

产品

普境安

研究主题

豚鼠致敏试验研究 (Buehler 法)

数据要求

U.S. EPA Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.2600 (1998)

作者

Daniel J. Merkel, B.S.

研究完成于

2005 年 3 月 10 日

执行实验室

Product Safety Laboratories

2394 Highway 130

Dayton, New Jersey 08810

实验室研究编号

16452

无数据保密声明

对于本研究中所载的任何资料，本研究基于其在 FIFRA 10(d)(1)(A)、(B)或(C)范围内的任何信息，均未提出保密要求。

公司：**ARCH ANGEL LLC**

公司代理人：

姓名

职称

签名

日期

（备注：此文件为中文翻译文件，签名请参考英文原文件）

良好的实验室实践合规声明

普境安

本研究满足美国联邦法案第 40 篇 160 部分要求：美国环境保护署(FIFRA)有以下例外：所接收和检测的检测物质浓度的稳定性、特性、身份和验证相关的具体信息是研究发起者的责任（见检测物质部分）

研究执行者：

Daniel J Merkel, B.S.

Product Safety Laboratories

Date

提交者：

签名

日期

委托方：

签名

日期

（备注：此文件为中文翻译文件，签名请参考英文原文件）

质量保证声明

产品安全实验室的质量保证小组审查了这项研究，以遵守产品安全实验室的标准操作程序、研究协议，以及所有适用的 GLP 标准。最终报告是对工作记录的准确表达，并保存在文件上。下面的摘要提供了在最终报告部分中对质量保证审计所作的陈述的核查。

本研究的质量保证：

质量保证	进程日期	向研究执行者和管理人员汇报结果的日期
协议审查	8/11/04 ¹ , 2/11/05	8/11/04 , 2/14/05
进程检验： 每 48 小时监测一次进程	12/10/04	2/14/05
原始数据审计	2/11/05	2/14/05
报告草案审查	2/11/05	2/14/05
最终报告审查	3/10/05	3/10/05

Lourse N. Caruso, B.S.
质量保证审计
Product Safety Laboratories

¹ 本研究使用的 PSL 的“通用”协议在这个日期被质量保证小组审查

（备注：此文件为中文翻译文件，签名请参考英文原文件）

目录

无数据保密声明	2
良好的实验室实践合规声明	3
质量保证声明	4
目录	5
豚鼠致敏试验研究 (Buehler 法)	6
1. 目的	6
2. 概述	6
3. 材料	7
4. 方法	8
5. 过程	9
6. 评估	10
7. 历史阳性对照验证研究	11
8. 试验实施	11
9. 参考文献	11
10. 质量保证	11
11. 终版草案的偏差	12
12. 终版报告和记录的保存.....	12
13. 结果	12
14. 结论	13
签名	14
表 1 : HNIC 检测初步刺激测试得分	15
表 2 : 独立体重 (检测物质)	16
表 3 : 独立体重 (阳性对照)	18
表 4 : 诱导阶段皮肤反应得分 (检测物质)	19
表 5 : 诱导阶段皮肤反应得分 (阳性对照)	20
表 6 : 激发阶段皮肤反应得分 (检测物质)	21
表 7 : 激发阶段皮肤反应得分 (阳性对照)	23

豚鼠致敏试验研究 (Buehler 法)

协议编号：	P328
代理人：	EPA (FIFRA)
研究编号：	16452
委托方：	ARCH ANGEL LLC 636 Hampshire, Suite 208 Quincy, IL 62301
检测物质识别：	普境安 编号#1 批号 63
检测物质描述：	浅粉色粉末
接受日期：	2004 年 11 月 8 日
PSL 参考编号：	041108-3D
研究开始日期：	2004 年 11 月 15 日
检测日期：	2004 年 11 月 22 日-12 月 22 日
笔记编号：	04-94：280-292 页

1. 目的

确定普境安引起皮肤致敏反应的可能性。

2. 概述

用豚鼠进行皮肤致敏试验，以确定在重复局部应用普境安后产生致敏反应的可能性。

在矿物油的研磨检测物质中，将 65%¹w/w 混合物局部应用于 20 个健康的试验豚鼠，在为期三周的诱导期中每周一次。在第一次诱导剂量后的 27 天，检测物质在其激发剂量最高的非刺激性浓度（HNIC，在初步刺激筛选中确定为矿物油中 33% w/w 混合

