

Table 12. Summary of the statistical analysis of the viability for each chemical.

Chem.	Stat.	Lab.						
		a	b	c	d	e	f	g
01	Mean	17.9	24.5	14.4	11.0	31.9	12.0	11.7
	Sd	11.3	19.8	5.2	2.9	6.4	2.0	2.0
	Min	11.2	10.4	10.6	9.1	25.2	10.4	10.6
	Max	31.0	47.1	20.3	14.3	38.1	14.3	14.0
02	Mean	73.8	72.4	87.8	86.6	88.0	72.7	98.0
	Sd	7.7	14.3	1.9	17.6	12.8	4.8	4.6
	Min	65.2	61.7	85.8	67.6	76.4	67.2	94.8
	Max	79.8	88.7	89.7	102.3	101.8	75.7	103.3
03	Mean	104.7	98.5	94.5	106.4	113.3	94.8	101.7
	Sd	4.1	4.6	1.3	5.8	14.1	2.7	8.9
	Min	100.9	93.3	93.1	101.4	103.9	92.5	93.4
	Max	109.1	102.3	95.7	112.8	129.6	97.9	111.1
04	Mean	99.3	97.8	98.2	101.8	115.3	95.2	105.9
	Sd	6.1	3.0	1.5	3.9	11.0	4.2	3.4
	Min	95.2	94.4	97.1	98.4	105.2	92.7	103.3
	Max	106.3	100.2	99.9	106.1	127.1	100.1	109.8
05	Mean	77.0	72.7	91.9	72.0	94.3	55.4	91.7
	Sd	2.5	11.4	3.1	6.8	7.6	16.3	4.5
	Min	74.1	61.7	89.2	66.1	89.6	39.3	88.4
	Max	78.5	84.5	95.2	79.4	103.0	71.9	96.8
06	Mean	84.8	80.7	81.2	92.1	89.7	87.8	74.2
	Sd	6.9	2.8	2.3	9.9	7.8	6.7	17.7
	Min	79.4	77.9	79.1	82.7	81.5	81.1	54.1
	Max	92.5	83.5	83.6	102.4	97.0	94.4	87.2
07	Mean	18.2	12.2	17.4	18.4	20.3	20.8	24.6
	Sd	5.7	1.3	3.0	4.2	2.5	8.9	6.1
	Min	12.6	10.8	15.2	13.8	17.5	15.6	19.9
	Max	24.1	13.2	20.8	21.7	22.2	31.1	31.5
08	Mean	99.1	97.4	78.3	106.6	105.6	94.7	103.7
	Sd	11.4	9.5	3.6	3.3	8.1	4.4	4.6
	Min	90.2	86.7	75.3	103.0	100.9	89.7	100.9
	Max	111.9	104.8	82.3	109.4	114.9	97.8	109.0
09	Mean	103.7	105.4	98.9	102.2	109.4	94.3	105.9
	Sd	8.2	7.6	6.8	3.6	6.0	6.8	5.4
	Min	97.1	96.7	93.5	98.1	103.9	86.5	102.3
	Max	112.8	110.1	106.6	105.0	115.8	98.8	112.1
10	Mean	102.1	112.2	104.9	109.3	118.8	102.1	109.8
	Sd	14.8	2.8	2.2	4.5	12.3	1.6	2.9
	Min	86.5	110.1	103.6	105.5	107.5	101.2	107.9
	Max	115.9	115.4	107.5	114.3	132.0	104.0	113.1

Table 12. continued.

Chem.	Stat.	Lab.						
		a	b	c	d	e	f	g
11	Mean	108.1	105.1	96.6	103.6	113.0	98.6	104.1
	Sd	8.7	1.4	3.8	1.9	9.0	4.3	4.4
	Min	98.1	103.7	94.1	102.4	105.5	94.6	100.5
	Max	113.7	106.6	101.0	105.8	123.1	103.1	109.0
12	Mean	20.7	21.7	32.6	52.6	56.9	52.8	99.5
	Sd	6.7	5.0	10.7	24.4	1.1	22.2	12.5
	Min	15.3	15.9	24.9	27.4	55.6	27.2	87.7
	Max	28.2	24.6	44.8	76.2	57.8	66.0	112.6
14	Mean	8.2	9.7	11.1	10.9	12.2	15.6	12.0
	Sd	2.6	2.1	3.1	0.8	1.9	2.2	1.4
	Min	6.6	8.3	9.1	10.2	10.4	13.1	10.6
	Max	11.1	12.1	14.7	11.7	14.2	17.0	13.5
15	Mean	8.8	9.8	13.5	8.6	10.3	7.2	14.4
	Sd	2.1	0.4	5.6	0.6	1.4	1.4	9.0
	Min	7.1	9.3	8.1	8.0	8.7	5.9	9.2
	Max	11.1	10.2	19.3	9.2	11.3	8.6	24.7
16	Mean	53.3	81.4	73.1	45.0	89.1	59.1	77.0
	Sd	18.7	23.9	18.9	31.2	9.8	8.6	11.0
	Min	32.2	54.1	51.5	18.1	78.7	50.4	64.9
	Max	67.9	98.3	86.3	79.2	98.2	67.5	86.5
17	Mean	5.5	4.9	5.8	5.3	6.9	5.6	5.6
	Sd	0.7	0.6	0.4	1.4	1.8	1.2	0.5
	Min	4.8	4.5	5.3	3.9	5.4	4.5	5.3
	Max	6.1	5.7	6.0	6.6	8.9	6.9	6.2
18	Mean	61.9	65.7	88.7	70.9	85.1	73.9	90.9
	Sd	31.7	29.8	2.2	12.4	15.0	6.0	4.5
	Min	25.3	46.5	87.3	59.0	69.1	69.2	85.9
	Max	82.1	100.0	91.2	83.7	98.9	80.6	94.4
19	Mean	28.7	39.2	22.5	25.6	59.5	66.3	39.8
	Sd	19.6	32.4	12.5	6.5	29.7	23.9	4.5
	Min	15.0	10.9	10.0	18.2	26.1	40.1	35.8
	Max	51.1	74.6	35.0	30.4	83.1	87.0	44.7
20	Mean	23.3	14.0	8.6	19.2	8.4	8.0	8.1
	Sd	12.1	9.3	1.6	10.8	2.3	0.2	1.2
	Min	9.3	8.0	7.6	9.6	6.2	7.8	6.7
	Max	31.1	24.8	10.4	30.9	10.7	8.2	8.8

