

表9-1 Quality Criteria for each plate for anti-estrogenic assay

	Old	New	mean ± 2SD	mean ± 2.5SD	mean ± 3SD
Fold-induction of Spike-in Control (25 μ M of E2)	> 6	≥ 4	6.0 ~ 14.7	4.9 ~ 15.8	3.9 ~ 16.8
			7.5 ~ 12.8	6.8 ~ 13.4	6.2 ~ 14.1
RTA of 1 nM E2	> 100%	≥ 100%	114.9 ~ 204.5	103.7 ~ 215.7	92.5 ~ 226.9
			130.4 ~ 185.5	123.6 ~ 192.3	116.7 ~ 199.2
RTA of 1 μ M OHT	< 16.9%	≤ 39.4%	0.5 ~ 39.4	-4.4 ~ 44.3	-9.3 ~ 49.1
			-0.2 ~ 38.7	-5.0 ~ 43.6	-9.9 ~ 48.4
RTA of 100 μ M Dig.	< 0%	≤ 0%	-14.2 ~ -5.9	-15.2 ~ -4.8	-16.3 ~ -3.8
			-13.8 ~ -6.9	-14.6 ~ -6.1	-15.5 ~ -5.2

表9-2 Performance Criteria for anti-estrogenic assay (Acceptable range for reference chemicals)

	Old	New	mean ± 2SD	mean ± 2.5SD	mean ± 3SD	
OHT	log [lin. IC30]	-9.86 ~ -8.76	-9.62 ~ -8.73	-9.62 ~ -8.73	-9.73 ~ -8.62	-9.84 ~ -8.51
				-9.50 ~ -8.83	-9.58 ~ -8.75	-9.66 ~ -8.67
	log [lin. IC50]	-9.79 ~ -8.28	-9.46 ~ -8.16	-9.46 ~ -8.16	-9.62 ~ -8.00	-9.79 ~ -7.83
					-9.39 ~ -8.21	-9.54 ~ -8.07
	log [var. IC50]	-9.15 ~ -8.94	-9.32 ~ -8.20	-9.32 ~ -8.20	-9.47 ~ -8.06	-9.61 ~ -7.91
					-9.32 ~ -8.18	-9.46 ~ -8.04
TAM	log [lin. IC30]	-7.88 ~ -6.99	-7.55 ~ -6.84	-7.55 ~ -6.84	-7.64 ~ -6.75	-7.73 ~ -6.66
				-7.29 ~ -7.10	-7.31 ~ -7.08	-7.34 ~ -7.05
	log [lin. IC50]	-7.48 ~ -6.50	-7.08 ~ -6.26	-7.08 ~ -6.26	-7.19 ~ -6.15	-7.29 ~ -6.05
					-6.93 ~ -6.41	-7.00 ~ -6.35
	log [var. IC50]	-7.17 ~ -6.77	-7.02 ~ -6.32	-7.02 ~ -6.32	-7.11 ~ -6.23	-7.20 ~ -6.14
					-6.93 ~ -6.41	-6.99 ~ -6.35
RU486	log [lin. IC30]	-6.20 ~ -5.32	-6.18 ~ -5.41	-6.18 ~ -5.41	-6.27 ~ -5.32	-6.37 ~ -5.22
				-6.11 ~ -5.47	-6.19 ~ -5.39	-6.27 ~ -5.31
	log [lin. IC50]	-5.70 ~ -5.09	-5.61 ~ -5.08	-5.61 ~ -5.08	-5.68 ~ -5.01	-5.74 ~ -4.95
					-5.56 ~ -5.11	-5.62 ~ -5.05
	log [var. IC50]	-6.22 ~ -5.32	-5.56 ~ -4.86	-5.56 ~ -4.86	-5.64 ~ -4.78	-5.73 ~ -4.69
					-5.44 ~ -4.95	-5.50 ~ -4.89
	log [lin. IC30]	-	-			
Corticosterone	log [lin. IC50]	-	-			
	log [var. IC50]	-	-			

表10-1 Quality Criteria for each plate for anti-estrogenic assay

Fold-induction of Spike-in Control (25 pM of E2) ^{*1}	>= 4
RTA ^{*2} of 1 nM E2	>= 100%
RTA of 1 μM OHT	=< 39.4%
RTA of 100 μM Dig.	=< 0%

$$*1: \text{Fold-induction of Spike-in Control} = \frac{(\text{Mean luminescence intensity of Spike-in Control})}{(\text{Mean luminescence intensity of vehicle control})} \\ \left[\frac{(\text{luminescence intensity of a well}) - (\text{Mean luminescence intensity of vehicle control})}{(\text{Mean luminescence intensity of vehicle control})} \right]$$

$$*2: \text{Relative Transcriptional Activation (RTA)} = \frac{[(\text{Mean luminescence intensity of Spike-in Control}) - (\text{Mean of luminescence intensity of vehicle control})]}{(\text{Mean luminescence intensity of vehicle control})}$$

表10-2 Performance Criteria for anti-estrogenic assay (標準物質の許容値)

	log [lin. IC30]	log [lin. IC50]	log [var. IC50]
OHT	-9.62 ~ -8.73	-9.46 ~ -8.16	-9.32 ~ -8.20
TAM	-7.55 ~ -6.84	-7.08 ~ -6.26	-7.02 ~ -6.32
RU486	-6.18 ~ -5.41	-5.61 ~ -5.08	-5.53 ~ -4.86
Flutamide	-	-	-

6. 海外ラボへの対応

本研究において海外施設において①陽性対照物質 E2 に対する転写活性化倍率の低値、②細胞の活性低下という不具合が報告された。

①の陽性対照物質 E2 に対する転写活性化倍率の低値に関しては使用機器の測定感度の問題を指摘し、上位機種への転換等により、機器に依存する不具合の撤廃を試みた。しかしながら、KFDA 及び VITO 共に機種変更による劇的な改善はみられず、不具合の原因として他の要因が考えられた。各施設からのヒアリングにより、各施設で作製して使用する培地に起因する問題（障害物質のコンタミ等）、使用する実験器具（ピペット、ディッシュ類等）、細胞の継代方法（フラスコによる継代 vs ディッシュによる継代）も懸念されたため、リードラボにて培地（血清不含）及び実験器具類を各施設に供給し、実験を行った。

