

るフォーマットで以降の測定を行うこととした(Fig. 1)。日吉における Task1 アゴニスト測定でのクライテリア値の総括を Table 1 に示した。1 回目測定ではクライテリアを満たす結果が得られたものの、2,3 回目測定では多くの指標でクライテリアを逸脱する結果となった。2,3 回目測定で用いた細胞は 1 回目で用いた同一ロットの継代であるが、E2 存在下でのルシフェラーゼの発光値 (PC_average) が非常に低いことから、新たなロットの細胞を用いて 4,5 回目測定を実施した。最終的に 5 回測定中 3 回で全クライテリアを満たす結果を得たことから、本試験系実施に十分な測定技術を有すると判断された。

1. 3 日吉における Task2 測定結果

Task2 測定では、プロトコールに従い 4 つの参照化合物についてアンタゴニストアッセイを実施した。測定を実施した全 14 アッセイの結果の総括を Table 2 に示す。1,2 回目の測定では、Task1 の 4,5 回目測定に用いた同一ロットの細胞を継代して用いたが、多くの項目でクライテリアを逸脱し、特に 2 回目測定結果では fold change が非常に低い結果を示した。測定結果からルシフェラーゼ発光が最大となる E2 濃度である 1nM E2 下での発光値は、4000 以下であり、細胞の反応性低下が疑われたことから、新たなロットの細胞を用いて 3~5 回目の測定を実施した。しかし、3 回目測定では、1nM E2 下での発光値は、10000 以上であるものの依然として多くの項目でクライテリアを満たさず、さらに 5 回目測定では、1nM E2 発光値が再び 5000 以下まで低下してしまい、細胞継代に何らかの問題が示唆された。本試験では、ルシフェラーゼ発光値自体にはクライテリアは設定していないが、継代による発光値低下の防止が重要であると考え、日吉、化評研技術者

間で情報交換を行った結果、以降の測定では継代時の培地交換頻度を増やすことを検討した。6 回目測定においては、再び新しいロットの細胞を用い、培地交換頻度を増やして継代し 7 回目測定を行った結果、1nM E2 発光値は 10000 以上で維持された。両測定結果は依然多くのクライテリアを逸脱しているが、これは 6 回目測定に用いるまでに既に以前の継代法で数代培養した細胞であるためと考え、継代開始時から培地交換頻度を増やして継代した細胞を用いて 8 回目測定を実施した結果、8 回目測定では Tamoxifen IC30 の 1 項目以外のクライテリアを満たす結果を得た。新たな条件で 9,10 回目の測定を継続した結果、Tamoxifen に関してはクライテリアを逸脱するものの、その程度は非常に小さく、また他の項目についてはクライテリアを満たす再現性の高い結果を得ることに成功した。11,12 回目測定では再び多くの項目でクライテリアを逸脱したが、これは 11 回目測定前のトリプシン処理時間が規定より長かったことから、細胞がダメージを受けたせいであると考えられた。再度、新しいロットの細胞を用いて 13,14 測定を行った結果、8~10 回目測定と再現性の高い結果が得られたことから、Tamoxifen クライテリアの逸脱は、むしろ試験施設間差によるものであると考えられた。よって、一部のクライテリアを逸脱するものの 8~10 及び 13,14 回目の再現性の高い 5 回測定結果を採用して、Task2 を終了した。

1. 4 日吉における Task2 の結果を反映したプロトコール及びクライテリア値のアップデート

日吉における Task2 で採用した、8~10 及び 13,14 回目の 5 回の測定結果と、以前、国内 3 施設のデータと併せたクライテリア値の再計算を実施した。Table 3~13 に各クライテリア

の総括結果、Table 14,15 にアップデート前のクラテリア値との比較を示した。再計算の結果から、合計 4 施設データをもとにした mean ± 2SD を新たなクラテリア値として SMT に提案した。また、日吉での検討結果により明らかになった継代における培地交換頻度やトリプシン処理時間に関する注意点についてプロトコールへの追加記載によるアップデートについても SMT への提案を行った。アップデートされたプロトコールについて添付資料 1 に示した。今回のアップデートによるプロトコールの変更点は以下である。

- Section 5.2. MEDIUM REPLACEMENT : 文章の追加 "The medium is recommended to be replaced on the next day after the cell propagation and the reconstitution of cells from the frozen stock."
- Section 5.3. CELL PROPAGATION and 5.4. PREPARATION OF FROZEN STOCK : (7) におけるトリプシン処理時間を "4 min". から "about 3min" に変更
- Section 6.5. CYTOTOXICITY (CELL VIABILITY) ASSAY USING CELL COUNTING KIT-8 (CCK-8) : (6).の後に Note を追加 "Note: If the bubble is generated, the bubble should be crushed. If the plate bottom is dirty, it should be wiped with 70-80% ethanol before the

measurement of the absorbance."

アップデートされたプロトコール及びクラテリア値に関して SMT からの反対意見は出されなかったことから、これらに従い日吉における Task3 を実施することとなった。

2、Lumi-cell ER アッセイバリデーション試験 : LumiCell バリデーションに関しては、本年度までに予定していた全てのフェーズの測定が全参加施設で終了し、データ解析の結果、アンタゴニストアッセイにおいて多くの化合物で高濃度域における非特異的なルシフェラーゼ活性低下が観察されたことに伴う最高濃度の低減化、アゴニスト・アンタゴニストアッセイにおける活性判定基準について、基準値をコントロール背景値の ±3SD から ±2000RLU に変更し、さらに従来は 1 点でも基準を超れば陽性判定するとしていたのに対して、少なくとも 3 点以上からなる用量-反応曲線により判定するとの変更案が事務局より提案された。プロトコールの変更案について SMT 電話会議の結果、メンバーの合意が得られたことを受けて、現在、ICCVAM での peer review に向けて、事務局である NICEATM においてバックグラウンドレビュードキュメントの作成を進めている。

3、AR-EcoScreen 細胞を用いたアンドロゲン受容体転写活性化試験法 : AR 転写活性化測定法については、本研究班開始以前に実施されたアゴニスト、アンタゴニスト測定の国内バリデーション結果をもとにしたバリデーションレポート及びガイドライン案を作成して peer review のため OECD に提案した。OECD に提案したガイドライン案について添付資料 2

に示した。提出されたバリデーション試験レポートに関して、第8回 VMG-NA ミーティングにおける議論では、多施設測定における化合物数が、アゴニスト、アンタゴニスト各5化合物しか実施されていないため、peer review 段階で測定化合物の追加が要求される可能性が指摘された。

D. 考察

HeLa アンタゴニスト測定法バリデーション試験では、海外2施設でアンタゴニスト測定に際して細胞培養や測定技術に起因すると考えられる問題等が認められたため、問題解決のため追加検討を実施した結果、問題はほぼ解決したものの、各施設ともに独自の予算で参加していたことから予算継続が困難になり、資金面等の理由からバリデーション試験への継続参加が困難であるとしていずれもタスク2終了前に撤退した。国際バリデーション試験では、コミュニケーションの問題などから、一度問題が発生すると問題解決に時間がかかることもあり、施設の参加継続のための費用を含む包括的な推進の枠組みが必要であると考察される。一方、国内参加施設の一つであるカネカは、予定していた全ての測定を一度終了していたが、詳細解析の結果、Task3の一部の結果においてリファレンスプレートがTask2で設定した暫定クライテリアを完全には満たしていないことから正式データとして採用するためには、再測定が必要であることが判明した。しかし、カネカは *in vitro* 事業から撤退したため追加の測定は不可能であった。しかし、Task3におけるコード化合物の判定結果は、他の国内2施設と完全に一致することから、むしろ暫定的に設定したリファレンスクライテリアが厳しすぎる可能性が示唆された。結果としてリードラボである CERI 及び大塚からは、予定した全