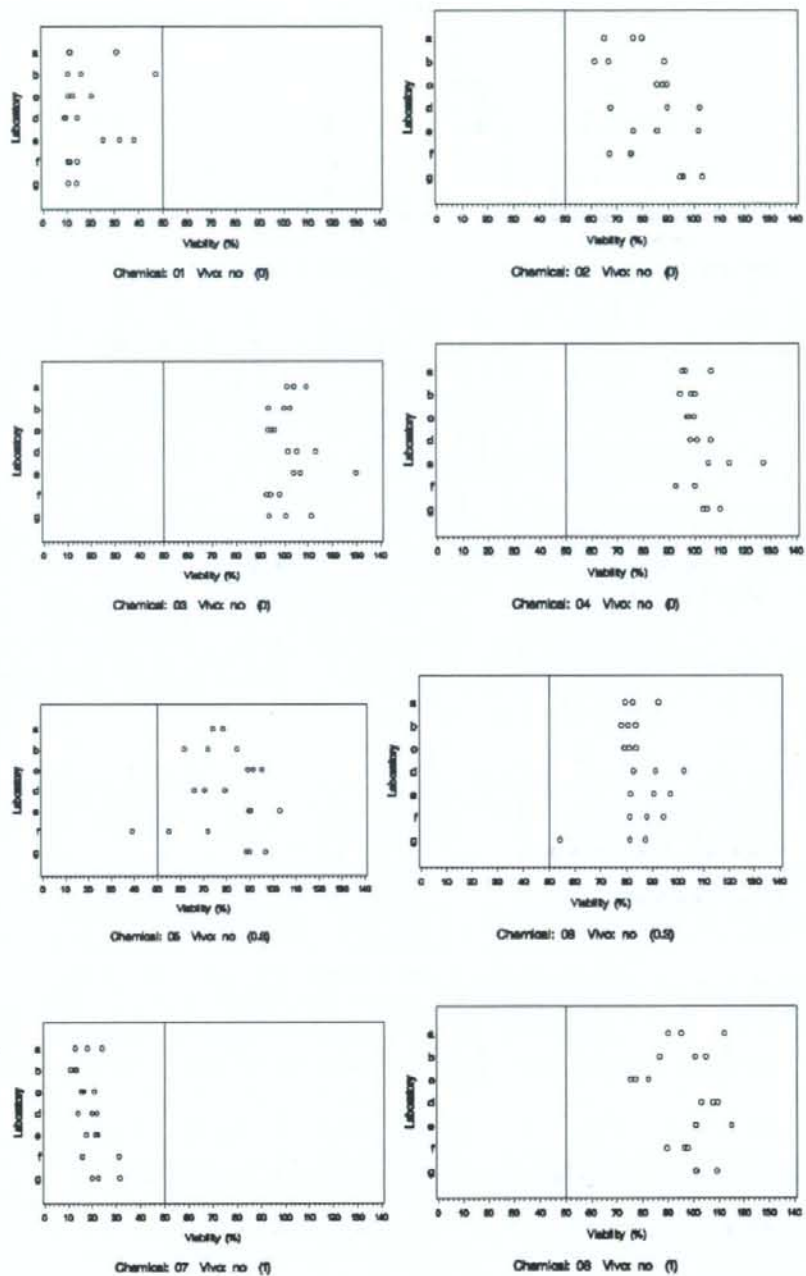


Figure 3. Distribution of the viability for each chemical.

