

# LabCyteバリデーション研究

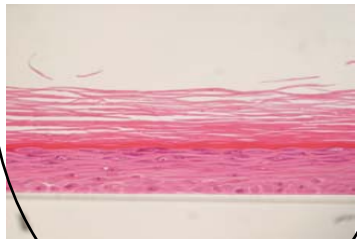
# 日本で製造販売されている培養皮膚モデル

## < Epidermal model >

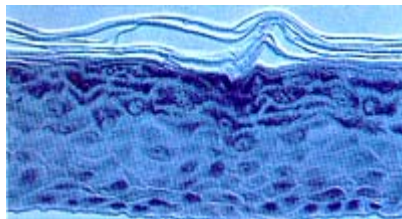
## < Skin model >

Commercially available in Japan

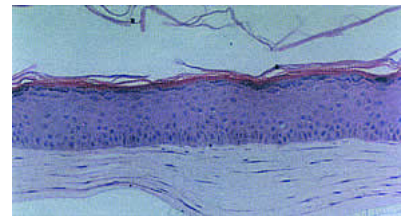
LabCyte  
(J-TEC)



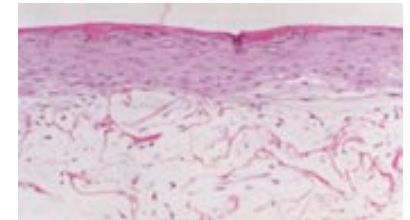
EpiDerm  
(KURABO-MATEK)



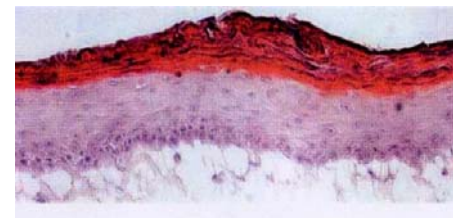
TESTSKIN  
(TOYOBO-Organogenesis)



Vitrolife-Skin  
(GUNZE)



Neoderm (TEGO ; Korea)



Validation study

# *In vitro*皮膚刺激性試験の経緯

# ECVAMにおける*in vitro*皮膚刺激性試験バリデーションの状況

- EPISKIN 新プロトコール検討 Adenylate kinase  
及びIL-1 $\alpha$ のマーカーとしての利用  
→特異性は67%
- EpiDerm 新プロトコール検討 追加培養の実施  
→プロトコールに改良の予知あり、  
施設間評価が必要
- SIFT 予測モデルの変更  
→プロトコールに改良の予知あり



正式なバリデーションの開始  
→2005年初旬に終了

# 日本で実施されたバリデーショナル研究 (2000-2003年)

- TESTSKINを用いたバリデーショナル研究
  - Vitrolife-Skinを用いたバリデーショナル研究
- 
1. いずれも化粧品原料での実施
  2. 公的に認証する術がなかった
  3. 結果が芳しくなかった