ての Task3 コード化合物の測定結果が得られたものの、2施設分のデータでのみあることから OECD GD34 に定めるバリデーション必要要件を満たすため、本年度より追加施設として LumiCell バリデーション参加施設である日吉における測定を開始し、Task1 では、5回の測定のうち規定した3測定でクライテリアを満たすデータの取得に成功した。しかし、引き続き実施した Task2 においては、多くのクライテリアを満たすことが出来ず、また結果の再現性についても問題があった。さらに、継代に伴う細胞反応性の急激な低下が観察された。継代に伴う細胞反応性の低下は、以前に海外2施設からも問題点として指摘された現象と同じであることから細胞の継代について検討を行った結果、継代時の培地交換頻度を増やす、トリプシン処理時間を短めにする、の2点が細胞の反応性を維持に重要であることが明らかとなりプロトコルの改定に繋がった。これまでの検討から反応性が一度低下した細胞の反応性が回復することはなく、一方、細胞の形態や生存率等に変化は認められないことから、本細胞の取り扱いには十分な注意を払う必要があると考えられる。最終的に日吉では14回の測定を実施し、クライテリア逸脱の原因が明らかな結果を除く5測定では、ほとんどのクライテリアを満たす再現性の高い結果を得た。しかし、特に Tamoxifen に関してはクライテリアを逸脱する傾向が明らかであり、その原因の一つとして国内3施設データから設定したクライテリアの幅が狭いことが挙げられる。すなわち、アゴニストアッセイにおけるクライテリア値の幅は、対数値で1.2~1.5であるのに対して、Tamoxifen のクライテリア値の幅は、約半分の0.7程度である。そこで、日吉の Task2 アッセイで採用された5測定結果を含めたクライテリア値のアップデートを

実施した。プロトコル及びクライテリアのアップデートは、SMT メンバーからの反対意見が示されなかった。アップデートされたプロトコル及びクライテリアの妥当性については、現在、準備を進めている日吉における Task3 結果によってアンタゴニスト作用検出の信頼性とともを検証を行う予定である。

LumiCell アッセイは、米国で開発されたやはり HeLa 法と同様の ER 転写活性化法であるが日米欧 3 極の代替法開発のための組織 (JaCVAM、ECVAM、ICCVAM) における国際共同開発の枠組みの一環として ICCVAM で計画したバリデーション研究協力を実施している。バリデーション試験に関しては、予定していた全てのフェーズの測定が全参加施設で終了し、データ解析の結果、特にアンタゴニストアッセイにおいては、高濃度域でほとんどの化合物が陽性判定となる等の問題があり、測定における最高濃度の変更や判定基準変更等の大幅なプロトコルの修正案が事務局より提案された。修正案は、SMT 電話会議で承認され、変更されたプロトコル案について、ICCVAM における peer review に向けてバックグラウンドレビュードキュメントの作成を進めており、今後、peer review 結果をもとに OECD ガイドライン案の提案の準備を進める。

AR EcoScreen 転写活性化測定法については、本研究班開始以前に実施されたアゴニスト、アンタゴニスト測定の国内バリデーション結果をもとにしたバリデーションレポート及びガイドライン案を peer review のため OECD に提案した。しかし、提案のもととなったバリデーション試験は、OECD によるバリデーション指針(GD34)が示される以前に実施されたため、多施設測定における化合物数が、アゴニスト、アンタゴニスト各 5 化合物であることに関して、第 8 回 VMG-NA ミーティングにおけ

る議論においては、peer review 段階で測定化合物の追加が要求される可能性が指摘された。さらに、OECD 事務局からは、peer review で追加試験が要求された後に試験を実施して再提案する場合、ガイドライン化にかかる時間がかかることから、可能であれば peer review 結果を待たずに追加試験実施を検討してはどうかとのコメントもあった。しかし、予算上の問題や以前のバリデーション参加施設のうち 1 施設が in vitro 事業を閉鎖してしまっているため追加バリデーションを実施するためには新たな施設での測定が必要であることから、直ちに追加測定を実施出来る見込みがないことから、まずは今回提出したバリデーションレポート、ガイドライン案でのピアレビューを進める運びとなった。測定化合物数が少ない理由としては、バリデーション費用の問題もあるが、アンドロゲン受容体に関しては、エストロゲン受容体と比べアゴニスト (アンタゴニスト) 作用が明確に示されている化合物が少なく、特にバリデーション試験が実施された当時にリファレンス化合物として選択可能な化合物が限られていたことが挙げられる。現在、米国 EPA で別の細胞系を用いた AR レポーター測定系のバリデーション試験を計画しており、今後、追加測定の検討及び追加バリデーションを実施する場合の測定対象物質についての検討のため米国 EPA との緊密な情報交換が必要と考察された。

E. 結論

本研究は、生殖毒性を始めとした様々な毒性の原因となる分子イベントである化学物質による内分泌かく乱性を迅速評価するための in vitro スクリーニング法について他施設バリデーション研究による再現性、信頼性についての検証を行い、OECD ガイドライン化を行うこ

とを目的としている。OECD では、加盟国が行政的に利用可能な内分泌かく乱性の評価手法の開発整備を推進するため、5段階からなるコンセプトアルフレームワークに基づきスクリーニングレベルから確定試験に至る試験法開発を進めており、本研究で対象とする *in vitro* スクリーニング系は、そのうちレベル 2 に相当する。いずれの試験法についても、バリデーション試験によりプロトコールにおける問題が明らかにされる一方で、問題解決等のためバリデーション試験進捗は当初計画より遅れたものの、本研究で得られた研究結果は、それぞれの試験法を国際的に受け入れられる試験法として成立させるために重要な情報であり本来の研究目的に沿うものである。我が国では、現在のところ内分泌かく乱性に基づく化学物質規制は検討されていないものの、非常に初期の段階からこの問題に取り組んできた経緯から、これまで OECD ガイドライン策定に多大な貢献をしてきており、本研究で進めている *in vitro* 評価法のガイドライン化においても非常に期待されており、早期のガイドライン化に向けた積極的な取り組みが重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Dourson ML, Parker A, Sweeney LM, Nishikawa A, Yoshida M, Ono A, Hirose A. "Proposal of new uncertainty factor application to derive tolerable daily intake." *Regul Toxicol Pharmacol.* 58(2):237-42.(2010)

2. 学会発表

小野 敦 ” *in vitro* 内分泌かく乱試験法の OECD ガイドライン受け入れ

(パネルディスカッション - *In vitro* トキシ

コロジー試験法の行政的な受け入れ)”

第 37 回 日本トキシコロジー学会学術年会 (沖縄) 2010.6

A. Ono, A. Hirose, M. Hirata-Koizumi, K. Matsuno*1, M. Kawabata, K. Yajima, T. Matsuyama, E. Kamata, M. Ema. "Gender-related differences of the hepatic enzyme activities in relation to the toxicity of benzotriazole ultraviolet absorber in rats" XII International congress of toxicology (Barcelona. Spain) 2010.7

F.Deal, W.Casey, P.Ceger, D.Allen, C.Yang, M.Nakamura, H.Kojima, A.Ono, H.Yoon, S.Han, W.Stokes "International Validation Study of an *in vitro* Cell Proliferation Test Method for Screening Potential Estrogenic Agonists and Antagonists in MCF - 7 cell" 50th Annual Meeting of Society of Toxicology (Washington DC, USA) 2011.3

添付資料 1 : Protocols of Stably Transfected Transcriptional Activation (STTA) Assay Using hER α -HeLa-9903 Cell line for Detecting Anti-estrogenic Activities of Chemicals - For Multi-laboratory Validation Study- Ver.2011/3/3

添付資料 2 : OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS XXX Stably Transfected Human Androgen Receptor- α Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist/Antagonist Activity of Chemicals (Version 2010 Nov.25)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3951	4504	4343	4195	3808	4291	4529	5186	4374	4229	3571	4072
B	3984	4230	4190	3891	4266	4382	4498	4940	4267	3970	5040	4237
C	4118	4081	4485	3874	4968	4424	4873	4826	4718	4481	4044	4290
D	3664	4555	4289	4743	4094	4658	4460	4521	4593	4887	4525	4242
E	4276	5021	4307	4049	4390	4749	4222	5260	4377	4386	3866	3893
F	3920	5010	4199	4542	4023	4922	5167	4317	4363	4460	4330	4387
G	4187	4127	4964	4283	4540	4515	3981	4383	4586	4161	4918	3518
H	3939	4015	3784	4079	3966	4228	5281	4225	4632	4130	4098	3796

AVG 4355.55
SD 382.3
CV(%) 8.8

Pass Criteria? [CV<10%] Pass Criteria.

