

U.S. EPA Endocrine Disruptor Screening Program: Use of Computational Tools in Prioritization and Screening

Dr. Scott G. Lynn

Exposure Assessment Coordination and Policy Division
Office of Science Coordination and Policy
Office of Chemical Safety and Pollution Prevention
US Environmental Protection Agency

Extend2010
Tokyo, Japan
January 15, 2015

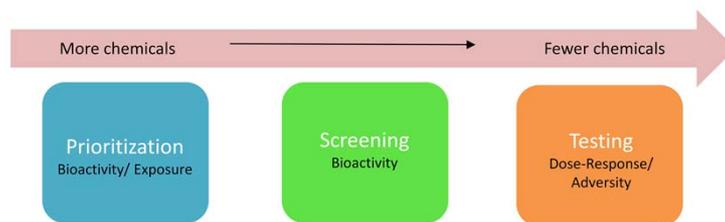
This presentation does not necessarily reflect US EPA policy.

皆さん、こんにちは。ここで話しかけることをうれしく思います。また、環境省の皆さんにも御招待いただき感謝申し上げます。

米国のEPAというのは、日本の環境省との間で既に10年に及ぶ2機関間協定を結んでおきまして、いろいろな試験法ガイドラインを共同で作っております。Tier 1、Tier 2のアッセイあるいは試験についての協力を行っています。ということで、このような形で日本のパートナーと共同するという事は非常にうれしいことです。

Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP)

- Established in 1998
 - Protection of human health and wildlife
 - Includes estrogen, androgen and thyroid pathways
 - Approach
 - Prioritization based on exposure and high throughput bioactivity
- “Data resulting from HTPS [HTS] will be combined with exposure-related information, and with any other effects-related information that is available, for each chemical for the purpose of setting priorities for T1S [screening]” (EDSTAC 1998)
- Screening for bioactivity
 - Testing for dose-response and adverse effects



EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 2 of 34

まず、内分泌かく乱化学物質スクリーニング計画、こちらは98年に創設されました。ヒト健康及び野生生物の保護を目的としています。そして、その中でこれに関連する様々なもの、例えば食品の品質であるとか、あるいはエストロゲン、アンドロゲンあるいは甲状腺軸についてもしっかりと含んでいくという形になっています。これが当局のほうから指定されたものということになります。

さらに、ばく露及びハイスループット（HTPS）生物活性に基づく優先順位付けを行っていくことになります。98年のEDSTAC報告書があります。「HTPSデータは、各物質ごとにTIS[スクリーニング]に向けた優先順位付けの目的で、ばく露関連情報、その他あらゆる入手可能な影響関連情報と統合されることになる」、これが16年前のことです。

そして今我々はいよいよこのビジョンを実現する段階にまで来ています。ハイスループットのツールを使うことができるようになってきている。そして、それを用いることによって内分泌かく乱化学物質の優先順位を付けていくことができるようになってきています。

まず全体像からお話をしましょう。最初に優先順位を付けていくのですが、生物活性とばく露をみていきます。それから生物活性をみながらスクリーニングを行っていきます。最後が用量反応関係あるいは有害性を決めていくということで、試験の実施を行わなくてはならないということです。こちらの情報がリスク評価の分野に入っていくというプロセスです。

Evolution of the EDSP

- Based on current pace it could take decades to screen all 10,000 chemicals for potential to interact with the endocrine system
- To address thousands of chemicals for potential to interact with the endocrine system, we must implement a more strategic approach to prioritize chemicals for targeted screening
- Recent advances in computational toxicology herald an important “evolutionary turning point” and an accelerated pace of screening and testing

EXTEND2010

January 15, 2014

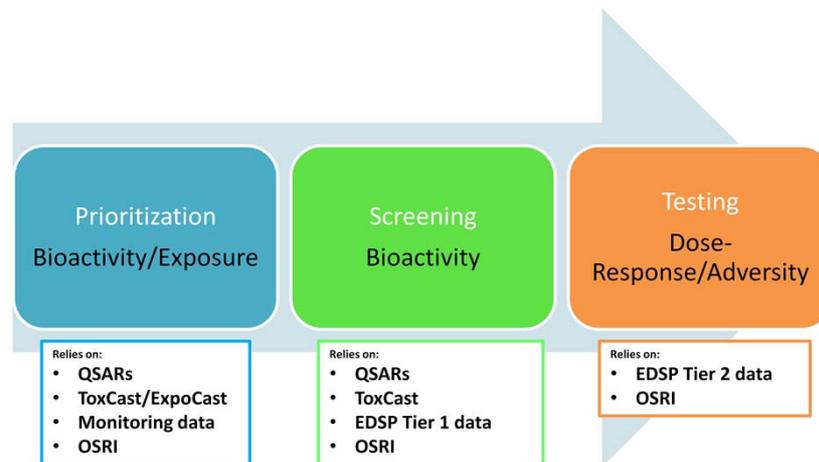
Slide 3 of 34

EDSPというのはかなり進化を遂げているものだということです。Tier 1、Tier 2のアッセイというのがありますが、それを全部やろうと思ったならば、既に10,000ぐらいの化学物質がありますから、それを全部スクリーニングしようとする現行ペースで数十年かかってしまうわけです。

ですから、もっと戦略的な手法によって優先順位付けをしなくはいけません。それによってスクリーニングの対象を絞っていかなくてはならないということになります。これまで10年間にわたって、どこからみていこうかということについて考えてきました。これを我々は優先順位付けと言っているわけですが、最近はいろいろな演算手法あるいは毒性学における演算手法が進歩したことで、我々は大きな進化を遂げたことになりました。スクリーニング・試験の加速化ができるようになっています。

EDSP

Prioritization, Screening & Testing



EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 4 of 34

まず優先順位付け、その部分では生物活性とばく露をみていく。これについては後ほどまたもう少し詳しくお話をしたいと思います。

また、定量的な構造決定などを使っていく。これがスクリーニング、生物活性です。さらに毒性学に関してのToxCastを使っていくことができるようになります。これも同じように国立センターの側で提出するものとなっています。それから、その他の科学的な情報についてこの中に入れていくもの、EDSPです。それからQSARあるいはEDSP Tier 1データを使っていくことができます。この中には11のアッセイ系が入っています。そのうちの6つについては、生物試験 (*in vivo*)、それから試験管内試験 (*in vitro*) など入っています。それからEDSP Tier 1ですが、こちらのバリデーションについては2008年に行われました。これについては、どのような化学物質がどんな状況となっているか後ほどお話をします。それからOSRI。

さらに試験の実施の分においては、EDSP Tier 2のデータ、これはまたどのような状態となっているか後ほどお話をしたいと思います。

FIFRA Scientific Advisory Panel Meeting, December 2-5, 2014
Integrated Bioactivity Exposure Ranking (IBER): Computational
Approach for the Screening of Chemicals in the EDSP

■ **ToxCast**

- ER – Prioritization, Tier 1 Substitution, WoE
- AR – Prioritization (future Tier 1 Substitution, WoE)

■ **HTTK/rTK**

- Bridges *in vitro*, concentration-based ToxCast data to *in vivo*, dose-based Exposures
- July 2014 FIFRA SAP

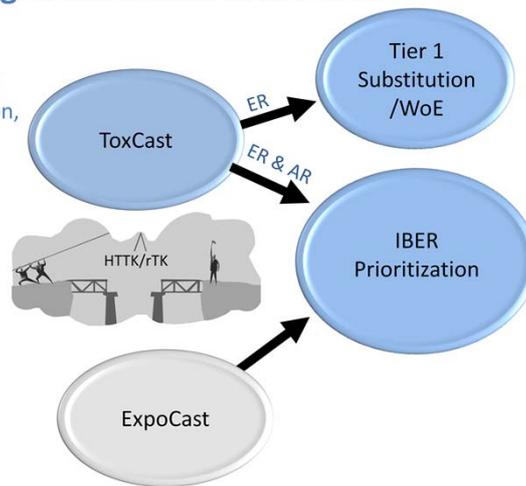
■ **ExpoCast**

- High throughput exposure
- July 2014 FIFRA SAP

■ **IBER Approach to Prioritization**

Tools and approach not intended to provide a precise assessment similar to traditional low throughput risk assessments (e.g., quantitative risk assessments using data from EDSP Tier 2 studies).