その結果、両施設ともある程度の改善が認められたことから、培地或いは培地調製に用いる水に起因する障害要因が示唆された。培地に用いる水は限外濾過膜による精製処理を行ったものを使用するが、原料となる水はその施設の所在地によって条件が異なることが考えられる。そこで、培地調製に用いる水の要因を削除するため、海外施設でも入手可能な市販の実験用培養用水（SIGMA, Water sterile-filtered, cell culture tested Cat.No. W3500-1L）での実験を行った。その結果、良好な成績が得られたため（表11）、海外施設への情報提供を行った。

表 1 1 従来法と市販培養用水を用いた際の比較

		従来法	市販培養用水
Fold Induction		6.71	13.42
RTA of 1nM E2		161.31	170.99
RTA of 1 μ M OHT		-1.35	8.08
RTA of 100 μ M Dig.		-16.24	-6.78
OHT	log[lin.IC30]	-9.69	-9.57
	log[lin.IC50]	-9.41	-9.27
OHT	log[lin.IC30]	-9.70	-9.56
	log[lin.IC50]	-9.43	-9.27

7.結論

これまでにテストガイドライン化が進行している HeLa-9903 細胞を用いる ERレポーター遺伝子アッセイのアゴニスト系試験に加え、アンタゴニストアッセイ系をガイドラインに加えるべく、施設間バリデーション研究を実施した。研究は Task-1 から Task-3 まで段階的に実施することとなった。Task-1 は既存のアゴニスト系ガイドラインの性能基準を満たすことを条件とし、Task-2 は昨年度、本委託研究で設定した暫定性能基準を基に実験を行い、本年度の結果から、新性能基準を設定することが出来た。現在、Task-3 実験は国内施設が先行して実施している段階である。今後、Task-1～Task-2 の結果明らかとなった海外施設の不調の原因を精査し、問題解決に取り組むと共に本研究の結果をガイドライン化のためのバリデーション報告書・及びガイドライン案の作成に活用していくことが望まれる。

研究報告書

内分泌かく乱物質スクリーニング

Lumi-cell ER アッセイのバリデーション (Phase II)

分担研究者 中村 昌文
(株式会社 日吉 技術部分析研究課)

平成20年度厚生労働省科学研究班「化学物質リスク評価法の国際的バリデーションに関する研究

研 究 報 告 書

研究テーマ

内分泌かく乱物質スクリーニング Lumi-cell ER アッセイの
バリデーション (Phase II)

分担研究者 中村 昌文 株式会社 日吉 技術部分析研究課

1. 緒言

株式会社 日吉では、NICEATM、ECVAM、そしてJaCVAMによって設計されたアゴニスト及びアンタゴニスト検出のための Lumi-cell ER アッセイのマルチフェーズ国際バリデーションスタディーの Phase II a 及び Phase II b を行った。Phase II a 及び Phase II b では Phase I の結果を経て修正された共通のプロトコールによる標準物質及びコントロール物質に加えて、被検試薬 (Phase I a アゴニスト試験 4 物質、アンタゴニスト試験 4 物質；Phase b アゴニスト試験 8 物質、アンタゴニスト試験 8 物質) を用いて様々な独立した実験により Lumi-cell ER アッセイの能力を実証した。基準をクリアしたアゴニスト及びアンタゴニストの標準物質及びコントロール物質、被検試薬の結果は本バリデーションスタディーの Phase III の経歴データベース作成に使われる。試験結果は、Validation Study Project Coordinator に送られ、研究所内の繰返し性及び研究所内・研究所間の再現性、細胞活性目視法による能力の実証が評価される。

2. 目的

化学物質リスク評価法の国際的バリデーションに関する研究 (Phase II) を行った。

- 1) Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究 (Phase II a)
- 2) Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究 (Phase II b)

3. 方法、結果、考察

内分泌かく乱物質スクリーニング Lumi-cell ER アッセイのバリデーション (Phase 0 及び Phase I) の際のフロー、試薬を用いて行った。主なフローを 図 1、及び図 2、に示す。



図1. 曝露の操作フロー

Viability Score	Brief Description
1	Normal Cell Morphology and Cell Density
2	Altered Cell Morphology and/or Small Gaps between Cells
3	Altered Cell Morphology and/or Large Gaps between Cells
4	Few (or no) Visible Cells
P	Wells containing precipitation are to be noted with "P"

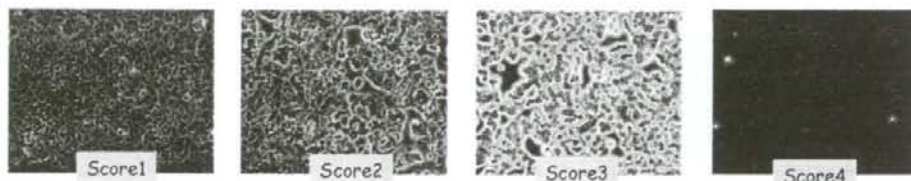


図2. Visual observation の一例

3. 1 Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究(Phase II a)

アゴニスト及びアンタゴニストの標準及びコントロールの試験を用いて、Lumi-cell ER アッセイの熟練度合いを示し、研究所内の繰返し性及び研究所内・研究所間の再現性を示し、個々の実験を行って（アゴニスト及びアンタゴニストのプロトコルそれぞれ 10 回）経歴データベースを作成する。

1) Phase I からの変更点及び追加点について

Phase I にて研究所内の繰返し性及び研究所内・研究所間の再現性を示し、個々の実験を

行って（アゴニスト及びアンタゴニストのプロトコールそれぞれ 10 回）経歴データベースを踏まえての変更点及び Phase II に際しての追加点を下記に示す。

変更点-1 Criteria について

表 1. の範囲内での Plate の Pass/Fail を判定する。

表 1. プレートにおける Pass/Fail の判定 Criteria 一覧

Agonist	Phase II a	Antagonist	Phase II a
Methoxychlor Control	6843~8990	Flavone\E2 Control	(-)1050~4202
E2 Reference Standard EC50	1.1E ⁶ ~5.1E ⁶	E2 Control	2830~9001
DMSO Control	256~7756	Ral\E2 Reference Standard IC50	3.2E ⁴ ~9.6E ⁴
Induction	>3times	DMSO Control	583~7513
		Reduction	>3times