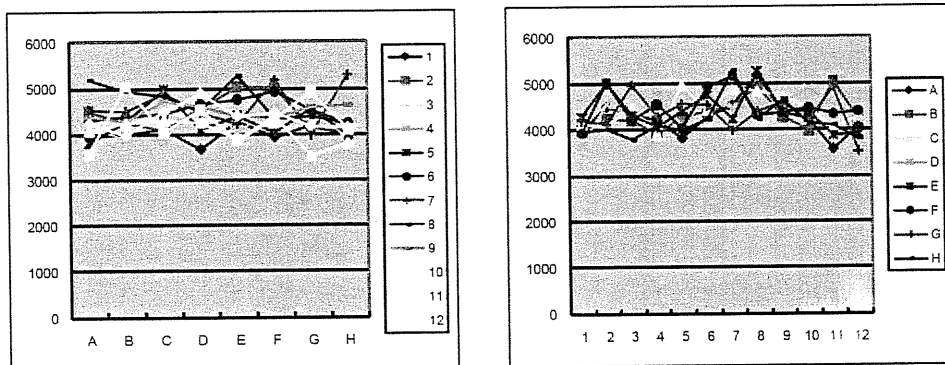


Fig. 1 日吉における Task1 エッジ効果測定結果

Criteria		N=1	N=2	N=3	N=4	N=5	
Fold Induction (FI)	>= 4	16.1	6.5	4.3	22.7	24.9	
1+2SDVC_FI		1.3	1.4	1.4	1.1	1.1	
10%PC-FI		2.5	1.6	1.3	3.2	3.4	
E2(1)	logPC10	< -11	-11.9	-12.8	-13.0	-12.3	-12.2
	logPC50	-11.4~-10.1	-10.6	-11.5	-11.7	-10.7	-10.7
	Log[EC50]	-11.3 ~ -10.1	-10.6	-11.5	-11.8	-10.5	-10.9
	Hill slope	0.7 ~ 1.5	1.0	0.8	1.1	0.7	1.0
E2(2)	logPC10	< -11	-12.0	-12.8	-12.9	-12.3	-12.5
	logPC50	-11.4~-10.1	-10.7	-11.6	-11.7	-10.7	-10.8
	Log[EC50]	-11.3 ~ -10.1	-10.6	-11.5	-11.7	-10.8	-10.9
	Hill slope	0.7 ~ 1.5	0.8	1.0	1.0	0.9	0.8
aE2	logPC10	-10.7~-9.3	-9.9	-10.8	-10.7	-10.2	-10.0
	logPC50	-9.6~-8.1	-8.8	-8.9	-9.5	-8.8	-8.9
	Log[EC50]	-9.6 ~ -8.4	-8.8	-9.1	-9.5	-8.8	-8.9
	Hill slope	0.9 ~ 2.0	0.9	0.6	1.0	0.9	1.0
Cor	logPC10	-	-	-	-	-	
	logPC50	-	-	-	-	-	
VC_average		263.5	161.3	241.7	552.0	634.5	
PC_average		4246.5	1053.7	1033.5	12542.3	15824.2	

Table 1 日吉における Task1 アゴニストアッセイ測定結果

Table 2 日吉におけるTask2アゴニストアッセイ測定結果

Criteria		ATG1	ATG2	ATG3	ATG4	ATG5	ATG6	ATG7	ATG8	ATG9	ATG10	ATG11	ATG12	ATG13	ATG14	
Fold Induction	>4 or 6	6.2	2.5	7.9	4.5	5.4	4.4	4.4	4.4	5.6	10.87	6.88	7.15	6.56	7.41	
RTA of 1nM E2	>= 100	203.62	270.16	211.53	227.39	200.38	200.71	218.06	183.97	181.11	180.62	188.01	230.65	175.79	188.04	
RTA of 1μM OHT	<= 39.4	40.12	19.30	34.86	43.27	41.66	39.91	40.43	17.14	27.13	35.39	44.04	48.90	28.45	26.87	
RTA of 100 μM Dig.	<= 0	-18.26	-66.67	-13.97	-27.89	-21.80	-29.02	-28.83	-28.98	-21.55	-9.79	-16.31	-15.47	-17.56	-15.16	
OHT	log[lin.IC30]	-9.62 ~ -8.73	-8.52	-8.57	-8.67	-8.38	-8.67	-8.52	-8.31	-9.08	-8.69	-8.74	-8.51	-8.36	-9.05	-9.06
	log[lin.IC50]	-9.46 ~ -8.16	-8.20	-8.33	-8.24	-8.05	-8.22	-8.19	-8.04	-8.70	-8.33	-8.34	-8.12	-8.01	-8.55	-8.60
	log[var.IC50]	-9.32 ~ -8.20	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	-8.44	-8.27	n.c.	n.c.	-8.55	-8.57
TAM	log[lin.IC30]	-7.55 ~ -6.84	-6.24	-6.33	-6.30	-6.16	-6.39	-6.27	-6.13	-6.74	-6.52	-6.37	-6.07	-6.12	-6.68	-6.58
	log[lin.IC50]	-7.08 ~ -6.26	-	-6.05	-5.73	-	-	-5.37	-	-6.35	-6.10	-5.91	-	-	-6.15	-6.18
	log[var.IC50]	-7.02 ~ -6.32	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	-6.44	-5.81	-5.79	n.c.	n.c.	-5.87	-6.27
RU486	log[lin.IC30]	-6.18 ~ -5.41	-5.50	-5.77	-5.59	-5.67	-5.88	-5.74	-5.67	-5.73	-5.77	-5.53	-5.66	-5.51	-5.78	-5.59
	log[lin.IC50]	-5.61 ~ -5.08	-5.08	-5.37	-5.09	-5.17	-5.25	-5.26	-5.26	-5.33	-5.30	-	-4.88	-	-5.26	-
	log[var.IC50]	-5.56 ~ -4.86	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.	-5.25	-5.20	-4.93	-	-	-5.20	-4.94
Flu.	log[lin.IC30]		-4.47	-4.69	-4.63	-4.49	-4.76	-4.83	-4.64	-4.83	-4.96	-4.61	-4.40	-4.43	-4.70	-4.65
	log[lin.IC50]		-4.07	-4.42	-4.25	-4.21	-4.25	-4.31	-4.30	-4.35	-4.40	-4.22	-	-4.01	-4.21	-4.06
1nM E2		3766.3	3956.2	11112.0	5818.8	4810.7	10063.5	10184.8	9103.3	13536.3	11953.3	5372.5	7787.8	8966.8	9501.8	
25pM E2		2015.8	1967.0	5626.8	2925.5	2644.3	5665.3	5326.2	5522.0	8126.0	6901.3	3066.2	3667	5459.7	5393.7	
DMSO		326.5	798.0	708.8	654.3	486.2	1298.2	1210.7	1257.0	1455.7	634.8	445.5	513	832.3	727.5	
	Judge	x	x	x	x	x	x	x	o	o	o	x	x	o	o	

Table 3 Fold Induction

Lab	trial	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance
CERI	1	11.4							
	2	10.3							
	3	9.6	8.8	16.1	11.2	1.3	2.9	25.6	8.3
	4	8.8							
	5	16.1							
Otsuka	1	8.3							
	2	8.7							
	3	9.0	8.3	9.0	8.7	0.2	0.4	4.1	0.1
Kaneka	1	10.0							
	2	10.5							
	3	9.5	9.2	13.2	10.5	0.7	1.6	15.3	2.6
	4	13.2							
	5	9.2							
Hiyoshi	1	4.4							
	2	5.6							
	3	10.9	4.4	10.9	7.0	1.1	2.5	35.3	6.1
	4	6.6							
	5	7.4							
	min	4.4	4.4	9.0	7.0	0.2	0.4	4.1	0.1
	max	16.1	9.2	16.1	11.2	1.3	2.9	35.3	8.3
	mean	9.4	7.7	12.3	9.3	0.8	1.8	20.1	4.3
	S.E.	0.6	1.1	1.5	1.0	0.2	0.6	6.7	1.8
	S.D.	2.7	2.2	3.1	1.9	0.5	1.1	13.4	3.6
	C.V.	28.4	28.8	24.9	20.4	58.0	61.3	67.0	85.2
	weighted mean				8.8				
	mean-2xS.D.	4.1			5.5				
	mean+2xS.D.	14.8			13.2				
	number of outlier	1			0				
	mean-2.5xS.D.	2.7			4.6				
	mean+2.5xS.D.	16.1			14.1				
	number of outlier	0			0				
	mean-3xS.D.	1.4			3.6				
	mean+3xS.D.	17.4			15.1				
	number of outlier	0			0				

