

- (2) Add 10µL of the 10,000pg/mL standard to a tube containing 390µL Standard Diluent Buffer. Label as 250 pg/mL Hu IL-1α. Mix.
- (3) Add 200µL of Standard Diluent Buffer to each of 6 tubes labeled 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, and 3.9 pg/mL Hu IL-1α.
- (4) Make serial dilutions of the standard as described in the following table (Table 3).

Table 3 – Dilution of Hu IL-1α Standard

Standard	Add	Into
250pg/mL	Prepare as described in step (2)	
125pg/mL	250pg/mL standard (200µL)	<u>Standard Diluent Buffer</u> (200µL)
62.5pg/mL	125pg/mL standard (200µL)	<u>Standard Diluent Buffer</u> (200µL)
31.3pg/mL	62.5pg/mL standard (200µL)	<u>Standard Diluent Buffer</u> (200µL)
15.6pg/mL	31.3pg/mL standard (200µL)	<u>Standard Diluent Buffer</u> (200µL)
7.8pg/mL	15.6pg/mL standard (200µL)	<u>Standard Diluent Buffer</u> (200µL)
3.9pg/mL	7.8pg/mL standard (200µL)	<u>Standard Diluent Buffer</u> (200µL)

- (5) Record details in the MDS 6 regarding steps (1) ~ (4).

### 3.2.6.1.2 HRP WORKING DILUTION BUFFER

- (1) Dilute 100x concentrated Streptavidin-Peroxidase (HRP) with HRP Diluent in an appropriate container (e.g. 15mL tube for centrifuge).
- (2) Prepare necessary volume of HRP working buffer depending on the number of wells used in the assay.  
If all of the substances (positive control, negative control, and 20 test chemicals) are to be assayed at a time, the total of 79 wells including 16 wells for standard dilution series are needed. Dilute 120µL of Streptavidin-Peroxidase (HRP) with 12mL of HRP Diluent.
- (3) Record details in the MDS 6 regarding steps (1) and (2).

### 3.2.6.1.3 ELISA WASH BUFFER

- (1) Dilute 1 volume of the 25x wash buffer concentrate with 24 volumes of distilled water (or deionized water) to prepare working wash buffer. The diluted buffer should be used within 14 days.
- (2) Prepare necessary volume of the wash buffer according to the assay design.  
ELISA wash buffer required to wash 1 plate is approximately 400mL.
- (4) Record details in the MDS 6 regarding steps (1) and (2).

### 3.2.6.2 ADDITION OF SAMPLES AND ANTIBODY

- (1) Allow frozen culture supernatant obtained in section 3.2.4.3 to reach room temperature before use if it is preserved in a frozen state.
- (2) Insert the necessary number of 8-well strips (HuIL-1 $\alpha$  Antibody-coated wells) in the frame. Figure 10 shows the allocation to an ELISA plate.


Figure 10 – Allocation to ELISA plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	DW-1	Sample 2-3	Sample 5-2	Sample 8-1	Sample 10-3	Sample 13-2	Sample 16-1	Sample 18-3		
B	IL-1 $\alpha$ 3.9pg/mL	IL-1 $\alpha$ 3.9pg/mL	DW-2	Sample 3-1	Sample 5-3	Sample 8-2	Sample 11-1	Sample 13-3	Sample 16-2	Sample 19-1		
C	IL-1 $\alpha$ 7.8pg/mL	IL-1 $\alpha$ 7.8pg/mL	DW-3	Sample 3-2	Sample 6-1	Sample 8-3	Sample 11-2	Sample 14-1	Sample 16-3	Sample 19-2		
D	IL-1 $\alpha$ 15.6pg/mL	IL-1 $\alpha$ 15.6pg/mL	Sample 1-1	Sample 3-3	Sample 6-2	Sample 9-1	Sample 11-3	Sample 14-2	Sample 17-1	Sample 19-3		
E	IL-1 $\alpha$ 31.3pg/mL	IL-1 $\alpha$ 31.3pg/mL	Sample 1-2	Sample 4-1	Sample 6-3	Sample 9-2	Sample 12-1	Sample 14-3	Sample 17-2	Sample 20-1		
F	IL-1 $\alpha$ 62.5pg/mL	IL-1 $\alpha$ 62.5pg/mL	Sample 1-3	Sample 4-2	Sample 7-1	Sample 9-3	Sample 12-2	Sample 15-1	Sample 17-3	Sample 20-2		
G	IL-1 $\alpha$ 125pg/mL	IL-1 $\alpha$ 125pg/mL	Sample 2-1	Sample 4-3	Sample 7-2	Sample 10-1	Sample 12-3	Sample 15-2	Sample 18-1	Sample 20-3		
H	IL-1 $\alpha$ 250pg/mL	IL-1 $\alpha$ 250pg/mL	Sample 2-2	Sample 5-1	Sample 7-3	Sample 10-2	Sample 13-1	Sample 15-3	Sample 18-2			

- (3) Following the allocation example, add 50 $\mu$ L of standards, Standard Diluent Buffer (blank), and samples to each well.
- (4) Add 50 $\mu$ L of Incubation Buffer into each well.
- (5) Add 50 $\mu$ L of HuIL-1 $\alpha$  Biotin conjugate solution into each well.
- (6) Tap gently on the side of the plate to mix. Cover the plate with a plate cover and incubate for 2 hours at room temperature.
- (7) Open the plate cover, and thoroughly decant solution from wells into an appropriate container (e.g. sterile steel box) and discard the liquid from the plate.  
\*Be careful not to run off the strips from the frame by shaking hard.
- (8) Add 400 $\mu$ L of ELISA wash buffer into each well, gently shake the plate to discard the liquid, and tap harder on the plate above paper towels to remove the ELISA wash buffer left in wells as much as possible.  
Repeat it 4 times to wash wells completely.
- (9) Record details in the MDS 6 regarding steps (1) ~ (8).