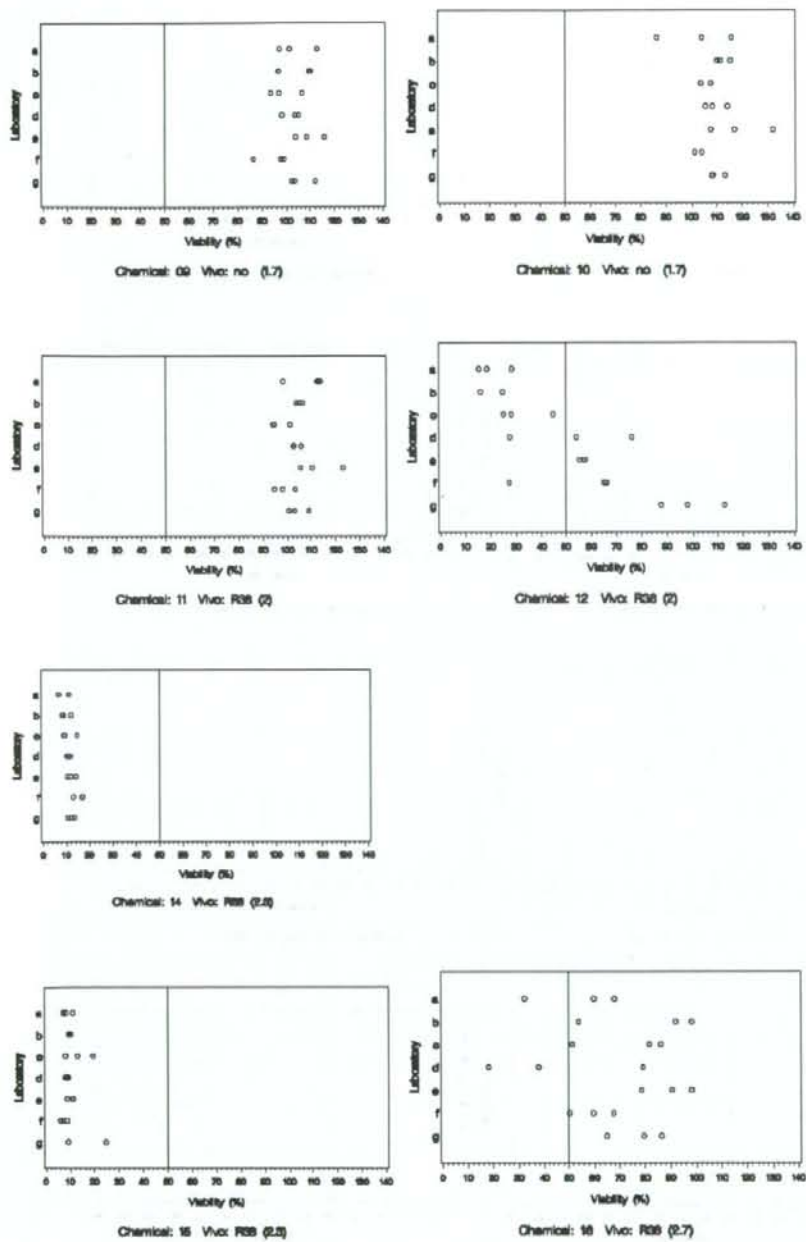


Figure 3. continued

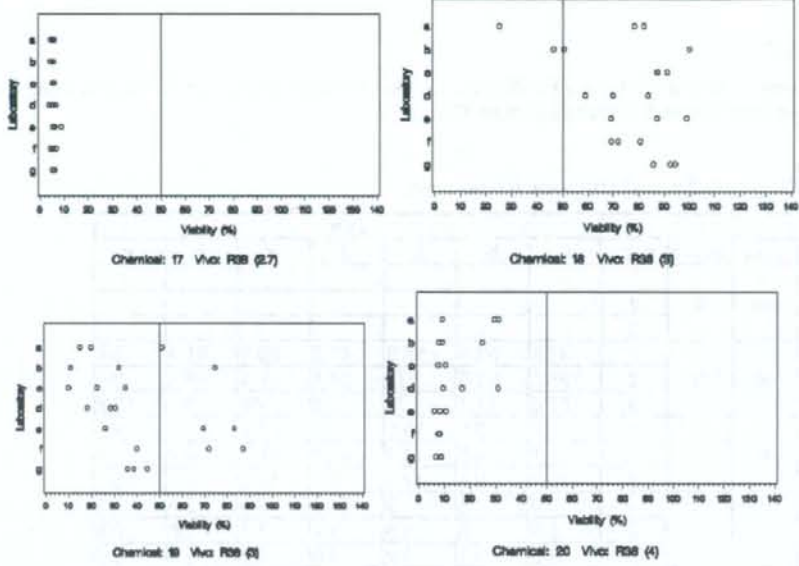


Figure 3. continued.

8-2-5. IL-1 $\alpha$

The results of the LabCyte EPI-MODEL 24 skin irritation test when IL-1 $\alpha$  was evaluated as an indicator are summarized in Table 13.

Table 13. IL-1 $\alpha$  levels from each laboratory.

Chem.	Vivo	Score	Exp.	Lab.							
				a	b	c	d	e	f	g	
01	no	0	1	.	.	.	.	.	.	.	.
			2	.	.	.	.	.	.	.	.
			3	.	.	.	.	.	.	.	.
02	no	0	1	132.8	52.9	59.3	41.2	60.7	61.3	9.4	
			2	68.1	56.5	37	89.1	68.4	99.3	9.6	
			3	97.6	41.1	76	72.4	46	70.1	12.6	
03	no	0	1	12	9.5	15.5	8.6	23.2	12.7	8.1	
			2	7.1	8.6	11.7	19.9	10.5	9.2	11.9	
			3	10.7	10.3	12.9	9.4	11.3	6.7	15.7	
04	no	0	1	10	6	8	11.7	9.5	2.5	6.3	
			2	5.3	8	5.5	13.2	15.1	2.6	8.6	
			3	6.3	4.7	7.2	7.9	9.7	3.4	6.8	
05	no	0.3	1	122	97.6	24.3	81.2	57.7	183.5	15.4	
			2	35.7	63.5	35.1	115.3	36.6		28.5	
			3	44.4	26	31.2	49.4	33	191.6	33.2	
06	no	0.3	1	59	85.7	114	85.6	94.4	60.8	112.5	
			2	62.9	93.6	104.9	139.5	81.4	48.1	62.1	
			3	68.8	85.1	82.9	64.5	52.9	54.8	147.1	
07	no	1	1	.	.	.	.	.	.	.	
			2	.	.	.	.	.	.	.	
			3	.	.	.	.	.	.	.	
08	no	1	1	8.2	9.4	84.1	4.1	6.9	21.4	5.3	
			2	3.6	6.4	31.6	10.4	8.5	4.9	5.8	
			3	6	4.1	33.1	5.2	6.7	2.1	7.2	
09	no	1.7	1	10.9	17.1	11.2	42.6	29.5	33	7.4	
			2	19.8	8.8	8.8	32.2	6.5	25.3	9.7	
			3	31.3	6.8	20.1	21.3	11.2	24.7	10.6	
10	no	1.7	1	27.9	7.4	31.3	41.2	46.5	39.3	9.8	
			2	17.1	12.7	15	50.4	26.7	26.7	14.5	
			3	66.2	12.2	30	42.1	26.3	24.2	13.2	

