参与抗氧化反应通路的转录因子[Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2]

OECD:世界经济合作和发展组织(The Organisation for Economic Co-operation and Development)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

qPCR:定量聚合酶链式反应(Quantitative Polymerase Chain Reaction)

SOP:标准操作规程(Standard Operating Procedures)

UNGHS:联合国全球化学品分类标识协调系统(United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)

UVCB:可变组分物质、复杂反应产物等无唯一、不能确定分子结构的化学物质(substances of Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials)

VRM:经验证的参考方法(the Validated Reference Method)

WLR:实验室内重现性(Within-laboratory Reproducibility)

5 原则

5.1 一致性原则

经验证的参考方法由基本结构、功能和程序构成。类似或改进的方法在结构与功能上与之保持一致。核查体外方法的这三要素,可明确其特有性质、程序关键细节及质量控制措施。体外方法主要用于定性或定量预测生物学反应,涵盖人类或环境危害效应及程度,其执行基础为一致性,即确保随时间推移和不同实验室间的结果具有一致性。

5.2 方法依据

基于 ARE-Nrf2 荧光素酶的皮肤致敏体外细胞试验方法由 OECD TG 442D 改进。对于类似或改进的方法,若存在特定参数或试验步骤差异,需提供相应的值或操作步骤修改说明。

5.3 可追溯性原则

制定可接受标准需基于方法所有关键组件和内容的历史数据,可从验证研究或相关文献中补充,且历史数据需来源于已验证的方法。

5.4 性能一致性评价

新方法应用前,需用参考化学品评估性能,确定可靠性和预测能力。这些化学品取自皮肤致敏体内动物实验的参考致敏物和非致敏物,以确保改进方法依 UNGHS 制度正确区分致敏性与非致敏性化学品。类似的或改进的测试方法,与验证参考方法相比,需具备相同或更优的再现性、敏感性、特异性和准确性。

6 基于 ARE-Nrf2 荧光素酶的皮肤致敏体外细胞试验方法

6.1 基本要求

6.1.1 细胞要求

基于 ARE-Nrf2 荧光素酶的皮肤致敏体外细胞试验应采用与皮肤致敏过程相关的转基因人类细胞系(如角质形成细胞、树突状细胞等),并确保荧光素酶报告基因稳定插入。克隆选择基于性能,如荧光素酶诱导光输出最佳信噪比,以及细胞用弱致敏剂处理时荧光素酶诱导最高动态范围。

标准参考细胞系包括 EndoSens、LuSens 及 KeratinoSens。

6.1.2 基因要求

荧光素酶报告基因应在人 AKR1C2(人源重组蛋白)基因的 ARE 元件或替代 ARE 元件的控制下,被皮肤致敏剂上调。若使用含替代 ARE 元件的细胞系,应证明所选 ARE 元件对 Nrf2 的特定依赖性 & 报告基因活性对 Nrf2 的依赖性。可通过在报告细胞系中暂时或永久灭活 Nrf2 活性,验证致敏剂诱导的荧光素酶活性因 Nrf2 表达减少或丢失而降低。

6.1.3 试验要求

应确定最佳细胞接种数量以及培养基组成(如 DMSO、FBS),以确保皮肤致敏剂(包括弱致敏剂)获得显著的荧光素酶诱导。还应评估受试物的细胞毒性。

6.1.4 稳定细胞系的判定要求

用于本试验的报告基因细胞系应为稳定表达荧光素酶的细胞系,其构建成功应满足以下要求:

- 报告基因应稳定整合于细胞基因组中,并受 ARE 调控(可通过 PCR/qPCR 等方法验证);
- 在非细胞毒性条件下(即细胞活力 $\geq 70\%$),阳性对照应能够诱导荧光素酶活性达到规定阈值(≥ 1.5 倍),且呈剂量依赖关系;
- 在独立重复试验中应获得一致结果(如至少 2 次独立试验结论一致);
- 细胞系在连续传代过程中应保持报告基因表达稳定(如多代传代后响应水平无显著变化)。