Table 4 RTA of 1nM E2

Lab	trial	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance
CERI	1	142.4							
	2	167.2							
	3	174.7	122.6	174.7	154.2	9.6	21.4	13.9	457.3
	4	164.3							
	5	122.6							
Otsuka	1	161.9							
	2	165.2							
	3	112.2	112.2	165.2	146.4	17.1	29.7	20.3	881.7
Kaneka	1	181.7							
	2	193.2							
	3	161.2	158.4	193.2	173.2	6.5	14.5	8.4	209.6
	4	158.4							
	5	171.4							
Hiyoshi	1	184.0							
	2	181.1							
	3	180.6	175.8	188.0	181.9	2.0	4.5	2.5	20.3
	4	175.8							
	5	188.0							
	min	112.2	112.2	165.2	146.4	2.0	4.5	2.5	20.3
	max	193.2	175.8	193.2	181.9	17.1	29.7	20.3	881.7
	mean	165.9	142.3	180.3	163.9	8.8	17.5	11.2	392.2
	S.E.	5.1	14.9	6.4	8.2	3.2	5.3	3.8	186.1
	S.D.	21.5	29.9	12.7	16.4	6.4	10.7	7.6	372.1
	C.V.	13.0	21.0	7.1	10.0	72.4	60.9	67.7	94.9
	weighted mean				180.0				
	mean-2xS.D.	122.8			131.1				
	mean+2xS.D.	208.9			196.8				
	number of outlier	2			0				
	mean-2.5xS.D.	112.1			122.9				
	mean+2.5xS.D.	219.7			205.0				
	number of outlier	0			0				
	mean-3xS.D.	101.3			114.7				
	mean+3xS.D.	230.4			213.2				
	number of outlier	0			0				

Table 5 RTA of 1 μ M OHT

Lab	trial	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance
CERI	1	5.4							
	2	14.3							
	3	12.1	5.4	15.4	12.5	1.9	4.2	33.3	17.2
	4	15.4							
	5	15.1							
Otsuka	1	14.6							
	2	14.0							
	3	16.3	14.0	16.3	15.0	0.7	1.2	8.0	1.4
Kaneka	1	25.5							
	2	27.8							
	3	24.5	24.5	39.2	30.4	2.9	6.4	21.1	41.0
	4	35.0							
	5	39.2							
Hiyoshi	1	17.1							
	2	27.1							
	3	35.4	17.1	35.4	27.0	2.9	6.5	24.2	42.6
	4	28.4							
	5	26.9							
	min	5.4	5.4	15.4	12.5	0.7	1.2	8.0	1.4
	max	39.2	24.5	39.2	30.4	2.9	6.5	33.3	42.6
	mean	21.9	15.3	26.6	21.2	2.1	4.6	21.6	25.6
	S.E.	2.2	4.0	6.2	4.4	0.5	1.3	5.2	9.9
	S.D.	9.4	7.9	12.5	8.8	1.0	2.5	10.5	19.9
	C.V.	42.7	51.9	47.0	41.6	50.4	54.8	48.5	77.6
	weighted mean				15.1				
	mean-2xS.D.				3.2				
	mean+2xS.D.				40.6				
	number of outlier				0				
	mean-2.5xS.D.				-1.5				
	mean+2.5xS.D.				45.3				
	number of outlier				0				
	mean-3xS.D.				-6.2				
	mean+3xS.D.				49.9				
	number of outlier				0				

Table 6 RTA of 100 μ M Dig.

Lab	trial	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance
CERI	1	-8.5							
	2	-9.6							
	3	-10.5	-11.6	-5.5	-9.1	1.0	2.3	-25.5	5.4
	4	-11.6							
	5	-5.5							
Otsuka	1	-13.0							
	2	-12.2							
	3	-11.7	-13.0	-11.7	-12.3	0.4	0.7	-5.3	0.4
Kaneka	1	-10.0							
	2	-9.5							
	3	-10.5	-10.9	-7.1	-9.6	0.7	1.5	-15.6	2.2
	4	-7.1							
	5	-10.9							
Hiyoshi	1	-29.0							
	2	-21.5							
	3	-9.8	-29.0	-9.8	-18.6	3.2	7.2	-38.6	51.6
	4	-17.6							
	5	-15.2							
	min	-29.0	-29.0	-11.7	-18.6	0.4	0.7	-38.6	0.4
	max	-5.5	-10.9	-5.5	-9.1	3.2	7.2	-5.3	51.6
	mean	-12.4	-16.1	-8.5	-12.4	1.3	2.9	-21.3	14.9
	S.E.	1.3	4.3	1.4	2.2	0.6	1.5	7.1	12.3
	S.D.	5.6	8.6	2.8	4.4	1.3	2.9	14.2	24.6
	C.V.	-44.7	-53.5	-32.4	-35.2	97.1	100.4	-66.8	164.4
	weighted mean				-12.1				
	mean-2xS.D.				-23.5				
	mean+2xS.D.				-1.3				
	number of outlier				1				
	mean-2.5xS.D.				-26.3				
	mean+2.5xS.D.				1.5				
	number of outlier				1				
	mean-3xS.D.				-29.1				
	mean+3xS.D.				4.2				
	number of outlier				0				

Table 7-1 lin.IC30		4-Hydroxytamoxifen									
Lab	trial	Cytotox log[lin.IC20]	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance	
CERI	1	-	-9.53								
	2	-	-9.38								
	3	-	-9.28	-9.53	-9.25	-9.35	0.05	0.11	-1.2	0.01	
	4	-	-9.25								
	5	-	-9.30								
Otsuka	1	-	-8.95								
	2	-	-8.94								
	3	-	-9.48	-9.48	-8.94	-9.12	0.18	0.31	-3.4	0.10	
Kaneka	1	-	-9.06								
	2	-	-8.90								
	3	-	-9.21	-9.21	-8.87	-9.02	0.06	0.14	-1.5	0.02	
	4	-	-8.87								
	5	-	-9.08								
Hiyoshi	1	-	-9.08								
	2	-	-8.69								
	3	-	-8.74	-9.08	-8.69	-8.92	0.09	0.19	-2.2	0.04	
	4	-	-9.05								
	5	-	-9.06								
	min		-9.53	-9.53	-9.25	-9.35	0.05	0.11	-3.4	0.01	
	max		-8.69	-9.08	-8.69	-8.92	0.18	0.31	-1.2	0.10	
	mean		-9.10	-9.33	-8.94	-9.10	0.09	0.19	-2.1	0.04	
	S.E.		0.06	0.11	0.12	0.09	0.03	0.04	0.5	0.02	
	S.D.		0.24	0.22	0.23	0.18	0.06	0.09	1.0	0.04	
	C.V.		-2.6	-2.3	-2.6	-2.0	61.5	46.2	-46.3	91.48	
	weighted mean					-9.23					
	mean-2xS.D.		-9.58			-9.47					
	mean+2xS.D.		-8.63			-8.74					
	number of outlier		0			0					
	mean-2.5xS.D.		-9.70			-9.56					
	mean+2.5xS.D.		-8.51			-8.65					
	number of outlier		0			0					
	mean-3xS.D.		-9.82			-9.65					
	mean+3xS.D.		-8.39			-8.56					
	number of outlier		0			0					