Endocrine Activity and Exposure-based Prioritization and Screening (December 2014)
<http://www.regulations.gov> (Search under EPA docket ID: EPA-HQ-OPP-2014-0614)



EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 5 of 34

こちらは先月、1ヶ月くらい前のこととなりますが、12月2～5日にアドバイザーパネルが行われました。FIFRAといわれるものです。FIFRAは、殺虫剤とか、防カビ剤などについて統括するものです。EPAその他の組織がこの中に入ってきます。学会その他の分野から人が入ってきて、政府以外のところからも入ってくる場所があります。この科学諮問パネル会合が行われていきましたが、その中で議論を行った上で、我々のアプローチについてのフィードバックがなされました。こちらですが、SAPのミーティングが行われました。こちらは包括的な生物活性ばく露ランキング（IBER）です。今日はこのIBERという言葉は何回も使わせていただきたいと思います。EDSPにおける化学物質スクリーニングのための演算手法を用いた取組です。

ToxCastがよく行われていますが、このToxCastの中にはいくつかのアッセイ系があります。エストロゲン受容体の評価がその一つです。この部分では優先順位付けを行っていきませんが、Tier 1をどのようにして代用していくのか。そしてweight-of-evidence (WoE) です。まず、ここではTier 1アッセイが行われたならば、その後に我々はこの試験結果の重み付けをしていく。その他のいろいろな科学的な知見を用いて、どのアッセイ、どの試験を実際にTier 2で活用すべきか考えていくわけです。

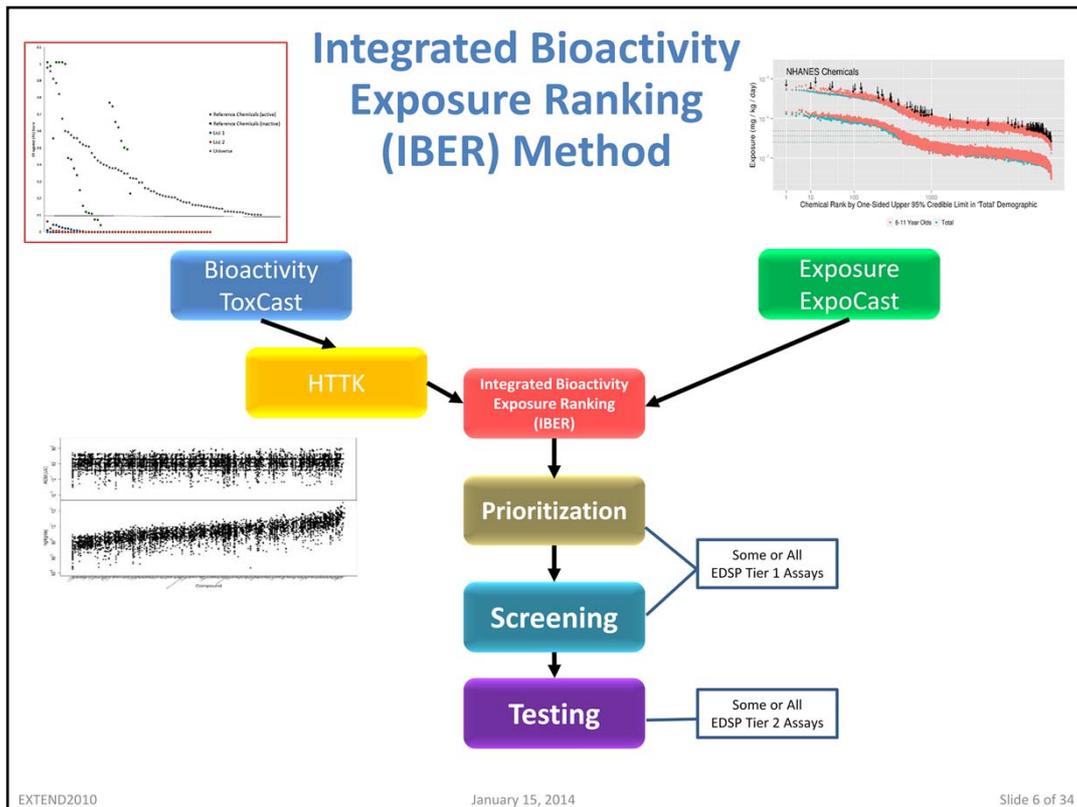
今のがエストロゲンですが、こちらが8つあります。それからアンドロゲンについても8つあるわけです。こちらの優先順位ですが、こちらについても今後のTier 1等について考えていくわけです。これがToxCast、エストロゲンが上に向かって矢印、そして、これについてはTier 1の代用をするために用いられるようになります。エストロゲン受容体、トランススuspensionのアッセイもありますし、場合によっては子宮肥大試験、*in vivo*もあります。生体内のもの。

また、ERとAR、エストロゲン受容体とアンドロゲン受容体両方をみていきますが、こちらを用いて、どの化学物質をTier 1に最初に入れていくかについての優先順位を付けることが可能となります。

こちらで橋渡しせねばなりません。ToxCastとExpoCastの間ですが、これはハイスループットのトキシコキネティクスあるいはリバーSTKが行われるようになります。ToxCastデータから、通常はμM濃度になりますが、これを用量に基づく*in vivo*のmgないしはkgレベルのばく露と結び付けます。こちらについては、SAPの会議が2014年の7月に行われました。FIFRAの会議です。こちらでは、12月の情報にこれがつながっていくものです。

それからもう一つ、information.govがあります。こちらについて7月の会議においての情報が入っていますが、それについては今日のお話の一番最後に、どのようなものがあるかリンクをお示ししたいと思います。

最後になりますが、ExpoCastです。このランク付けを、生態ばく露に関して、これを組合せてみていきます。ToxCastとExpoCastを組み合わせることによって、ハイスループットのトキシコキネティクスを橋渡しとして使っていくアプローチをお見せしています。こちらは完全に正確な、いわゆる従来型のロースループットに匹敵する結果を出すことを意図しているわけではありません。むしろEDSP Tier 2の試験データを用いた定量的なリスク評価であるとお考えいただきたいと思います。

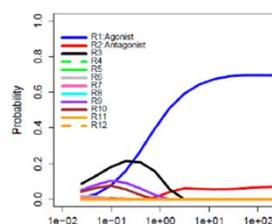
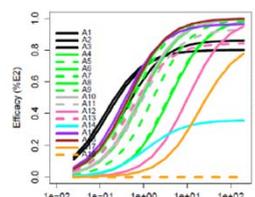


IBER（包括的生物活性ばく露ランキング）ですが、こちらはToxCastを用いたもの、それからこれを今度転換していきます。ハイスループットのTKのデータを用いていく。そしてそれを今度ExpoCastからばく露情報が入ってくる。その結果、IBERランキングが生まれていきます。このIBERランキング、包括的生物活性ばく露ランキングについてですが、こちらで優先順位を付けるだけではなく、場合によっては、ToxCastのデータをみた上で、これは要らないということもあり得えます。これはTier 1のアッセイです。そして、その上でTier 2の試験に意向します。

先ほどもお話ししましたが、WoEですが、これは内分泌系との相互作用があるかどうかについてTier 1でみていく。その上で、どのTier 2の試験を使っていくべきなのか。そして、どの化学物質を試験の対象とすべきかを考えることができます。これが*in vivo*の状況です。Tier 2の試験について、どんな状況であったか、今日の発表の一番最後にお話をしたいと思います。