Table 13. continued.

Chem.	Vivo	Score	Exp.	Lab.						
				a	b	c	d	e	f	g
11	R38	2	1	5	31.1	18	15.3	10.4	16.2	6.4
			2	3.3	11.9	15.8	19	9.7	8.1	7.5
			3	18.2	5	8.9	8.7	8.6	12.6	11.9
12	R38	2	1				157.2	120.4		34.5
			2				113	118.6	90.2	27.3
			3					58.3	66.2	13.6
14	R38	2.3	1							
			2							
			3							
15	R38	2.3	1							
			2							
			3							
16	R38	2.7	1	86.9	68.1	129.4		126.8	116.5	90.8
			2		100.2	74.4	169.7	76.1	107.5	70.9
			3	121.2	42.5	83.6		73.1	87.3	79.2
17	R38	2.7	1							
			2							
			3							
18	R38	3	1	61.5		60.6	90.3	86.9	114.5	18
			2	57.7	104.9	45.8	221.3	98.7	76.4	45.1
			3		17.2	51.4	138.1	63.9	102.2	22.1
19	R38	3	1		57.3			109.2		
			2						69.2	
			3	102.3				68	59.5	
20	R38	4	1							
			2							
			3							

Cells highlighted in yellow indicate that the classification changed based on the IL-1 $\alpha$  data.

### 8-2-6. Classification of three independent viabilities at each laboratory

The classifications of three independent viabilities only evaluated by the MTT assay are shown in Table 14. Classifications of three independent viabilities evaluated by the MTT and IL-1 $\alpha$  assays are shown in Table 13. The IL-1 $\alpha$  results changed the classification for only 5 data points. The percent of changed data is 3.0% (12/399).

Table 14. Classification using three independent viabilities.

Chem.	Vivo	Score	Exp.	Lab.						
				a	b	c	d	e	f	g
01	no	0	1	P	P	P	P	P	P	P
			2	P	P	P	P	P	P	P
			3	P	P	P	P	P	P	P
02	no	0	1	N	N	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	N	N	N	N
			3	N	N	N	N	N	N	N
03	no	0	1	N	N	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	N	N	N	N
			3	N	N	N	N	N	N	N
04	no	0	1	N	N	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	N	N	N	N
			3	N	N	N	N	N	N	N
05	no	0.3	1	P	N	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	N	N	P	N
			3	N	N	N	N	N	N	N
06	no	0.3	1	N	N	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	P	N	N	N
			3	N	N	N	N	N	N	P
07	no	1	1	P	P	P	P	P	P	P
			2	P	P	P	P	P	P	P
			3	P	P	P	P	P	P	P
08	no	1	1	N	N	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	N	N	N	N
			3	N	N	N	N	N	N	N
09	no	1.7	1	N	N	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	N	N	N	N
			3	N	N	N	N	N	N	N
10	no	1.7	1	N	N	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	N	N	N	N
			3	N	N	N	N	N	N	N

P: positive, N: Negative



Table 14. continued.

Chem.	Vivo	Score	Exp.	Lab.						
				a	b	c	d	e	f	g
11	R38	2	1	N	N	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	N	N	N	N
			3	N	N	N	N	N	N	N
12	R38	2	1	P	P	P	P	P	P	N
			2	P	P	P	N	N	N	N
			3	P	P	P	P	N	N	N
14	R38	2.3	1	P	P	P	P	P	P	P
			2	P	P	P	P	P	P	P
			3	P	P	P	P	P	P	P
15	R38	2.3	1	P	P	P	P	P	P	P
			2	P	P	P	P	P	P	P
			3	P	P	P	P	P	P	P
16	R38	2.7	1	N	N	P	P	P	N	N
			2	P	N	N	P	N	N	N
			3	N	N	N	P	N	N	N
17	R38	2.7	1	P	P	P	P	P	P	P
			2	P	P	P	P	P	P	P
			3	P	P	P	P	P	P	P
18	R38	3	1	N	P	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	N	N	N	N
			3	P	N	N	N	N	N	N
19	R38	3	1	P	N	P	P	N	P	P
			2	P	P	P	P	P	N	P
			3	N	P	P	P	N	N	P
20	R38	4	1	P	P	P	P	P	P	P
			2	P	P	P	P	P	P	P
			3	P	P	P	P	P	P	P

Table 15. Classification using the MTT and IL-1 $\alpha$  assay.