¹ 所收到的检测物质是粉末。为了加强皮肤接触，在应用之前，先用矿物油湿润检测物质。不认为超过 65% 的浓度太干燥，而不能确保与皮肤有足够的接触。

物)被应用于每只豚鼠的未用药的位点上。未用药的对照组(10只动物)在相同的环境条件下保持不变,只在激发阶段用检测物质处理。在每次诱导和激发剂量后大约24小时和48小时,为动物们的红斑情况评分。

在激发后发现敏感反应的发病率和严重程度的总结如下表所示:

	致敏反应指标			
	阳性反应发病率 ¹		严重程度 ²	
	小时		小时	
	24	48	24	48
检测动物	0/20	0/20	0.15	0.08
未用药的对照组动物	0/10	0/10	0.20	0.10

根据本研究的结果,试验物质不是接触致敏剂。在历史阳性对照验证研究中,以 α -己基桂醛技术(HCA)观察到的阳性反应验证了本研究中使用的检测系统(见第7点)。

3. 材料

A. 检测物质

该检测物质被鉴定为普境安,编号#1批次63,于2004年11月8日收到,并进一步被PSL确认,参考编号为041108-3D。检测物质为粉色粉末,常温保存。在使用之前,用研钵和杵磨碎检测物质。PSL进行的初步的溶解性检测表明,超过65%的浓度太干燥,不能与皮肤有足够的接触。在丹麦保留了对检测物质的合成、制作或衍生方法的记录。

除另有说明外,委托方还提供了以下与检测物质描述有关的信息:

剂量:不提供

pH: 3.5(作为1% w/w 溶液)³

¹ 得分大于0.5的动物。

² 所有红斑的总和除以动物的数量。

³ 由Product Safety Laboratories(来自PSL研究编号16446和16445分别用于活性成分和pH)决定。

溶解度：微溶于水

稳定性：检测物质在检测期间预计会稳定

到期时间：不适用

B. 动物

3.B.1 动物数量：34

3.B.2 组数：3

3.B.3 每组动物数量：

初步刺激组：4

试验组：20

未用药对照组：10

3.B.4 性别：雄性和雌性。雌性是未生育过的和没有怀孕的

3.B.5 物种/应变：豚鼠/哈特利白化

3.B.6 年龄/体重：初步刺激组：青年

试验组和对照组：青年/雌性 试验前 381-447g

3.B.7 资料来源：2004 年 11 月 12 日和 12 月 1 日（初步刺激组）2004 年 11 月 12 日（试验组和对照组）来源于 Elm Hill Breeding Labs, Chelmsford, MA

4. 方法

A. 管理

4.A.1 饲养环境：这些动物单独居住在悬挂的不锈钢笼子中，其网格地板符合最新的《护理和使用实验室动物 DHEW(NIH)指南》的建议尺寸。在笼子下放置垃圾纸，每周至少更换三次。

4.A.2 动物的房间温度范围：19-23°C

4.A.3 光照周期：12 小时光照/黑夜循环

4.A.4 适应时间：10、11 或 12 天

4.A.5 食物：珠皮豚鼠鼠粮 #5025

4.A.6 水：采用自动配水系统对自来水进行过滤

4.A.7 污染物：在食物或水中没有发现任何将会干扰这项研究的结果的已知污染物。对食品和分析至少每年进行一次，并且记录保存在 Product Safety Laboratories 的文件中

B. 识别

- 4.B.1 笼子：每个笼子都有一个笼子卡片，上面至少标明了该动物的研究编号、身份和性别。
- 4.B.2 动物：每只豚鼠都有一个颜色代码，加上分配给研究编号 16452 的顺序动物号码，构成了唯一的标识。

5. 过程

A. 预刺激试验

在激发剂量之前，用一组动物来确定检测物质的最高非刺激性浓度（HNIC）。修剪（Oster model #A5-small）每只豚鼠的背部区域和侧翼的皮毛。这一区域被分成四个试验点（在中线两边各有两个点）。用矿物油浸湿了研磨的试验物质，使 w/w 浓度分别达到 65%、49%、33%和 17%。将每个浓度应用于一个检测部位（0.4g 或者每 ml），使用一个封闭的 25mm 山顶室。这些部位都是用非过敏性的 Durapore 胶带包裹的。经过 6 个小时的暴露后，移除试验室，轻轻清除检测部位残留的检测物质。大约 24 小时后，根据 5.E 点描述的评分系统对每个部位进行局部反应评估（红斑）。

从这些结果中，我们建立了 HNIC（在 4 个豚鼠中产生的反应最高浓度，不超过 2 个 0.5 和 2 个 0 分），用于激发。对激发阶段的 HNIC 选择了 33%的 w/w 混合矿物油。

