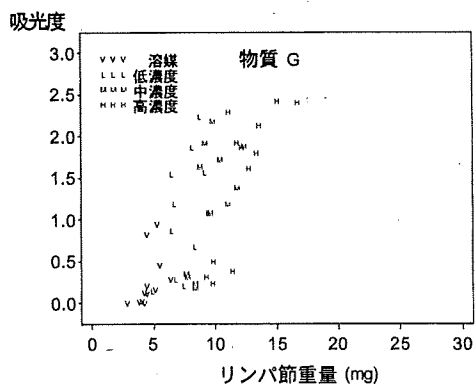
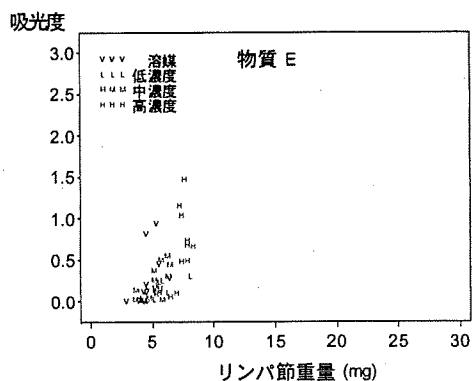
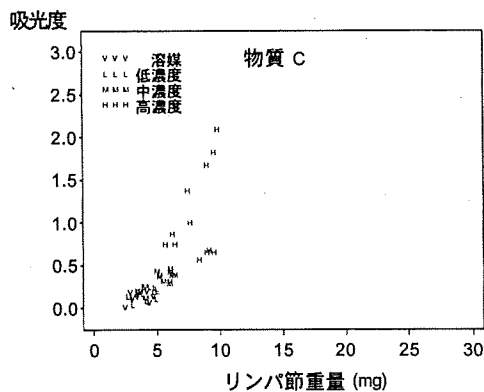
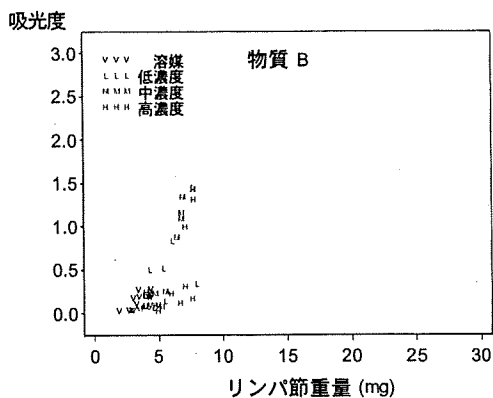


図3. 各施設におけるBrdU取り込み量（吸光度の分布）

3.4.3 リンパ節重量とBrdU取り込み量の関係

リンパ節重量と吸光度の関係を評価できる物質の結果のみを図4に示す。リンパ節重量と吸光度の間に直線的な関係があるものもあったが、直線関係にないと考えられる物質も認められた。被験物質の影響が強いほどリンパ節重量は増加するので吸光度とリンパ節重量の間に直線的な関係がない場合には、各施設で適切な操作が実施されなかったことを示している。



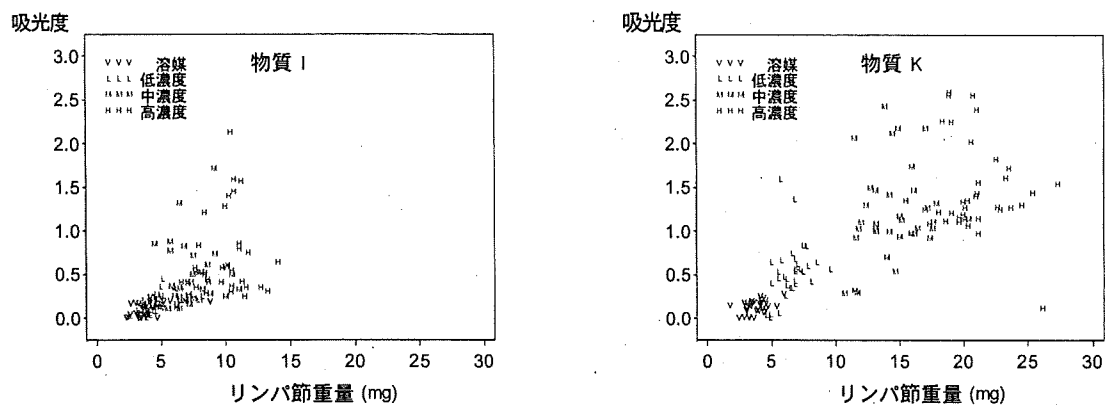


図4. 吸光度とリンパ節重量の関係

3.5 LLNA-BrdU の分析感度

本報告書では、分析感度を陽性対照物質が適切に陽性と判定される能力と定義した。図5、図6 にそれぞれ予備実験、本実験における各実験の陽性対照物質のSI 値とその95%信頼区間を示す。

予備試験および本試験ともいずれも陽性と判定する基準値であるSI 値2を超えていた。しかし、SI値の範囲は予備試験の平均値が2~6であるのに対し、本試験では2~30に上がっていた。この結果からも予備試験と本試験間で施設内および施設間差が極めて大きいと考えられた。