6.2 试验步骤

6.2.1 细胞的准备

测试所用细胞应处于 80%~90% 融合状态,且避免生长至完全融合。于测试前 1 d 收集细胞,并以 1×10^4 个细胞/孔的密度接种至 96 孔板。接种时应防止细胞沉降,以保证细胞在孔内均匀分布。

6.2.2 受试物和对照的制备

受试物 and 对照品应在测试当天溶解于 DMSO 中,配制成所需质量浓度。对于未明确相对分子质量的测试物质,宜配制成 40 mg/mL 的储备液,采用合适溶剂(DMSO、无菌水或培养基)进行连续稀释,制得 12 个测试浓度。

6.2.3 细胞毒性测试

细胞毒性测试采用 MTT 法,其作为检测终点,数据与结果的准确性受多种因素影响,应避免比色、染料等自身因素以及颜色、还原剂效应等测试物质因素的干扰。在 48 h 暴露时间后,更换培养基为含 0.5 mg/mL MTT 的新鲜培养基,在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下孵育 2 h。移除 MTT 培养基后,加入适当溶出剂[如 10% (质量浓度)十二烷基硫酸钠和 0.4% (体积分数)醋酸 DMSO 溶液],振荡并静置足够时间后,测量吸光度以计算细胞活力。

6.2.4 荧光素酶活性试验

细胞在 96 孔板中培养 24 h 后,移除培养基,更换为新鲜培养基,并加入 50 μL 受试物/对照品。受试物/对照品暴露 48 h 后,用磷酸盐缓冲盐水清洗细胞,向每孔加入用于荧光读数的裂解缓冲液,室温下保持 20 min。将含细胞裂解液的板置于光度计中读取,步骤如下:

- 向每孔加入 50 μL 荧光素酶底物;
- 等待 1 s;
- 整合荧光素酶活性 2 s;若使用其他设置,应根据所用光度计进行调整。

6.3 性能标准

6.3.1 重复测试

对于每种测试化学品和阳性对照物质,应进行一次测试以得出预测(阳性或阴性),测试应包括至少两次独立重复,每次重复包含三个重复孔(即 $n=6$)。若两次独立重复的结果不一致,则应进行第三次重复。独立重复测试应分批次进行,每次使用新鲜的测试化学品原液和独立采集的细胞(细胞可以来自同一代)。每块板至少设置一个空白孔(无细胞且无处理),用于评估基准值。

6.3.2 可接受标准

进行基于 ARE-Nrf2 荧光素酶的皮肤致敏体外细胞试验时,应满足以下验收标准。荧光测量的质量控制见附录 B。如果不满足下列条件中的任何一项,则应丢弃数据并重新测试。

- 阳性对照肉桂醛至少在一个测试浓度(在 $4\ \mu\text{mol}$ ~ $64\ \mu\text{mol}$ 范围内)获得的荧光素酶活性诱导应在 >1.5 的阈值中具有统计学意义(例如使用 t 检验)。
- 阳性对照的 EC1.5 应在定期更新的两个检测的历史平均值的标准差范围内(例如,在基于验证数据集的 $7\ \mu\text{mol}$ ~ $30\ \mu\text{mol}$ 之间)。此外,在 $64\ \mu\text{mol}$ 时,肉桂醛的平均诱导倍数应在 2~8 之间。如果不满足后一个标准,应仔细检查肉桂醛的剂量反应,只有当阳性对照在增加浓度时有增加荧光素酶活性诱导的明显剂量反应时,才可接受试验。
- 每次重复时,溶剂/载体对照(即 DMSO)的发光读数的平均变异系数应低于 20%。如果可变性较高,则应丢弃结果。

6.4 结果判定与预测模型

6.4.1 结果判定

对于每次荧光素酶试验预测运行,如果测试化学品在测试中连续满足下列四个条件中的任意两个条件,或在重复三次测试中获得两次相同结果,则预测结果为阳性;否则预测结果为阴性:

- I_{max} 等于或高于 1.5 倍,与溶剂对照相比,在统计学上有显著差异;
- 在最低浓度诱导荧光素酶活性 1.5 倍(即 EC1.5 测定浓度)时,细胞活力高于($>$)70%;
- EC1.5 值小于 $1\ 000\ \mu\text{mol}$ (或对于没有规定相对分子质量的测试化学品 $<200\ \mu\text{g/mL}$);
- 荧光素酶诱导呈现剂量依赖性增加。