変更点-2 Comprehensive testing プレートレイアウトについて

Agonist 及び Antagonist は、図 3. のレイアウトによって行った。

変更点-3 Cell viability について

・ Visual observation 顕微鏡で確認し、DRAFT LUMI-CELL[®]ER ASSAY Visual Observation Cell Viability Manual に従って、カテゴリー-1、2、3、4 を判断する。さらに顕微鏡では、倍率×100 でウェル毎にデジタルカメラで撮影し、カテゴリーの判断を評価する。

・ Cell TiterGlo[®](Promega 製)は、実施しない。

追加点-1 Test Substance Solubility について

被検試薬（未知試薬）につき、溶解方法を決めておく。

1-1) 被検試薬の DMSO への可溶性確認試験

- 15mL チューブに 100 mg 被検試薬及び DMSO 溶液 1mL を加え準備する。(濃度 ; 100mg/mL)
- 攪拌する。溶解しない場合は、10 分間超音波をかける。
- 溶解しない場合は、100mg/mL 溶液 1mL に 9 mL DMSO を加える。(濃度 ; 10 mg/mL) その後、攪拌。必要あれば 10 分間超音波をかける。
- 溶解するまで、1/10 希釈しながら試験を続ける。

1-2) 調整溶液の DMEM 培地への可溶性試験

- 13mm チューブに一番濃度の高い調整 DMSO 溶液(決定した液) 4 μL を加える。
- 400 μL エストロゲンフリー DMEM 培地を加え、攪拌する。

- c) 濁りや沈殿が起こった場合、10分間攪拌する。
- d) 攪拌して、調整 DMSO が溶解しなければ、10分間超音波をかける。
- e) 再度濁りや沈殿がある場合、次に薄い濃度を順次作成する。

追加点-2 Range finding testing について

Range finding testing とは、Comprehensive testing における開始濃度の決定を行うための試験であり、Agonist 及び Antagonist それぞれ被検試薬溶解決定濃度から 10 倍希釈(7 段階)で曝露し、細胞毒性及び細胞活性を考慮し、開始濃度及び希釈段階 (1:2 か 1:5) を判断する。Agonist 及び Antagonist は、図 4. のレイアウトによって行った。

2) 方法

試験に用いられる標準、コントロール物質及び被検試料は the LUMI-CELL® ER Validation Study Substance Inventory and Distribution Management group により提供された。標準及びコントロールの前処理はルミセルプロトコール¹⁾²⁾³⁾⁴⁾に具体的に記載されている。プロトコールに具体的に記載されているアゴニストの標準、コントロール物質及び被検試料の 96 穴プレートレイアウトは図 3.に示す

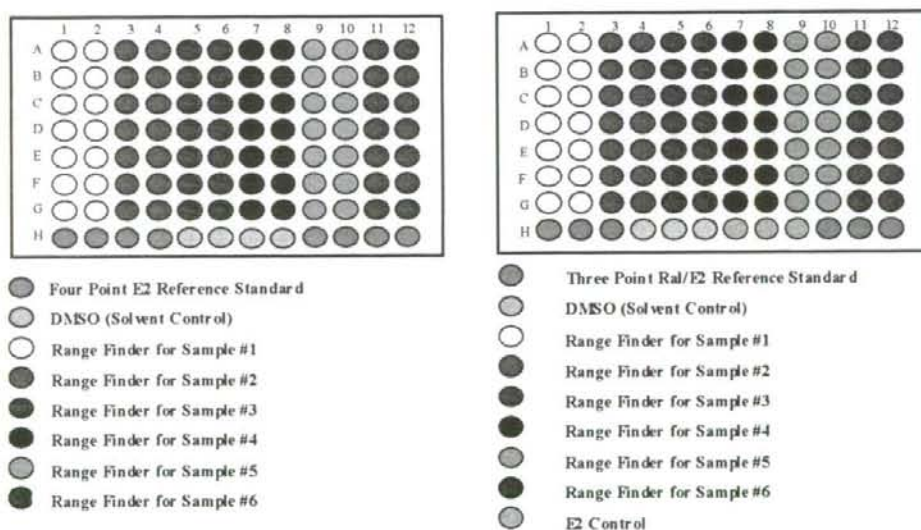


図 3. Comprehensive testing ; 96 穴プレートレイアウト
左図 ; アゴニスト試験 右図 ; アンタゴニスト試験

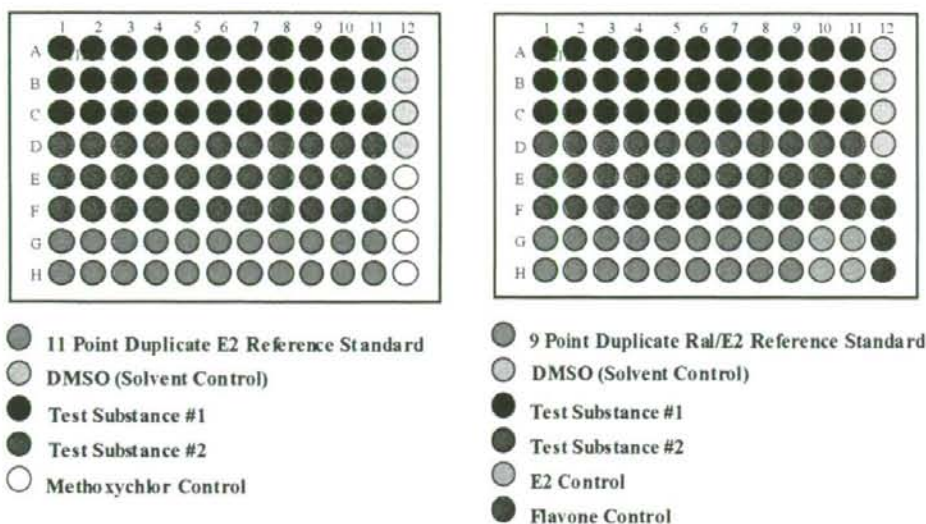


図4. Range finding testing ; 96 穴プレートレイアウト
 左図 ; アゴニスト試験 右図 ; アンタゴニスト試験

アゴニスト試料は、スポンサーより表2. の試料を提供された。

表2. アゴニスト試験で用いる試薬一覧

スポンサーID	状態	保存方法	受け入れ日	受け入れ者	Comments
H0001	Solid	Room Temp	4-Dec-08	Nakamura	
H0002	Solid	Room Temp	4-Dec-08	Nakamura	
H0003	Solid	Room Temp	4-Dec-08	Nakamura	
H0004	Solid	Room Temp	4-Dec-08	Nakamura	