### 3.2.6.3 ADDITION OF HRP WORKING DILUTION BUFFER

- (1) Add 100 $\mu$ L of the HRP working solution to each well.
- (2) Cover plate with a plate cover and incubate for 30 minutes at room temperature.
- (3) Open the plate cover, and thoroughly decant solution from wells into an appropriate container (e.g. sterile steel box) and discard the liquid from the plate.  
\*Be careful not to run off the strips from the frame by shaking hard.

Version 5.01	<b>IN VITRO SKIN IRRITATION TEST: HUMAN EPIDERMIS MODEL</b> Model: LabCyte EPI-MODEL 24	Page 15 of 26
August 2008		 Japan Tissue Engineering Co., Ltd.

- (4) Add 400µL of ELISA wash buffer into each well, gently shake the plate to discard the liquid, and tap harder on the plate above paper towels to remove the ELISA wash buffer left in wells as much as possible.

Repeat it 4 times to wash wells completely.

- (5) Record details in the MDS 6 regarding steps (1) ~ (4).

#### 3.2.6.4 CHROMOGENIC REACTION AND STOP SOLUTION

- (1) Add 100µL of Stabilized Chromogen to each well.
- (2) Incubate for 15 minutes at room temperature and in the dark.
- (3) Add 100µL of stop solution to each well. Tap side of plate gently to mix.
- (4) Record details in the MDS 6 regarding steps (1) ~ (3).

#### 3.2.6.5 OD MESUREMENT AND CALCULATION OF IL-1α PRODUCTION

- (1) Read the absorbance of each well at 450 nm using 96-well multi plate reader.
- (2) Draw the standard curve of double logarithm from these absorbance values of the standards.
- (3) Read the IL-1α concentrations for distilled water (negative control) and unknown samples from the standard curve.
- (4) Calculate the IL-1α production from the equation below.

$$\text{IL-1}\alpha \text{ production (pg/tissue)} = \frac{\text{IL-1}\alpha \text{ production for a sample (pg/mL)} \times 1 \text{ (mL: medium amount for post-incubation)}}{1}$$

- (5) Record details in the MDS 6 regarding steps (1) ~ (4).

**[FLOWCHART 1] IL-1 $\alpha$  ELISA ASSAY FLOWCHART**

(1) Add standards, Standard Diluent Buffer (blank), samples (50 $\mu$ L), and Incubation Buffer (50 $\mu$ L).

Add HuIL-1 $\alpha$  Biotin conjugate (50 $\mu$ L)

↓ Incubate for 2 hours at room temperature

(2) Discard the liquids in wells and repeat washing 4 times with ELISA wash buffer (400 $\mu$ L).

Add HRP dilution working buffer (100 $\mu$ L)

↓ Incubate for 30 minutes at room temperature

(3) Discard the liquids in wells and repeat washing 4 times with ELISA wash buffer (400 $\mu$ L).

(4) Add Stabilized Chromogen (100 $\mu$ L)

↓ Incubate for 15 minutes at room temperature and in the dark

(5) Add stop solution (100 $\mu$ L)

(6) Read the absorbance at 450nm

## 4. ASSESSMENT

### 4.1 CONDITIONS FOR SUCCESSFUL STUDY

The skin irritation test should be considered successful if both of the following criteria have been met.

- Tissue viability: mean OD measured value for negative control is  $\geq 0.7$
- Positive control: mean tissue viability for 5% SLS (positive control) is  $\leq 40\%$


### 4.2 ASSAY CRITERIA

The criteria for in vitro interpretation are shown below.

Tissue Viability (primary)	IL-1 $\alpha$ ELISA (secondary)	Classification
Mean tissue viability is $\leq 50\%$	/	Irritant
Mean tissue viability is $> 50\%$		
Mean tissue viability is $> 50\%$	Mean IL-1 $\alpha$ release is $\geq 120\text{pg/tissue}$	Non Irritant
Mean tissue viability is $> 50\%$	Mean IL-1 $\alpha$ release is $< 120\text{pg/tissue}$	

**[FLOWCHART 2] ASSESSMENT FLOWCHART**

- (1) Tissue viability of negative control → (either criterion is not met) → Assay Failure  
 Mean OD measured value  $\geq 0.7$   
Positive control (5% SLS) should be irritant  
 Mean tissue viability  $\leq 40\%$   
 ↓  
 (both criteria are met)
- (2) Assessment of test samples (1° assessment)  
 Mean tissue viability  $\leq 50\%$  → (Yes) → Classified as irritant  
 ↓  
 (No)  
 ↓
- (3) Assessment of test samples (2° assessment)  
 Mean IL-1 $\alpha$  production  $\geq 120\text{pg/tissue}$  → (Yes) → Classified as irritant  
 ↓  
 (No)  
 ↓  
 Classified as non irritant

Version 5.01	<b>IN VITRO SKIN IRRITATION TEST: HUMAN EPIDERMIS MODEL</b> Model: LabCyte EPI-MODEL 24	Page 18 of 26
August 2008		 <b>J-TEC</b> Japan Tissue Engineering Co., Ltd.

**MDS 1:**  
**RECEIPT OF LABCYTE EPI-MODEL24**

施設名: \_\_\_\_\_ 試験名: \_\_\_\_\_ 試験番号: \_\_\_\_\_  
Laboratory name Test name Test No.

1. LabCyte EPI-MODEL24

受領日: \_\_\_\_\_  
Date received

ロット番号: \_\_\_\_\_  
Lot No.

使用期限: \_\_\_\_\_  
Expiration date (MM/DD/YYYY)

付属品: アッセイ培地 30mL  (ロット番号: \_\_\_\_\_ 使用期限: \_\_\_\_\_)  
Accessories Assay medium, 30mL Lot No. Expiration date (MM/DD/YYYY)  
 24 ウェルアッセイプレート   
24 well assay plate

特記事項 Note

2. アッセイ培地  
Assay medium

受領日: \_\_\_\_\_  
Date received

ロット番号: \_\_\_\_\_  
Lot No.