Chem.	Vivo	Score	Exp.	Lab.						
				a	b	c	d	e	f	g
01	no	0	1	P	P	P	P	P	P	P
			2	P	P	P	P	P	P	P
			3	P	P	P	P	P	P	P
02	no	0	1	P	N	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	N	N	N	N
			3	N	N	N	N	N	N	N
03	no	0	1	N	N	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	N	N	N	N
			3	N	N	N	N	N	N	N
04	no	0	1	N	N	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	N	N	N	N
			3	N	N	N	N	N	N	N
05	no	0.3	1	P	N	N	N	N	P	N
			2	N	N	N	N	N	P	N
			3	N	N	N	N	N	P	N
06	no	0.3	1	N	N	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	P	N	N	N
			3	N	N	N	N	N	N	P
07	no	1	1	P	P	P	P	P	P	P
			2	P	P	P	P	P	P	P
			3	P	P	P	P	P	P	P
08	no	1	1	N	N	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	N	N	N	N
			3	N	N	N	N	N	N	N
09	no	1.7	1	N	N	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	N	N	N	N
			3	N	N	N	N	N	N	N
10	no	1.7	1	N	N	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	N	N	N	N
			3	N	N	N	N	N	N	N

Table 15. continued.

Chem.	Vivo	Score	Exp.	Lab.						
				a	b	c	d	e	f	g
11	R38	2	1	N	N	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	N	N	N	N
			3	N	N	N	N	N	N	N
12	R38	2	1	P	P	P	P	P	P	N
			2	P	P	P	N	N	N	N
			3	P	P	P	P	N	N	N
14	R38	2.3	1	P	P	P	P	P	P	P
			2	P	P	P	P	P	P	P
			3	P	P	P	P	P	P	P
15	R38	2.3	1	P	P	P	P	P	P	P
			2	P	P	P	P	P	P	P
			3	P	P	P	P	P	P	P
16	R38	2.7	1	N	N	P	P	P	N	N
			2	P	N	N	P	N	N	N
			3	P	N	N	P	N	N	N
17	R38	2.7	1	P	P	P	P	P	P	P
			2	P	P	P	P	P	P	P
			3	P	P	P	P	P	P	P
18	R38	3	1	N	P	N	N	N	N	N
			2	N	N	N	P	N	N	N
			3	P	N	N	P	N	N	N
19	R38	3	1	P	N	P	P	N	P	P
			2	P	P	P	P	P	N	P
			3	N	P	P	P	N	N	P
20	R38	4	1	P	P	P	P	P	P	P
			2	P	P	P	P	P	P	P
			3	P	P	P	P	P	P	P

Cells highlighted in yellow indicate that the classification changed based on the IL-1 $\alpha$  data.

### 8-2-7. Sensitivity, specificity and accuracy

The final classification was decided by a majority vote at each laboratory. With IL-1 $\alpha$ , 4 classifications were changed at Labs. a, d, (2 pieces of data) and f. The sensitivity, specificity and accuracy of each laboratory are shown in Table 16(A), (B) and (C). Total sensitivity, specificity and accuracy are shown in Table 17(A), (B) and (C). In (A), we compared the data from the MTT assay with the EU classification for each chemical. In (B), the data from the MTT assay and IL-1 $\alpha$  were compared with the EU classification for each chemical. In (C), we compared the MTT assay data with the GHS-EU classification for each chemical.

Table 16(A). Sensitivity, specificity and accuracy based on the MTT assay vs. the EU classification.

Index	Lab.						
	a	b	c	d	e	f	g
Sensitivity	6/9	6/9	6/9	6/9	4/9	4/9	5/9
	66.7	66.7	66.7	66.7	44.4	44.4	55.6
Specificity	8/10	8/10	8/10	8/10	8/10	8/10	8/10
	80	80	80	80	80	80	80
Accuracy	14/19	14/19	14/19	14/19	12/19	12/19	13/19
	73.7	73.7	73.7	73.7	63.2	63.2	68.4

Table 16(B). Sensitivity, specificity and accuracy based on the MTT assay and IL-1 $\alpha$  vs. the EU classification.

Index	Lab.						
	a	b	c	d	e	f	g
Sensitivity	7/9	6/9	6/9	8/9	4/9	4/9	5/9
	77.8	66.7	66.7	88.9	44.4	44.4	55.6
Specificity	8/10	8/10	8/10	8/10	8/10	7/10	8/10
	80	80	80	80	80	70	80
Accuracy	15/19	14/19	14/19	16/19	12/19	11/19	13/19
	78.9	73.7	73.7	84.2	63.2	57.9	68.4

Table 16(C). Sensitivity, specificity and accuracy based on the MTT assay vs. the GHS-EU classification.

Index	Lab.						
	a	b	c	d	e	f	g
Sensitivity	5/7	5/7	5/7	6/7	4/7	4/7	5/7
	71.4	71.4	71.4	85.7	55.6	55.6	71.4
Specificity	9/12	9/12	9/12	10/12	10/12	10/12	10/12
	75	75	75	83.3	83.3	83.3	83.3
Accuracy	14/19	14/19	14/19	15/19	14/19	13/19	15/19
	73.7	73.7	73.7	78.9	73.7	68.4	78.9

Table 17(A). Total sensitivity, specificity and accuracy of the MTT assay vs. the EU classification.