* 標準及びコントロール物質は、前回購入したものを使用する。

アンタゴニスト試料は、スポンサーより表3. の試料を提供された。

表3. アンタゴニスト試験で用いる試薬一覧

スポンサーID	状態	保存方法	受け入れ日	受け入れ者	Comments
H0005	Solid	Room Temp	4-Dec-08	Nakamura	
H0006	Solid	Room Temp	4-Dec-08	Nakamura	
H0007	Solid	0℃	4-Dec-08	Nakamura	
H0008	Solid	Room Temp	4-Dec-08	Nakamura	

* 標準及びコントロール物質は、前回購入したものを使用する。

3) 結果

Lumi-cell ER 細胞の 3) - 1 Substance solubility, 3) - 2 Range finding testing, 3) - 3 Comprehensive testing のアゴニスト活性及びアンタゴニスト活性についての EC₅₀ もしくは、IC₅₀ 及び Dose response curve の経歴データベースを作成した。

3) - 1 Substance solubility の結果は、下記の通りであった。

アゴニスト試料

- ・ H0001 100mg/ml in DMSO, 1mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- ・ H0002 100mg/ml in DMSO, 0.1mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- ・ H0003 10mg/ml in DMSO, 0.01mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- ・ H0004 100mg/ml in DMSO, 1mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media

アンタゴニスト試料

- ・ H0005 2mg/ml in DMSO, 0.02mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- ・ H0006 2mg/ml in DMSO, 0.02mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- ・ H0007 2mg/ml in DMSO, 0.02mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media
- ・ H0008 200mg/ml in DMSO, 0.02mg/ml in DMSO/aqueous cell culture media

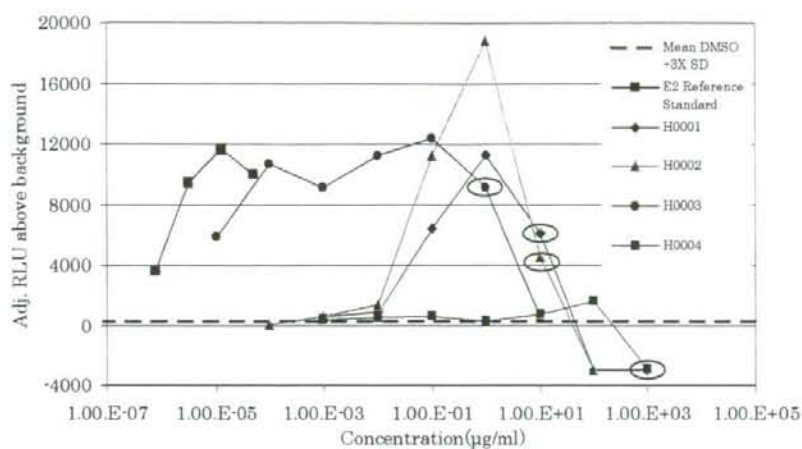
3) - 2 Range finder testing の結果は、表4. 及び表5. 図5. 図6. 下記の通りであった。

表4. アゴニスト試料における Range finding testing

Experiments: Phase IIa Range Finder Testing					
試験 I.D.	試料 Code	日付	Plate Induction	採用の有無	Rationale for Unacceptability
AgRF 1	H0001	12 Apr. 08	3.4	Used	Acceptable
	H0002	12 Apr. 08		Used	Acceptable
	H0003	12 Apr. 08		Used	Acceptable
	H0004	12 Apr. 08		Used	Acceptable

表5. アンタゴニスト試料における Range finding testing

Experiments: Phase IIa Range Finder Testing					
試験 I.D.	試料 Code	日付	Plate Induction	採用の有無	Rationale for Unacceptability
AntRF 1	H0005	12 Apr. 08	6.9	Used	Acceptable
	H0006	12 Apr. 08		Used	Acceptable
	H0007	12 Apr. 08		Used	Acceptable
	H0008	12 Apr. 08		Used	Acceptable