使用期限: \_\_\_\_\_  
Expiration date (MM/DD/YYYY)

特記事項 Note

記録日: \_\_\_\_\_ 試験担当者: \_\_\_\_\_ 確認日: \_\_\_\_\_ 試験責任者: \_\_\_\_\_  
Date (MM/DD/YYYY) Operator Check date (MM/DD/YYYY) Study director

事務局確認 確認日: \_\_\_\_\_ 氏名: \_\_\_\_\_  
Secretariat Check date (MM/DD/YYYY) Name

**MDS 2:**

**PRE-INCUBATION OF LABCYTE EPI-MODEL24 (Section 3.2.1)**

施設名: \_\_\_\_\_ 試験名: \_\_\_\_\_ 試験番号: \_\_\_\_\_  
Laboratory name Test Name Test No.

1. アッセイ培地を温め、24 ウェルアッセイプレート第 1 行に 0.5mL ずつ添加する。

Warm up the assay medium and add 0.5mL of the assay medium in wells of the 1<sup>st</sup> line of 24-well assay plate.

アッセイ培地: \_\_\_\_\_ (ロット番号: \_\_\_\_\_ 使用期限: \_\_\_\_\_)  
Assay medium Lot No. Expiration date (MM/DD/YYYY)

約 30 分間加温 To warm for 30 min.

0.5mL ずつ添加 To add 0.5mL of assay medium to each well

プレート数: \_\_\_\_\_  
Number of plate(s)

2. 培養表皮モデルを取り出し、24 ウェルアッセイプレート第 1 行に移す。

Transfer culture inserts to wells of the 1<sup>st</sup> line of 24-well assay plate.

LabCyte EPI-MODEL24: (ロット番号: \_\_\_\_\_ 使用期限: \_\_\_\_\_)  
Lot No. Expiration date (MM/DD/YYYY)

作業日時: \_\_\_\_\_  
Operation date (MM/DD/YYYY) and time

培養カップ底面に気泡が無いことを確認   
To confirm that there is no bubble under the cell culture insert.

3. CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れ、被験物質暴露まで一晩静置する。

LabCyte EPI-MODEL24 is cultured in CO<sub>2</sub> incubator overnight.

培養開始日時: \_\_\_\_\_  
Time/date or culture start (MM/DD/YYYY)

被験物質暴露予定日時: \_\_\_\_\_  
Planned time/date of test substance treatment

**特記事項** Note

記録日: \_\_\_\_\_ 試験担当者: \_\_\_\_\_ 確認日: \_\_\_\_\_ 試験責任者: \_\_\_\_\_  
Date (MM/DD/YYYY) Operator Check date (MM/DD/YYYY) Study director

事務局確認 確認日: \_\_\_\_\_ 氏名: \_\_\_\_\_  
Secretariat Check date (MM/DD/YYYY) Name

**MDS 3-1:**
**APPLICATION OF TEST SUBSTANCES, RINSING AND POST-INCUBATION (Section 3.2.2 ~ 3.2.3)**

施設名: \_\_\_\_\_ 試験名: \_\_\_\_\_ 試験番号: \_\_\_\_\_  
 Laboratory name Test name Test No.

**1. 陽性対照物質の調製 Preparation of positive control.**

SLS の秤量 \_\_\_\_\_ mg 調製量 \_\_\_\_\_ mL 作業日時: \_\_\_\_\_  
 Weight of SLS Preparation vol. Operation date (MM/DD/YYYY)

**2. アッセイ培地を温め、24 ウェルアッセイプレート第3行に 1.0mL ずつ添加する。**

Warm up the assay medium and add 1.0mL of the assay medium in wells of the 3<sup>rd</sup> line of 24-well assay plate.  
 アッセイ培地: \_\_\_\_\_ (ロット番号: \_\_\_\_\_) 使用期限: \_\_\_\_\_  
 Assay medium Lot No. Expiration date (MM/DD/YYYY)  
 約 30 分間加温  1.0mL ずつ添加  作業日時: \_\_\_\_\_  
 To warm for 30 min. To add 1.0mL of assay medium. Operation time/date (MM/DD/YYYY)

**3. 被験物質を適用する。**

Apply test substances on the LabCyte EPI-MODEL24.  
 作業開始日時: \_\_\_\_\_ 作業終了日時: \_\_\_\_\_  
 Time/date of operation started (MM/DD/YYYY) Time/date of operation done (MM/DD/YYYY)

**4. 暴露 15 分後、培養表皮モデルを洗浄し、24 ウェルアッセイプレート第3行に移す。**

After treatment of test substance for 15 min., wash out the LabCyte EPI-MODEL24 transfer the culture inserts to the 3<sup>rd</sup> line of 24-well assay plate.  
 PBS: \_\_\_\_\_ (ロット番号: \_\_\_\_\_) 使用期限: \_\_\_\_\_  
 Lot No. Expiration date (MM/DD/YYYY)  
 作業開始日時: \_\_\_\_\_ 作業終了日時: \_\_\_\_\_  
 Time/date of operation started (MM/DD/YYYY) Time/date of operation done (MM/DD/YYYY)  
 培養カップ底面に気泡が無いことを確認 To confirm that there is no bubble under the cell culture insert.

**5. 被験物質情報 Information of test substance**

被験物質コード番号 Test substance code No.	ロット番号 Lot No.	物理的性状 Physical state	適用量 Test substance vol.(weight) (秤量記録 weighting)	適用時刻 Application time	暴露時間 Treatment period (15分 15min.)
注射用水 (陰性対照) Distilled Water (Negative control)		液体 Liquid	25 L L	:	<input type="checkbox"/>
5% SLS (陽性対照) (Positive control)		液体 Liquid	25 L L	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
		液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>

記録日: \_\_\_\_\_ 試験担当者: \_\_\_\_\_ 確認日: \_\_\_\_\_ 試験責任者: \_\_\_\_\_  
 Date (MM/DD/YYYY) Operator Check date (MM/DD/YYYY) Study director

事務局確認 確認日: \_\_\_\_\_ 氏名: \_\_\_\_\_  
 Secretariat Check date (MM/DD/YYYY) Name



**MDS 3-2:**

**APPLICATION OF TEST SUBSTANCES, RINSING AND POST-INCUBATION**  
(Section 3.2.2~3.2.3)

施設名: \_\_\_\_\_ 試験名: \_\_\_\_\_ 試験番号: \_\_\_\_\_  
Laboratory name Test name Test No.