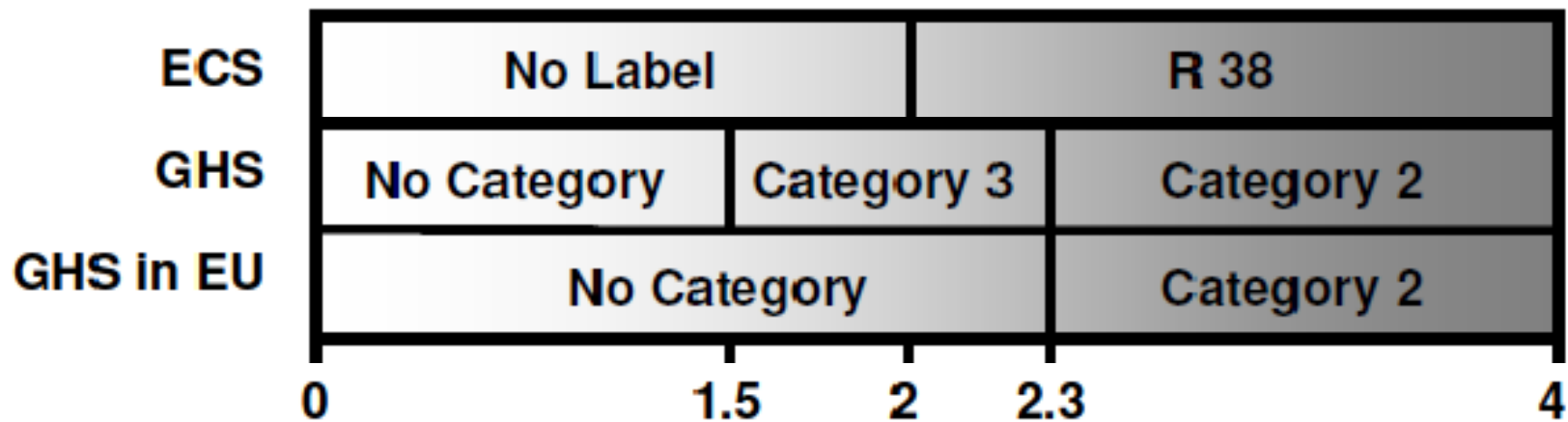
# 国際的なin vitro皮膚刺激性試験の 経緯

2007年4月	EPISKINがESACに認証された。
2008年4月	OECDでの検討が開始された。
2008年夏	ガイドライン案が提案される。
2008年10月	OECD第1回専門家会議
2008年11月	EpiDermおよびSkin EthicsもESAC で認証される。
2009年4月	LabCyteのOECDでの検討が開始さ れる。
2009年6月	OECD第2回専門家会議

# OECD専門家会議で覆されたESAC の決定

1. IL-1 $\alpha$ は指標として不要  
(MTTアッセイのみでよい)
2. EPISKINだけでなく、バリデーション研究が  
終わったすべてのモデルを受け入れる  
(EPISKIN performance standard 準拠が必要)
3. In vivo データはGHS基準を基本とする

# EU,GHS基準



# EPISKIN performance standard

1. 試験の成立条件
2. Reference list(バリデーション研究が行われた物質から、陰陽性、物性などを考慮して決定)
3. 一致性、特異性、感度などの基準設定

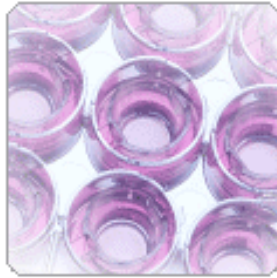
Catch-upバリデーションのため、これらを決めることがバリデーション委員会の重要な仕事

# EPISKIN performance standardの改訂

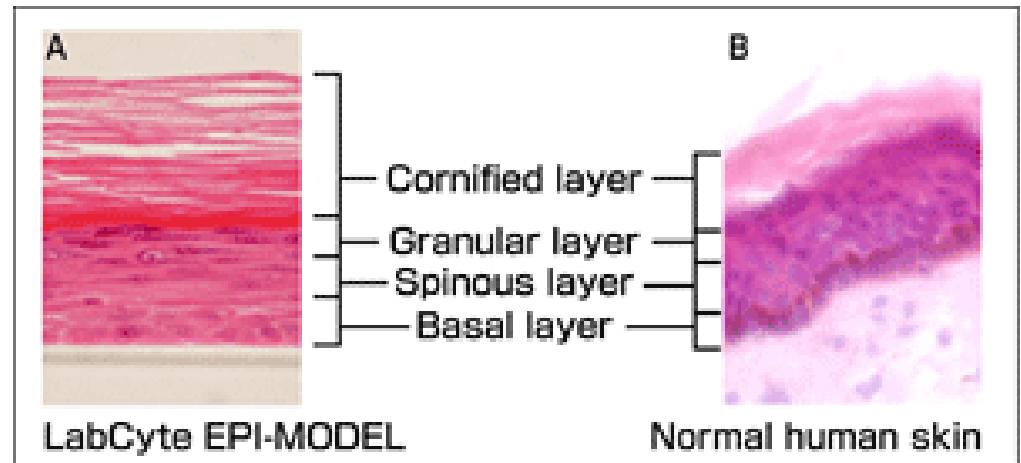
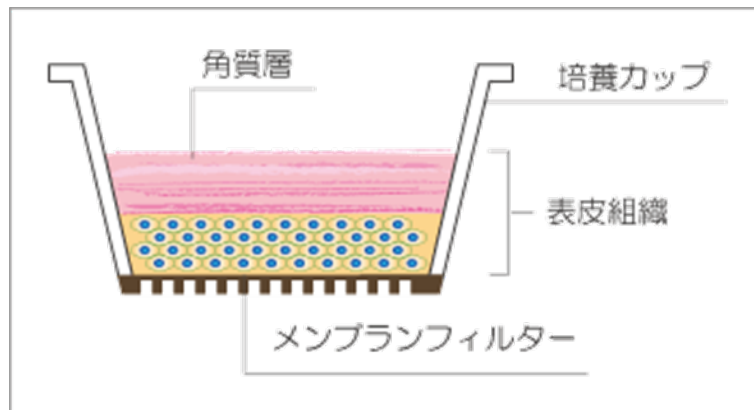
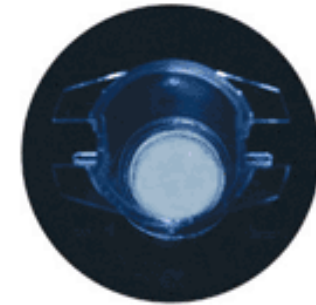
- 皮膚刺激性の基準値を2から2.3に変更