6.4.2 预测模型

如果在给定的重复中,6.4.1 中条件 a)、b) 和 c) 均满足,但未观察到荧光素酶诱导明显的剂量依赖性增加,则该重复的结果应判定为不确定,可能需要进一步测试。在最大测试浓度 $<1\ 000\ \mu\text{mol}$ (或对于未确定相对分子质量的测试化学品为 $200\ \mu\text{g/mL}$) 下测试的化学品,若阴性结果是在最大测试浓度下未达到细胞毒性水平(即细胞活力 $\geq 70\%$),也应判定为不确定。

7 类似或修改方法的确立

7.1 参考化学品清单

参考化学品用于确定一种类似或改进测试方法的可靠性和相关性。一种类似或改进的测试方法,如果证明其在结构和功能上与 VRM 足够类似,或只是对 VRM 的微小改进,该方法至少应与 VRM 方法相同或更好。附录 A 列出 20 种参考化学品,涵盖代表体外皮肤致敏作用的全部范围的物质,通过各种机制起作用,并且代表不同化学类别(基于官能团的化学类别)。清单包括非致敏剂和皮肤致敏剂,涵盖由 LLNA EC3 值确定的各种致敏效力类别(弱、中、强和极端)。这些化学品可用于评估类似或修改的试验方法的可靠性和相关性,以区分非致敏剂和皮肤致敏剂。

7.2 参考化学品使用说明

如果无法获得附录 A 所列物质,可使用其他遵循参考化学品定义标准且具有足够体内参考数据的物质,这些物质应来自 VRM 验证研究中使用的范围。必要时,可将代表其他化学类别并具有足够体内参考数据的其他物质添加到参考化学品清单中,以进一步评估所提议测试方法的相关性。除非出于其他

合理原因无法使用,否则选择参考化学品应遵循参考化学品定义中规定的标准,并提供足够的体外参考数据,例如优先来自预验证后优化过程中使用的测试化学品,或来自 VRM 的验证研究。

7.3 可靠性和预测能力确认

7.3.1 确认要求

为建立在体外皮肤致敏性试验指南范围内拟议的类似或修改的试验方法的可靠性和相关性,附录 A 中所列的所有参考化学品都应进行检测。所有基于性能标准的验证研究必须由国际认可的验证机构按照国际准则指南进行独立评估。这 20 种参考化学品的每一个应在至少三个实验室中进行检测。为评估实验室内的重现性,附录 A 中粗体标注的 12 种参考化学品子集应由每个参与实验室测试,每个实验室进行三个合格的测试,得出三个预测。其余 8 种参考化学品应由每个实验室进行一个合格的测试,以便每个实验室得出一个预测,从而为三个实验室提供总共三个预测。最后,应使用所有 20 种参考化学品来评估预测能力。如获得一致结果,一个合格的测试至少由两次合格的独立重复组成,如前两次结果不一致,则由第三次合格的独立重复组成。每个浓度测试包括三个重复。阴性(溶剂)对照和阳性对照化学品分别进行三次重复试验。

7.3.2 方法确认的统计

实验室内重现性、实验室间重现性、准确度、灵敏度和特异性值的计算应遵循以下规则,以确保使用预定义的一致方法。

- WLR:基于每个参与实验室对附录 A 中粗体标记的 12 种参考化学品子集的分类一致性计算,使用三个合格的测试。
- BLR:基于至少三个参与实验室对附录 A 中所列 20 种参考化学品的分类一致性计算。BLR 计算仅使用合格实验,基于分类一致性。每个实验室对用于 WLR 评估的 12 种物质生成三种分类(每个实验室三种预测模式得出单一最终分类),对仅用于 BLR 评估的 8 种物质各生成一个分类。
- 精度值:使用至少三个实验室使用 20 种参考化学品生成的所有合格试验计算,基于每次合格试验的预测结果。加权计算考虑 20 种参考化学品的不同试验数量,即同时用于 BLR 和 WLR 评估的 12 种物质各有 9 个测试,仅用于 BLR 评估的 8 种物质各有 3 个测试。每种物质从所有参与实验室获得的每个合格测试的最终结果在计算中作为独立分类被捕获,并应用修正因子,使所有物质在计算中权重相等。每种物质的阴性和阳性预测除以对该物质的预测总数,使每种物质的最终权重为 1。