5. 被験物質情報 Information of test substance

被験物質コード番号 Test substance code No.	物理的性状 Physical state	適用量 Test substance vol.(weight) (秤量記録 weighing)	適用時刻 Application time	暴露時間 Treatment period (15 ⇒ 15min.)
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>
	液体、粘性液体、固体 Liquid, viscous, solid	25μL, ( mg, mg, mg)	:	<input type="checkbox"/>

6. CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れ、42 時間後培養する。

Culture LabCyte EPI-MODEL24 in CO<sub>2</sub> incubator for 42 hrs.

後培養開始日時: \_\_\_\_\_

Time/date of post-incubation started (MM/DD/YYYY)

後培養終了予定日時: \_\_\_\_\_

Time/date post-incubation done (MM/DD/YYYY)

<p>特記事項 Note</p>
------------------

記録日: \_\_\_\_\_ 試験担当者: \_\_\_\_\_ 確認日: \_\_\_\_\_ 試験責任者: \_\_\_\_\_  
Date (MM/DD/YYYY) Operator Check date (MM/DD/YYYY) Study director

事務局確認 確認日: \_\_\_\_\_ 氏名: \_\_\_\_\_  
Secretariat Check date (MM/DD/YYYY) Name

**MDS 4:**  
**MTT ASSAY AND MEDIA SAMPLING (Section 3.2.4)**

施設名: \_\_\_\_\_ 試験名: \_\_\_\_\_ 試験番号: \_\_\_\_\_  
Laboratory name Test name Test No.

1. MTT 培地の調製 Preparation of MTT medium  
調製量 \_\_\_\_\_ mL ロット番号 \_\_\_\_\_ 調製日時: \_\_\_\_\_  
Preparation vol. Lot No. Operation time/date (MM/DD/YYYY)

2. MTT 培地を温め、24 ウェルアッセイプレート第 4 行に 0.5mL ずつ添加する。  
Warm up the MTT medium and add 0.5mL of the MTT medium in wells of 4th line of 24-well assay plate.  
MTT 培地: (ロット番号: \_\_\_\_\_ 使用期限: \_\_\_\_\_)  
MTT medium Lot No. Expiration date (MM/DD/YYYY)  
約 30 分間加温  0.5mL ずつ添加  作業日時: \_\_\_\_\_  
To warm for 30 min. To add 0.5mL of the MTT medium. Operation time/date (MM/DD/YYYY)

3. 後培養終了後、培養表皮モデルを 24 ウェルアッセイプレート第 4 行に移す。  
After post-incubation, the LabCyte EPI-MODEL24 transfer to wells of 4th line of 24-well assay plate.  
作業開始日時: \_\_\_\_\_ 作業終了日時: \_\_\_\_\_  
Time/date of operation started (MM/DD/YYYY) Time/date of operation done (MM/DD/YYYY)  
培養カップ底面に気泡が無いことを確認 To confirm that there is no bubble under the cell culture insert.

4. 24 ウェルアッセイプレート第 3 行の培養上清全量を、1.5mL マイクロチューブにサンプリングする。  
Transfer the whole amount of the culture supernatant at the 3<sup>rd</sup> line of 24-well assay plate to 1.5mL microtube.  
サンプリング Collection of culture supernatant.   
作業日時: \_\_\_\_\_  
Operation time/date (MM/DD/YYYY)

5. CO<sub>2</sub> インキュベーターに入れ、3 時間 MTT 反応を行う。  
LabCyte EPI-MODEL24 culture overnight in CO<sub>2</sub> incubator for 42 hrs.

**MTT 反応時間情報** Information of MTT reaction periods.

被験物質コード番号 Test substance code No.	ロット番号 Lot No.	MTT 反応 開始時刻 At start MTT reaction	MTT 反応 終了時刻 At end MTT reaction	被験物質コード番号 Test substance code No..	ロット番号 Lot No.	MTT 反応 開始時刻 At start MTT reaction	MTT 反応 終了時刻 At end MTT reaction
注射用水 (陰性対照) Distilled Water (Negative control)		:	:			:	:
5% SLS (陽性対照) (Positive control)		:	:			:	:
		:	:			:	:
		:	:			:	:
		:	:			:	:
		:	:			:	:
		:	:			:	:
		:	:			:	:
		:	:			:	:
		:	:			:	:

特記事項 Note

記録日: \_\_\_\_\_ 試験担当者: \_\_\_\_\_ 確認日: \_\_\_\_\_ 試験責任者: \_\_\_\_\_  
Date (MM/DD/YYYY) Operator Check date (MM/DD/YYYY) Study director  
事務局確認 確認日: \_\_\_\_\_ 氏名: \_\_\_\_\_  
Secretariat Check date (MM/DD/YYYY) Name

**MDS 5:**  
**FORMAZAN EXTRACTION AND MEASUREMENT (Section 3.2.5)**

施設名: \_\_\_\_\_ 試験名: \_\_\_\_\_ 試験番号: \_\_\_\_\_  
Laboratory name Test name Test No.

- MTT 反応終了後、培養皮膚をピンセットでつまんで取り出し、1.5mL チューブに移す。  
After MTT reaction, pick up the cultured epidermis from the cell culture insert and put in 1.5mL microtube.  
スカルペルの使用 Did you use a scalpel for cutting out of cultured epidermis?   
作業日時: \_\_\_\_\_  
Operation time/date (MM/DD/YYYY)
- イソプロパノール 300μL を入れて培養表皮モデルを完全に浸漬する。  
Add isopropanol (300μL) add in microtube and the cultured epidermis is embedded in isopropanol.  
イソプロパノール ロット番号 \_\_\_\_\_ 300μL 添加   
Lot No. To add isopropanol (300μL).  
培養表皮モデルを完全に浸漬 Embedded the cultured epidermis in isopropanol.   
作業日時: \_\_\_\_\_  
Operation time/date (MM/DD/YYYY)
- 冷暗所で一晚以上静置し、色素を抽出する。 Allow microtube to stand at cold and dark space for MTT formazan extraction.  
冷暗所に静置 Place microtube at cold and dark space
- 抽出液 (200μL) を 96 ウェルプレートの各ウェルに入れる。  
Extract solution (200μL) is transferred to each well of 96-well plate.  
抽出液 200μL を 96 ウェルプレートに移す To be transferred 96-well plate.   
作業日時: \_\_\_\_\_  
Operation time/date (MM/DD/YYYY)