		<i>In vivo</i> classification		
		Irritant	Non-irritant	Total
<i>In vitro</i> prediction	Irritant	37	14	51
	Non-irritant	26	56	82
	Total	63	70	133
Sensitivity (%)		58.7		
Specificity (%)		80		
Accuracy (%)		69.9		

Table 17(B). Total sensitivity, specificity and accuracy of the MTT assay and IL-1 $\alpha$  vs. the EU classification.

		<i>In vivo</i> classification		
		Irritant	Non-irritant	Total
<i>In vitro</i> prediction	Irritant	40	15	55
	Non-irritant	23	55	78
	Total	63	70	133
Sensitivity (%)		63.5		
Specificity (%)		78.6		
Accuracy (%)		71.4		

Table 17(C). Sensitivity, specificity and accuracy of the MTT assay vs. the GHS-EU classification.

		<i>In vivo</i> classification		
		Irritant	Non-irritant	Total
<i>In vitro</i> prediction	Irritant	34	17	51
	Non-irritant	15	67	82
	Total	49	84	133
Sensitivity (%)		69.4		
Specificity (%)		79.7		
Accuracy (%)		75.9		

## 9. Discussion

### 9-1. Reliability

The concordance of classification obtained with three independent test runs for the 19 reference chemicals at each laboratory was 91.7% (122/133: 7 labs X 19 chemicals). The addition of IL-1 $\alpha$  data for 14 chemicals decreased this value to 81.2 % (108/133).

The concordance of classification obtained with three independent test runs for the 19 reference chemicals between seven laboratories was 86.5% (115/133). The addition of the IL-1 $\alpha$  data, 80.5% (107/133) did not significantly affect this value. Based on a comparison of the results from the seven laboratories, the classification of 5 chemicals (No. 5, 12, 16, 18 and 19) should be potentially changed. However, the classifications of the remaining chemicals were not changed. The variation of these chemicals is larger than those of others. The IL-1 $\alpha$  data changed the classification for No. 5, 16 and 18 at Lab. f (No. 5), Lab. a (No. 16), and Lab. d (No. 18). The effect of IL-1 $\alpha$  on the reliability of these results is small.

### 9-2. Predictivity

In December 2008, the EU adopted the UN Globally Harmonised System for Classification and Labelling and will implement this using the so-called CLP regulation (11). The new EU classification system based on UN GHS (abbreviated here as "GHS-EU") continues to use two categories to distinguish non-irritant (no-category) from irritant (category 2) substances. However, according to the new rules for skin irritation classification and labelling, the cut-off score to distinguish between no-category and category 2 substances was shifted from a value of 2.0 (EU classification system) to 2.3. Consequently substances with an *in vivo* score between 2.0 and 2.3 that are considered irritant under the existing EU classification system will be considered non-irritants under the future GHS-EU classification system, which does not use the optional UN GHS category 3.

The prediction values of the LabCyte EPI-MODEL 24 skin irritation test when it was evaluated by cell viabilities (MTT) as an indicator, and the EU classifications are shown in Table 17(A). The sensitivity, specificity and accuracy of this prediction model are 58.7%, 80.0%, and 69.9%, respectively. The prediction values of the skin irritation test with LabCyte EPI-MODEL 24 when it was evaluated based on MTT + IL-1 $\alpha$  as an indicator and the EU classifications are shown in Table 17(B). The sensitivity, specificity and accuracy, of this prediction model are 63.5%, 78.6%, and 71.4%, respectively. The effect of IL-1 $\alpha$  on the predictivity was small.

The prediction values of the skin irritation test with LabCyte EPI-MODEL 24 when it was only evaluated by MTT as an indicator and the GHS-EU classification are shown in Table 17(C). The sensitivity, specificity and accuracy of this prediction model are 69.4%, 79.7%, and 75.9%, respectively.

### 9-3. Similarity with EPISKIN

Based on the ECVAM Performance Standards (3), the prediction values of the EPISKIN skin irritation test when it was only evaluated based on MTT or MTT+IL-1 $\alpha$  as indicators were determined and compared with the EU classification. The sensitivity and specificity of the MTT assay are 74.7% and 80.8%, respectively. The sensitivity and specificity of MTT +IL-1 $\alpha$  are 90.7% and 78.8%, respectively. Compared with Table 16(A) and (B), the prediction values of the skin irritation test with LabCyte EPI-MODEL 24 were lower than those of EPISKIN. Therefore, the predictivity of LabCyte EPI-MODEL 24 has no advantages over EPISKIN.

#### 9-4. Proposal

Due to the threshold shift that occurred with the adoption of the UN GHS system in the EU, the reference chemicals of the ECVAM Performance Standards were no longer balanced with an equal representation of irritant versus non-irritant substances in the new ECVAM Performance Standards (12).

To address this and other issues (i.e. global commercial availability, evidence that some substances are non-irritants in human, handling qualities) the reference chemical set was updated. The updated reference chemical list reflects the false-negative and false-positive rates obtained with the EPISKIN method under GHS on the basis of the full set of 58 test substances from the ECVAM skin irritation validation study and allows for the appropriate future validation of modified or similar ("me-too") test methods.

Furthermore, the defined accuracy values (to be included in the ECVAM skin irritation Performance Standards) are derived from the performance of the validated reference method for EPISKIN with the updated reference chemicals under the GHS-EU and on the basis of additional considerations relating to the relevance in the species of interest.

Therefore, it may be necessary to perform additional validation studies according to the reference chemicals in the new ECVAM Performance Standards.