B. 动物的选择和准备

在开始前一天，剪下一组动物背部区域和侧翼的皮毛。在剪除后和开始前，为动物称重，检查皮肤是否有任何异常。不存在皮肤刺激的健康动物，才能被选中进行检测。动物在每个剂量前都要重新修剪皮毛。

C. 诱导阶段

在使用之前，用研钵和杵磨碎检测物质。每周一次，持续三周，在每只检测动物的左侧使用一个封闭的 25mm 的山顶室，使用 0.04 克 65%¹ w/w 矿油混合检测物质。为了避免腔室脱位，并尽量减少检测物质的损失，这些腔室被固定在适当的地方，用非过敏性的 Durapore 胶带包裹在 6 小时的暴露期后，移除试验室，轻轻清除检测部位残留的检测物质。在每个诱导应用程序后大约 24 小时和 48 小时内，根据 5.E 点描述的评分系统，对局部反应（红斑）进行读数。

¹ 所收到的检测物质是粉末。为了加强皮肤接触，在应用之前，先用矿物油湿润检测物质。不认为超过 65% 的浓度太干燥，而不能确保与皮肤有足够的接触。

D. 激发阶段

在第一次诱导剂量后的 27 天，将 33% w/w 矿物油中研磨的检测物质混合物（HNIC）的十分之四毫升应用于每只动物右侧的一个未用药的部位，作为激发剂量，使用上述过程。根据第 5.E 点所述的系统，在激发应用程序后大约 24 小时和 48 小时，对这些部位敏感反应（红斑）进行评估。

除试验动物外，同一批装运的 10 只豚鼠在相同的环境条件下维持不变，并只接受检测物质的 HNIC 治疗。这些动物构成了“未用药对照组”群体。

E. 评分系统

0 - 无反应

0.5 - 非常微弱的红斑，通常不融合*

1 - 微弱的红斑，通常融合

2 - 温和的红斑

3 - 严重红斑，有或无水肿

* 非常微弱的红斑不被认为是阳性反应。

F. 体重

在开始前和激发后的第二天记录动物的独立体重。

6. 评估

为了评估在激发时的致敏反应，在检测和空白对照动物中使用了两个指标：一个是发病率，一个是严重程度（Ritz, H. 和 Buehler, E., 1980）。

发病率指数为动物与红斑的比率，每组动物评估的动物数目超过 0.5 个，并在激发评估后的 24 小时和 48 小时内呈现如下：

发病率指数 = 红斑的分数超过 0.5 / 被评估的动物

严重程度指标是指红斑评分，并根据以下公式对激发评估后的 24 小时和 48 小时间隔进行计算：

$$\text{严重程度指标} = \frac{\text{红斑评分总数}}{\text{被评估动物数量}}$$

采用以下标准将检测物质归类为潜在接触敏化剂（Robinson 等人，1990）：

在 24 小时或 48 小时的评分区间，15%或更多的检测动物在没有类似结果的空白对照组中表现出阳性反应（得分>0.5）。

24 小时间隔内的阳性反应必须在至少一种检测动物中持续 48 小时。

7. 历史阳性对照验证研究

本研究中使用 α -己基桂醛技术（HCA）作为阳性对照物。最近的验证，PSL 研究# 15590，于 2004 年 8 月 12 日由产品安全实验室完成。本研究的原始数据和报告存档于产品安全实验室历史数据笔记本 02：页码 132 - 141。这项检测是在 Dayton 实施进行的，对 Elm Hill Breeding Labs 的哈特利白化豚鼠进行诱导和激发程序，类似于第 5 点所描述的。本试验所得的结果载于第 13 点。

8. 试验实施

这项研究是在新泽西州代顿市 130 号公路 2394 号产品安全实验室进行（08810）进行的。这项研究的主要技术人员是 Anselmo Villagran, B.S.。这项研究遵守 GLP 的以下规定：

- 40 CFR 160：美国 EPA GLP 标准：农药项目（FIFRA）

并按照：

- 美国环保署健康影响测试指南，OPPTS 870. 2600（2003）

9. 参考文献

Robinson, M., Nusair, T., Fletcher, E. 和 Ritz, H., A Review of the Buehler Guinea

Pig Skin Sensitization Test And Its Use in a Risk Assessment Process for Human Skin Sensitization. Toxicology, 61, 91-107, 1990.

Ritz, H. 和 Buehler, E., Planning, Conduct, and Interpretation Of Guinea Pig Sensitization Patch Tests. Current Concepts in Cutaneous Toxicity, V.A. Drill and P. Lazar (Eds.), Academic Press, New York, 1980, page 25.