96 ウェル割り付け記録 Sample location on 96-well plate.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	フランク blank											
B	注射用水-1 Distilled Water-1											
C	注射用水-2 Distilled Water-2											
D	注射用水-3 Distilled Water-3											
E	5% SLS-1 *											
F	5% SLS-2											
G	5% SLS-3											
H												

- 570nm、及び 650nm の吸光度を測定し、570nm の吸光度から 650nm の吸光度を差し引いた値を測定値とする。 Analyze extracts OD at 570nm and 650nm, and calculated the OD(570nm-650nm).  
570nm、及び 650nm の吸光度を測定 To analyze OD at 570nm and 650nm.   
測定値 (570nm 吸光度-650nm の吸光度) を計算 To calculate the OD(570nm-650nm).   
測定値から生細胞率を計算 To calculate cell viability.   
生細胞率を別途配布するファイルに転記 Input cell viability is input to the data sheet.   
データシートをプリントアウトして裏面に貼付 The data sheet is stuck on this back of the sheet.   
転記ミスがないことを確認 Check of input error.   
作業日時: \_\_\_\_\_  
Operation time/date. (MM/DD/YYYY)

特記事項 Note

記録日: \_\_\_\_\_ 試験担当者: \_\_\_\_\_ 確認日: \_\_\_\_\_ 試験責任者: \_\_\_\_\_  
Date (MM/DD/YYYY) Operator Check date (MM/DD/YYYY) Study director

事務局確認 確認日: \_\_\_\_\_ 氏名: \_\_\_\_\_  
Secretariat Check date (MM/DD/YYYY) Name

**MDS 6:**  
**MEASUREMENT OF IL-1α RELEASE (Section 3.2.6)**

施設名: \_\_\_\_\_ 試験名: \_\_\_\_\_ 試験番号: \_\_\_\_\_  
 Laboratory name Test Name Test No.

IL-1□ ELISA kit: (ロット番号: \_\_\_\_\_) 使用期限: \_\_\_\_\_  
 Lot No. Expiration date (MM/DD/YYYY)

1. IL-1□標準液 (希釈系列) の調製 Preparation of IL-1□ standard  
 IL-1□ Standardの希釈 □ 希釈系列の作製 □ 作業日時: \_\_\_\_\_  
 Resolved IL-1a conc. Preparation of Standard Sol. Operation time/date (MM/DD/YYYY)

2. HRP 希釈液の調製 Preparation of HRP solution  
 使用ウェル数 \_\_\_\_\_ ウェル 調製量 \_\_\_\_\_ mL 作業日時: \_\_\_\_\_  
 Well No. used present assay Vol. of preparation Operation time/date (MM/DD/YYYY)

3. ELISA 洗浄液の調製 Preparation of wash buffer  
 使用ウェル数 \_\_\_\_\_ ウェル 調製量 \_\_\_\_\_ mL 作業日時: \_\_\_\_\_  
 Well No. used present assay Vol. of preparation Operation time/date (MM/DD/YYYY)

4. 培養上清、被験物質の添加 To add unknown samples  
 検体、標準品添加 □ Incubation buffer の添加 □ HuL-1α Biotin conjugate の添加 □  
 To add unknown samples or standard To add incubation buffer To add HuL-1αBiotin conjugate  
 静置開始日時: \_\_\_\_\_ 静置終了時刻: \_\_\_\_\_  
 Date/time of incubation started (MM/DD/YYYY) Time of incubation done

96 ウェル割り付け記録 Sample location on 96-well plate

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	blank	blank	注射用1-1 Distilled Water-1									
B	IL-1□ 3.9pg/mL	IL-1□ 3.9pg/mL	注射用1-2 Distilled Water-2									
C	IL-1□ 7.8pg/mL	IL-1□ 7.8pg/mL	注射用1-3 Distilled Water-3									
D	IL-1□ 15.6pg/mL	IL-1□ 15.6pg/mL										
E	IL-1□ 31.3pg/mL	IL-1□ 31.3pg/mL										
F	IL-1□ 62.5pg/mL	IL-1□ 62.5pg/mL										
G	IL-1□ 125pg/mL	IL-1□ 125pg/mL										
H	IL-1□ 250pg/mL	IL-1□ 250pg/mL										

5. HRP 希釈液の添加 To add HRP diluent  
 HRP 希釈液添加 To add HRP solution □  
 静置開始時刻: \_\_\_\_\_ 静置終了時刻: \_\_\_\_\_  
 Time of incubation started Time of incubation done

6. 基質による発色と反応停止 To add substrate and to add stop solution  
 反応開始時刻: \_\_\_\_\_ 反応終了時刻: \_\_\_\_\_  
 Time of incubation started Time of incubation done

7. 吸光度測定と IL-1□産生量の計算 To analyze OD and calculation of IL-1□ concentration  
 450nm の吸光度を測定 To analyze at absorbance (450nm) □  
 吸光度を別途配布するデータシートに転記 Raw data is input to the data sheet. □  
 データシートをプリントアウトして裏面に貼付 The data sheet is stuck on this back of the seat. □  
 転記ミスがないことを確認 Check of input error. □  
 作業日時: \_\_\_\_\_  
 Operation time/date (MM/DD/YYYY)


特記事項 Note

記録日: \_\_\_\_\_ 試験担当者: \_\_\_\_\_ 確認日: \_\_\_\_\_ 試験責任者: \_\_\_\_\_  
 Date (MM/DD/YYYY) Operator Check date (MM/DD/YYYY) Study director