Reference list中の20物質のバランスを補正するため、および日本からの抗議により6物質を差し替え

# LabCyte EPI-MODEL 24を用 いたバリデーション研究



# LabCyte



The LabCyte EPI-MODEL is produced by culturing human epidermal cells on a culture plate. After human epidermal cells have been cultured and proliferated, exposing their surface to the air causes it to keratinize\*, creating a cultured epidermis model similar to the human epidermis (Figures A and B).

# 試験の概要

ECVAM performance standardに準じた19物質および陰性、陽性対照(各3ウェル)

MTTアッセイおよび

IL-1 $\alpha$ アッセイ(プロトコールに準じる)

3回実施

## 注意事項

- ・IL-1 $\alpha$ の検量線は毎回作成する
- ・提出物は、データのメールでの送付と記録用紙の宅配送付

# 試験の概要

技術講習会：平成20年5月

Phase I：平成20年6月～7月

Phase II：平成20年9月29日～平成21年1月10日

データおよび記録送付先：京都大学および  
東京理科大学

データ送付締切：平成21年1月中旬

中間報告会：

平成21年2月20日 J-TEC

(本試験結果の確認、報告書の作成について)

# バリデーション実行委員会

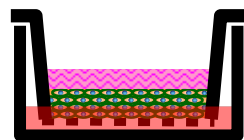
- 日本動物実験代替法学会 バリデーション委員会  
大森、出原、吉村
- 統計解析 東京理科大学 富岡、石山
- リードラボ&トレーニング J-TEC
- 実行委員長、被験物質配布 小島

## 参加施設

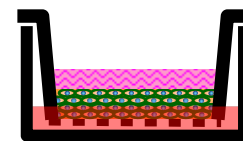
愛研、小林製薬、残留農薬研究所、ファンケル、  
富士フィルム、丸石製薬、DSTC

# 【Method 1】

## 1. Pre-culture



Overnight



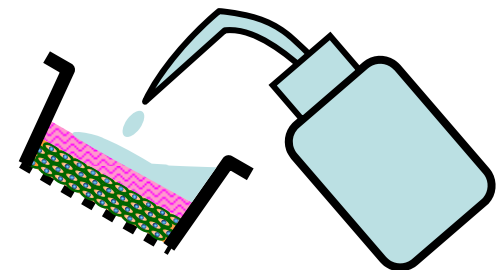
## 2. Exposure of chemicals



Application  
Volume: 25 $\mu$ L

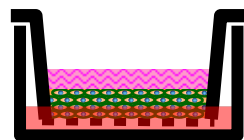


Expose  
(15 min.)