Table 7-2 lin.IC30		Tamoxifen									
Lab	trial	Cytotox log[lin.IC20]	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance	
CERI	1	-5.21	-7.56								
	2	-	-7.32								
	3	-	-7.07	-7.56	-7.06	-7.24	0.09	0.21	-2.9	0.04	
	4	-	-7.06								
	5	-5.94	-7.17								
Otsuka	1	-	-7.00								
	2	-	-7.10								
	3	-	-7.52	-7.52	-7.00	-7.21	0.16	0.28	-3.8	0.08	
Kaneka	1	-5.29	-7.08								
	2	-5.34	-7.02								
	3	-5.39	-7.20	-7.21	-7.02	-7.14	0.04	0.09	-1.2	0.01	
	4	-	-7.21								
	5	-5.34	-7.21								
Hiyoshi	1	-5.15	-6.74								
	2	-	-6.52								
	3	-	-6.37	-6.74	-6.37	-6.58	0.06	0.14	-2.2	0.02	
	4	-	-6.68								
	5	-5.08	-6.58								
	min		-7.56	-7.56	-7.06	-7.24	0.04	0.09	-3.8	0.01	
	max		-6.37	-6.74	-6.37	-6.58	0.16	0.28	-1.2	0.08	
	mean		-7.02	-7.26	-6.86	-7.04	0.09	0.18	-2.5	0.04	
	S.E.		0.08	0.19	0.16	0.16	0.03	0.04	0.5	0.01	
	S.D.		0.33	0.38	0.33	0.31	0.05	0.08	1.1	0.03	
	C.V.		-4.7	-5.2	-4.8	-4.4	57.9	45.2	-43.1	80.64	
	weighted mean					-6.86					
	mean-2xS.D.		-7.68			-7.66					
	mean+2xS.D.		-6.37			-6.42					
	number of outlier		0			0					
	mean-2.5xS.D.		-7.84			-7.82					
	mean+2.5xS.D.		-6.20			-6.26					
	number of outlier		0			0					
	mean-3xS.D.		-8.01			-7.97					
	mean+3xS.D.		-6.04			-6.11					
	number of outlier		0			0					

Table 7-3 lin.IC30		RU486									
Lab	trial	Cytotox log[lin.IC20]	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance	
CERI	1	-4.84	-5.96								
	2	-4.74	-6.05								
	3	-4.63	-5.68	-6.05	-5.68	-5.86	0.09	0.18	-3.0	0.03	
	4	-4.82	-5.74								
	5	-5.42									
Otsuka	1	-	-5.84								
	2	-	-5.79								
	3	-	-6.07	-6.07	-5.79	-5.90	0.09	0.15	-2.5	0.02	
Kaneka	1	-4.85	-5.65								
	2	-5.32									
	3	-4.83	-5.70	-5.70	-5.46	-5.60	0.07	0.13	-2.3	0.02	
	4	-5.06									
	5	-4.94	-5.46								
Hiyoshi	1	-4.74	-5.73								
	2	-4.57	-5.77								
	3	-4.61	-5.53	-5.78	-5.53	-5.68	0.05	0.11	-2.0	0.01	
	4	-4.78	-5.78								
	5	-4.64	-5.59								
min			-6.07	-6.07	-5.79	-5.90	0.05	0.11	-3.0	0.01	
max			-5.46	-5.70	-5.46	-5.60	0.09	0.18	-2.0	0.03	
mean			-5.76	-5.90	-5.62	-5.76	0.07	0.14	-2.4	0.02	
S.E.			0.04	0.09	0.07	0.07	0.01	0.01	0.2	0.00	
S.D.			0.17	0.19	0.15	0.14	0.02	0.03	0.4	0.01	
C.V.			-3.0	-3.2	-2.6	-2.5	23.2	19.5	-17.6	38.97	
weighted mean						-5.78					
mean-2xS.D.			-6.10			-6.04					
mean+2xS.D.			-5.41			-5.48					
number of outlier			0			0					
mean-2.5xS.D.			-6.19			-6.11					
mean+2.5xS.D.			-5.32			-5.41					
number of outlier			0			0					
mean-3xS.D.			-6.28			-6.18					
mean+3xS.D.			-5.23			-5.34					
number of outlier			0			0					

Table 8-1 lin.IC50		4-Hydroxytamoxifen									
Lab	trial	Cytotox log[lin.IC20]	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance	
CERI	1	-	-9.29								
	2	-	-9.12								
	3	-	-9.06	-9.29	-9.03	-9.12	0.05	0.10	-1.1	0.01	
	4	-	-9.03								
	5	-	-9.09								
Otsuka	1	-	-8.54								
	2	-	-8.54								
	3	-	-9.17	-9.17	-8.54	-8.75	0.21	0.36	-4.2	0.13	
Kaneka	1	-	-8.59								
	2	-	-8.47								
	3	-	-8.78	-8.78	-8.35	-8.54	0.07	0.16	-1.9	0.03	
	4	-	-8.35								
	5	-	-8.49								
Hiyoshi	1	-	-8.70								
	2	-	-8.33								
	3	-	-8.34	-8.70	-8.33	-8.50	0.07	0.16	-1.9	0.03	
	4	-	-8.55								
	5	-	-8.60								
min			-9.29	-9.29	-9.03	-9.12	0.05	0.10	-4.2	0.01	
max			-8.33	-8.70	-8.33	-8.50	0.21	0.36	-1.1	0.13	
mean			-8.72	-8.99	-8.56	-8.73	0.10	0.20	-2.3	0.05	
S.E.			0.07	0.14	0.16	0.14	0.04	0.06	0.7	0.03	
S.D.			0.32	0.29	0.33	0.28	0.07	0.11	1.3	0.06	
C.V.			-3.6	-3.2	-3.8	-3.2	74.2	57.9	-57.8	115.03	
weighted mean						-8.94					
mean-2xS.D.			-9.36			-9.29					
mean+2xS.D.			-8.09			-8.16					
number of outlier			0			0					
mean-2.5xS.D.			-9.52			-9.43					
mean+2.5xS.D.			-7.93			-8.02					
number of outlier			0			0					
mean-3xS.D.			-9.68			-9.57					
mean+3xS.D.			-7.77			-7.88					
number of outlier			0			0					

Lab	trial	Cytotox log[lin.IC20]	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance	
CERI	1	-5.21	-7.21								
	2	-	-6.89								
	3	-	-6.62	-7.21	-6.60	-6.80	0.12	0.26	-3.8	0.07	
	4	-	-6.60								
	5	-5.94	-6.67								
Otsuka	1	-	-6.52								
	2	-	-6.65								
	3	-	-6.86	-6.86	-6.52	-6.68	0.10	0.17	-2.6	0.03	
Kaneka	1	-5.29	-6.53								
	2	-5.34	-6.45								
	3	-5.39	-6.63	-6.63	-6.45	-6.54	0.03	0.06	-1.0	0.00	
	4	-	-6.55								
	5	-5.34	-6.53								
Hiyoshi	1	-5.15	-6.35								
	2	-	-6.10								
	3	-	-5.91	-6.35	-5.91	-6.14	0.07	0.16	-2.6	0.03	
	4	-	-6.15								
	5	-5.08	-6.18								
			min	-7.21	-7.21	-6.60	-6.80	0.03	0.06	-3.8	0.00
			max	-5.91	-6.35	-5.91	-6.14	0.12	0.26	-1.0	0.07
			mean	-6.52	-6.76	-6.37	-6.54	0.08	0.16	-2.5	0.03
			S.E.	0.07	0.18	0.16	0.14	0.02	0.04	0.6	0.01
			S.D.	0.31	0.36	0.31	0.29	0.04	0.08	1.2	0.03
			C.V.	-4.8	-5.4	-4.9	-4.4	48.3	48.6	-46.4	82.85
			weighted mean				-6.46				
			mean-2xS.D.	-7.14			-7.11				
			mean+2xS.D.	-5.90			-5.96				
			number of outlier	1			0				
			mean-2.5xS.D.	-7.30			-7.25				
			mean+2.5xS.D.	-5.75			-5.82				
			number of outlier	0			0				
			mean-3xS.D.	-7.45			-7.40				
			mean+3xS.D.	-5.59			-5.68				
			number of outlier	0			0				