事務局確認 確認日: \_\_\_\_\_ 氏名: \_\_\_\_\_  
 Secretariat Check date (MM/DD/YYYY) Name

## REVISION HISTORY

Rev.	Content	Date Revised
Ver.1	1) First version	27/02/2008
Ver.2	1) Revised clerical error.	28/02/2008
Ver.3	1) Revised the post-incubation time and assessment criteria in compliant with the EpiSkin method described in "Performance Standards for Applying Human Skin Models to in vitro Skin Irritation Testing" 2) Added photos and figures for instruction.	17/03/2008
Ver.4	1) Added MDS 1~6. 2) Added instruction and operational steps regarding the IL-1 $\alpha$ ELISA kit. 3) Added subsections "Delivery of LabCyte EPI-MODEL24" and "Instruction For Use of LabCyte EPI-MODEL24" to Section 2. 4) Added in Section 2 the description regarding test substances. 5) Added in Section 2 the description of materials provided by J-TEC separately from other materials. 6) Stated the calculation procedures specifically in Section 3.2.5.2 "OPTICAL DENSITY MEASUREMENTS OF EXTRACTS".	15/05/2008
Ver.4.1	1) Moved scalpel from Section 2.4 "MATERIALS PROVIDED BY J-TEC" to Section 2.5 "MATERIALS NOT PROVIDED WITH THE J-TEC KITS". 2) Removed the description regarding how to operate procedures by oneself. 3) Moved IL-1 $\alpha$ ELISA reagents from Section 3.1 "PREPARATIONS" to Section 3.2 "STUDY METHODS". 4) Added a flowchart of IL-1 $\alpha$ ELISA procedures. 5) Changed from "in the cold dark place" to "in the cold dark place (or refrigerator)" regarding formazan extraction. 6) Added a description of "ultrasonic cleaning equipment or vortex mixer" as an example of MTT dissolution method. 7) Changed the treatment period column from entering actual time to checkboxes in the MDS 3.	21/05/2008
Ver.5.0	1) Corrected typos of the section number for IL-1 $\alpha$ ELISA reagents. 2) Removed a space of lot numbers for SLS in the MDS 3.	27/08/2008

Version 5.01	<b>IN VITRO SKIN IRRITATION TEST: HUMAN EPIDERMIS MODEL</b> Model: LabCyte EPI-MODEL 24	Page 26 of 26
August 2008		 Japan Tissue Engineering Co., Ltd.

	<ol style="list-style-type: none"> <li>3) Removed a space of lot numbers for PBS in the MDS 3.</li> <li>4) Added a space of lot numbers for isopropanol in the MDS 5.</li> <li>5) Added a checkbox about using a scalpel when removing tissues in the MDS 5.</li> <li>6) Added a space of lot numbers for IL-1<math>\alpha</math> ELISA kit in the MDS 6.</li> <li>7) Changed the applicable parts of product codes and kit components in Section 2.2, with the change of IL-1<math>\alpha</math> ELISA kit types to 96test only.</li> <li>8) Decrease the volume by half to 10mL and changed the storage condition from within 1 month to within 24 hours in Section 3.1.2 "POSITIVE CONTROL SUBSTANCE".</li> <li>9) Added the manufacturers and product codes of 24-well plate and 96-well plate in Section 2.4 "MATERIALS PROVIDED BY J-TEC".</li> <li>10) Added specific time frames for incubation or culturing.</li> <li>11) Added the conditions for successful study in Section 4 "ASSESSMENT"</li> <li>12) Changed the specific method of applying liquids in Section 3.2.2.2 "APPLICATION OF TEST SUBSTANCES".</li> <li>13) Added descriptions in English in the MDSs.</li> <li>14) Changed the application time interval from 1minute to 1~3minute(s).</li> <li>15) Numbered figures and flowcharts.</li> <li>16) Increase the size of spaces for lot numbers in the MDSs.</li> <li>17) Changed spaces of dates from MM/DD to MM/DD/YYYY.</li> <li>18) Added director check date, study director, secretariat check date and name at the end of each MDS.</li> <li>19) Changed the size of matrixes for sample allocation to 96-well plate in the MDS 5 &amp; 6.</li> <li>20) Changed the test substance name to test substance code in the MDS 3 &amp; 4.</li> <li>21) Divided the MDS 3 into MDS 3-1 and 3-2, and added spaces of date, operator, check date, study director at the end of the MDS 3-1, and spaces of laboratory name, test name and test no. at the beginning of the MDS 3-2.</li> </ol>	
--	--	--

## 2) 皮膚刺激性試験代替法の第三者評価

### 研究要旨

欧州代替法バリデーションセンター (ECVAM) 科学諮問委員会の非理事会メンバー (ESAC) によって承認された培養表皮モデル EPISKIN を用いた皮膚刺激試験代替法の評価結果は、R38 表示による化学物質の分類を予測する *in vitro* 試験として有用な方法であることが確認された。

また、日本製の培養表皮モデルである LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激試験代替法は、EPISKIN と同等の性能を持つものと判断され、本試験法が、OECD テストガイドライン No. 404 に基づく、GHS 表示における category II とそれ以下の 2 段階の識別が可能であると判断された。

### A. 研究目的

欧州代替法バリデーションセンター

(ECVAM) で行われた第26 回会議 (2007 年4月26 日) において、ECVAM 科学諮問委員会の非理事会メンバー (ESAC) によって提出された培養表皮モデル EPISKIN を用いた皮膚刺激試験代替法が承認された。

ESAC の評価は、欧州で1998 年から開始された、ウサギによる皮膚一次刺激性試験結果を予測できる試験法探索のために、ECVAM 皮膚刺激タスクフォースから提出されたバリデーション報告書をもとに実施されている。このバリデーションの目的は、現在行われている欧州での化学物質の皮膚刺激性分類表示である R38 表示 (EU classification system: 皮膚刺激性物質を R38 として分類表示し、非刺激性物質を表示しない) の *in vitro* 試験による予測評価である。

一方、ECVAM が承認した培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法と類似の試験法として開発され、Japan Tissue Engineering Co., Ltd. (J-TEC) より提案された培養表皮モデルである LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法についても評価した。

### B. 研究方法

皮膚刺激性評価委員会委員

委員長

岡本裕子 (コーセー)

委員

寒水孝司 (大阪大学)

森本隆史 (住友化学)