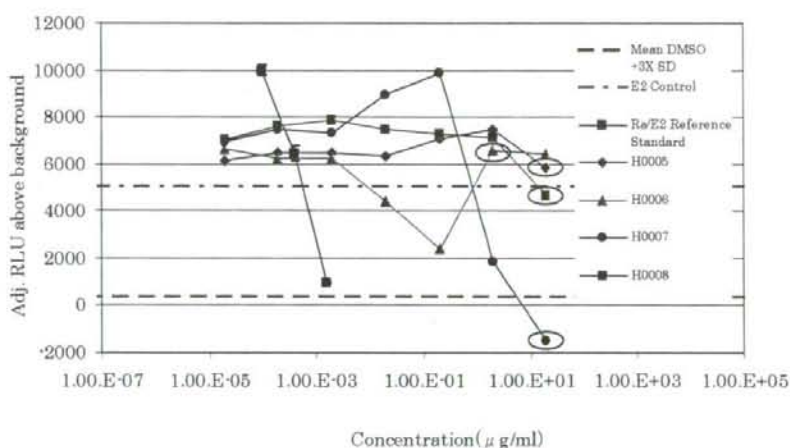


○ : Starting Concentration used for Comprehensive testing

H0001,H0002,H0004 は、Double serial dilution

H0003 は、Half-Log dilution

図5. Range finder testing (アゴニスト試験) のグラフ



○ : Starting Concentration used for Comprehensive testing

H0005~H0008 は、Double serial dilution

図6. Range finder testing (アンタゴニスト試験) のグラフ

3)-3 Comprehensive testingの結果は、表6. 及び表7. 図7. 図8. の通りであった。

表6. Comprehensive testing (アゴニスト試験)の結果一覧

Experiments: Phase IIa Comprehensive Testing: Agonist						
試験 I.D.	試料 Code	日付	Plate Reduction	IC ₅₀ (µg/mL)	採用の有無	不採用の理由
CT 1	H0001	22-Apr-08	3.1	0.090 ³	Used	Acceptable
	H0002			0.058 ³	Used	Acceptable
CT 2.1	H0003	22-Apr-08	3.7	NA	Repeated	Dilution ratio mistake
	H0004			NA	Repeated	NG ¹
CT 2.2	H0003	01-May-08	4.3	NA	Repeated	NG ¹
CT 3	H0001	01-May-08	4.1	0.095 ³	Used	Acceptable
	H0002			0.059 ³	Used	Acceptable
CT 4	H0003	01-May-08	3.9	8.6E-6 ³	Used	Acceptable
	H0004			Negative	Used	Acceptable
CT 5	H0001	16-May-08	4.1	NA	Repeated	Range over the Methoxychlor
	H0002			NA		
CT 6	H0003	16-May-08	4.1	3.6E-6 ³	Used	Acceptable
	H0004			Positive ⁴	Used	Acceptable
CT 7	H0003	31-May-08	3.7	4.0E-6 ³	Used	Acceptable
	H0004			Negative	Used	Acceptable
CT 8	H0001	20-Jun-08	4.7	0.086 ³	Used	Acceptable
	H0002			0.057 ³	Used	Acceptable

NA = Not applicable, EC₅₀ values are not calculated for substances tested on plates not meeting acceptance criteria.

¹ The reason for NG is because we set a principle to use same plate for H0003 and H0004. Hence, if either of these does not exist, the data will not be accepted.

² Well was accidentally exchanged for the controls but due to the historical records we could confirm the data and thus replace it in the right place, hence the data was accepted.

³ Deleted some points for calculating EC₅₀. The deleted points are shown in Figure 7.

⁴ Positive at 6.25 x 10⁺¹ and 3.13 x 10⁺¹ µg/mL

表 7. Comprehensive testing (アンタゴニスト試験) の結果一覧

Experiments: Phase IIa Comprehensive Testing:Antagonist						
試験 I.D.	試料 Code	日付	Plate Reduction	IC ₅₀ (µg/mL)	採用の有無	不採用の理由
CT 1	H0005	25-Apr-08	7.5	Negative ⁷	Used ¹	Acceptable
	H0006			Positive ^{2,7}	Used ¹	Acceptable
CT 2	H0007	25-Apr-08	10	0.53	Used	Acceptable
	H0008			Positive ³	Used	Acceptable
CT 3	H0005	09-May-08	12	Positive ^{4,7}	Used	Acceptable
	H0006			Positive ^{5,7}	Used	Acceptable
CT 4	H0007	09-May-08	13	0.40	Used	Acceptable
	H0008			Positive ³	Used	Acceptable
CT 5	H0005	21-May-08	8.5	Positive ^{3,7}	Used	Acceptable
	H0006			Positive ^{5,7}	Used	Acceptable
CT 6	H0007	21-May-08	8.2	0.75	Used	Acceptable
	H0008			Positive ³	Used	Acceptable

¹Well was accidentally exchanged for the controls but due to the historical records we could confirm the data and thus replace it in the right place, hence the data was accepted.

²Positive for antagonism at 2.5×10^{-1} , 1.25×10^{-1} , 6.25×10^{-2} , 3.13×10^{-2} and 1.56×10^{-2} µg/mL

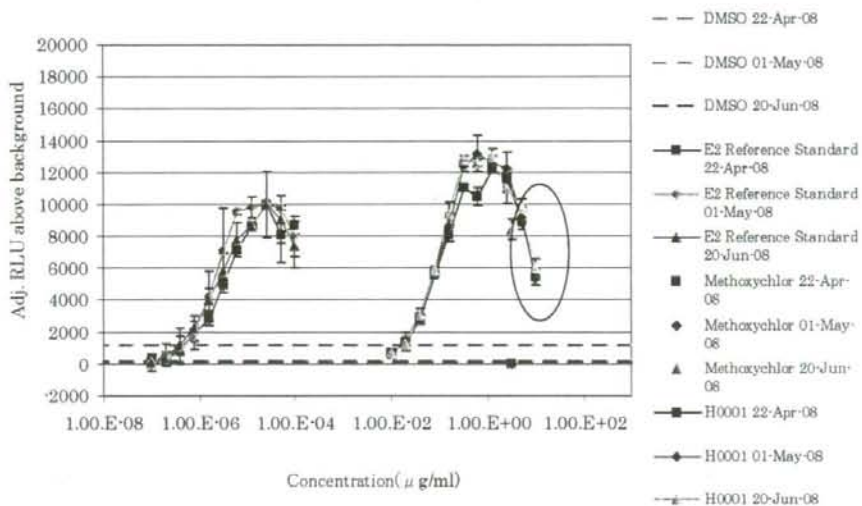
³Positive for antagonism at $1.0 \times 10^{+1}$ and $5.0 \times 10^{+0}$ µg/mL

⁴Positive for antagonism at $1.0 \times 10^{+1}$ µg/mL

⁵Positive for antagonism at $1.0 \times 10^{+0}$ to 7.81×10^{-3} µg/mL and at 1.95×10^{-3} µg/mL

⁶Positive for antagonism at 5.0×10^{-1} and 1.56×10^{-2} µg/mL

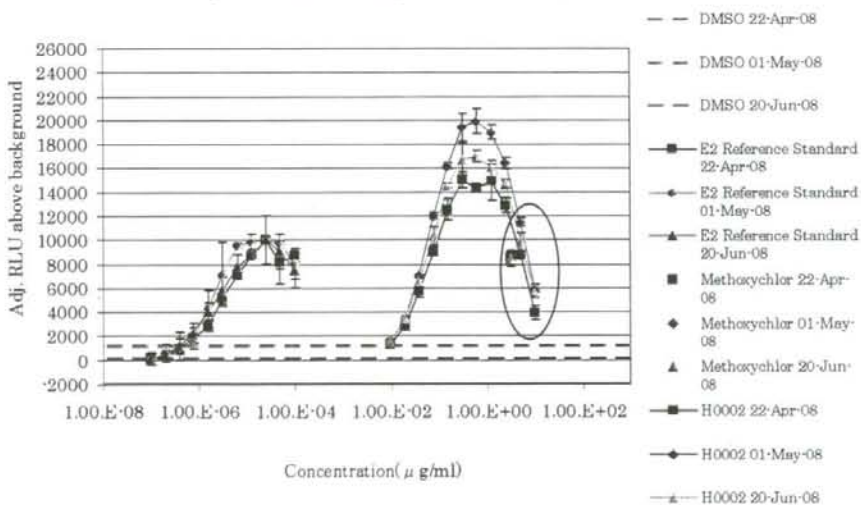
⁷Deleted some points for calculating EC₅₀. The deleted points are shown in Figure 7.