#### 10. Conclusions

Based on the EU classification, 9 irritants (one skin irritant could not be purchased in Japan) and 10 non-irritants in the EPISKIN Performance Standards were tested by the same 7 labs. The assay demonstrated acceptable reliability of the positive control (100%) and accuracy (71% overall accuracy, 64% overall sensitivity, 79% overall specificity) on the MTT assay for use as a stand-alone assay to distinguish between skin irritants and non-irritants. In addition, the IL-1 $\alpha$  endpoint was determined to be unnecessary.

#### 11. Acknowledgements

This validation study has supported by the Health and Labour Sciences Research Grant, Japan.

#### 12. References

- 1) OECD (2002) *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 404: Acute Skin Irritation/Corrosion*. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development.
- 2) United Nations Economic Commission for Europe (2003). *Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Part 3: Health and Environmental Hazards*, pp. 107–228. New York, NY, USA, and Geneva, Switzerland: United Nations Organisation.
- 3) ECVAM statement on the validity of in-vitro tests for skin irritation (2007)
- 4) ECVAM SIVS: Performance standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing (2007)
- 5) OECD (2005) Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34. Available at: [http://www.oecd.org/document/30/0,3343,en\\_2649\\_34377\\_1916638\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/30/0,3343,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html). accessed on 12.02.2008.
- 6) Hartung, T., Bremer, S., Casati, S., Coecke, S., Corvi, R., Fortaner, S., Gribaldo, L., Halder, M., Hoffmann, S., Roi A.J., Prieto, P., Sabbioni, E., Scott, L., Worth, A. and Zuang, V. (2004) A Modular Approach to the ECVAM Principles on Test Validity. *ATLA* 32, 467-72.

- 7) Masakazu Katoh, Fumiyasu Hamajima, Takahiro Ogasawara, and Ken-ichiro Hata (2009) Assessment of the Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to the ECVAM-Validated Protocol, *Journal of Toxicological Science*, accepted
- 8) Rheinwald J.G. and Green H. (1975): Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*, **6**, 331-344
- 9) Green H. (1978): Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: new view. *Cell*, **15**, 801-811.
- 10) OECD (1999) *OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring No 5, Compliance of Laboratory Suppliers with GLP Principles*. Paris, France: Organisation for Economic Cooperation and Development.
- 11) REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006
- 12) ECVAM STATEMENT ON THE PERFORMANCE UNDER UN GHS OF THREE IN-VITRO ASSAYS FOR SKIN IRRITATION TESTING AND THE ADAPTATION OF THE REFERENCE CHEMICALS AND DEFINED ACCURACY VALUES OF THE ECVAM SKIN IRRITATION PERFORMANCE STANDARDS (2009)



### <バリデーション参加施設一覧>

参加施設	所属部署
株式会社愛研	生物課
小林製薬株式会社	研究開発カンパニー 研究開発推進部 テクニカルセンターグループ
財団法人残留農薬研究所	毒性部
株式会社ファンケル	総合研究所 安全性品質研究センター 皮膚科学グループ
富士フイルム株式会社	環境・品質マネジメント部 安全性評価センター
丸石製薬株式会社	中央研究所 第2開発研究部
株式会社薬物安全性試験センター	毒性研究部

### <その他連絡先>

京都大学大学院	医学研究科
医薬品食品衛生研究所	安全性生物試験研究センター 薬理部
ダイセル化学工業株式会社	評価・解析センター
東京理科大学大学院	経営工学科
東京理科大学大学院	理学部第二部 数学科
東京理科大学大学院	理学研究科
株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング	研究開発部

## 培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験のバリデーション研究計画書（案）

2008年2月22日 Ver.1.0

2008年4月24日 Ver.2.0

2008年5月21日 Ver.3.0

### 0. まえおき

本研究は、日本動物実験代替法学会（以下「本学会」という）バリデーション委員会が実行委員会を組織して行うものである。

研究遂行中に本計画書の内容を変更したときは、その度ごとに改訂日、改訂内容、改訂責任者を本計画書に追記する。

### 1. 研究目的

本研究の目的は、培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験で得られる皮膚刺激性の判定が、複数の施設間でどの程度一致するか（施設間再現性）、EPISKIN で得られた判定結果とどの程度一致するか（同等性）、動物実験結果とどの程度一致するか（代替可能性）、という3つの課題への解答を、多施設での実験を通して評価することである。

### 2. 実行組織

本組織の正式名称を「LabCyte EPI-MODEL24 バリデーション研究実行委員会」とし、連絡等での略称は「LabCyte バリ実行委」とし、本計画書内では単に「本実行委」とする。

本実行委は次の委員で構成する。（確定した時点で委員リストを作成して本計画書に添える。）

- 1) 実験参加施設代表：実験参加施設から各1名
- 2) バリデーション委員会委員：若干名
- 3) 技術担当：若干名

実際の委員は、それぞれの組織からの推薦に基づいて本学会バリデーション委員会が決定する。決定の理由及び時点は記録に残すものとする。

研究遂行においては、小島 肇が主任研究者を務める厚生労働科学研究班（H19-医薬一般-003）の協力を得る。

本実行委では以下の役割の担当者を、内部あるいは外部に委嘱し、その氏名を記録しておく。

- ・実行委員長：研究組織と運営・進行を計画通りに行い、最終報告を作成する。
- ・技術研修担当者：技術研修の準備を行い、試験法の内容、プロトコール、記録用紙等の説明を行い、実技指導を行う。
- ・被験物質選考担当者 海外の専門家に打診するとともに、日本での搬入経路、費用などを考慮して本バリデーション研究に最適な被験物質を選定する。
- ・試料等手配担当者：試料をコード化して実験参加施設に、関連する機材と共に送付する。コード表を研究結果が確定して公表されるまで保管する。
- ・実験担当者：（具体的人名は、参加施設から提案）技術研修を受け、試料等手配担当者から送付された試料等を用いて、プロトコールに従った実験を行い、実験結果をデータ解析担当者に送付する。