ER Methodological Approach

- Use computational tools to model ER bioactivity – focus on agonism
 - 16 ToxCast assays relevant to agonist pathway
 - Model AUC for R1 (agonist) and R2 (antagonist) activities
- Prioritize chemicals in EDSP universe for ER agonist bioactivity



EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 7 of 34

さて、エストロゲン受容体の方法論的な手法についてですが、繰り返しになりますが、計算科学的なツールを用いてERの生物活性モデルへと使っていく。その際にはアゴニズムに着目します。いろいろな文献がありますが、アゴニスト経路に関連する16のToxCast試験があります。それからもう一つ、アンタゴニストもあります。こちらではアゴニストパスウェイをR1で使っていきます。これはFIFRAの会議の文書の中に入っていますので、それはまた最後にリンクをお示ししますので、ご覧いただきたいと思います。

そして、この中では、いわゆるAUC（曲線下面積）を使っています。二つのスコアをまずこのモデルからつくります。最初がR1（アゴニスト）です。この中では、化合物がエストロゲン受容体をアゴニスト的に駆動することができるかどうか。それからR2の曲線ですが、こちらはアンタゴニストとして活性を持つかどうかについてみているもの。アゴニストとアンタゴニスト両方の曲線を用いていく。その上で化学物質に関しての優先順位付けを行っていきます。

これはERアゴニスト生物活性をToxCastのデータを用いて決定を行っています。その際には科学的な信頼性が重要となってきます。

Scientific Confidence Needed To Use [Any] New Assay

- Are reference chemicals that include a range of structures and potencies accurately detected?
 - *In vitro* reference chemicals
 - *In vivo* reference chemicals
- How well do new methods compare with current methods?
 - ToxCast versus Tier 1 results

EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 8 of 34

新規の試験を行うにあたっては、常に科学的信頼性が重要になります。その際には、12月にそのパネルのメンバーに議論していただいたわけですが、対照物質が用いられています。多様な構造や力価を網羅している。しかも正確に検出されなくてはならない。*in vitro*、*in vivo*いずれでも対照物質を使用します。

このような新規手法が現行手法と比べてどうなのかということですが、これはToxCastの結果とTier 1アッセイの結果を比較することによって得ることができます。先ほどお話ししましたようにエストロゲン受容体結合アッセイ、それから子宮肥大試験の結果についても確認していくということになります。

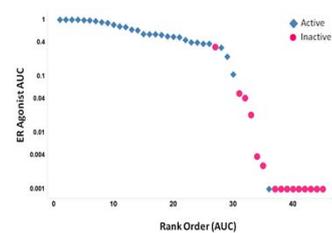
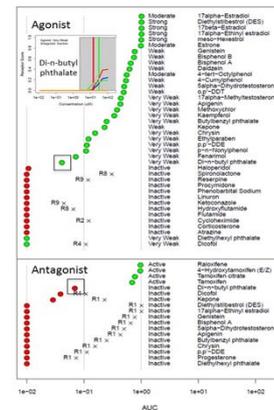
Scientific Confidence: ER Reference Chemicals

- Excellent performance of ER AUC scores against *in vitro* reference chemicals

| | |
|-------------|------|
| # True Pos | 28 |
| # True Neg | 12 |
| # False Pos | 0 |
| # False Neg | 4 |
| PPV | 1.0 |
| NPV | 0.75 |
| BA | 0.94 |
| Sensitivity | 0.88 |
| Specificity | 1.0 |

- Excellent performance of ER AUC scores against *in vivo* reference chemicals

| | |
|-------------|------|
| # True Pos | 28 |
| # True Neg | 12 |
| # False Pos | 1 |
| # False Neg | 1 |
| PPV | 0.97 |
| NPV | 0.92 |
| BA | 0.95 |
| Sensitivity | 0.97 |
| Specificity | 0.92 |



EXTEND2010

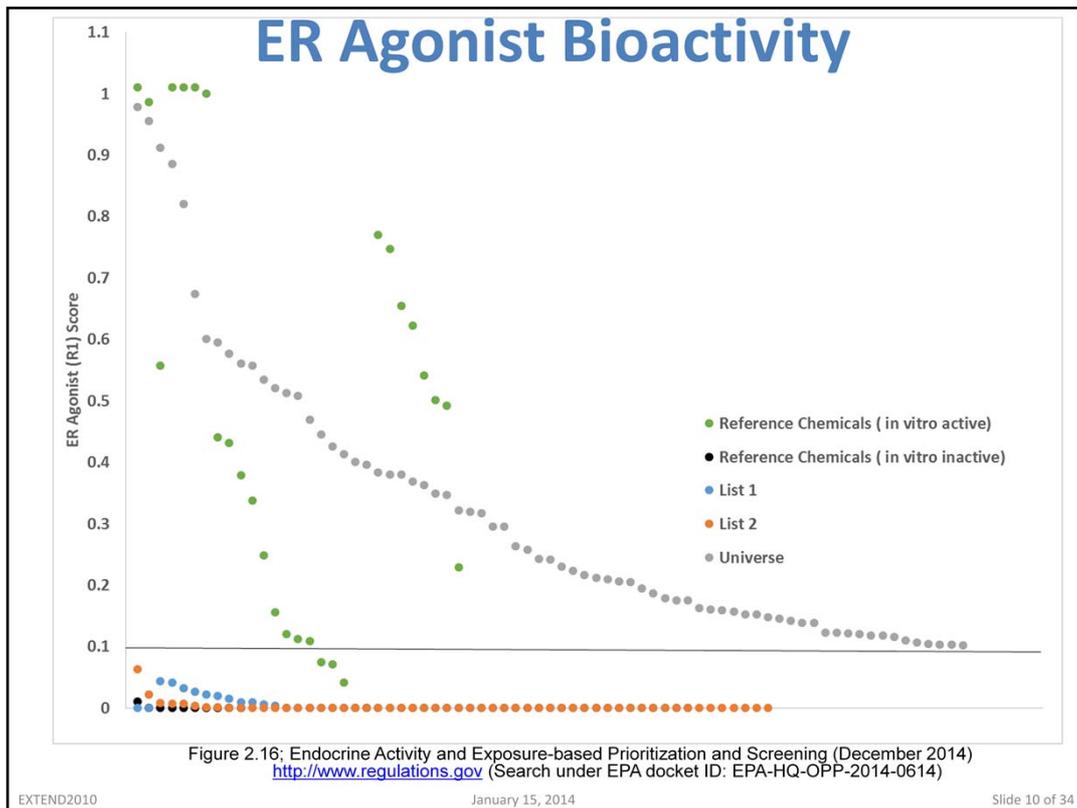
January 15, 2014

Slide 9 of 34

そこで、科学的な信頼性はどうかということになります。ER対照物質に関してですが、*in vitro*対照物質に関してはER AUCスコアとの優れた対応性がある、一致しているということがわかります。真陽性が28、真陰性が12、偽陽性は0ですし、偽陰性も4つしかありませんでした。PPVについては1、NPVについては0.75です。balance accuracy (BA)については0.94、感受性0.88、特異性が1.0でした。非常にすばらしいといえます。

*in vivo*に関しても同じように良好な結果が出ています。こちらにはマージンがありませんが、あまりにも小さいということで、おそらく紙上で見ることもできないのではないかと思います。このレファレンス化学物質について、*in vitro*と*in vivo*に関して何を使ったのかということについては、Webサイト上の連邦政府書類集、いわゆるドーケット中に入っていますので、リンクが張ってありますので、ご覧いただきたいと思います。

このように信頼性が非常に高いことがわかります。ToxCastのスコアですが、これから先も優先順位付けの中で使っていくことができる。それが一つ。それから二つ目として、一つのセットをつくっていく上でのスクリーニングに用いることができます。Tier 1のアッセイ部分において代替的に使っていくためにこれを使うことができます。