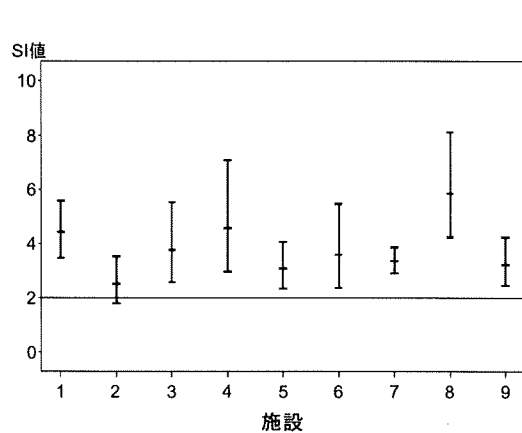


図5. 予備試験のSI値

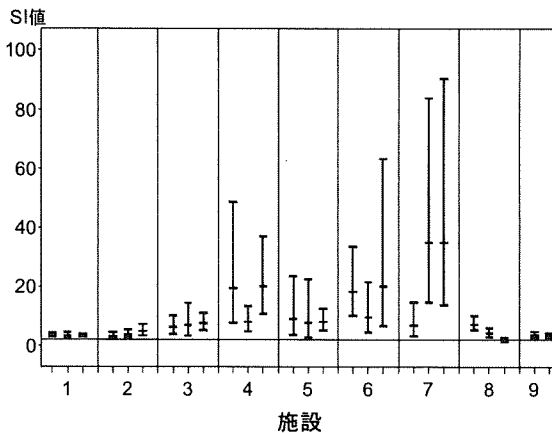
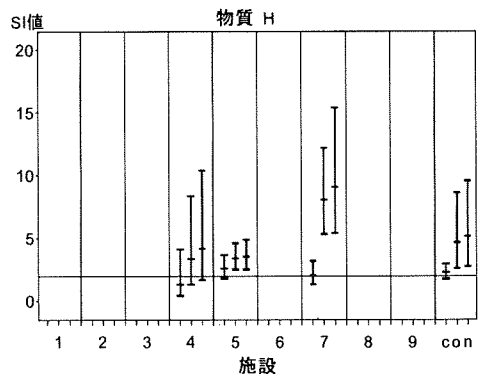
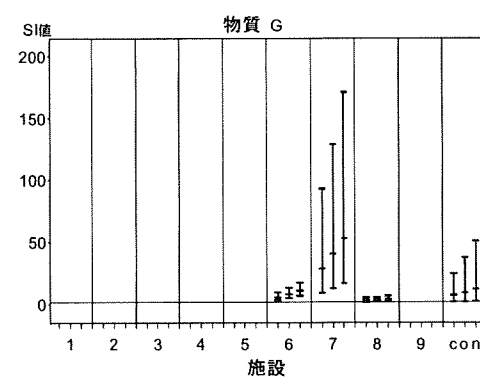
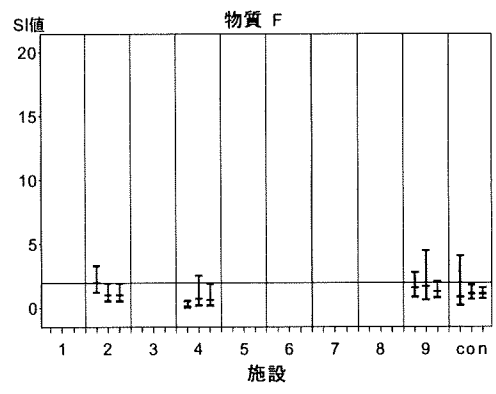
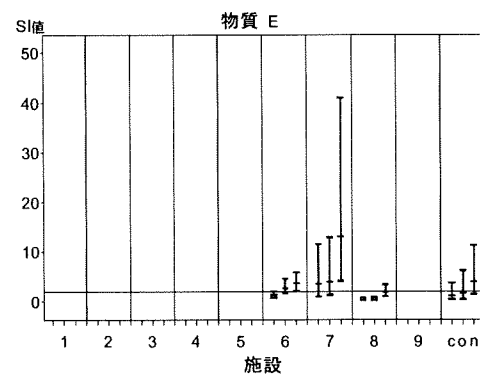
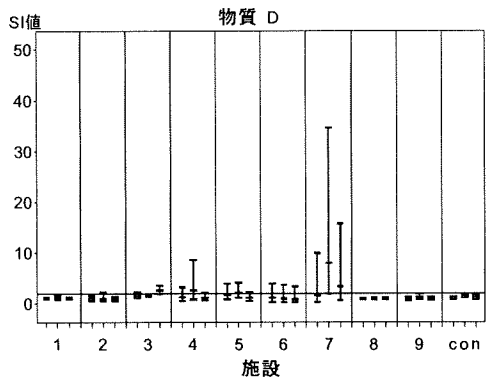
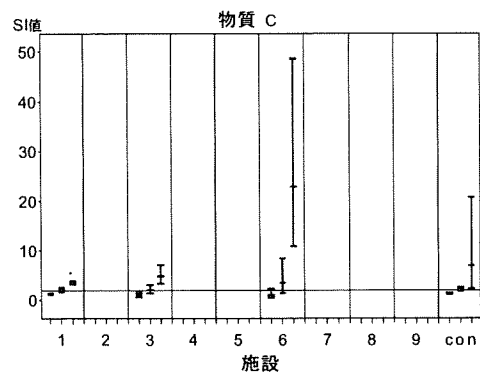
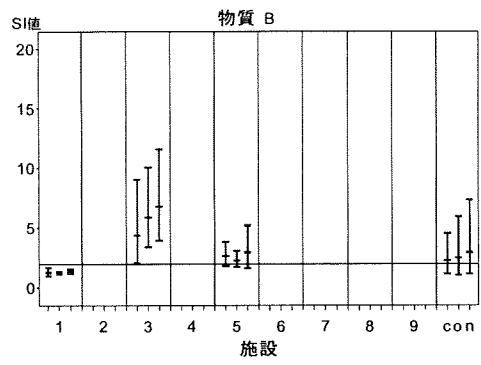
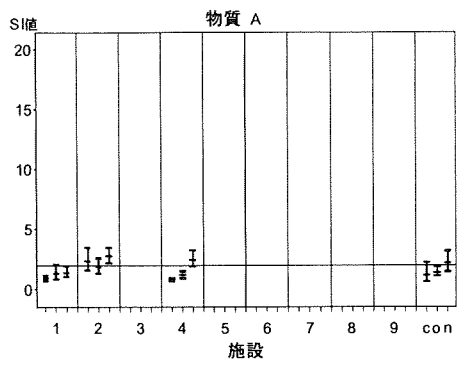