杉林堅次 (城西大)

鹿庭正昭 (国立医薬品食品衛生研究所)

赤松浩彦 (藤田保健衛生大学)

吉田真由美 (ポーラファルマ)

### B-3) 方法

培養表皮モデル EPISKIN を用いた皮膚刺激

試験代替法については、ESAC の statement および論文をもとに、評価を実施した。本評価は昨年度実施されたが、JaCVAM 評価会議より、IL (インターロイキン) -1 $\alpha$  を用いない場合の再評価の指示を受け、再度 MTT アッセイのみの値を用いて再評価したものである。

一方、LabCyte EPI-MODEL24 においては、日本動物実験代替法学会において実施されたバリデーション報告書および背景報告書をもとに評価された。

### C. 結果および考察

本委員会では、ESAC が評価した資料について検証・確認を行い、EPISKIN に対して以下の結論を得た。

- ① ウサギによる皮膚一次刺激性試験が、人の皮膚の損傷を評価するのに対し、本試験法ではヒト細胞を用いた三次元培養モデルを用いることから、代替試験として科学的に妥当である。
- ② この方法は、OECD テストガイドライン No. 404 を代替するものと明記されており、試験法適用の目的が化学物質の皮膚刺激表示 R38 (2 段階) および GHS (3 段階) の表示の識別評価に用いるためと明記されている。
- ③ 試験プロトコールは、表皮モデルへの試験物質暴露方法とその細胞毒性評価にいたる詳細なプロトコールが存在している。またその内容も本試験が正確に実施できるようなものであると判断できる。
- ④ ESAC の評価において、追加された IL-1 $\alpha$  の放出測定は、バリデーション評価が終了していない点、その改善効果がわずかであり、あくまでも補助的な位置づけにとどまることから、MTT 還元法による評価を基本として評価し、

IL-1 $\alpha$ の放出測定は参考データとして取り扱うのが妥当と判断された。その場合でも、結果の再現性、予測性、信頼性は妥当であった。

- ⑤ OECD の Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (No. 34)に基づいてバリデーションがなされている。
- ⑥ 培養表皮モデルの製造に関し、生産施設の監査が実施され、品質確認されている。
- ⑦ バリデーションマネージメントチームが組織され、その中に生物統計の専門家が含まれている。
- ⑧ バリデーション結果が専門家に評価されている点から得られたデータの信頼性・質・正確性は国際水準を満たしていると判断できる。
- ⑨ データ解析の結果から、施設内再現性・施設間再現性に問題はないものである。
- ⑩ 58種の試験試料は、in vivo データが入手できる既存の信頼できる3つのデータベースに登録されているものから選択されており、選択基準は妥当である。陰性コントロールは PBS、陽性コントロールは 0.5%SDS が設定されている。

以上より、培養表皮モデル EPISKIN を用いた皮膚刺激試験代替法の承認に関する ESAC の評価結果を検討した結果、IL-1 $\alpha$ の放出測定は、バリデーション評価が終了していない点、その改善効果わずかであり、あくまでも補助的な位置づけにとどまることから、MTT 還元法による評価を基本として評価し、IL-1 $\alpha$ の放出測定は参考データとして取り扱うのが妥当と判断された。MTT 還元法だけで評価した場合でも、結果の再現性、予測性、信頼性は妥当であったことから、本試験法が、OECD テストガイドライン No. 404 に基づく R38 表示による化学物質の分類を予測する代替法として有用性が確認された。

また、LabCyte EPI-MODEL24 についても、

- ① 本試験法はすでに承認されている培養表皮モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法と類似の試験法である。使用された表皮モデルはヒトケラチノサイトか

ら再構築されており、その機能と細胞毒性発現メカニズムおよびその性能は同等であることからこれを皮膚刺激性試験代替法として用いることは科学的に妥当である。

- ② この方法は、すでに承認された試験法と同様、OECD テストガイドライン No. 404 を代替するものであり、試験法適用の目的は、化学物質の GHS 表示における皮膚刺激識別の category II とそれ以下を識別することにある。
- ③ 試験プロトコールは、表皮モデルへの試験物質暴露方法とその細胞毒性評価について適切なプロトコールが存在しており、その試験法は、既存試験法とほとんど同じで、本試験が正確に実施できる。IL-1 $\alpha$ の放出測定の追加は、改善効果がわずかであり、かつ、MTT 還元法による評価で良好な結果がえられていることから、最終プロトコールからは削除されている。
- ④ 試験において、陽性対照物質 (5%SDS) および陰性対照 (注射用蒸留水) が設定されている。予測モデルには、細胞生存率を用いており、既存試験法と同様に、細胞生存率 50%以下となる化学物質を category II と評価している。
- ⑤ バリデーション評価結果の採用基準 (陰性対照の OD は 0.7 以上、陽性対照の細胞生存率は 40%未満) が明示されている。
- ⑥ OECD の Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (No. 34)に基づいてバリデーションがなされている。
- ⑦ LabCyte EPI-MODEL24 は、OECD GLP Consensus Document No. 5 に従い、製造ロット毎に MTT 法による組織生存率とバリア機能の確認による品質管理が行われている。
- ⑧ バリデーションマネージメントチームが組織され、その中に生物統計の専門家が含まれている。
- ⑨ データ解析により、施設内再現性・施設間再現性には、おおむね問題はないものである。
- ⑩ 使用した 25 種の試験試料は、ECVAM が作成した「再構築皮膚モデルを用いた



in vitro 皮膚刺激性試験法に関する performance standards」を基に選択されている。これらは、in vivo データが入手できる既存の信頼できる3つのデータベースに登録されているものから選択されており、かつ、GHS表示における category II と no category に識別される試験試料をバランスよく含んでいることから選択基準は妥当である。

- ⑪ 試験の予測性は、ECVAMが作成した「培養上皮モデルを用いた in vitro 皮膚刺激性試験法に関する performance standards」で設定されている一致性に関する値、特異度 (specificity): 70%、感度 (sensitivity): 80%、精度 (overall accuracy): 75% を満たしており、その予測性は妥当なものであった。