こちらでは今度はERアゴニスト生物活性をご覧いただいています。ToxCastからですが、まずレファレンス化学物質がグリーンで出ています。対照物質です。こちらが*in vitro*の活性のもので、非常に良い一致がみられることがおわかりになると思います。これは期待したとおりです。

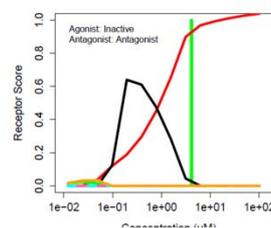
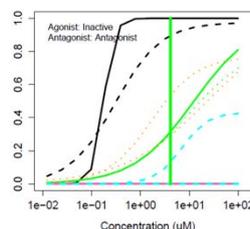
対照物質、*in vivo*の部分については黒で入っているもの、こちらでは*in vitro*不活性のものですが、リスト1の化学物質がこちらです。こちらでは67の化学物質がリスト1に入っていました。それがTier 1を通った最初のグループですが、そのうち52だけがサポートされたということです。つまり、15については、この部分について登録はされていたけれども、これはTier 1テストでその先に進んでいけないということになったということです。これは市場からは除外されるということです。つまり、この部分では、例えば農薬とか殺虫剤などの中で不活性のものについては除かれるということです。不活性のものについては、イナートということで、不活性の物質として扱われるようになります。こちらがリスト1、こちらがTier 1バッテリーの中に入っていくことになります。そして、この中にも非常に良い一致性がみられることがわかります。エストロゲン受容体に関してですが、非常に良い結果がみられたということがわかりました。Tier 1の試験の中から出た結果です。ということで、この中の化学物質ではどれもエストロゲン受容体の生物活性には関わっていませんでした。

それから、こちらをご覧いただきますと、AUCのスコアが出ています。こちらでは0.1とこのを検討しています。こちらがオレンジのもので、

こちらですが、ご覧のように母集団でみてみますとどうでしょうか。EPAの内分泌かく乱化学物質におけるWebページがありますので、それを母集団として示しています。母集団全体でみてみますと、はっきりした結果が出ています。かなりエストロゲン受容体のAUCスコアが高くなっている化学物質があることがわかります。これらの化学物質について、しっかり試験をしてみたいということになります。ばく露情報についてもToxCastから出さなくてはなりません。つまり、これらが優先順位の高いものということになるわけです。

AR Methodological Approach

- Use computational tools to model AR bioactivity – focus on antagonism
 - 6 ToxCast assays relevant to antagonist pathway
 - Model AUC for R1 (agonist) and R2 (antagonist) activities
- Prioritize chemicals in EDSP universe for AR antagonist bioactivity



EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 11 of 34

今回はアンドロゲン受容体ですが、計算科学的ツールをアンドロゲン受容体の生物活性モデルへ使っていく。アゴニズムに着目する。これに加えてアンタゴニズムにも注目するという事です。アンドロゲン受容体について、これをアンタゴニスト的にみていくこととなります。これが我々の優先順位です。R2のスコアをつくっていくこととなります。アンタゴニスト活性のためのToxCastのモデルとしてのR2です。そしてAUCをみて、その上で優先順位を振っていきます。その中にはアンタゴニストについては6つあるということがわかります。そしてその中で、ドーナットの中に情報が入っています。

それから、こちらでR1とR2の活性のためのモデルとしてのAUCがこの中で出ています。このスコアを使って物質の優先順位を決めていくこととなります。

そしてアンドロゲン受容体アゴニスト生物活性によるEDSP母集団化学物質の優先順位付けを行っていくこととなります。

Scientific Confidence Needed To Use [Any] New Assay

- Are reference chemicals that include a range of structures and potencies accurately detected?
 - *In vitro* reference chemicals
 - *In vivo* reference chemicals
- How well do new methods compare with current methods?
 - ToxCast versus Tier 1 results

EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 12 of 34

これから先の道筋ですが、対照物質が多様な構造や力価を網羅しているということをお我々は担保していきたい。しかも正確に検出されなくてははいけません。これは*in vitro*だけではなく、*in vivo*でも同様です。*in vivo*についてはまだ終了していません。

これは発表の中には入っていませんが、この新しい手法についても、現行手法と比較して、どの程度うまくいっているのかということ、また、ToxCastとTier 1との結果を突き合わせていくこととなります。

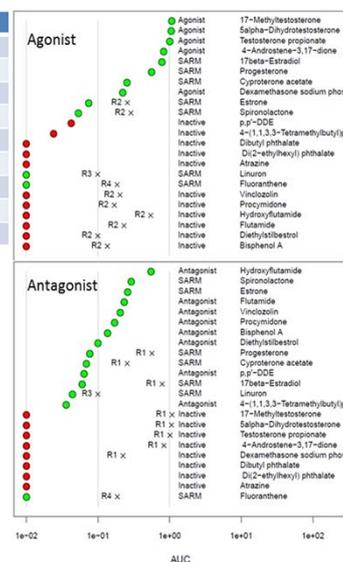
アンドロゲンに関するTier 1についてのハーシュバーガー試験を行っています。*in vivo*に関してはいくつかのものについてみています。これは去勢を行っていくのですが、子宮肥大試験と違って、ここでは完全にエストロゲンのアゴニストだけをみています。ハーシュバーガー試験については、この中でアンドロゲン経路、アンタゴニストと、アンドロゲン受容体のアンタゴニストをみるという形をとります。ということで、これが究極的な比較ということになります。その他の科学パネルがレビューを行っていきませんが、おそらく2015年中に結果を出すことになるとは思いますが、それが実際そのとおりの時間枠で進められるかどうかはわかりません。

Scientific Confidence: Reference Chemicals

- Excellent performance of ToxCast AR AUC scores against *in vitro* reference chemicals

| | |
|-------------|------|
| # True Pos | 14 |
| # True Neg | 8 |
| # False Pos | 0 |
| # False Neg | 1 |
| PPV | 1.0 |
| NPV | 0.89 |
| BA | 0.97 |
| Sensitivity | 0.93 |
| Specificity | 1.0 |

- Performance of ToxCast AR AUC scores against *in vivo* reference chemicals - TBD