7.4 实验室内可重复性

实验室内可重复性的评估应在单个实验室中进行。目标是在附录 A 中粗体标记的 12 种参考化学品的三个不同独立合格测试运行中,获得预测(阴性/阳性)的一致性 $\geq 80\%$ 。

7.5 实验室之间的可重复性

对于要在实验室之间转移的体外毒性试验方法,基于至少三个实验室对 20 种参考化学品的试验结果的独立测试运行中仅使用合格试验获得的预测一致性应 $\geq 80\%$ 。

7.6 预测能力

类似或经改进的体外方法的预测能力(敏感性、特异性和准确性)应等于或优于 VRM 得出的目标值。准确性、敏感性和特异性均应等于或高于 80.0%。此外,除非能给出明确理由,否则任何强或极端的

致敏剂都不应被低估为非致敏剂。

7.7 验证不可接受的情况

由于技术问题、同时进行的阳性和阴性对照失败等原因致使结果不符合测试接受标准(即不合格的测试),为数据补充完整,最多允许再进行两次包含阳性对照和阴性对照的运行(重新测试)。每个实验室中的每种参考化学品最多可进行两次额外运行,即每个实验室每个参考化学品的合格测试不应超过三个,更多测试不必要。不可接受的测试或运行应记录其程度,分析可能原因,形成文件并报告。

附录 A
(资料性)
参考化学品

参考化学品清单见表 A.1。

表 A.1 参考化学品清单

参考化学品	CAS号	物理状态	体外分类	基于体外的VRM预测
基于体外结果的非致敏剂				
4-甲氧基乙酰苯酮	100-06-1	固体	非致敏剂	阳性
丙三醇	56-81-5	液体	非致敏剂	阴性
异丙醇	67-63-0	液体	非致敏剂	阴性
水杨酸	69-72-7	固体	非致敏剂	阴性
氯苯	108-90-7	液体	非致敏剂	阴性
乳酸	50-21-5	液体	非致敏剂	阴性
水杨酸甲酯	119-36-8	液体	非致敏剂	阴性
磺胺	63-74-1	固体	皮肤致敏(微弱)	阴性
基于体外结果的致敏剂				
乙二醇二甲基丙烯酸酯	97-90-5	液体	皮肤致敏(微弱)	阳性
苯甲酸苯酯	93-99-2	固体	皮肤致敏(微弱)	阴性
柠檬醛	5392-40-5	液体	皮肤致敏(中等)	阳性
4-丙烯基-2-甲氧基苯酚	97-54-1	液体	皮肤致敏(中等)	阳性
溴菌腈	35691-65-7	固体	皮肤致敏(强烈)	阳性
对苯二胺	106-50-3	固体	皮肤致敏(强烈/中等)	阳性
2,4-二硝基氯苯	97-00-7	固体	皮肤致敏(中等)	阳性
4-硝基苄基溴	100-11-8	固体	皮肤致敏(中等)	阳性
丁香油酚	97-53-0	液体	皮肤致敏(微弱)	阴性
2-巯基苯并噻唑	149-30-4	固体	皮肤致敏(中等)	阳性
4-甲氨基酚硫酸盐	55-55-0	固体	皮肤致敏(强烈)	阳性
氧氮杂茂酮	15646-46-5	固体	皮肤致敏(极端)	阳性

附录 B

(资料性)