図6. 本試験のSI値

3.6 各被験物質の用量反応関係

図7 にSI 値の用量反応関係を示す。図中con と示されているのは、メタ・アナリシスによるSI 値の重み付き平均を示している。

ほとんどの物質において、各施設のSI値の信頼区間が大きく、正當に評価されていないと判断した。



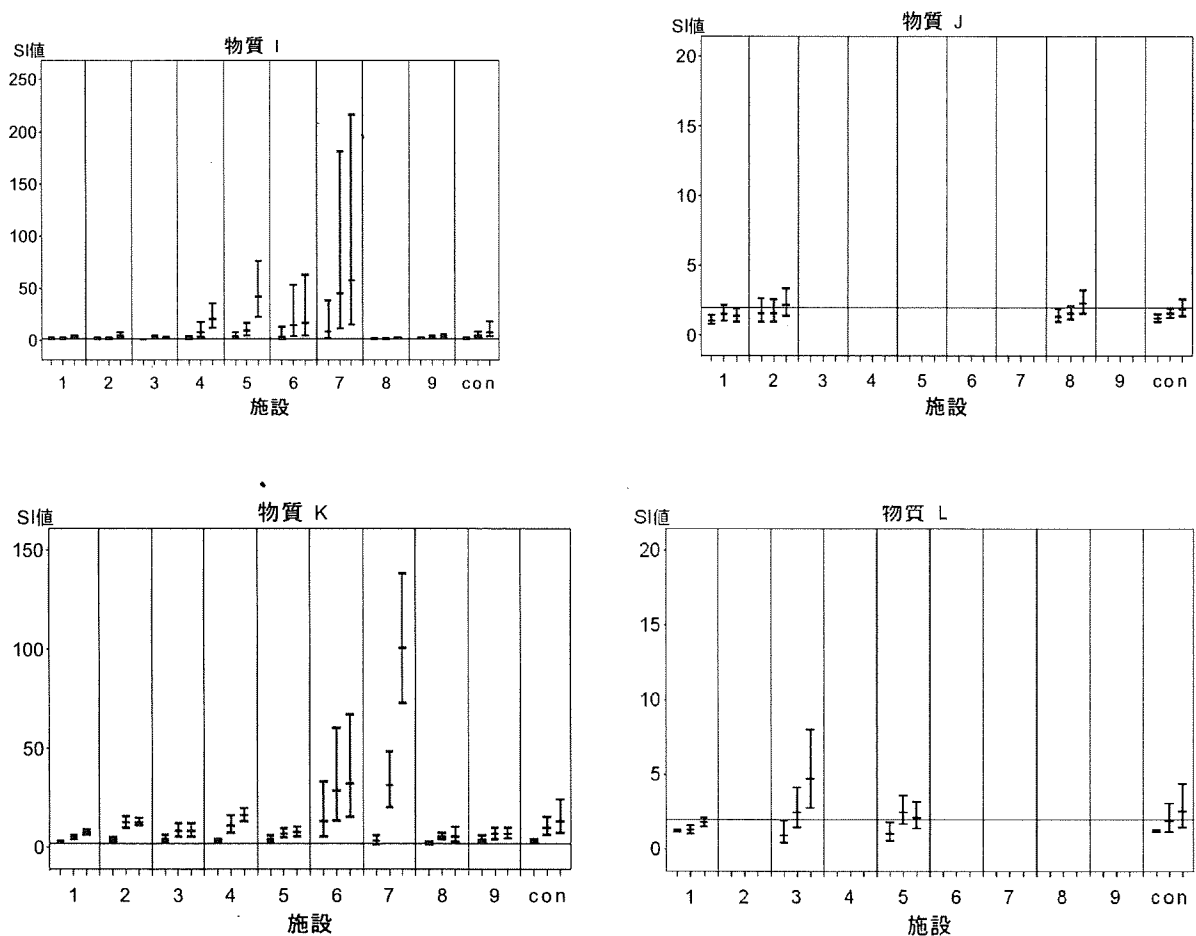


図7. 物質毎に各施設のSI値

3.7 施設内再現性

図5, 図6の結果からほとんどの物質において, 各施設のSI値の信頼区間が大きく, 施設間再現性が良好ではないことが明らかになった。

3.8 施設間再現性

図5～7の結果からほとんどの物質において, 各施設のSI値の信頼区間が大きく, 施設間再現性が良好ではないことが明らかになった。

3.9 代替可能性

この検討を行う以前の問題が解決されていないことから, 比較は実施しなかった。

対象となる試験法であるGPMT/BT 法, LLNA 法の感作性の判定結果は, Haneke ら (2001) とGerberick ら (2004) の文献の値を用いる予定であったが, 比較しなかった。対象となる試験法との対応性として, GPMT/BT 法を基準としたが, やはり比較は実施しなかった。

4. 考察

4.1 本研究の位置付け

OECD (2005) のガイドライン34 の用語集には, Catch-up バリデーション研究とは” A validation study for a test method that is structurally and functionally similar to a previously validated reference

test method. The candidate test method should incorporate the essential test method components included in performance standards developed for the reference test method and should have comparable performance when evaluated using the reference chemicals provided in the performance standards” であると記載されている。

LLNA-BrdU 法はLLNA 法におけるエンドポイントの改良法であり、両試験法の原理は同じである。そして、本研究に用いた被験物質は、LLNA 法の性能を評価するために実施された被験物質を用いた。したがって、本バリデーション研究は、上記のCatch-up バリデーション研究に該当するといえると考えた。

4.2 本研究の妥当性

4.2.1 本研究で評価したLLNA-BrdU 法の特徴

本研究で評価した試験法であるLLNA-BrdU法は、感作性の評価に関する原理はLLNA 法と同じである。LLNA-BrdU 法の特徴は、エンドポイントをBrdUの取り込み量としてキットを用いて吸光度の測定とすることである。吸光度の測定操作は極めて簡便であり、測定結果は迅速に得ることができる。また、再測定が可能である。

4.2.2 被験物質の選択

本研究では、既知のデータが豊富でLLNA 法での実験結果がわかっている20の被験物質のリスト(資料4)の中から12 被験物質を選択した。LLNA 法による文献のEC2 値に基づき感作性を3 段階(無(negative), 弱(weak, moderate), 強(strong, extreme))に分類した場合、12 被験物質の感作性の内訳は、無が4 物質、弱が4 物質、強が4 物質であり、試験物質の選択は妥当と考えた。ブラインドされた被験物質を配布者が事前に調製して送付した理由として、①予備試験なしで使用動物数を抑え、②各被験物質の同一濃度での結果を比較すること、③適用濃度から感作性の強度を予測できないようにする、④溶媒の選択、溶解または懸濁方法の統一化、⑤複数被験物質における用事調製操作の簡便化、ミスの削減が大きな目的であった。そのため、①選択物質も安定性が高いものになった、②実験開始の1週間前に調整し、DMSOを溶媒とする被験物質を除いて冷蔵で送付し、使用までの冷蔵保管を徹底した、③実験時の状態確認および溶解、均一懸濁液の調整を徹底した。結果として、被験物質の安定性を疑問視する声もLLNA-BrdUバリ実行委の中からも上がったが、長短所を比較して事前調整が選択された。また、LLNA-DAバリデーションにおいて溶媒でプラスチック容器が溶けたとの反省をもとに、すべての被験物質溶液はガラス瓶に入れたものが配布された。

表4に示すように、被験物質によっては析出、懸濁などの記録が残されたが、施設間でかけ離れた対処を行っていないことを事後の聞き取り調査などで確認した。

4.2.3 試験法の普及

施設間差を少なくするために、本研究では、技術研修会を実施し、陽性対照物質を用いた予備実験を行い、データシートを作成してデータの入力フォーマットを統一した。被験物質名は遮蔽されていたにもかかわらず、9施設という規模で実施された3 つの被験物質および陽性対照物質の施設間再現性は良好でなかったため、これらの配慮は結果に反映されなかった。

4.2.4 データの質に関して

実施可能性の面から、本研究では、完全なGLP (good laboratory practice) に対応した実験を実施できなかった。しかしながら、データの質を担保するために以下に記載するような配慮をした。

実験についての記録用紙(資料7)を作成した。記録用紙には実験担当者・実験責任者のもとの、機器の校正・作動確認、使用液・試薬の使用について、動物への適用、実験時間が記録され、各施設に残され

ている。これらの記録は試料等手配担当者およびデータ解析担当者ですべて確認作業が行われ、不備については聞き取り調査を実施し、すべての内容を確認した。

測定値がこの研究のために準備された一定の書式のデータシート（資料8）に正しく記録されているかどうかを確認するために、データクリーニングが行われ、実験中にデータシートのプリントアウトに入力されたデータと入力されたファイルとの値の整合性が確認された。なお、このデータシートは入力規制機能を用いて、不適切な値が入らないように設計された。なお、各施設から集められたデータシートの電子ファイルは、プログラムにより一括して読み込まれ、データベースが作成されている。