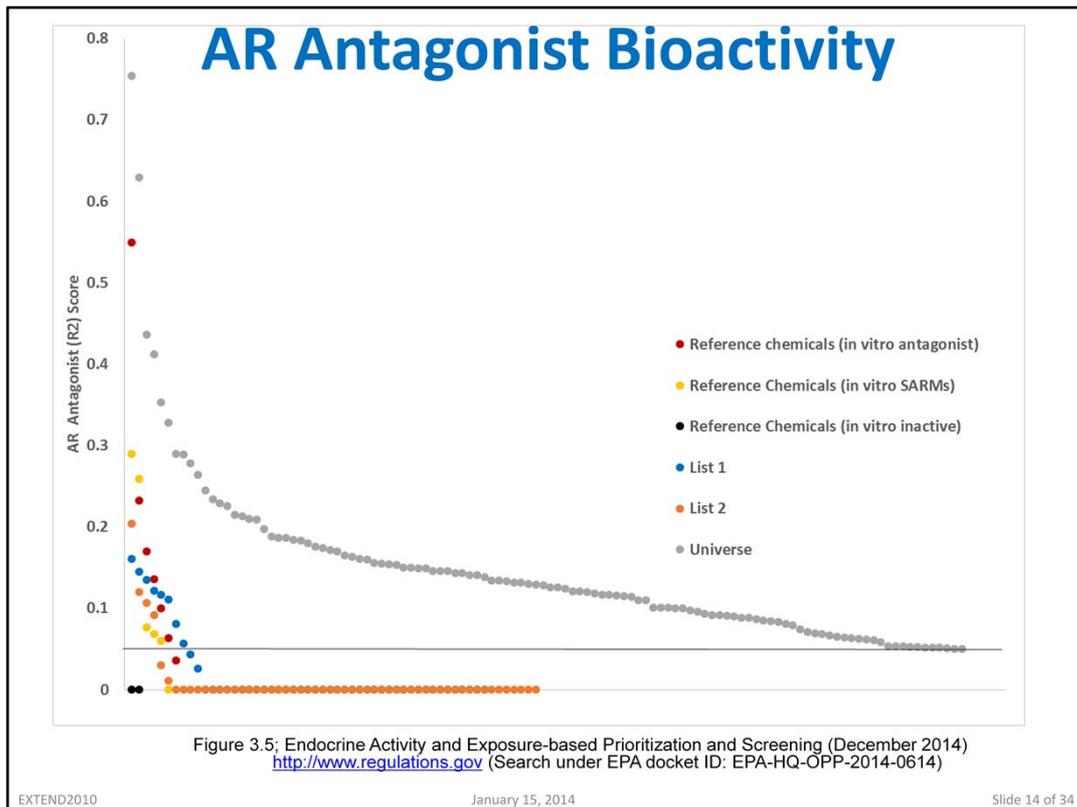


EXTEND2010

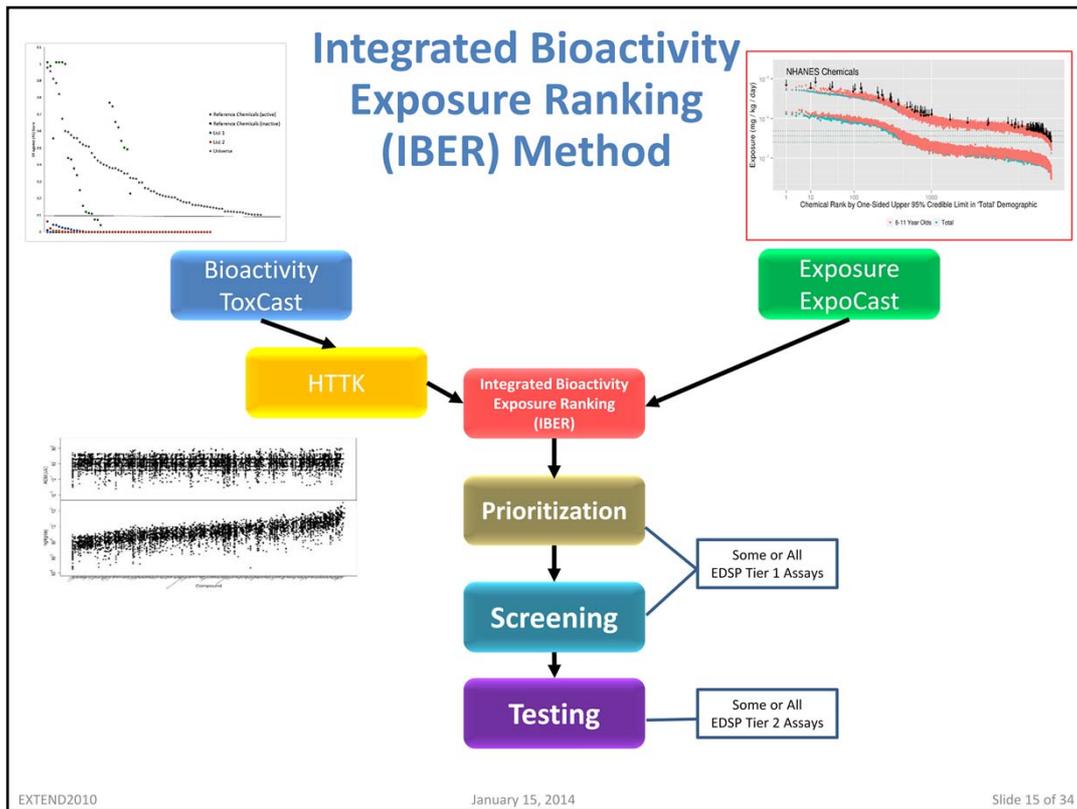
January 15, 2014

Slide 13 of 34

次に、科学的信頼性：対照物質ですが、こちらも非常にうまくいっています。真陽性が14、真陰性が8、偽陽性が0で、偽陰性も一つだけでした。これは先ほどもお話ししましたが、*in vivo*については、まだ決定されておらず、最終結果が出ていません。現在も努力は進められているところです。ToxCastとアンドロゲン受容体のAUCを比較しようということで、現在もハーシュバガー試験の結果がこれから先出てくるということで、これからドーナットを見ていただきますと、子宮肥大試験のときと同じように出していくこととなりますので、ご覧いただきたいと思います。文献をご覧くださいますと、その中で最終的な結果を突き合わせていくこととなります。

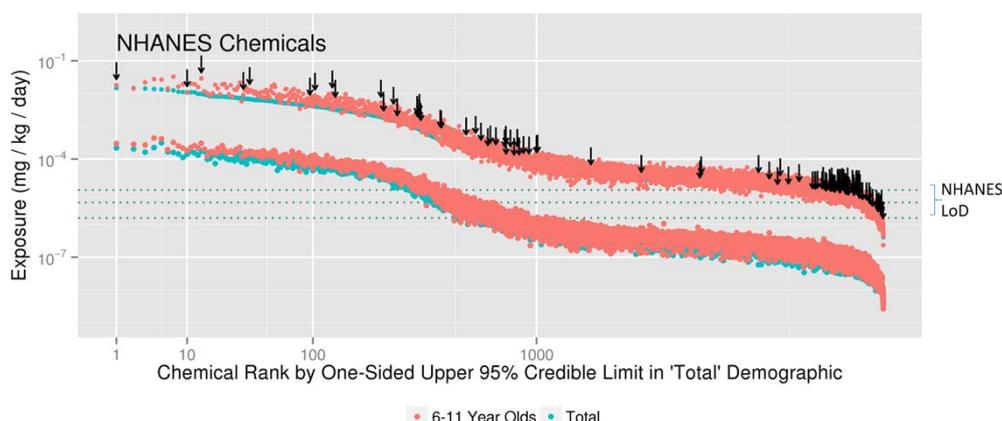


そしてリスト1、リスト2をみてみますと、化学物質の中に比較的低い生物活性のものもあります。これはARのアンタゴニズムに関してです。リスト2に関しては、わずかな化学物質しかありませんが、この化学物質の母集団をみてみますと、より高い抗原のアンタゴニスト生物活性のものもあります。それを優先順位のトップにしていこうと思います。



では、その計算方法です。包括的生物活性ばく露ランキング（IBER）の手法ですが、ToxCastの生物活性です。そして、ばく露価値ということで、これはExpoCastを使います。

ExpoCast: Predictions for 7968 Chemicals



- ExpoCast is an initiative to develop the necessary approaches and tools for rapidly predicting exposure for thousands of chemicals (Cohen-Hubal, *et al.*, 2010)
- Chemicals currently monitored by NHANES are distributed throughout the predictions
- Chemicals with the first and ninth highest 95% limit are monitored by NHANES
- New High Throughput Methods To Estimate Chemical Exposure (July 2014)
 - <http://www.regulations.gov> (Search under EPA docket number: EPA-HQ-OPP-2014-0331)

EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 16 of 34

ExpoCastのイニシアチブというのは、何千という化学物質を迅速に予測するためのツールです。Cohen-Hubal氏が著者になっていますが、こちらはEPAの中のコンピューテーショナル・トキシコロジーの部門で実施しています。