* Line represents the mean of three E2 replicates plus three times the standard deviation of the E2 mean

○ : Deleted 2 high concentration points to calculate EC₅₀ of H0001.

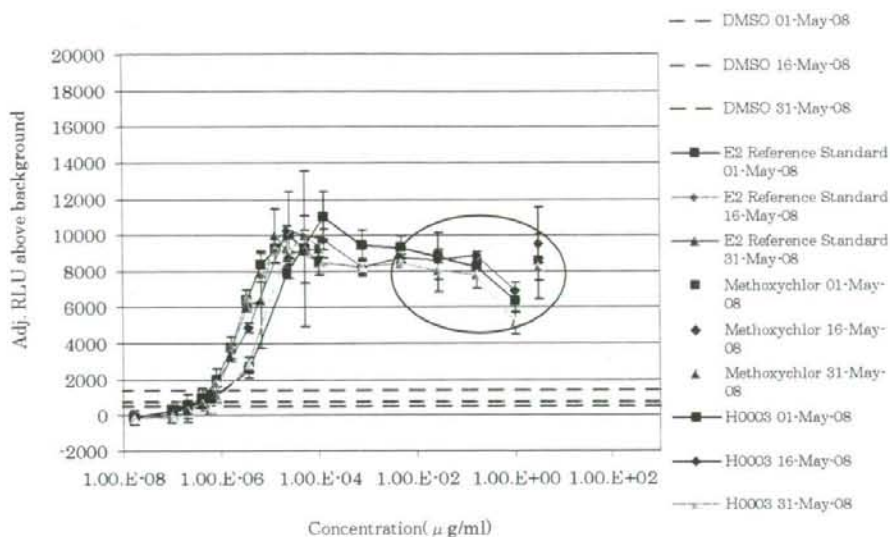
図7-1. Comprehensive testing (アゴニスト試験) H0001 のグラフ



* Line represents the mean of three E2 replicates plus three times the standard deviation of the E2 mean

○ : Deleted 2 high concentration points to calculate EC₅₀ of H0002

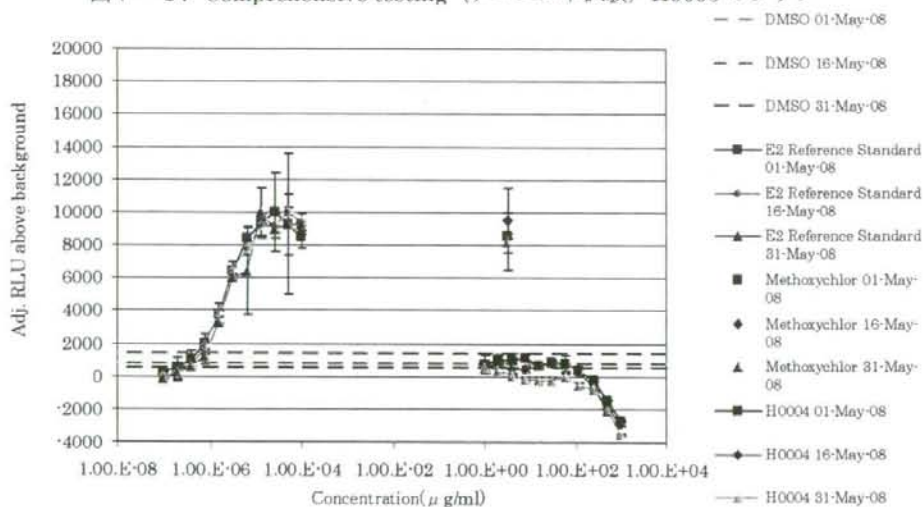
図7-2. Comprehensive testing (アゴニスト試験) H0002 のグラフ



* Line represents the mean of three E2 replicates plus three times the standard deviation of the E2 mean

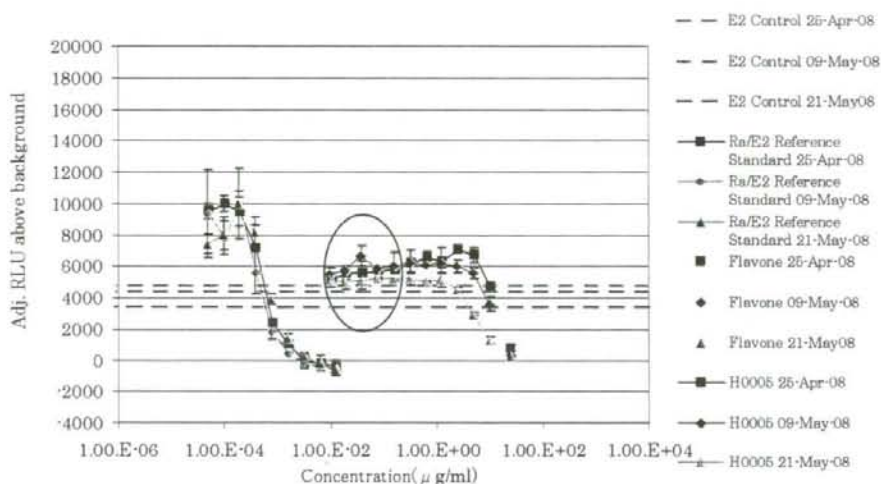
○: Deleted 4 high concentration points to calculate EC_{50} of H0003.