4.2.5 個々の被験物質に対する考察

バラツキのない方法の改善が必要なことから、個々の物質について考察しない。

4.3 本研究の限界と今後の課題

本方法は、希釈によって再測定が可能である利点を持つが、これがバラツキを大きくし、結果として施設間差を大きくしてしまった。この研究のSOPでは溶媒群での平均吸光度が0.2を超える場合には細胞液を希釈して測定を行うことと決めていたが、ブランク値を差し引くことおよび下限は決めていなかった。このため希釈しすぎた場合には、細胞がなくなり吸光度が0に近い値を取る施設が現れた（資料11参照）。SI値は、被験物質群と溶媒群のBrdU量取り込み量の比で定義されるので、溶媒群の吸光度が0に近くなると、極端に大きな値をとることになる。これが施設間差の大きかった一因であると考えられた。

実験操作によるバラつきが大きかった点に対して、LLNA-BrdUバリ実行委にて議論し、特に以下の点について対応策、改善点が決まった。

- ① 生理食塩液の容量は実施施設で事前に至適条件を検討の後、変更することが出来るが、陰性対照ウェルの吸光度が0.1-0.2となる条件を採用する。この範囲にあることを実験の成立条件とする。
- ② AOO群または溶媒群の平均吸光度が0.2を超えた場合には細胞浮遊液を更に希釈後、再測定を行う。0.1を下回った場合には解析対象から外す。なお、予め数段階の希釈懸濁液（5～15ml 懸濁液を調整し、生理食塩液で希釈した浮遊液）を調製し、同時に測定を行っても構わないが、その際には実験成立条件を満たす1データのみを採用する。
- ③ ブランクは差し引く
- ④ その他、実験者から上がってきた試験操作法の問題点もSOPに追記する（BrdU腹腔内投与、懸濁液の調整、洗浄・乾燥操作など）

さらに本研究にはいくつかの限界がある。それらについても記載する。

・被験物質について

本研究で評価に用いた被験物質数はわずか12物質のみである。特に代替可能性の検討では、1物質の結果の評価の違いが、感度などの指標に大きく影響してしまう。

・本研究特有の事項

本研究では、各被験物質はあらかじめ調製されて実験施設に送付された。このため被験物質の析出が認められた物質について各実験施設で改めて調製を行うことはできなかった。しかし、通常の実験では、析出等が認められた場合に再度被験物質の調製が実施されるであろう。本研究ではこの点が結果に与える影響について把握できない。用事調整でないことから、物質の安定性についてはデータがない限り反論できない。

・実験施設

本研究を遂行するにあたり、実験施設はLLNA法もしくはその改良法の実験経験のある施設を選んだ。

LLNA-DA法バリデーションから続く試験法への慣れが、推測での選択につながった可能性もある。

5. 結論

本研究で実施した12の被験物質の濃度範囲で得られた結果はLLNA法と比較してバラツキが大きく、試験法の改良が必要であると結論した。検討結果としては、吸光度で測定する溶媒のBrdU取り込み量の大きさにSI値が大きく依存すること、ブランクに関する処置が不明確であったこと、希釈の影響が十分にわかっていなかったことが考えられ、これらを反映させるべきである。

謝辞

本研究は厚生労働科学研究「動物実験代替法の開発と利用に関する調査研究」班、日本動物実験代替法学会の協力を得ました。本研究に対する理解と支援に感謝いたします。

本研究は、多くの方の協力を得ました。彼らの協力なしでは本研究を行うことができませんでした。以下の方々に心より感謝致します。

上森健至（ダイセル化学工業株式会社）、山岸学（ダイセル化学工業株式会社）、山下邦彦（ダイセル化学工業株式会社）、小濱とも子（国立医薬品食品衛生研究所）、古谷真美（財団法人食品薬品安全センター）、森村智美（財団法人食品薬品安全センター）、志田勝彦（財団法人食品薬品安全センター）、白石啓二（財団法人化物質評価研究機構）、飯田憲二（財団法人化物質評価研究機構）、東原信彦（財団法人化物質評価研究機構）、正門孝臣（住友化学株式会社）、後藤浩彦（大塚製薬株式会社）、白石明（明治製菓株式会社）、織原由佳里（大正製薬株式会社）、山崎紀世（大正製薬株式会社）、小宮千春（富士フイルム株式会社）、吉野幸江（富士フイルム株式会社）、藤島敦（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）、竹原広（財団法人食品農医薬品安全性評価センター）

参考文献

- Basketter, DA., Scholes, E. W., Kimber, I., Botham, P. A., Hilton, J., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C. and Waite, S. J. (1991) Interlaboratory evaluation of the local lymph node assay with 25 chemicals and comparison with guinea pig test data. *Toxicology Methods* 1, 30-43.
- Basketter, DA. and Scholes, E. W. (1992) Comparison of the local lymph node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. *Food and Chemical Toxicology* 30, 65-69.
- Basketter, DA., Gerberick, G. F., Kimber, I. and Loveless, S. E. (1996) The local lymph node assay: a viable alternative to currently accepted skin sensitization tests. *Food and Chemical Toxicology* 34, 985-997.
- Basketter, DA., Gerberick, G. F. and Kimber, I. (1998) Strategies for identifying false positive responses in predictive skin sensitization tests. *Food and Chemical Toxicology* 36, 327-333.
- Basketter, DA., Lea, L. J., Cooper, K. J., Ryan, C. A., Gerberick, G. F., Dearman, R. J. and Kimber, I. (1999) Identification of metal allergens in the local lymph node assay. *American Journal of Contact Dermatitis* 10, 207-212.
- Basketter, DA., Lea, L. J., Dickens, A., Briggs, D., Pate, I., Dearman R. J. and Kimber I. (1999) A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node