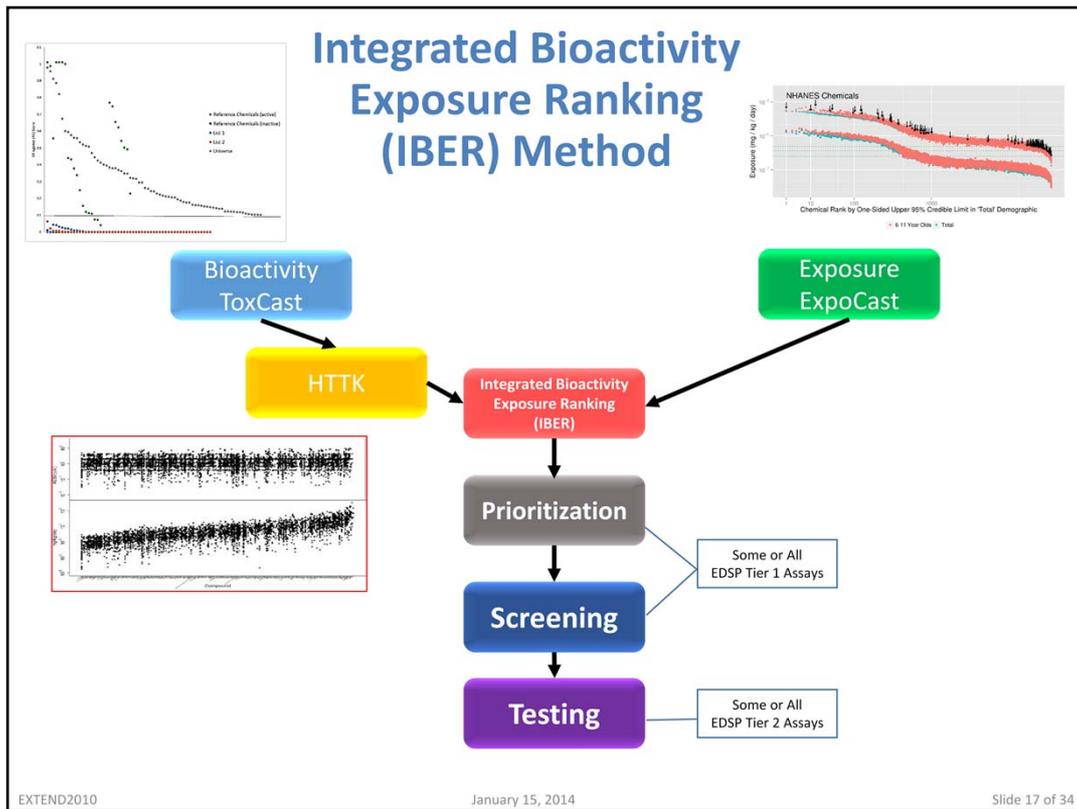
また、モニタリングされている化学物質の予測曲線ですが、現在これはNHANESによって実施されています。分布が出されています。化学物質をモニターして、特にこれは血漿と尿を観察する。しかも多様な人集団のものを観察する。

そして、そのモニターレベルをExpoCastのモデルに適用して、第1及び第9の上位95%信頼限界にある化学物質をモニタリングするということです。

そして、新しいハイスループット手法を用いてばく露の推定をします。これは2014年7月に実施されていまして、この検索のドocketナンバーがこちらにあります。

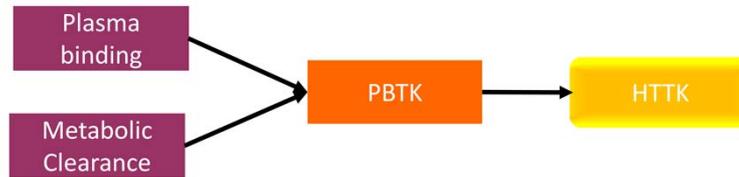
ExpoCastの予測ですが、約8,000の物質が網羅されていまして、mg/day単位でのヒトばく露です。ニアフィールド、ファーフィールドのモデルを組み合わせると一つのばく露の予測値を出しています。LOD (limit of detection) という検出限界値で、化学的解析を実施しています。ヒトの血清や尿を扱うので、ある程度の限界があります。

そして黒で示されている矢印ですが、これが第1及び第9の上位95%の信頼限界を示しているところです。6から11歳の子供が最も高リスクのカテゴリーとEPAでは決めているわけですから、その年齢群を内分泌かく乱のハイリスク対照群として別にしています。



IBERに関する部分です。ExpoCastとToxCastのツールをハイライトしており、まず生物活性スコアをExpoCast値に変換しなければなりません。それは一日ばく露量ですが、ハイスループットのアプローチ、HTTKによって実施します。

High Throughput Toxicokinetics (HTTK)



- *In vitro* plasma protein binding and metabolic clearance assays allow approximations of key toxicokinetic physiological processes to be calculated
- Incorporation of this *in vitro* data into a physiologically based toxicokinetic (PBTK) model allows conversion from bioactivity concentration (μM) to bioactive administered dose ($\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$)
- HTTK data can be applied to perform *in vitro-in vivo* extrapolation (IVIVE) or “reverse dosimetry” which can approximately convert *in vitro* HTS results to daily doses needed to produce similar levels in a human.

New High Throughput Methods To Estimate Chemical Exposure (July 2014)
<http://www.regulations.gov> (Search under EPA docket number: EPA-HQ-OPP-2014-0331)

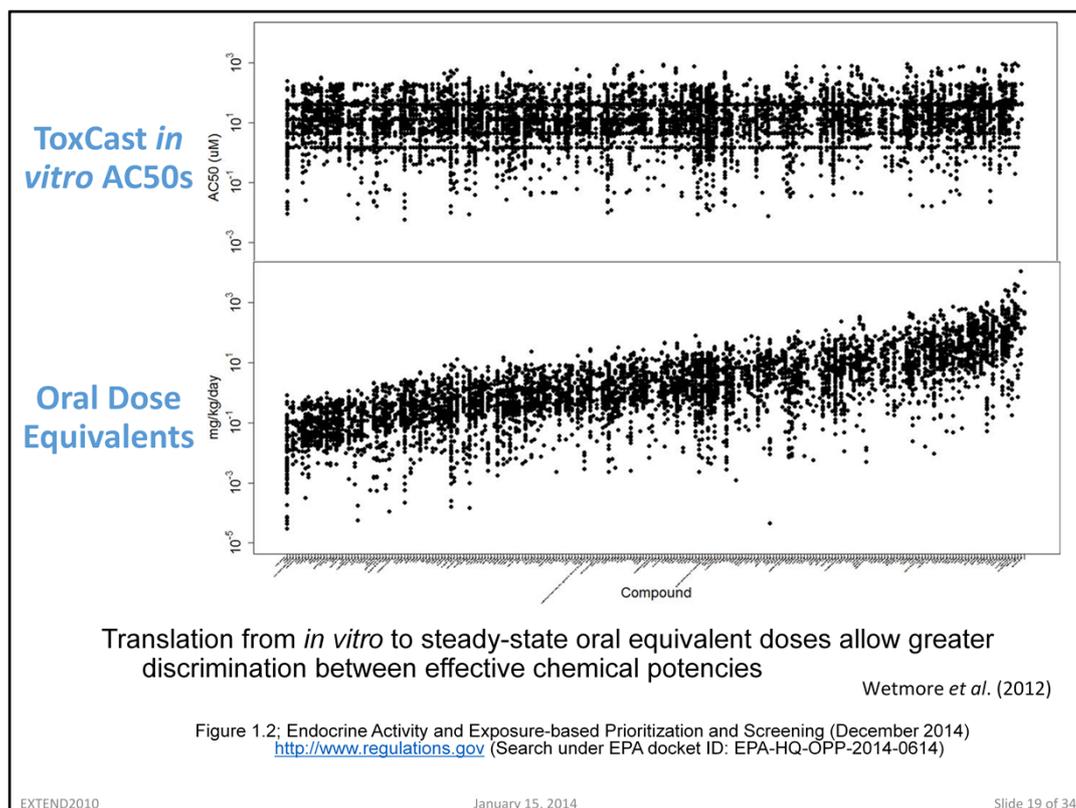
EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 18 of 34