Washing

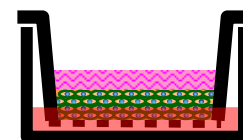
## 3. Post-treatment



Medium  
volume: 1mL



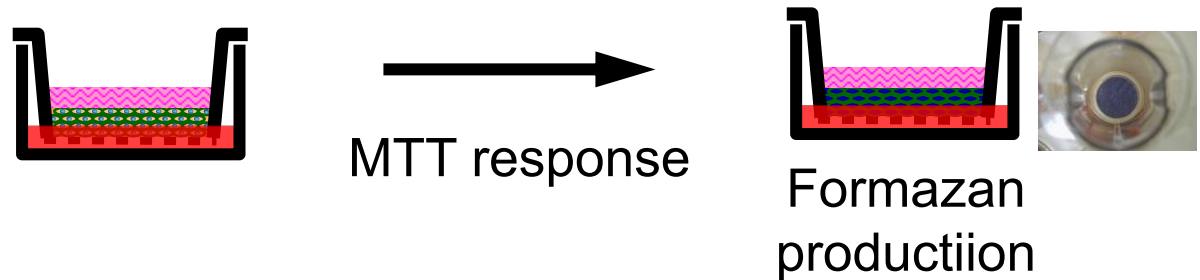
Post-incubation  
(42 hour)



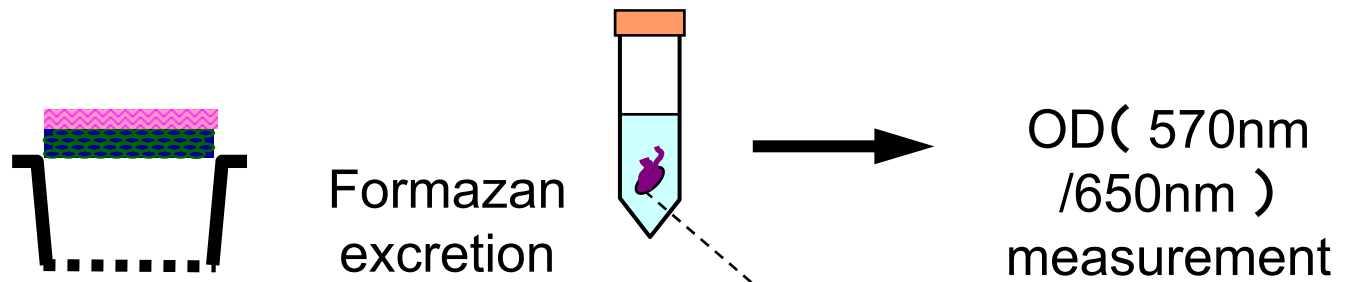
Sampling (IL-1 $\alpha$   
release)

## 【Method 2】

### 4. MTT assay



### 5. Viability



### 6. Acceptance Criteria

Viability	IL-1 $\alpha$ ELISA	Criteria
$\leq 50\%$		Irritant
$> 50\%$	Average IL-1 $\alpha$ release $\geq 120\text{pg/tissue}$	
$> 50\%$	Average IL-1 $\alpha$ release $< 120\text{pg/tissue}$	Non-irritant

# 被験物質

No.	試薬名	CAS number	EU label	In vivo score	施設名						
					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	151-21-3	R38*	2*	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	$\alpha$ -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

# まとめ

EPISKIN performance standards に掲載された9 刺激性物質（日本国内で購入可能なもの）および 10 非刺激性物質 を用い、LabCyte EPI-MODEL24 について、7 施設でバリデーション研究を実施した。その結果、MTTアッセイにおける陽性対照物質の再現性は 高く(100 %)、被験物質による一致度 71%, 特異度64%, 感度79%であった。この値は、EUの定めた目標値をいずれもクリアしていない。なお、指標としてのIL-1  $\alpha$  の必要性は低かった。

# LabCyteバリデーション研究の 今後の予定

- ・2009年4月 PhaseⅢ開始
- ・2009年6月 OECD専門家会議にデータ提出
- ・2009年8月 報告書提出

## 学会発表

- 1)トキシコロジー学会(岩手)
- 2)WC7(ローマ)
- 3)動物実験代替法学会(大阪)
- 4)SOT(ソルトレークシティ)

# JaCVAMの目標

- OECDガイドラインに日本モデル名も掲載させる。
- MADE IN JAPAN製の存在を国際社会に示す。
- In vitro試験の普及を促す。

ご静聴ありがとうございました。