10. 质量保证

最终报告经审核，与原始数据记录一致，符合协议、产品安全实验室标准操作程序和适当良好实验室的实践标准。在研究期间进行的检查和审核的日期，以及对研究主任和设施管理的检查和审计结果的报告日期，记载于质量保证声明中。

11. 终版草案的偏差

无偏差

12. 终版报告和记录的保存

签署的最终报告原件将被转发给委托方。本已签署的报告副本，连同议定书和在产品安全实验室生成的所有原始数据保存在产品安全实验室档案中。产品安全实验室将维持这些记录至少 5 年。在此之后，委托方将有机会获得该记录，或者将收取由产品安全实验室继续收费存档。

13. 结果

预刺激试验分数见表 1。表 2 和表 3 中分别给出了试验组、未用药对照组以及历史阳性对照动物的独立体重。在表 4 至表 7 中，对试验组、未用药对照组和历史阳性对照动物的诱导与激发阶段皮肤反应进行评分。

诱导阶段

试验动物（在矿物油中 65% w/w 混合检测物质）：大多数试验部位在诱导阶段都有很微弱的红斑（0.5 – 1）。

历史阳性对照动物（HCA 未稀释）：在诱导阶段，所有阳性对照试验部位都有很微弱的红斑（0.5 – 1）。

激发阶段

试验动物（在矿物油中 33% w/w 混合检测物质）：在激发应用后 24 小时内，20 个试验部位中有 6 个出现非常微弱的红斑（0.5）。同样的刺激在三个部位持续了 48 小时。

未用药对照动物（在矿物油中 33% w/w 混合检测物质）：激发 24 小时后，在 10 个未用药部位发现非常微弱的红斑（0.5）。同样的刺激在两个部位持续了 48 小时。

历史阳性对照动物（在矿物油中 75% w/w HCA 混合物）：激发后 24 和 48 小时，10 个阳性对照动物中有 6 个表现出敏感反应（微弱的红斑[1]）。

历史未用药对照动物（在矿物油中 75% w/w HCA 混合物）：激发后 24 小时，在 4 个阳性对照试验部位发现非常微弱的红斑（0.5）。刺激在两个部位持续了 48 小时。

14. 结论

根据这些发现和使用的评估系统，不认为普境安是接触敏化剂。

在历史阳性对照验证研究中，以 α -己基桂醛技术（HCA）观察到的阳性反应验证了本研究中使用的检测系统（见第 7 点）。

签名

普境安

我们，以下署名人，声明本报告中所记载的方法、结果和数据忠实地反映了在研究过程中所用进程和原始数据。

Daniel J Merkel, B.S.

研究主任

Product Safety Laboratories

日期

Gary Wnorowski, B.A., M.B.A

董事长

Product Safety Laboratories

日期

（备注：此文件为中文翻译文件，签名请参考英文原文件）

表 1 : HNIC 检测初步刺激测试得分 (检测物质)¹

		浓度 (%) ²			
动物编号	性别	65% ³	49	33	17
21747	雄性	1	0.5	0	0
21748	雄性	0.5	0.5	0	0
21749	雄性	1	0.5	0	0
21750	雄性	0.5	0	0	0

¹ HNIC - 最高的非刺激性浓度

² 十分之四克或毫升的检测物质是磨碎的，用作矿物油的 w/w 混合物。

³ 所收到的检测物质是粉末。为了加强皮肤接触，在应用之前，先用矿物油湿润检测物质。

表 2：独立体重（检测物质）

检测物质组

动物编号	性别	初始（g）	激发后（g）
21906	雌性	424	577
21907	雌性	442	602
21908	雌性	431	604
21909	雌性	420	568
21910	雌性	401	538
21911	雌性	403	520
21912	雌性	394	535
21913	雌性	408	577
21914	雌性	410	606
21915	雌性	399	509
21916	雌性	412	543
21917	雌性	430	597
21918	雌性	399	547
21919	雌性	389	519
21920	雌性	380	493
21921	雌性	410	572
21922	雌性	398	512
21923	雌性	412	527
21924	雌性	392	557
21925	雌性	409	517

表 2 (接上页) : 独立体重 (检测物质)

检测物质组

动物编号	性别	初始 (g)	激发后 (g)
21926	雌性	414	568
21927	雌性	412	555
21928	雌性	381	501
21929	雌性	432	615
21930	雌性	427	577
21931	雌性	418	572
21932	雌性	414	626
21933	雌性	447	611
21934	雌性	423	597
21935	雌性	401	548