#### D. 結論

以上より、培養表皮モデル EPISKIN および

LabCyte EPI-MODEL24を用いた皮膚刺激試験代替法は、化学物質の分類を予測する in vitro 試験として有用な方法であることが確認された。

なお、LabCyte EPI-MODEL24を用いた皮膚刺激試験代替法の第三者評価については、日本動物実験代替法学会に依頼した成果である。

#### E. 資料

- 資料 2-1 ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法の第三者評価報告書
- 資料 2-2 ヒト皮膚モデル『LabCyte EPI-MODEL 24』を用いた皮膚刺激性試験代替法の第三者評価報告書 ver. 4
- 資料 2-3 LabCyte EPI-MODEL24評価英文要旨

## ヒト皮膚モデルを用いた皮膚刺激性試験代替法の第三者評価報告書

評価対象:3次元皮膚モデル EPISKINに関するESACのstatementの評価

### 皮膚刺激性試験代替法の第三者評価委員会

評価委員長	岡本裕子（株式会社コーセー）
委員	赤松浩彦（藤田保健衛生大学）
	鹿庭正昭（国立医薬品食品衛生研究所）
	杉林堅次（城西大学）
	寒水孝司（大阪大学）
	森本隆史（住友化学株式会社）
	小島 肇（国立医薬品食品衛生研究所）
オブザーバー	実川節子（日本ロレアル株式会社）
	鳥島 久（倉敷紡績株式会社）
	森川訓行（ゲンゼ株式会社）
	久野智弘（東洋紡）
	山口達也（東洋紡）

## 要旨

欧州代替法バリデーションセンター(ECVAM)で行われた第 26 回会議(2007 年 4 月 26 日)において、ECVAM 科学諮問委員会の非理事会メンバー(ESAC)によって提出された 3 次元皮膚モデル EPISKIN を用いた in vitro 皮膚刺激試験法の承認に関する ESAC の statement について評価した。

ESAC の評価は、欧州で 1998 年から開始された、ウサギによる皮膚一次刺激性試験結果を予測できる試験法探索のための ECVAM 皮膚刺激タスクフォースから提出された正式バリデーション報告書をもとに実施されている。

このバリデーションの目的は、現在行われている欧州での R38 表示(EU classification system: 皮膚刺激性物質を R38 として分類表示し、非刺激性物質を表示しない)による化学物質の分類を in vitro 試験が予測できるかどうかを評価することであった。

3 次元ヒト皮膚モデル EPISKIN を用いた in vitro 皮膚刺激試験法の概要は、試験物質を皮膚の表面に 15 分接触させ、更に 42 時間培養後、MTT の還元を用いた組織生存率を測定し、50% 生存率を識別点として刺激性を識別するものである。バリデーションにおいて、良好な結果が得られたことから、ESAC は、3 次元ヒト皮膚モデルである EPISKIN を用いた試験法が、ウサギ皮膚刺激性を予測するため、また R38 表示を区別する目的で使用される Draize 皮膚刺激性試験(OECD TG 404 および EU 危険物指令 Directive 67/548/EEC の付属 Annex V に記載の試験法 B.4)を代替する、信頼性があり適切なスタンド・アローンの試験法であると評価した。

また、特異性を損なわずに感受性を向上させる可能性があるという理由で、IL-1 $\alpha$  の放出測定による判定を追加することが、MTT 還元法で得られた陰性判定を確定するために有効な補助法であると判断している。

本委員会では、ESAC が評価した資料について検証・確認を行い、以下の結論を得た。

- ① ウサギによる皮膚一次刺激性試験が、人の皮膚の損傷を評価するのに対し、本試験法では人細胞を用いた三次元モデルを用いることから、代替試験として科学的に妥当である。
- ② この方法は、OECD の TG404 を代替するものと明記されており、試験法適用の目的が化学物質の皮膚刺激表示 R38(2 段階)及び GHS(3 段階)の表示の識別評価に用いるためと明記されている。
- ③ 試験プロトコールは、皮膚モデルへの試験物質暴露方法とその細胞毒性評価にいたる詳細なプロトコールが存在している。またその内容も本試験が正確に実施できるようなものであると判断できる。
- ④ ESAC の評価において、追加された IL-1 $\alpha$  の放出測定は、バリデーション評価が終了していない点、その改善効果わずかであり、あくまでも補助的な位置づけにとどまることから、MTT 還元法による評価を基本として評価し、IL-1 $\alpha$  の放出測定は参考データとして取り扱うのが妥当と判断された。その場合でも、結果の再現性、予測能力、信頼性は妥当であった。
- ⑤ OECD の Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment (No.34)に基づいてバリデーションがなされている。
- ⑥ ヒト皮膚モデルの製造に関し、生産施設の監査が実施され、品質確認されている。
- ⑦ バリデーションマネージメントチームが組織され、その中に生物統計の専門家が含まれている。

- ⑧ バリデーション結果が専門家に評価されている点から得られたデータの信頼性・質・正確性は国際水準を満たしていると判断できる。
- ⑨ データ解析において、施設内変動性、施設間変動性について評価しており、施設内再現性・施設間再現性に問題はないものである。
- ⑩ 58種の試験資料は、in vivo データが入手できる既存の信頼できる3つのデータベースに登録されているものから選択されており、選択基準は妥当である。陰性コントロールはPBS、陽性コントロールは0.5%SDSが設定されている。
  
- ⑪ 以上より、3次元皮膚モデル EPISKINを用いた in vitro 皮膚刺激試験法の承認に関するESAC の評価結果を検討した結果、ESAC の評価で追加された IL-1 $\alpha$  の放出測定は、バリデーション評価が終了していない点、その改善効果わずかであり、あくまでも補助的な位置づけにとどまることから、MTT 還元法による評価を基本として評価し、IL-1 $\alpha$  の放出測定は参考データとして取り扱うのが妥当と判断された。MTT 還元法だけで評価した場合でも、結果の再現性、予測能力、信頼性は妥当であったことから、~~納得できるものであることが確認され、~~本試験法が、OECDTG404に基づくR38表示による化学物質の分類を予測する in vitro 試験として有用な方法であることが確認された。