Lab	trial	Cytotox log[lin.IC20]	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance	
CERI	1	-4.84	-5.55								
	2	-	-5.55								
	3	-4.63	-5.33	-5.55	-5.33	-5.46	0.06	0.11	-2.1	0.01	
	4	-4.82	-5.39								
	5	-5.42									
Otsuka	1	-	-5.26								
	2	-	-5.30								
	3	-	-5.38	-5.38	-5.26	-5.31	0.04	0.06	-1.1	0.00	
Kaneka	1	-4.85	-5.25								
	2	-5.32									
	3	-4.83	-5.32	-5.32	-5.12	-5.23	0.06	0.10	-1.9	0.01	
	4	-5.06									
	5	-4.94	-5.12								
Hiyoshi	1	-4.74	-5.33								
	2	-4.57	-5.30								
	3	-4.61	-	-5.33	-5.26	-5.30	0.02	0.04	-0.7	0.00	
	4	-4.78	-5.26								
	5	-4.64	-								
			min	-5.55	-5.55	-5.33	-5.46	0.02	0.04	-2.1	0.00
			max	-5.12	-5.32	-5.12	-5.23	0.06	0.11	-0.7	0.01
			mean	-5.33	-5.40	-5.24	-5.32	0.04	0.08	-1.5	0.01
			S.E.	0.03	0.05	0.04	0.05	0.01	0.02	0.3	0.00
			S.D.	0.12	0.11	0.09	0.09	0.02	0.04	0.7	0.01
			C.V.	-2.2	-2.0	-1.7	-1.8	42.7	46.3	-45.7	77.01
			weighted mean				-5.31				
			mean-2xS.D.	-5.57			-5.51				
			mean+2xS.D.	-5.10			-5.13				
			number of outlier	0			0				
			mean-2.5xS.D.	-5.63			-5.56				
			mean+2.5xS.D.	-5.04			-5.09				
			number of outlier	0			0				
			mean-3xS.D.	-5.69			-5.61				
			mean+3xS.D.	-4.98			-5.04				
			number of outlier	0			0				

Table 9-1 var.IC50		4-Hydroxytamoxifen							
Lab	trial	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance
CERI	1	-9.12							
	2	-9.05							
	3	-9.06	-9.12	-9.04	-9.06	0.01	0.03	-0.4	0.00
	4	-9.04							
	5	-9.04							
Otsuka	1	-8.62							
	2	-8.61							
	3	-8.82	-8.82	-8.61	-8.68	0.07	0.12	-1.4	0.01
Kaneka	1	-8.56							
	2	-8.45							
	3	-8.75	-8.75	-8.26	-8.51	0.08	0.18	-2.1	0.03
	4	-8.26							
	5	-8.51							
Hiyoshi	1	Does not converge							
	2	-8.44							
	3	-8.27	-8.57	-8.27	-8.46	0.07	0.14	-1.6	0.02
	4	-8.55							
	5	-8.57							
	min	-9.12	-9.12	-9.04	-9.06	0.01	0.03	-2.1	0.00
	max	-8.26	-8.57	-8.26	-8.46	0.08	0.18	-0.4	0.03
	mean	-8.69	-8.82	-8.55	-8.68	0.06	0.12	-1.4	0.02
	S.E.	0.07	0.11	0.18	0.14	0.01	0.03	0.4	0.01
	S.D.	0.28	0.23	0.37	0.27	0.03	0.06	0.7	0.01
	C.V.	-3.3	-2.6	-4.3	-3.2	50.2	52.0	-53.3	76.69
	weighted mean				-9.00				
	mean-2xS.D.	-9.26			-9.23				
	mean+2xS.D.	-8.12			-8.13				
	number of outlier	0			0				
	mean-2.5xS.D.	-9.40			-9.36				
	mean+2.5xS.D.	-7.98			-7.99				
	number of outlier	0			0				
	mean-3xS.D.	-9.54			-9.50				
	mean+3xS.D.	-7.84			-7.85				
	number of outlier	0			0				

Table 9-2 var.IC50		Tamoxifen							
Lab	trial	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance
CERI	1	-7.13							
	2	-6.79							
	3	-6.73	-7.13	-6.64	-6.80	0.09	0.19	-2.8	0.04
	4	-6.71							
	5	-6.64							
Otsuka	1	-6.51							
	2	-6.73							
	3	-6.75	-6.75	-6.51	-6.66	0.08	0.13	-2.0	0.02
Kaneka	1	-6.52							
	2	-6.42							
	3	-6.65	-6.65	-6.42	-6.54	0.04	0.09	-1.3	0.01
	4	-6.53							
	5	-6.60							
Hiyoshi	1	-6.44							
	2	-5.81							
	3	-5.79	-6.44	-5.79	-6.04	0.13	0.30	-5.0	0.09
	4	-5.87							
	5	-6.27							
	min	-7.13	-7.13	-6.64	-6.80	0.04	0.09	-5.0	0.01
	max	-5.79	-6.44	-5.79	-6.04	0.13	0.30	-1.3	0.09
	mean	-6.49	-6.74	-6.34	-6.51	0.08	0.18	-2.8	0.04
	S.E.	0.08	0.14	0.19	0.17	0.02	0.05	0.8	0.02
	S.D.	0.36	0.29	0.38	0.33	0.04	0.09	1.6	0.04
	C.V.	-5.5	-4.3	-6.0	-5.1	46.4	51.3	-56.6	95.94
	weighted mean				-6.63				
	mean-2xS.D.	-7.21			-7.18				
	mean+2xS.D.	-5.78			-5.84				
	number of outlier	0			0				
	mean-2.5xS.D.	-7.39			-7.34				
	mean+2.5xS.D.	-5.60			-5.68				
	number of outlier	0			0				
	mean-3xS.D.	-7.57			-7.51				
	mean+3xS.D.	-5.42			-5.51				
	number of outlier	0			0				

Table 9-3 var.IC50		RU486								
Lab	trial	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance	
CERI	1	-5.43								
	2	-5.44								
	3	-5.15	-5.44	-5.15	-5.32	0.07	0.14	-2.6	0.02	
	4	-5.26								
	5									
Otsuka	1	-5.13								
	2	-4.87								
	3	-5.23	-5.23	-4.87	-5.08	0.11	0.19	-3.7	0.03	
Kaneka	1	-5.12								
	2									
	3	-5.26	-5.26	-5.12	-5.19	0.07	0.10	-1.9	0.01	
	4									
	5	Does not converge								
Hiyoshi	1	-5.25								
	2	-5.20								
	3		-5.25	-5.20	-5.22	0.02	0.03	-0.6	0.00	
	4	-5.20								
	5									
		min	-5.44	-5.44	-5.20	-5.32	0.02	0.03	-3.7	0.00
		max	-4.87	-5.23	-4.87	-5.08	0.11	0.19	-0.6	0.03
		mean	-5.21	-5.30	-5.09	-5.20	0.07	0.11	-2.2	0.02
		S.E.	0.04	0.05	0.07	0.05	0.02	0.03	0.7	0.01
		S.D.	0.15	0.10	0.15	0.10	0.04	0.07	1.3	0.01
		C.V.	-2.8	-1.8	-2.9	-1.9	56.5	58.7	-59.7	89.07
		weighted mean				-5.22				
		mean-2xS.D.	-5.51			-5.40				
		mean+2xS.D.	-4.91			-5.00				
		number of outlier	1			0				
		mean-2.5xS.D.	-5.58			-5.45				
		mean+2.5xS.D.	-4.84			-4.95				
		number of outlier	0			0				
		mean-3xS.D.	-5.66			-5.50				
		mean+3xS.D.	-4.77			-4.90				
		number of outlier	0			0				

Table 10-1 Hillslope		4-Hydroxytamoxifen								
Lab	trial	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance	
CERI	1	-4.056								
	2	-4.615								
	3	-4.494	-5.918	-4.056	-4.856	0.322	0.720	-14.8	0.518	
	4	-5.195								
	5	-5.918								
Otsuka	1	-0.963								
	2	-0.960								
	3	-0.530	-0.963	-0.530	-0.818	0.144	0.249	-30.5	0.062	
Kaneka	1	-0.786								
	2	-0.827								
	3	-0.583	-0.827	-0.583	-0.706	0.046	0.103	-14.6	0.011	
	4	-0.705								
	5	-0.627								
Hiyoshi	1	Does not converge								
	2	-0.870								
	3	-0.779	-0.892	-0.761	-0.826	0.033	0.065	-7.9	0.004	
	4	-0.761								
	5	-0.892								
		min	-5.918	-5.918	-4.056	-4.856	0.033	0.065	-30.469	0.004
		max	-0.530	-0.827	-0.530	-0.706	0.322	0.720	-7.890	0.518
		mean	-1.974	-2.150	-1.483	-1.801	0.136	0.284	-16.943	0.149
		S.E.	0.474	1.256	0.859	1.019	0.067	0.150	4.786	0.124
		S.D.	1.954	2.513	1.719	2.037	0.133	0.301	9.573	0.248
		C.V.	-99.0	-116.9	-115.9	-113.1	98.0	105.9	-56.5	166.4
		weighted mean				-0.856				
		mean-2xS.D.	-5.883			-5.875				
		mean+2xS.D.	1.934			2.273				
		number of outlier	1			0				
		mean-2.5xS.D.	-6.860			-6.894				
		mean+2.5xS.D.	2.911			3.292				
		number of outlier	0			0				
		mean-3xS.D.	-7.837			-7.912				
		mean+3xS.D.	3.888			4.310				
		number of outlier	0			0				