- assay dose responses. *Journal of Applied Toxicology* 19, 261-266.
- Basketter, DA., Blaikie, L., Dearman, R. J., Kimber, I., Ryan, C. A., Gerberick, G. F., Harvey P., Evans, P., White, I. R. and Rycroft, R. J. G. (2000) Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42, 344-348.
- Basketter, DA., Evans, P., Fielder, R. J., Gerberick, G. F., Dearman, R. J. and Kimber, I. (2002) Local lymph node assay - validation, conduct and use in practice. *Food and Chemical Toxicology* 40, 593-598.
- Basketter, DA., Casati, S., Gerberick, G. F., Griem P., Philips B. and Worth A. (2005) Skin sensitisation. *Alternatives To Laboratory Animals* 33 supplement 1, 83-103.
- Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node 49 assay. II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 34, 258-273.
- Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kimber, I., Dearman, R. J. and Basketter DA. (2000) Local lymph node assay: Validation assessment for regulatory purposes. *Toxicology* 11, 3-18.
- Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kern, P. S., Dearman, R. J., Kimber, I., Patlewicz, G. Y. and Basketter, DA. (2004) A chemical dataset for evaluation of alternative approaches to skin-sensitization testing. *Contact Dermatitis* 50, 274-288.
- Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 34, 274-286.
- Kimber, I., Hilton, J., Botham, P. A., Basketter, DA., Scholes, E. W., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C., Gray, T. J. B. and Waite, S. J. (1991) The murine local lymph node assay: results of an inter-laboratory trial *Toxicology Letters* 55, 203-213.
- Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Basketter, DA., Scholes, E. W., Ladics, G. S., Loveless, S. E., House, R. V. and Guy A. (1995) An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures. *Toxicology* 103, 63-73.
- Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick G. F., Ryan, C. A., Basketter, DA., Lea, L., House, R. V., Ladics, G. S., Loveless, S. E. and Hastings K. L. (1998) Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: an interlaboratory evaluation. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 53, 563-579.
- Loveless, S. E., Ladics, G. S., Gerberick G. F., Ryan, C. A., Basketter, DA., Scholes, E. W., House, R. V., Hilton, J., Dearman, R. J. and Kimber, I. (1996) Further evaluation of the local lymph node assay in the final phase of an international collaborative trial. *Toxicology* 108, 141-152.
- Normand, S. L. T. (1999) Meta-analysis: formulating, evaluating, combining, and reporting. *Statistics in Medicine* 18, 321-359.
- OECD (1992) Organization for Economic Co-operation and Development -OECD guidelines for testing of chemicals. No. 406: Skin sensitization. 50

- OECD (2002) Organization for Economic Co-operation and Development - OECD guidelines for testing of chemicals. No. 429: Skin sensitization: Local lymph node assay.
- OECD (2005) Organization for Economic Co-operation and Development - OECD series on testing and assessment. No. 34: Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated test methods for hazard assessment.
- Sailstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N. and Stokes, W. S. (2001) ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay. I. the ICCVAM review process. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 34, 249-257.
- Scholes, E. W., Basketter, D. A., Sarll, A. E., Kimber, I., Evans, C. D., Miller, K., Robbins, M. C., Harrison, P. T. C. and Waite, S. J. (1992) The local lymph node assay: Results of a final inter-laboratory validation under field conditions. *Journal of Applied Toxicology* 12, 217-222.
- Takeyoshi, M., Yamasaki, K., Yakabe, Y., Takatsuki, M. and Kimber, I. (2001). Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicology Letters* 119, 203-208

3) 培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24 を用いた皮膚刺激性試験代替法のバリデーション

研究要旨

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL24を用いた皮膚刺激性試験代替法の多施設バリデーションが日本動物実験代替法学会 学会バリデーション委員会の下部組織であるバリデーション実行委員会にて実施された。このバリデーションの結果、19 被験物質で得られた結果から、LabCyte EPI-MODEL24を用いた皮膚刺激性試験代替法はと全体として施設間再現性は良好であったとされた。代替の可能性はJ-TECが提唱した結果とほぼ同程度であり、再現性が高いと考察された。EPISKINとの同等性については、特異度は同程度であるが、感度がやや劣る可能性がある結論された。

さらに、評価指標をMTTアッセイによる細胞毒性に絞り、6物質を用いた追加バリデーションを実施し、2次にわたるバリデーションの結果から、良い施設間再現性および予測性を得た。

A. 研究目的

LabCyte EPI-MODEL24 は、株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (J-TEC) が開発した培養表皮モデルである。この試験は、皮膚刺激性試験代替試験法として開発が進められている。日本動物実験代替法学会 バリデーション委員会では、バリデーション実行委員会を組織して、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、(1) 複数の施設間でどの程度一致するか (施設間再現性)、(2) 海外で先行して開発が進められた別の皮膚刺激性試験代替法である EPISKIN で得られた判定結果とどの程度一致するか (同等性)、(3) 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つの課題を検討するためにバリデーションを実施した。さらに、ECVAM (欧州動物実験代替法検証センター) の performance standard の変更を受け、それらの基準に合わせるための追加バリデーション (第二次) を実施した。

B. 研究方法

日本動物実験代替法学会バリデーション委員会が皮膚刺激性試験代替法のバリデーションを公募した。結果として、多数の施設から応募があり、その中から厳しい基準をクリアした7施設の協力を得てバリデーションを行うことになった。ECVAM performance standardに記載されている20のうち、日本で入手可能な19被験物質をコード化して配布し、9月より開始し、2009年1月に終了した。被験物質処理後、MTTアッセイおよびインターロイキン (IL) -1 α を指標とした。

判定方法は、プロトコールに従い

(1) OD₅₅₀ が 0.7 より小さい、または陽性対照の細胞生存率が 40%より大きい場合には「実験不成立」、そうでなければ「実験が成立」として (2) へ

(2) (1) で実験が成立した場合に、被験物質の細胞生存率が 50%以下の場合には「皮膚刺激性あり」、そうでなければ (3) へ、

(3) (2) で「皮膚刺激性あり」でなければ IL-1 α 産生量が 120pg/組織以上の場合には「皮膚刺激性あり」、そうでなければ「皮膚刺激性なし」と判定とした。

さらに、第一次バリデーションに参加した7施設の協力を得て第二次バリデーションを行うことになった。皮膚刺激基準の変更に伴い改定されたECVAM performance standardに新たに記載された6被験物質をコード化して配布し、2009年4月より開始し、6月に終了した。被験物質処理後、細胞毒性の指標であるMTTアッセイを指標とした。

判定方法は、プロトコールに従い

(1) OD₅₅₀ が 0.7 より小さい、または陽性対照の細胞生存率が 40%より大きい場合には「実験不成立」、そうでなければ「実験が成立」として (2) へ

(2) (1) で実験が成立した場合に、被験物質の細胞生存率が 50%以下の場合には「皮膚刺激性あり」と判定とした。

第一次バリデーションで用いたIL (インターロイキン) -1 α は測定指標としなかった。

C. 結果と考察

これまでの解析結果から、IL-1 α で判定が覆るデータは4点しかなく、ばらつきを大きくするだけであるとの見解で一致をみた。25

物質中、22物質は判定に食い違いがなく、全体として施設間再現性は良好であったとされた。代替の可能性としては、平均感度が83.3%、特異度が73.1%であり、ECVAMが定めた基準を満たしていた(資料1参照)。7施設において、6物質により得られた結果では、すべての施設がすべての物質を皮膚刺激性ありと判断した。