図7-3. Comprehensive testing (アゴニスト試験) H0003 のグラフ



* Line represents the mean of three E2 replicates plus three times the standard deviation of the E2 mean

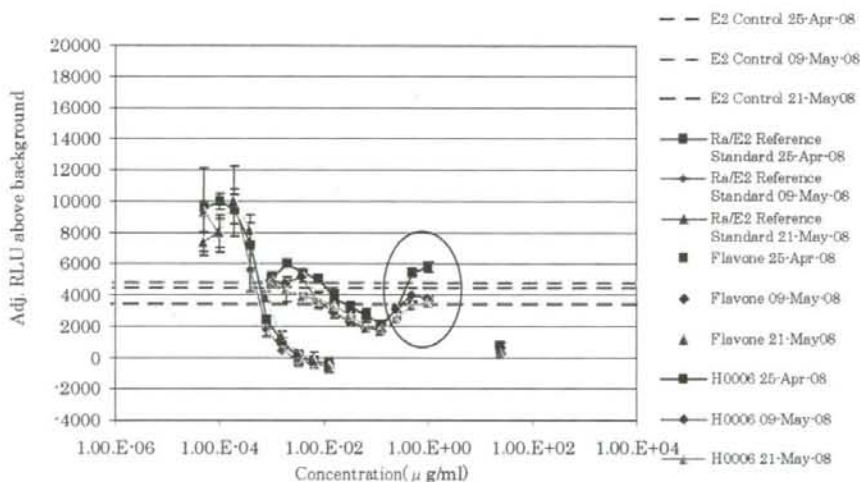
図7-4. Comprehensive testing (アゴニスト試験) H0004 のグラフ



* Line represents the mean of three raloxifene/E2 replicates minus three times the standard deviation of the raloxifene/E2 mean

○ : Deleted 5 low concentration points to calculate EC₅₀ of H0005.

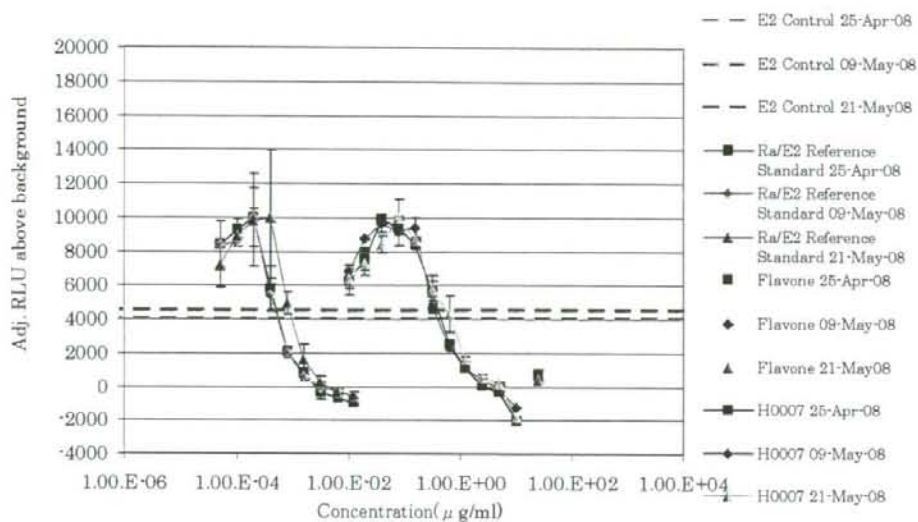
図8-1. Comprehensive testing (アンタゴニスト試験) H0005 のグラフ



* Line represents the mean of three raloxifene/E2 replicates minus three times the standard deviation of the raloxifene/E2 mean

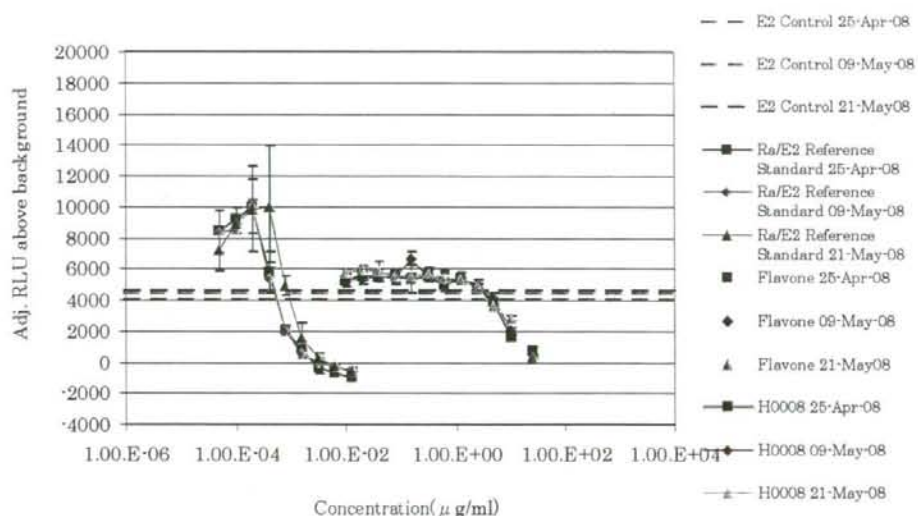
○ : Deleted 3 high concentration points to calculate EC₅₀ of H0006.

図8-2. Comprehensive testing (アンタゴニスト試験) H0006 のグラフ



* Line represents the mean of three raloxifene/E2 replicates minus three times the standard deviation of the raloxifene/E2 mean

図8-3. Comprehensive testing (アンタゴニスト試験) H0007のグラフ



* Line represents the mean of three raloxifene/E2 replicates minus three times the standard deviation of the raloxifene/E2 mean

図8-4. Comprehensive testing (アンタゴニスト試験) H0008のグラフ

4) 考察

今回、2つのミスを犯した。1) Agonsit/H0003の1回目について、Half-Log dilutionの方法を6倍希釈の所を10倍希釈と勘違いし、希釈率を間違えた。これは、Protocolの確認不足であった。2) Antagonistの1回目(CT1及びCT2)について、E2 ControlとFlavoneの曝露時のWELL内の位置を勘違いし、入れ間違えた。これは、Plate sheetと試薬の一致しているかの確認が不足していた。フローの確認を十分行うことでミスを軽減することは出来るが、Protocolの変更箇所の明示がなく、変更頻度が高ければ、ミスの頻度も高くなる可能性がある。

検量線及び被検試薬のComprehensive testingの際、一部S.D.の高いものが見受けられたが、どの程度までであれば、採用してよいか判定が必要かもしれない。

被検液のEC₅₀(3回繰返し)の結果は、表8.の通りであった。

表8. 被検液のEC₅₀(3回繰返し)結果一覧

Code	1st.	2nd.	3rd.	Ave.	S.D.	C.V.
H0001	0.090	0.095	0.086	0.090	0.0043	4.7
H0002	0.058	0.059	0.057	0.058	0.0012	2.1
H0003	8.5E-06	3.6E-06	4.0E-06	5.4E-06	2.8E-06	52
H0004	negative	positive	negative	-	-	-
H0005	negative	positive	positive	-	-	-
H0006	positive	positive	positive	-	-	-
H0007	0.53	0.40	0.75	0.56	0.18	32
H0008	positive	positive	positive	-	-	-

We need to decide up to which level of variability (C.V.) is good and acceptable. I also felt that we need protocols to confirm that the result from Graph pad prism is appropriate, and the determination of the data deleted.