Table 10-2 Hillslope		Tamoxifen							
Lab	trial	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance
CERI	1	-1.137							
	2	-0.598							
	3	-0.803	-1.137	-0.598	-0.820	0.092	0.206	-25.2	0.043
	4	-0.688							
	5	-0.873							
Otsuka	1	-0.765							
	2	-0.865							
	3	-0.548	-0.865	-0.548	-0.726	0.094	0.162	-22.3	0.026
Kaneka	1	-0.765							
	2	-0.726							
	3	-0.713	-0.765	-0.611	-0.689	0.029	0.066	-9.5	0.004
	4	-0.630							
	5	-0.611							
Hiyoshi	1	-0.886							
	2	-0.373							
	3	-0.559	-0.886	-0.373	-0.637	0.106	0.236	-37.1	0.056
	4	-0.481							
	5	-0.885							
	min	-1.137	-1.137	-0.611	-0.820	0.029	0.066	-37.130	0.004
	max	-0.373	-0.765	-0.373	-0.637	0.106	0.236	-9.541	0.056
	mean	-0.717	-0.913	-0.533	-0.718	0.080	0.168	-23.540	0.032
	S.E.	0.043	0.079	0.055	0.039	0.017	0.037	5.663	0.011
	S.D.	0.180	0.158	0.110	0.077	0.034	0.074	11.325	0.022
	C.V.	-25.2	-17.3	-20.6	-10.7	42.9	44.4	-48.1	68.9
	weighted mean				-0.734				
	mean-2xS.D.	-1.078			-0.872				
	mean+2xS.D.	-0.356			-0.564				
	number of outlier	1			0				
	mean-2.5xS.D.	-1.168			-0.911				
	mean+2.5xS.D.	-0.266			-0.525				
	number of outlier	0			0				
	mean-3xS.D.	-1.258			-0.949				
	mean+3xS.D.	-0.176			-0.486				
	number of outlier	0			0				

Table 10-3 Hillslope		RU486							
Lab	trial	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance
CERI	1	-1.106							
	2	-0.866							
	3	-1.807	-1.807	-0.866	-1.305	0.205	0.409	-31.4	0.168
	4	-1.440							
	5								
Otsuka	1	-0.256							
	2	-0.419							
	3	-0.284	-0.419	-0.256	-0.320	0.050	0.087	-27.3	0.008
Kaneka	1	-1.356							
	2								
	3	-1.149	-1.356	-1.149	-1.253	0.104	0.146	-11.7	0.021
	4								
	5	Does not converge							
Hiyoshi	1	-1.058							
	2	-0.946							
	3		-1.058	-0.736	-0.913	0.094	0.163	-17.9	0.027
	4	-0.736							
	5								
	min	-1.807	-1.807	-1.149	-1.305	0.050	0.087	-31.369	0.008
	max	-0.256	-0.419	-0.256	-0.320	0.205	0.409	-11.686	0.168
	mean	-0.952	-1.160	-0.752	-0.948	0.113	0.202	-22.055	0.056
	S.E.	0.137	0.291	0.186	0.227	0.033	0.071	4.460	0.037
	S.D.	0.474	0.582	0.373	0.453	0.065	0.142	8.920	0.075
	C.V.	-49.8	-50.2	-49.6	-47.8	57.6	70.6	-40.4	134.2
	weighted mean				-0.480				
	mean-2xS.D.	-1.901			-1.854				
	mean+2xS.D.	-0.003			-0.041				
	number of outlier	0			0				
	mean-2.5xS.D.	-2.138			-2.080				
	mean+2.5xS.D.	0.234			0.185				
	number of outlier	0			0				
	mean-3xS.D.	-2.375			-2.307				
	mean+3xS.D.	0.471			0.412				
	number of outlier	0			0				

Table 11 Abs. of Spike-in Control

Lab	trial	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance
CERI	1	0.536							
	2	0.552							
	3	0.456	0.235	0.552	0.424	0.060	0.135	31.8	0.018
	4	0.340							
	5	0.235							
Otsuka	1	0.679							
	2	1.680							
	3	0.766	0.679	1.680	1.042	0.320	0.555	53.2	0.307
Kaneka	1	0.426							
	2	0.347							
	3	0.227	0.227	0.699	0.402	0.081	0.181	45.1	0.033
	4	0.699							
	5	0.309							
Hiyoshi	1	0.538							
	2	0.757							
	3	0.646	0.538	0.849	0.684	0.054	0.121	17.7	0.015
	4	0.629							
	5	0.849							
	min	0.227	0.227	0.552	0.402	0.054	0.121	17.7	0.015
	max	1.680	0.679	1.680	1.042	0.320	0.555	53.2	0.307
	mean	0.593	0.420	0.945	0.638	0.129	0.248	36.9	0.093
	S.E.	0.078	0.113	0.252	0.149	0.064	0.103	7.8	0.072
	S.D.	0.330	0.225	0.505	0.298	0.128	0.206	15.6	0.143
	C.V.	55.6	53.7	53.4	46.8	99.4	83.2	42.2	153.4
	weighted mean				0.580				
	mean-2xS.D.	-0.067			0.041				
	mean+2xS.D.	1.252			1.234				
	number of outlier	1			0				
	mean-2.5xS.D.	-0.232			-0.108				
	mean+2.5xS.D.	1.417			1.383				
	number of outlier	1			0				
	mean-3xS.D.	-0.396			-0.257				
	mean+3xS.D.	1.582			1.532				
	number of outlier	1			0				

Table 12 Abs. of Cytotox. Control

Lab	trial	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance
CERI	1	0.064							
	2	0.065							
	3	0.066	0.062	0.066	0.064	0.001	0.002	2.5	0.000
	4	0.063							
	5	0.062							
Otsuka	1	0.073							
	2	0.091							
	3	0.101	0.073	0.101	0.088	0.008	0.014	16.1	0.000
Kaneka	1	0.068							
	2	0.078							
	3	0.080	0.068	0.080	0.075	0.002	0.005	6.3	0.000
	4	0.073							
	5	0.077							
Hiyoshi	1	0.071							
	2	0.074							
	3	0.085	0.071	0.085	0.076	0.002	0.005	7.2	0.000
	4	0.073							
	5	0.077							
	min	0.062	0.062	0.066	0.064	0.001	0.002	2.5	0.000
	max	0.101	0.073	0.101	0.088	0.008	0.014	16.1	0.000
	mean	0.075	0.069	0.083	0.076	0.003	0.007	8.0	0.000
	S.E.	0.002	0.002	0.007	0.005	0.002	0.003	2.9	0.000
	S.D.	0.010	0.005	0.014	0.010	0.003	0.005	5.7	0.000
	C.V.	13.7	7.0	17.4	13.1	98.0	83.0	71.6	143.8
	weighted mean				0.065				
	mean-2xS.D.	0.054			0.056				
	mean+2xS.D.	0.095			0.096				
	number of outlier	1			0				
	mean-2.5xS.D.	0.049			0.051				
	mean+2.5xS.D.	0.100			0.101				
	number of outlier	1			0				
	mean-3xS.D.	0.044			0.046				
	mean+3xS.D.	0.105			0.106				
	number of outlier	0			0				