皮膚刺激性試験代替法に関する OECD ガイドラインの動向として、OECD ガイドラインでは①EPISKIN の指標が MTT アッセイのみになった、②in vivo データの分類が EU 分類から GHS 基準となった、③EPISKIN 以外にも EpiDerm や SkinEthics が提案されている(資料2および3)。一方、日本でも本バリデーションの結果を受けて、LabCyte に関する添付資料を JaCVAM 評価委員会および OECD に提出しており、日本での評価が終了し、OECD において第三者評価が進んでいる。

D. 結論

本研究で実施した得られた結果から、LabCyte EPI-MODEL24を用いた皮膚刺激性試験代替法はと全体として施設間再現性は良好であったとされた。代替の可能性はJ-TECが提唱した結果とほぼ同程度であり、再現性が高いと考察された。EPISKINとの同等性については、特異度は同程度であるが、感度がやや劣る可能性がある結論された。

2回にわたるバリデーションの中で得られた結果から、LabCyte EPI-MODEL24を用いた皮膚刺激性試験代替法はの施設間再現性は良好であった。代替の可能性としては、平均感度が83.3%、特異度が73.1%であり、ECVAMが定めた基準を満たしていた。

E. 資料

資料 3-1 VALIDATION STUDY OF *IN VITRO* SKIN IRRITATION TEST USING LABCYTE EPI-MODEL 24

資料 3-2 VALIDATION STUDY OF *IN VITRO* SKIN IRRITATION TEST USING LABCYTE EPI-MODEL 24 (2ND VALIDATION REPORT)

資料 3-3 VALIDATION STUDY OF *IN VITRO* SKIN IRRITATION TEST USING LABCYTE EPI-MODEL 24 (FINAL REPORT)

JSAAE VALIDATION REPORT:

**VALIDATION STUDY OF *IN VITRO* SKIN IRRITATION TEST USING LABCYTE
EPI-MODEL 24**

APRIL 15, 2009

LABCYTE VALIDATION MANAGEMENT TEAM

Contents

1. Goal Statement	4
2. Objective	4
3. Test Methods	4
3-1. Reconstructed human cultured dermal model	
3-2. Model supplier	
4. Validation Management Structure	5
4-1. Validation Management Team	
4-2. Chemical selection, acquisition, coding and distribution	
4-3. Independent biostatisticians	
4-4. Participating laboratories	
4-5. Sponsorship	
5. Study Design	7
6. Test Chemicals	7
6-1. Chemical selection	
6-2. Chemical list	
6-3. Chemical coding and distribution	
7. Protocol	8
7-1. Protocol of the skin irritation test with LabCyte EPI-MODEL	
7-2. Prediction model of skin irritation	
7-3. Difference between LabCyte EPI-MODEL 24 protocol and EPISKIN protocol	
7-4. Data collection, handling, and analysis	
7-5. Quality assurance, GLP	
8. Results	11
8-1. Phase I	
8-1-1 Negative control	
8-1-2 Positive control and test chemicals	
8-2. Phase II	12
8-2-1. Comments on the datasheets by phase II	
8-2-2. Negative control	
8-2-3. Positive control	
8-2-4. Skin irritation test by cell viability	
8-2-5. IL-1 α	
8-2-6. Classification of three independent viabilities at each laboratory	
8-2-7. Sensitivity, specificity and accuracy	

9. Discussion	-----	30
9-1. Reliability		
9-2. Predictivity		
9-3. Similarity with EPISKIN		
9-4. Proposal		
10. Conclusions	-----	31
11. Acknowledgements	-----	31
12. References	-----	31

This report describes the validation study for an *in vitro* skin irritation test using LabCyte™ EPI-MODEL 24 supported by the JSAAE (Japanese Society for the Alternative to Animal Experiments).

1. Goal Statement

- The aim of this study was to validate *in vitro* skin irritation tests in a formal inter-laboratory study. The ultimate goal of the test will be to replace the regulatory Draize skin irritation test according to OECD TG 404 (1).
- The primary goal of this validation study was to evaluate the ability of *in vitro* tests to reliably discriminate skin irritant (I) from non-irritant (NI) chemicals, as defined by the EU classification, or the classification and labelling of skin irritation (category 1/category 2; no category, as defined by the OECD and United Nations proposal for Globally Harmonised System (GHS; 2) .

2. Objective

In vitro test systems that use human reconstructed models were evaluated by JSAAE. The LabCyte™ model is comprised of normal, human-derived epidermal keratinocytes. This model has progressed through protocol optimisation and multi-laboratory assessments. The present objective was to perform a catch-up validation study to assess the relevance (predictive capacity) and reliability (reproducibility within and between laboratories) of this test system using a challenging set of coded test chemicals for which high quality *in vivo* data are available refer to the ESAC statement of EPISKIN (3) and the ECVAM performance standard (4).

The validation study was performed in accordance with the principles and criteria documented in the OECD *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment* (5) and according to the Modular Approach to validation (6).

3. Test Methods

3-1. Reconstructed human cultured dermal model

LabCyte EPI-MODEL 24 is a new, commercially available reconstructed human cultured epidermal model produced by Japan Tissue Engineering Co., Ltd (7). It consists of normal human epidermal keratinocytes whose biological origin is neonate foreskin. In order to expand human keratinocytes while maintaining their phenotype, they were cultured with 3T3-J2 cells as a feeder layer (8 and 9). The human cultured epidermis is reconstructed by cultivating proliferating keratinocytes on an inert filter substrate (surface 0.3 cm²) at the air-liquid interface for 13 days with optimized medium containing 5% fetal bovine serum. These cells construct a multilayer structure consisting of a fully differentiated epithelium with features of the normal human epidermis, including a stratum corneum. The LabCyte EPI-MODEL is embedded in an agarose gel containing a nutrient solution and shipped in 24-well plates at approximately 18°C.

3-2. Model supplier

According to OECD GLP Consensus Document No. 5 "*Compliance of Laboratory Suppliers with GLP Principles*", the management of the test facility is entirely responsible for the quality and reliability of both the equipment and materials (10).

Therefore, the acceptability of the equipment and materials in laboratories that comply with GLP-like principles should be guaranteed to any regulatory authority to whom studies are submitted. In Japan, GLP has been implemented and suppliers belong to national regulatory or voluntary accreditation schemes (for example, for laboratory animals), which can provide users with additional documentary evidence that a test system has a defined quality.

The audits focused on the procedures that were established to guarantee a defined quality of the tissue models.

4. Validation Management Structure

The management structure of the study is shown in Figure 1.

4-1. Validation Management Team

The Validation Management Team (VMT) plays a central role in overseeing the conduct of the validation study and is responsible for the following:

- 1) Project plan, including goal statement
- 2) Study protocol/amendments
- 3) Outcome of QC audits
- 4) Test chemicals
- 5) Data management procedures
- 6) Timeline/study progression
- 7) Study interpretation and conclusions
- 8) Reports and publications

The VMT makes the final decision about which laboratories will participate in the validation study.