・データ解析担当者：必要なデータクリーニングを行い、データベースを固定し、データ解析を行う。中間報告会では、解析結果をまとめて報告する。

### 3. 培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験の実験手順

実験担当者は、本実行委で作成した資料1「培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験プロトコル」を用いて、本実行委が用意した試料と指定した機材を用いて、培養皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験による評価実験を行う。

### 4. 研究日程

本実行委は2008年3月末までに参加施設を公募し、実験参加施設代表者としての委員を決定する。

本学会バリデーション委員会は2008年4月末までに研究計画書を確定し、委員会を発足させ、以後の研究遂行を本実行委に委任する。

本実行委は2008年5月末までに技術研修を実施する。

実験担当者は、2008年7月末までに各施設で予備実験を行い、本研究計画書及び、実験プロトコルの改訂についての意見を提出する。本実行委はこれらの意見に基づいて、プロトコルの改訂を行う。さらに、委員となる参加施設代表者を確定する。

実験担当者は2008年9月中旬より実験を開始し、2008年12月末までに実験結果をデータ解析担当者に報告する。

本実行委は2009年1月に中間報告会を開催する。

本実行委は2009年3月末までに報告書をまとめ、最終報告会を開催し、最終報告書を本学会バリデーション委員会に提出する。

### 5. 実験参加施設

実験参加施設は、次の条件を満たすものとする。

- (1) 培養皮膚モデルを用いた実験を実施した実績がある
- (2) 本実行委に本学会会員を施設代表として参加させる。
- (3) 実験において施設に求められる機材（測定器）を用意できる。
- (4) 実験担当者に技術研修を受けさせる。

### 6. 被験物質

被験物質選定担当者は資料2「EPISKIN performance standard」のリストから、既知データに基づいて、皮膚刺激性が弱度、中度、強度のものが含まれるように、最大20被験物質を選定し、選定結果を被験物質割付担当者に知らせる。被験物質割付担当者は割付のデザインを作成し、試料等手配担当者に知らせる。試料等手配担当者は被験物質割付担当者のデザインに基づいて、実験担当者に被験物質が何であるかわからないようにコード化して、関連試料と共に実験参加施設に送付する。

### 7. 被験物質の実験参加施設への割付

本実行委は、被験候補物質の内の12物質を標準被験物質とし、他の施設は残りのすべての被験物質を実験に用いる。被験物質コードと被験物質溶液の配布は、試料等手配担当者が行ってその記録を管理する。

## 8. 試料の準備

試料等手配担当者は、各被験物質を各実験参加施設に関連試料および資料と共に実験参加施設に送付する。

## 9. 経費

本学会バリデーション委員および委員長が依頼した者以外の旅費は実験参加施設等の自弁とする。

本実行委が送付するもの以外の、実験器具・消耗品の費用は、各実験参加施設が負担する。ただし、LabCyte EPI-MODEL24 購入の費用は半額を J-TEC が負担する。

## 10. 技術研修と予備実験

技術研修は、2008年5月15～16日に、株式会社 J-TEC（愛知県蒲郡市）で実施する。実験担当者は、この技術研修を受けなければならない。

技術研修を終わった実験担当者は、自施設で溶媒及び陽性対照物質について予備実験を行い、結果をデータ解析担当者に送付する。

データ解析担当者は、送付されたデータを速やかに検討し、全体の結果を本実行委に報告する。実行委員長は、報告結果を検討し、本実験に進むことについての結論を出し、実験参加施設に通知する。実行委員長が計画変更の必要があると判断したとき、実行委員長は直ちに実行委員会を招集し、計画変更を審議し、滞りない進行を図るものとする。

## 11. データ管理

実験担当者は、以下の記録・結果を所定の記録用紙に記録する。

- (1) 器材の点検記録および陽性対照物質溶液の調製記録
- (2) 被験物質使用記録
- (3) LabCyte EPI-MODEL24 の入荷、管理に関する記録
- (4) 被験物質の適用記録
- (5) 使用試薬、キットの使用に関する記録
- (6) 吸光度測定結果

実験担当者または実験参加施設代表者は、記録用紙の情報を所定の電子ファイル（データシート）に転載し、データシート、および記録用紙のコピーをデータ解析担当者に送付する。記入要領は技術研修会で担当者が説明する。

## 12. データ解析

データ解析担当者はデータの内容についての疑問を各実験者に問い合わせ、クリーニングを行った後に、基本データベースを作成する。データベースには、前節で求められている記録のうち、実験結果の理解に必要なことを全て含める。

データ解析担当者は、研究の目的に沿ったデータ解析を行う。解析では、次の2つを主解析とする。

- (1) 被験物質の吸光度による施設内および間ばらつきの評価
- (2) 過去の生体での実験結果との比較における、感度・特異度・一致度の評価
- (3) EPISKIN との同等性評価