Table 13 Abs. of Spike-in Control - Cytotox. Control

Lab	trial	measured	min	max	mean	S.E.	S.D.	C.V.	variance
CERI	1	0.472							
	2	0.486							
	3	0.391	0.173	0.486	0.360	0.060	0.133	37.1	0.018
	4	0.277							
	5	0.173							
Otsuka	1	0.606							
	2	1.589							
	3	0.665	0.606	1.589	0.953	0.318	0.551	57.8	0.304
Kaneka	1	0.358							
	2	0.269							
	3	0.147	0.147	0.626	0.326	0.082	0.184	56.3	0.034
	4	0.626							
	5	0.232							
Hiyoshi	1	0.467							
	2	0.683							
	3	0.561	0.467	0.772	0.606	0.054	0.120	19.7	0.014
	4	0.556							
	5	0.772							
	min	0.147	0.147	0.486	0.326	0.054	0.120	19.7	0.014
	max	1.589	0.606	1.589	0.953	0.318	0.551	57.8	0.304
	mean	0.518	0.348	0.868	0.562	0.128	0.247	42.7	0.092
	S.E.	0.076	0.112	0.247	0.145	0.064	0.102	9.0	0.071
	S.D.	0.324	0.225	0.494	0.290	0.127	0.205	18.0	0.141
	C.V.	62.6	64.6	57.0	51.5	99.0	82.8	42.2	152.7
	weighted mean				0.509				
	mean-2xS.D.	-0.130			-0.017				
	mean+2xS.D.	1.167			1.141				
	number of outlier	1			0				
	mean-2.5xS.D.	-0.293			-0.162				
	mean+2.5xS.D.	1.329			1.286				
	number of outlier	1			0				
	mean-3xS.D.	-0.455			-0.307				
	mean+3xS.D.	1.492			1.431				
	number of outlier	1			0				

Table 14 Quality Criteria for each plate for anti-estrogenic assay

	pre validation	200812 update	201103 update	mean±2SD	mean±2.5SD	mean±3SD
Fold-induction of Spike-in Control (25 µM of E)	> 6	>= 4	>= 4	4.1 ~ 14.8	2.7 ~ 16.1	1.4 ~ 17.4
RTA of 1 nM E2	> 100%	>= 100%	>= 100%	122.8 ~ 208.9	112.1 ~ 219.7	101.3 ~ 230.4
RTA of 1 µM OHT	< 16.9%	=< 39.4%	=< 40.6%	3.2 ~ 40.6	-1.5 ~ 45.3	-6.2 ~ 49.9
RTA of 100 µM Dig.	< 0%	=< 0%	=< 0%	-23.5 ~ -1.3	-26.3 ~ 1.5	-29.1 ~ 4.2
				-21.1 ~ -3.7	-23.3 ~ -1.5	-25.5 ~ 0.7

Table 15 Performance Criteria for anti-estrogenic assay (Acceptable range for reference chemicals)

	pre validation	200812 update	201103 update	mean±2SD	mean±2.5SD	mean±3SD
OHT	log [lin.IC30]	-9.86 ~ -8.76	-9.62 ~ -8.73	-9.58 ~ -8.63	-9.70 ~ -8.51	-9.82 ~ -8.39
	log [lin.IC50]	-9.79 ~ -8.28	-9.46 ~ -8.16	-9.36 ~ -8.09	-9.36 ~ -8.09	-9.52 ~ -7.93
	log [var.IC50]	-9.15 ~ -8.94	-9.32 ~ -8.20	-9.26 ~ -8.12	-9.26 ~ -8.12	-9.40 ~ -7.98
TAM	log [lin.IC30]	-7.88 ~ -6.99	-7.55 ~ -6.84	-7.68 ~ -6.37	-7.84 ~ -6.20	-8.01 ~ -6.04
	log [lin.IC50]	-7.48 ~ -6.50	-7.08 ~ -6.26	-7.14 ~ -5.90	-7.30 ~ -5.75	-7.45 ~ -5.59
	log [var.IC50]	-7.17 ~ -6.77	-7.02 ~ -6.32	-7.21 ~ -5.78	-7.21 ~ -5.78	-7.39 ~ -5.60
RU486	log [lin.IC30]	-6.20 ~ -5.32	-6.18 ~ -5.41	-6.10 ~ -5.41	-6.10 ~ -5.32	-6.28 ~ -5.23
	log [lin.IC50]	-5.70 ~ -5.09	-5.61 ~ -5.08	-5.57 ~ -5.10	-5.57 ~ -5.10	-5.63 ~ -5.04
	log [var.IC50]	-6.22 ~ -5.32	-5.56 ~ -4.86	-5.51 ~ -4.91	-5.51 ~ -4.91	-5.58 ~ -4.84
1st: Corticosterone 2nd, 3rd: Fultamide	log [lin.IC30]	-	-	-	-	-
	log [lin.IC50]	-	-	-	-	-
	log [var.IC50]	-	-	-	-	-

**Protocols of Stably Transfected Transcriptional Activation (STTA)
Assay Using hER α -*HeLa*-9903 Cell line for Detecting
Anti-estrogenic Activities of Chemicals
= For Multi-laboratory Validation Study=**

**Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan
(CERI)**

Table of Contents

0. ACRONYMS	5
1. PROVISIONAL OVERVIEW OF THE EXPERIMENTS FOR THE MULTI-LABORATORY VALIDATION STUDY	7
2. PURPOSE OF THE ASSAY	8
3. EQUIPMENTS	9
3.1. EQUIPMENTS FOR THE STUDY	9
4. MATERIALS	10
4.1. CELL LINES	10
4.2. CELL MEDIUM	10
4.2.1. REAGENT	10
4.2.2. PREPARATION OF 10%DCC-FBS-EMEM	12
4.3. PHOSPHATE BUFFERED SALINE WITHOUT Mg^{2+} AND Ca^{2+} (PBS (-))	12
4.4. EDTA-TRYPISINE	12
4.5. SOLVENT FOR CHEMICAL STOCK SOLUTIONS	13
4.6. CONTROL CHEMICALS AND REFERENCE CHEMICALS FOR TASK-1 AND TASK-2	13
4.6.1. 17B-ESTRADIOL (E2)	13
4.6.2. 17A-ESTRADIOL (AE2)	14
4.6.3. CORTICOSTERONE (COR)	14
4.6.4. 4-HYDROXYTAMOXIFEN (OHT)	14
4.6.5. TAMOXIFEN (TAM)	14
4.6.6. RU486	14
4.6.7. FLUTAMIDE (FLU)	15
4.6.8. DIGITONIN (DIG)	15
4.7. TEST CHEMICALS	15
4.8. LUCIFERASE ASSAY REAGENT	15

4.9. PHOSPHATE BUFFERED SALINE WITH Mg^{2+} (PBS (+)).....	16
4.10. REAGENT FOR CYTOTOXICITY (CELL VIABILITY) TESTING	16
5. CELL CULTURING	17
5.1. RECONSTITUTION OF CELLS FROM THE FROZEN STOCK	18
5.2. MEDIUM REPLACEMENT	18
5.3. CELL PROPAGATION	18
5.4. PREPARATION OF FROZEN STOCK	19
6. PROCEDURE FOR THE ER-STTA ASSAY	21
6.1. SEEDING CELLS IN A 96-WELL PLATE.....	25
6.2. CHEMICAL EXPOSURE FOR ESTROGENIC ASSAY.....	26
6.2.1. DILUTIONS OF REFERENCE CHEMICALS IN A 1.5 mL POLYPROPYLENE (PP) TUBE	26
6.2.2. PREPARATION OF DMSO DILUTIONS OF THE TEST CHEMICALS IN A 96-WELL PLATE (FIG. 4).....	26
6.2.3. DILUTION IN A 96-WELL DEEP-WELL PLATE “WITH MEDIUM” (FIG. 4).....	27
6.2.4. CHEMICAL EXPOSURE TO CELLS.....	27
6.3. CHEMICAL EXPOSURE FOR ANTI-ESTROGENIC ASSAY	28
6.3.1. DILUTIONS OF REFERENCE CHEMICALS AND SPIKE-IN SOLUTION IN A 1.5 mL POLYPROPYLENE (PP) TUBE.....	28
6.3.2. PREPARATION OF DMSO DILUTION OF THE TEST CHEMICALS IN A 96-WELL PLATE (FIG. 6)	28
6.3.3. 10% DCC-FBS-EMEM CONTAINING 75 pM E2.....	29
6.3.4. 10% DCC-FBS-EMEM CONTAINING 0.3% DMSO.....	29
6.3.5. DILUTION IN A 96-WELL DEEP-WELL PLATE “WITH MEDIUM” (FIG. 6).....	31
6.3.6. CHEMICAL EXPOSURE TO CELLS.....	32
6.4. LUCIFERASE ASSAY	33
6.5. CYTOTOXICITY (CELL VIABILITY) ASSAY USING CELL COUNTING KIT-8 (CCK-8)	33
7. DATA ANALYSIS	34