Members:

Chair (Mr. Hajime Kojima, JaCVAM: Japanese Center for the Validation of ALternative Methods)

Sponsor representative: JSAAE representatives (Mr. Takashi Omori: Kyoto Univ., Mr. Kenji Idehara: Daicel Chemical Industries, LTD and Mr. Isao Yoshimura: Tokyo University of Science)

Sponsor representative: LabCyte™ suppliers and lead lab (Mr. Masakazu Kato: Japan Tissue Engineering Co., Ltd, J-TEC)

4-2. Chemical selection, acquisition, coding and distribution

- 1) Select chemicals
- 2) Liaise with suppliers
- 3) Final check of provided chemicals
- 4) Acquire chemicals
- 5) Code test chemicals
- 6) Distribute test chemicals

Member:

Mr. Hajime Kojima, JaCVAM

4-3. Independent biostatisticians

- 1) Approve spreadsheets
- 2) Collect data
- 3) Analyse data

Members:

Mr. Takashi Omori: Kyoto Univ.

Mr. Etsuyoshi Mlyaoaka and Mr. Kenya Ishiyama: Tokyo University of Science

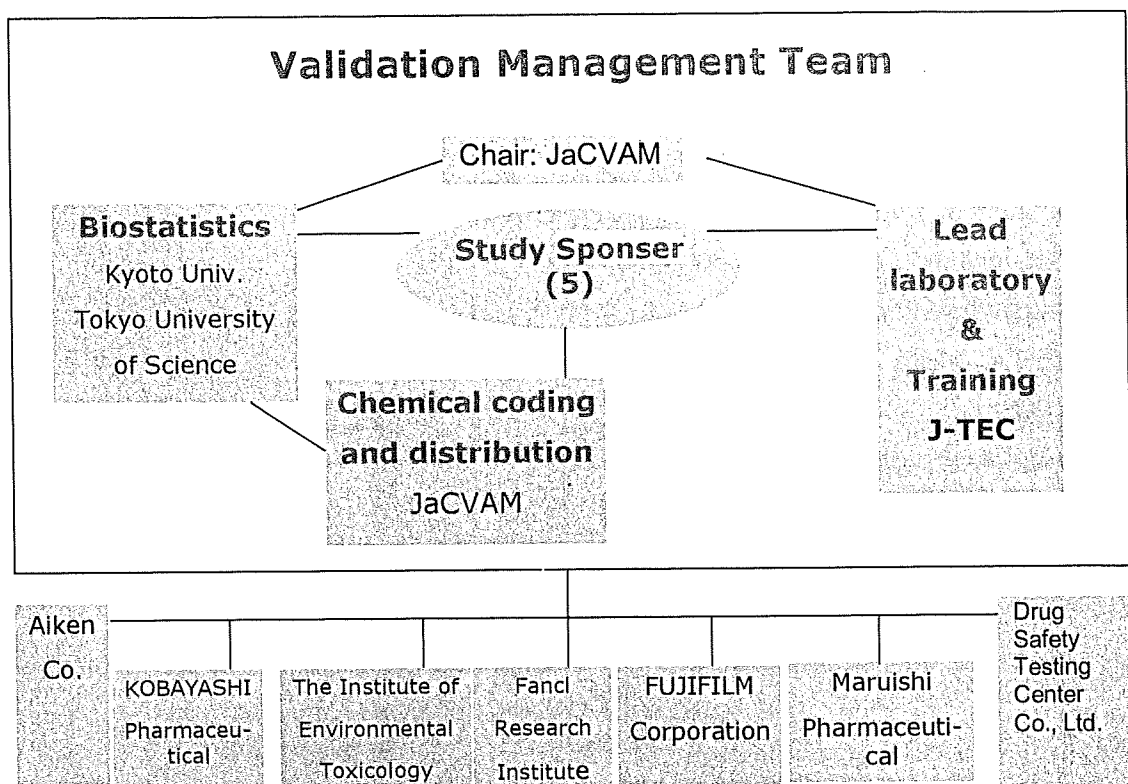


Figure 1. Management structure of the JSAAE skin irritation validation study

4-4. Participating laboratories

The laboratories participating in the study are defined as shown in Figure 1.

The following 7 laboratories participated in the validation study for the evaluation of the LabCyte assays:

- Laboratory 1 – Aiken Co., Ltd. (Ms Yoko Ando and Ms Yui Asako)
- Laboratory 2 – KOBAYASHI Pharmaceutical Co., Ltd. (Mr. Yoshihiro Yamaguchi and Ms Maki Nakamura)
- Laboratory 3 – The Institute of Environmental Toxicology (Mr. Tadashi Kosaka and Mr. Koichi hayashi)
- Laboratory 4 – Fancl Research Institute (Ms. Tamie Suzuki and Ms. Runa Izumi)
- Laboratory 5 – FUJIFILM Corporation (Ms. Atsuko Yuasa, and Mr. Shinichi Aki-moto)
- Laboratory 6 – Maruishi Pharmaceutical Co., Ltd. (Mr. Yukihiko Watanabe and Osamu Mitani)
- Laboratory 7 – Drug Safety Testing Center Co., Ltd. (Mr. Shinsuke Shinoda and Ms Saori Hagiwara)

A lead laboratory is also identified as J-TEC (Mr. Masakazu Kato and Mr. Toshihiro Yokouchi). This laboratory was not participated in the validation study.

All of the laboratory responsibilities (particularly, the work programme and data submission deadlines) were specified in contracts between JaCVAM and the laboratories. Each

laboratory will also be responsible for complying with GLP-like principles and specifying QA aspects.

4-5. Sponsorship

The study was financed by JSAAE and J-TEC.

JSAAE finance:

- management of the study (VMT meetings)
- independent statistical support (biostatistician)
- independent laboratory responsible for purchasing, coding, and distributing chemicals to the participating laboratories
- purchasing and distributing IL-1 α kits to the laboratories
- independent QC audit of the data
- publication of the study

J-TEC finance:

- lead laboratories for the test method
- training the participating laboratories
- independent QC audit of the LabCyte models
- financial assistance for the participating laboratories

5. Study Design

Before this validation study, a LabCyte training course was conducted by J-TEC in April 2008. All technicians from each laboratory participated in this training course.

Two phases of validation studies were performed. In Phase I, we confirmed the transferability of the test protocol and assessed its reproducibility using suitable statistical analyses by testing three coded chemicals (ethanol, glycerol and naphthalen acetic acid) and a positive control (5% sodium lauryl sulfate solution) in seven laboratories between June and July of 2008. In Phase II, we confirmed the robustness of the intra- and inter-laboratory reproducibility and the correlation of the test using 19 new chemicals that were tested in reference to the EPISKIN Performance Standards(4). These tests were conducted by 7 laboratories between September 2008 and January 2009.