荧光测量的质量控制

B.1 以下三个参数对于确保光度计获得可靠结果至关重要：

- a) 具有足够的灵敏度,在板孔中提供稳定的背景；
- b) 由于长时间孵育而在平板上没有梯度变化；
- c) 在来自强活性孔的相邻孔中没有光污染。

B.2 质量控制分析(见表B.1)应进行以下证明：

- a) 在表B.1的D行中,荧光素酶诱导的剂量依赖性增加, $I_{\max} > 20$ (在大多数情况下, $I_{\max}$ 值在 100 到 300 之间)；
- b) H7到H11孔中荧光素酶诱导量呈剂量依赖性增加,H11孔中诱导量为2倍~8倍；
- c) 在C行和E行中,荧光素酶的诱导没有剂量依赖性的增加(诱导值不等于或超过 1.5(理想情况下不高于 1.3),这是由于可能的光污染,特别是在EGDMA行的强活性孔附近；
- d) A、B、C、E、F、G等行间差异无统计学意义(即平板上无梯度)；
- e) A、B、C、E、F和G行以及H行DMSO井的变异性应低于 20%(即稳定背景)。

表 B.1 质量控制分析

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	EGDMA 0.98	EGDMA 1.95	EGDMA 3.9	EGDMA 7.8	EGDMA 15.6	EGDMA 31.25	EGDMA 62.5	EGDMA 125	EGDMA 250	EGDMA 500	EGDMA 1000	EGDMA 2000
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	CA 4	CA 8	CA 16	CA 32	CA 64	—

注1: EGDMA(Ethylene glycol dimethacrylate),二甲基丙烯酸乙二醇酯(CAS No.:97-90-5),是一种强诱导剂。
注2: CA(Cinnamic aldehyde),positive reference,肉桂醛,阳性参考品(CAS No.:104-55-2),浓度以 $\mu\text{mol/L}$ 表示。

参 考 文 献

- [1] GB/T 16886.10—2024 医疗器械生物学评价 第10部分:皮肤致敏试验
- [2] 化妆品安全技术规范(食品药品监管总局公告2015年第268号)
- [3] OECD(2005).Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment, No.34, OECD Publishing, Paris.
- [4] OECD(2014).The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, OECD Series on Testing and Assessment, No. 168, OECD Publishing, Paris.
- [5] OECD(2018).Guidance Document on Good In Vitro Method Practices (GIVIMP), OECD Series on Testing and Assessment, No. 286, OECD Publishing, Paris.
- [6] OECD(2015).Performance Standards for Assessment of Proposed Similar or Modified In Vitro Skin Sensitisation ARE-NRF2 Luciferase Test Methods, OECD Series on Testing and Assessment, No. 213, OECD Publishing, Paris.
- [7] Natsch A. The Nrf2-Keap1-ARE toxicity pathway as a cellular sensor for skin sensitizers—Functional relevance and a hypothesis on innate reactions to skin sensitizers[J]. Toxicol Sci. 2010 Feb;113(2):284-92.
- [8] Ramirez T, Mehling A, Kolle SN, et al. LuSens: a keratinocyte based ARE reporter gene assay for use in integrated testing strategies for skin sensitization hazard identification[J]. Toxicol In Vitro. 2014 Dec;28(8):1482-97.
- [9] Ramirez T, Stein N, Aumann A, et al. Intra-and inter-laboratory reproducibility and accuracy of the LuSens assay: A reporter gene-cell line to detect keratinocyte activation by skin sensitizers[J]. Toxicol In Vitro. 2016 Apr;32:278-86.
- [10] Zhong G, Li H, Bai J, et al. Advancing the predictivity of skin sensitization by applying a novel HMOX1 reporter system[J]. Arch Toxicol. 2018 Oct;92(10):3103-3115.
- [11] Casati S, Griesinger C, Worth A, et al. EURL ECVAM Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing[R]. EUR 26427. Luxembourg (Luxembourg): Publications Office of the European Union; 2014. JRC87551.
- [12] Carmichael N, Borlak J, Clewell Iii H, et al. ESAC Opinion on the BASF-coordinated Performance Standards-based validation of the LuSens test method for skin sensitisation testing[R]. EUR 28176 EN. Luxembourg (Luxembourg): Publications Office of the European Union; 2016. JRC103706
- [13] ECETOC (2003).Contact Sensitization: Classification According to Potency[R]. Technical Report No. 87.
-