5) その他特記事項

・Luminometerは、Centro LB 960, BERTHOLD TECHNOLOGIES, Germanyを使用する。

・細胞は、#13~#18継代数で行った。

3. 2 Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究(Phase II b)

アゴニスト及びアンタゴニストの標準及びコントロールの試験を用いて、Lumi-cell ER アッセイの熟練度合いを示し、研究所内の繰返し性及び研究所内・研究所間の再現性を示し、個々の実験を行って（アゴニスト及びアンタゴニストのプロトコールそれぞれ 10 回）経歴データベースを作成する。

1) Phase I からの変更点及び追加点について

Phase I 及び Phase II a にて研究所内の繰返し性及び研究所内・研究所間の再現性を示し、個々の実験を行って経歴データベースを踏まえての変更点及び Phase II b に際しての追加点を下記に示す。

変更点-1) Criteria について

表 9. の範囲(Phase II b)内での Plate の Pass/Fail を判定する。

表 9. プレートにおける Pass/Fail の判定 Criteria 一覧

Agonist	Phase II a	Phase II b
Methoxychlor Control	6843~8990	6881~9347
E2 Reference Standard EC50	1.1E ⁻⁶ ~5.1E ⁻⁶	7.1E ⁻⁷ ~4.7E ⁻⁶
DMSO Control	256~7756	428~8119
Induction	>3times	

Antagonist	Phase II a	Phase II b
Flavone\E2 Control	(-)1050~4202	(-)1283~3716
E2 Control	2830~9001	3333~8399
Ral\E2 Reference Standard IC50	3.2E ⁻⁴ ~9.6E ⁻⁴	2.9E ⁻⁴ ~9.8E ⁻⁴
DMSO Control	583~7513	428~8119
Reduction	>3times	

変更点-2 Worksheet(Excel)の変更（追加）。

特に Plate 及び Test Substance の Pass/Fail の細分判定

2) 方法

試験に用いられる標準、コントロール物質及び被検試料は the LUMI-CELL® ER Validation Study Substance Inventory and Distribution Management group により提供された。標準及びコントロールの前処理はルミセルプロトコール¹⁾²⁾³⁾⁴⁾に具体的に記載されている。プロトコールに具体的に記載されているアゴニストの標準、コントロール物質及び被検試料の 96 穴プレートレイアウトは図 9. 及び図 10. に示す。

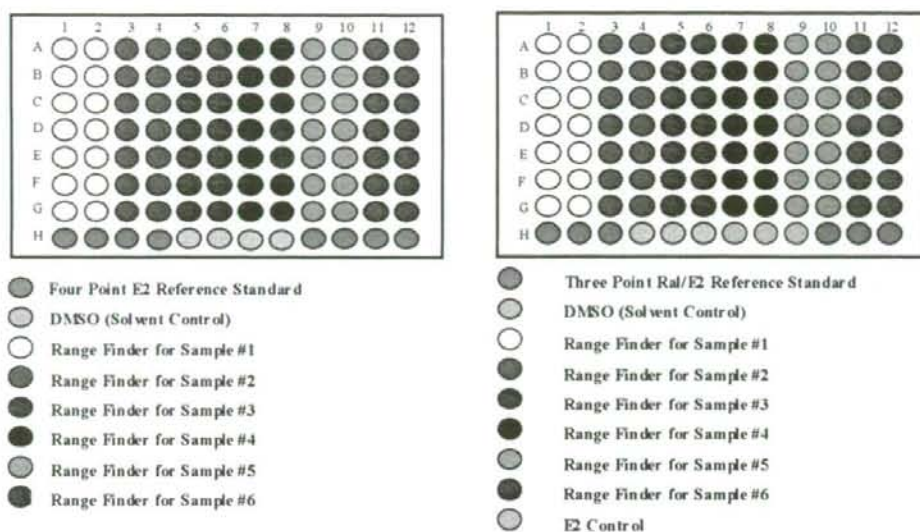


図9. Range finding testing ; 96 穴プレートレイアウト
左図 ; アゴニスト試験 右図 ; アンタゴニスト試験

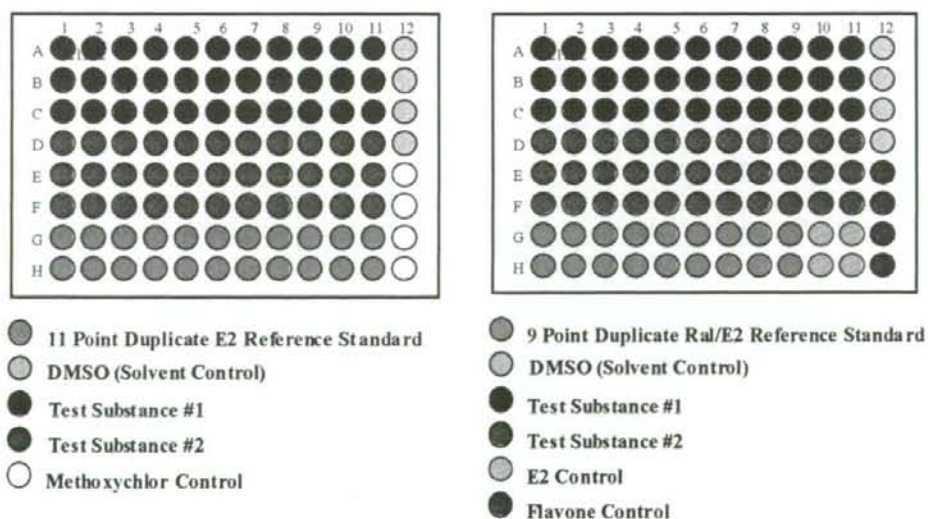


図10. Comprehensive testing ; 96 穴プレートレイアウト
左図 ; アゴニスト試験 右図 ; アンタゴニスト試験