トキシコキネティクス、HTTKですが、これは*in vitro*での血漿蛋白質結合を主要な検査としています。そして*in vitro*のデータというのは、生理学に基づいたトキシコキネティクス（PBTK）モデルに組み込んで、 μM の生物活性濃度を生物活性用量（ $\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ ）に変換することが可能になります。ExpoCastの予測ですが、これを直接比較することができます。

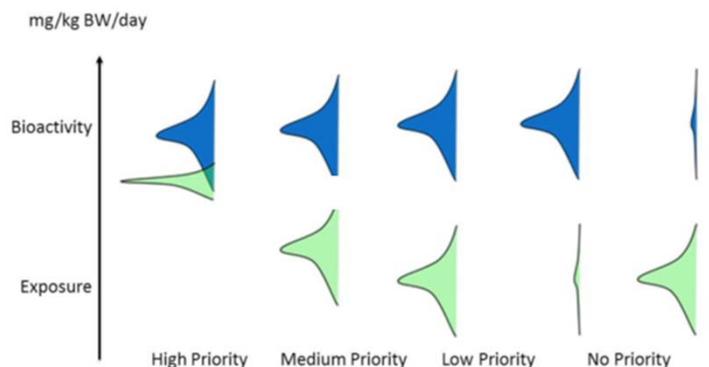
HTTKのデータは、*in vitro-in vivo*間の外挿（IVIVE）やHTSの結果をヒトの一日用量に大まかに変換することができる。つまり、「逆ドシメトリー」を実施することが可能です。既存データに関しては、<http://www.regulation.gov>で検索していただければと思います。



実際のToxCastのデータです。AC50値は50%の活性を示しており、*in vitro*のスコアでµM濃度値になります。*in vitro*スコアを定常状態用量に変換すると、化学物質の有効力価をよりはっきりと識別することが可能になります。約8,000の物質のToxCast、AC50値の結果を変換すると、こういったデータの中の水平なものから、より低用量での活性が認められます。これは故意に見えないようになっているのです。しかし、この解像度は、Webサイトでご覧いただくとはっきりと見えるかと思えます。

この情報は、2014年12月のピア・レビューのパネルで発表されたものです。このアプローチに関して膨大な情報があります。Wetmore (2012) ではヒトばく露情報になりますが、ハイスループット、HTTK、そしてToxCastのスコアがあります。それからWetmore (2013) ではラットで同じアプローチをとっています。また、2014年のWetmore論文もありまして、違う用語、AERというような文言を使っていますが、概念としては同じになります。これらは我々のアプローチがどのようなものなのかということを示すデータとなります。

Integrated Bioactivity Exposure Relationship (IBER)



- In Vitro* assays - Bioactivity Concentration
- Use *in vitro* toxicokinetics - Convert to Bioactivity Dose
- Compare with modeled Exposure

Section 6, p. 92; Endocrine Activity and Exposure-based Prioritization and Screening (December 2014)
<http://www.regulations.gov> (Search under EPA docket ID: EPA-HQ-OPP-2014-0614)

EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 20 of 34

IBER、生物活性とばく露との関連性ですが、生物活性を一日当たりの体重当たりに換算しています。これはハイスループットのトキシコキネティクスを使って変換することによってばく露予測をしています。一日当たり体重当たりのmg/kg/dayで出しています。生物活性濃度が6より高かった場合、すなわちばく露よりも高かった場合は、おそらく我々EPAが着目すべき化学物質でないという判断になります。しかし、生物活性とばく露が濃度的に重なってくるほど、内分泌と相互作用する可能性がありますので、優先順位が高くなり試験の必要があるということで、いずれはリスク評価につながっていくことになります。*in vitro*試験では、生物活性濃度、そして*in vitro*のトキシコキネティクスを利用して、生物活性用量への変換を実施しています。

こちらに検索サイトが載っています。2014年12月のピア・レビューのパネルのWebサイトです。

Objectives: IBER

- Before using the IBER approach in the EDSP framework, EPA is reviewing the scientific strengths and limitations of the approach
 1. Prioritize chemicals for further EDSP screening and testing based on rank of ER bioactivity and estimated exposure
 2. Prioritize chemicals for further EDSP screening and testing based on rank of AR bioactivity and estimated exposure

EXTEND2010

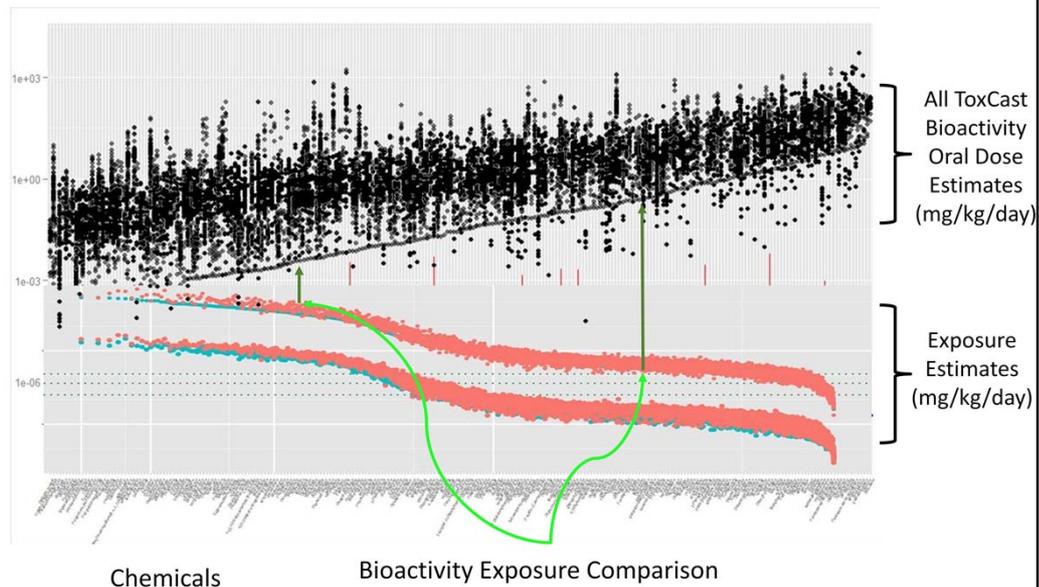
January 15, 2014

Slide 21 of 34

IBERの目的です。IBERがEDSPの枠組みにおいて利用される前には、科学的な強さと限界についての精査がされていませんでした。しかし、ER生物活性、推定ばく露によるランキングに基づいてEDSPスクリーニングあるいは試験の実施を推進することによって、化学物質を優先的に順位付けることができるようになったわけです。

それから、アンドロゲンの生物活性、推定ばく露のランキングに基づいてEDSPスクリーニングや試験の実施を推進することによって、また化学物質の優先順位付けが実施されるようになったということです。

Compare Bioactivity and Exposure Output: “Integrated Bioactivity Exposure Ranking (IBER)”