6. Test Chemicals

6-1. Chemical selection

According to the EPISKIN Performance Standards, we selected 19 new chemicals to test. One chemical on the chemical list reference for the EPISKIN Performance Standards cannot be purchased on the Japanese market. The VMT is responsible for the final approval of the chemicals proposed by JaCVAM. To avoid any potential bias in the final selection, the laboratory representatives on the VMT were not party to these discussions, nor were they informed of the final list of test chemicals for either phase of the validation study.

6-2. Chemical list

The reference chemicals described in the Performance Standards are shown in Table 1. Among them, tri-isobutyl phosphate (No. 13) could not be used in the examination because it was not available in Japan. Therefore, a 5% SLS solution was used instead of tri-isobutyl phosphate. The data obtained with the 5% SLS solution were not used for calculating the predictivity of the test.

Table 1. Reference test chemicals and codes

No.	Chemical	CAS number	EU label	In vivo score (PII)	Laboratory						
					a	b	c	d	e	f	g
01	1-bromo-4-chlorobutane	6940-78-9	no	0	A-01	B-099	C-077	D-115	E-133	F-031	G-049
02	diethyl phthalate	84-66-2	no	0	A-02	B-100	C-078	D-116	E-134	F-032	G-050
03	di-propylene glycol	25265-71-8	no	0	A-03	B-081	C-079	D-117	E-135	F-033	G-051
04	naphtalen acetic acid	86-87-3	no	0	A-04	B-082	C-080	D-118	E-136	F-034	G-052
05	allyl phenoxy-acetate	7493-74-5	no	0.3	A-05	B-083	C-061	D-119	E-137	F-035	G-053
06	isopropanol	67-63-0	no	0.3	A-06	B-084	C-062	D-120	E-138	F-036	G-054
07	4-methyl-thio-benzaldehyde	3446-89-7	no	1	A-07	B-085	C-063	D-101	E-139	F-037	G-055
08	methyl stearate	112-61-8	no	1	A-08	B-086	C-064	D-102	E-140	F-038	G-056
09	allyl heptanoate	142-19-8	no	1.7	A-09	B-087	C-065	D-103	E-121	F-039	G-057
10	heptyl butyrate	5870-93-9	no	1.7	A-10	B-088	C-066	D-104	E-122	F-040	G-058
11	hexyl salicylate	6259-76-3	R38	2	A-11	B-089	C-067	D-105	E-123	F-021	G-059
12	terpinyl acetate	80-26-2	R38	2	A-12	B-090	C-068	D-106	E-124	F-022	G-060
13	5(W/V %) SLS				A-13	B-091	C-069	D-107	E-125	F-023	G-041
14	1-decanol	112-30-1	R38	2.3	A-14	B-092	C-070	D-108	E-126	F-024	G-042
15	cyclamen aldehyde	103-95-7	R38	2.3	A-15	B-093	C-071	D-109	E-127	F-025	G-043
16	1-bromohexane	111-25-1	R38	2.7	A-16	B-094	C-072	D-110	E-128	F-026	G-044
17	α -terpineol	98-55-5	R38	2.7	A-17	B-095	C-073	D-111	E-129	F-027	G-045
18	di-n-propyl disulphide	629-19-6	R38	3	A-18	B-096	C-074	D-112	E-130	F-028	G-046
19	butyl methacrylate	97-88-1	R38	3	A-19	B-097	C-075	D-113	E-131	F-029	G-047
20	heptanal	111-71-7	R38	4	A-20	B-098	C-076	D-114	E-132	F-030	G-048

1) CAS No.: Chemical abstracts service registry number.

2) PII: Primary irritation index.

6-3. Chemical coding and distribution

The chemicals were coded and distributed by an independent company contracted by JaCVAM. The (company's name) is certified according to ISO 9001, EN 4500 and GLP and has an established record of reliable services. The codes were provided by JaCVAM.

7. Protocol

7-1. Protocol of the skin irritation test with LabCyte EPI-MODEL

LabCyte EPI-MODEL tissues were shipped from the supplier on Mondays and delivered to recipients on Tuesdays. Upon receipt, the tissues were aseptically removed from the transport agarose medium, transferred into 24-well plates (BD Biosciences, CA, USA) with the assay medium (0.5 mL), and incubated overnight (37°C, 5% CO₂ humidified atmosphere). On the following day, the tissues were topically exposed to the test chemicals. Liquids (25 µL) were applied with a micropipette, and solids (25 mg) were applied from microtubes and moistened with 25 µL sterile water. If necessary, the mixture was gently spread over the surface of the epidermis with a microspatula. Viscous liquids were applied using a cell-saver-type tip with a micropipette. Each test chemical was applied to three tissues. In addition, three tissues serving as negative controls were treated with 25 µL distilled water, and three tissues serving as positive controls were exposed to 5% SLS. After a 15-minute exposure, each tissue was carefully washed with PBS (Invitrogen, CA, USA) 10 times using a washing bottle to remove any remaining test chemical from the surface. The blotted tissues were then transferred to new 24-well plates containing 1 mL of fresh assay medium.

The treated and control tissues were incubated for 42 hours (37°C, 5% CO₂ humidified atmosphere). When the 42-hour post-incubation period was complete, blotted tissues were transferred to new 24-well plates containing 0.5 mL of freshly prepared MTT medium (1 mg/mL; Dojindo Co., Kumamoto, Japan) for the MTT assay and conditioned medium was collected to determine the interleukin-1 alpha (IL-1α) levels. Tissues were incubated for three hours (37°C, 5% CO₂ humidified atmosphere) and then transferred to microtubes containing 0.3 mL isopropanol, which completely immersed the tissue. Formazan extraction was performed at room temperature, and the tissues were allowed to stand overnight. Subsequently, 200-µL extracts were transferred to a 96-well plate. The optical density was measured at 570 nm and 650 nm as a reference absorbance, with isopropanol as a blank.

The tissue viability was calculated as a percentage relative to the viability of the negative controls. The mean of three values from identically treated tissues was used to classify a chemical according to the prediction model.

The amount of IL-1α released in the conditioned medium after 42 hours was determined using an IL-1α ELISA kit (Invitrogen, CA, USA), following the manufacturer's detailed instructions.

7-2. Prediction model of skin irritation

In this study, the prediction model of skin irritation potential with LabCyte EPI-MODEL was set to refer to the conditions for EPISKIN described in the ECVAM Performance Standards. This prediction model is described in Table 2. In the event that the three independent results within an individual batch were not consistent, the result that occurred twice was used.

Acceptance criteria

- 1) OD_{NC} of the negative control is greater than 0.7.
- 2) The viability of the positive control is less than 40%.

Table 2. Positive Criteria.

Tissue Viability (primary)	IL-1α ELISA (secondary)	Classification
Mean tissue viability ≤ 50%	Mean IL-1α release ≥ 120 pg/tissue	Irritant
Mean tissue viability > 50%		
Mean tissue viability > 50%	Mean IL-1α release < 120 pg/tissue	Non-irritant