表 3：独立体重（阳性对照）历史阳性对照验证研究¹

阳性对照组

动物编号	性别	初始（g）	激发后（g）
21934	雄性	499	612
21935	雄性	522	707
21936	雄性	469	727
21937	雄性	553	739
21938	雄性	513	657
21939	雄性	587	761
21940	雌性	443	566
21941	雌性	441	539
21942	雌性	441	539
21943	雌性	469	630

未用药对照组

动物编号	性别	初始（g）	激发后（g）
21944	雌性	503	621
21945	雌性	475	594
21946	雄性	559	674
21947	雄性	536	656
21948	雄性	584	756

¹ PSL 研究 编号#15590，由 PSL 于 2004 年 8 月 12 日完成。

表 4：诱导阶段皮肤反应得分（检测物质）

检测物质组

诱导编号	1		2		3	
浓度 ¹	65%		65%		65%	
应用量（g）	0.4		0.4		0.4	
小时 ²	24	48	24	48	24	48
动物编号						
21906	0	0	0	0	0	0
21907	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5
21908	0	0	0	0	0	0
21909	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
21910	0.5	0.5	0	0	0	0
21911	0.5	0.5	0	0	0	0
21912	0	0	0	0	0	0
21913	0.5	0	0	0	0	0
21914	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0
21915	0	0	0	0	0.5	0.5
21916	0.5	0	0.5	0.5	0	0
21917	0	0	0	0	0	0
21918	0	0	0	0	0.5	0.5
21919	0	0	0.5	0.5	0.5	0
21920	0	0	0	0	0	0
21921	1	0.5	0	0	0	0
21922	0	0	0	0	0.5	0
21923	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0
21924	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0
21925	0	0	0	0	0	0

¹ 研磨的试验物质被用作矿物油中 65% 的 w/w 混合物。

² 诱导剂量后的时间（小时）。

表 5：诱导阶段皮肤反应得分（阳性对照）

历史阳性对照验证研究¹

阳性对照组

诱导编号	1		2		3	
浓度 ²	未稀释的		未稀释的		未稀释的	
应用量 (ml)	0.4		0.4		0.4	
小时 ³	24	48	24	48	24	48
动物编号						
21934	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0.5
21935	0.5	0	0.5	0.5	0.5	0.5
21936	0.5	0.5	1	1	1	1
21937	1	0.5	1	1	1	1
21938	0.5	0.5	1	1	1	0.5
21939	1	0.5	1	1	1	1
21940	0	0	1	1	1	1
21941	0.5	0.5	1	1	0.5	0.5
21942	0.5	0	1	1	1	1
21943	1	0.5	1	1	1	1

¹ PSL 研究 编号#15590，由 PSL 于 2004 年 8 月 12 日完成。

² 未稀释十分之四毫升的 HCA。

³ 诱导剂量后的时间（小时）。

表 6：激发阶段皮肤反应得分（检测物质）检测物质组¹

动物 编号	剂量后时间（小时）	
	24	48
21906	0.5	0
21907	0	0
21908	0	0
21909	0	0
21910	0.5	0
21911	0	0
21912	0	0
21913	0	0
21914	0.5	0.5
21915	0	0
21916	0	0
21917	0.5	0.5
21918	0	0
21919	0	0
21920	0.5	0.5
21921	0	0
21922	0.5	0
21923	0	0
21924	0	0
21925	0	0

¹ 应用十分之四毫升的矿物油中研磨的检测物质 33%的 w/w 混合物。

表 6 (接上页) : 激发阶段皮肤反应得分 (检测物质)检测物质组 ¹

动物 编号	剂量后时间 (小时)	
	24	48
21926	0	0
21927	0	0
21928	0	0
21929	0.5	0
21930	0.5	0.5
21931	0	0
21932	0.5	0
21933	0.5	0.5
21934	0	0
21935	0	0

¹ 应用十分之四毫升的矿物油中研磨的检测物质 33%的 w/w 混合物。

表 7：激发阶段皮肤反应得分（阳性对照）历史阳性对照验证研究¹阳性对照组²

动物 编号	剂量后时间（小时）	
	24	48
21934	0	0
21935	0.5	0.5
21936	1	1
21937	1	1
21938	0.5	0.5
21939	0.5	0.5
21940	1	1
21941	1	1
21942	1	1
21943	1	1

未用药对照组²

动物 编号	剂量后时间（小时）	
	24	48
21944	0.5	0.5
21945	0.5	0
21946	0.5	0
21947	0	0
21948	0.5	0.5

¹ PSL 研究 编号#15590，由 PSL 于 2004 年 8 月 12 日完成。² 应用十分之四毫升的矿物油中 75%的 w/w HCA 混合物。