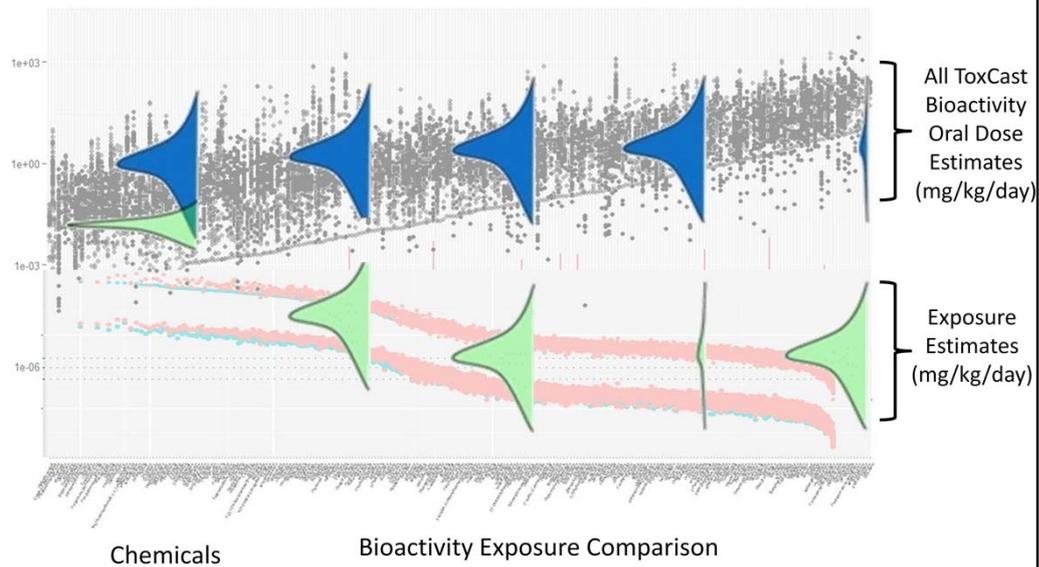
EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 22 of 34

これがどうやってなされているかですが、ToxCastの生物活性をmg/kg/dayの推定経口用量に換算します。化学物質のリストもこちらに列挙されていますが、ここは解像度がよくないので、どういう化学物質かわかりませんが、解像度をよくするとすべての化学物質がよく見えるようになります。ばく露の推定としては、生物活性の推定経口用量が出されます。それらが優先順位の高い物質になります。そして、生物活性とばく露のランキングには大きな開きがあります。

Compare Bioactivity and Exposure Output: “Integrated Bioactivity Exposure Ranking (IBER)”

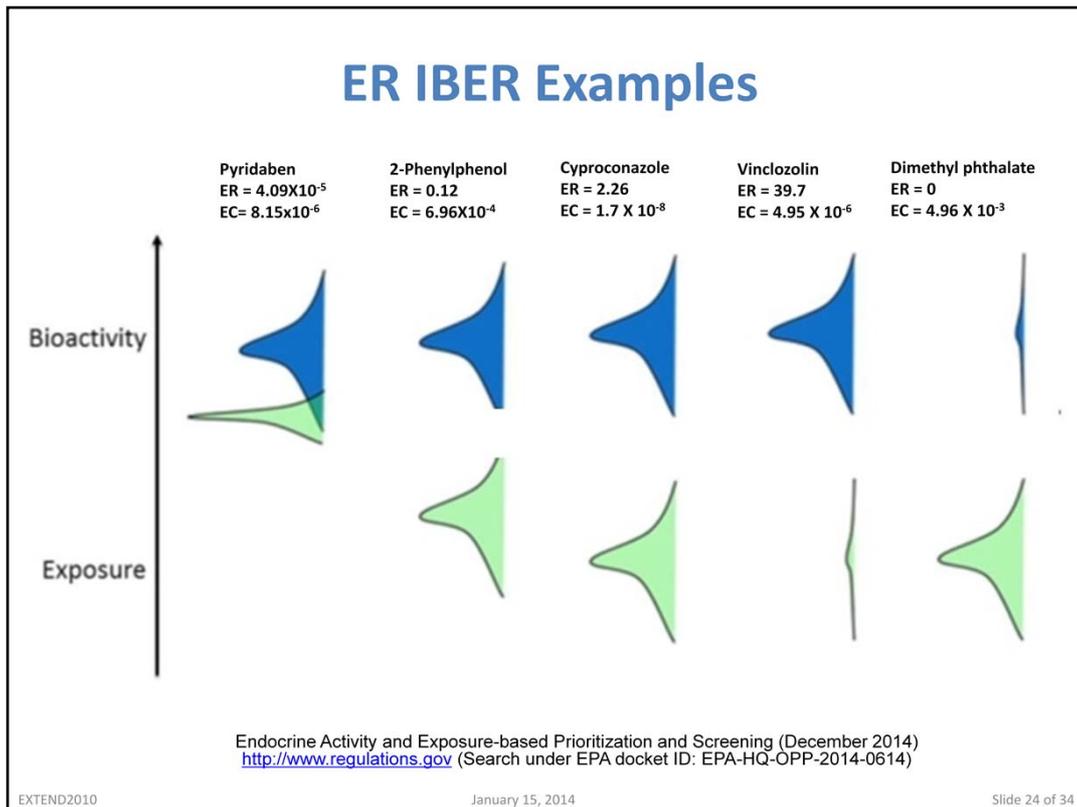


EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 23 of 34

こちらの方は開きがそれほど大きくないということで、概念的な数字をこのように上に重ねると、EPAが現在優先順位として考えていない物質があり、むしろそれらを我々は高い優先順位と考えている、そして試験を実施すべき物質とみなします。



このアプローチを採用した事例です。これはエストロゲン受容体ですが、2014年12月のWebサイトによるデータになりますが、一番左のピリダベンですが、これは生物活性の用量とばく露の間の開きが非常に小さいものということになります。一番右のフタル酸ジメチルが一番大きかったということです。

Integrated Bioactivity Exposure Ranking

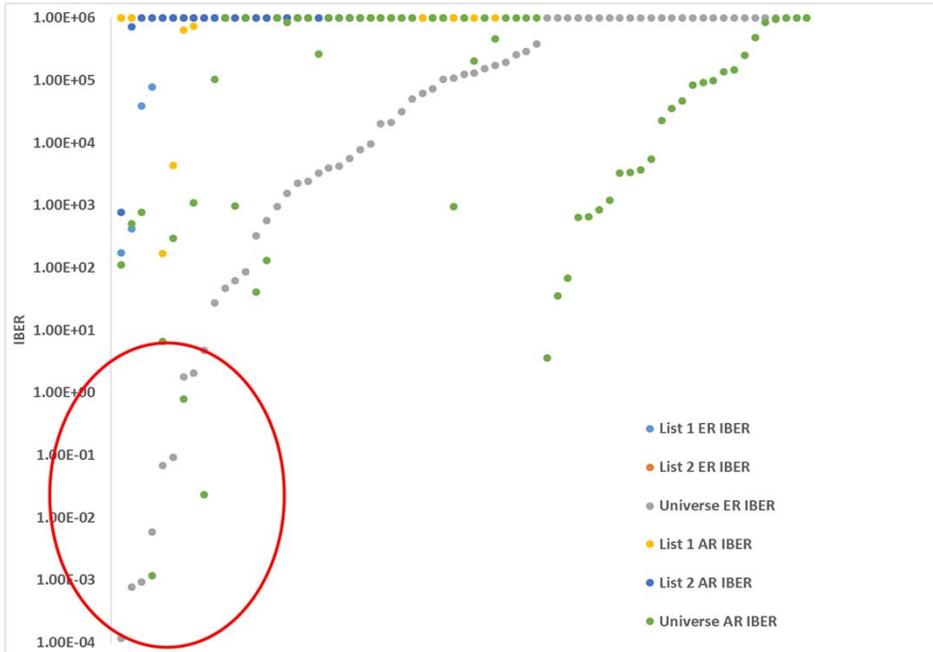


Figure 6.5; Endocrine Activity and Exposure-based Prioritization and Screening (December 2014)
<http://www.regulations.gov> (Search under EPA docket ID: EPA-HQ-OPP-2014-0614)

EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 25 of 34

ピア・レビュー・パネルのデータになります。Figure 6.5になります。包括的生物活性ばく露ランキングで優先順位が示されています。ここで忘れてはいけないのは、この事例では、IBERが小さくなればなるほどより優先順位が高くなるということです。

Appendix 3: Supplementary Data

Appendix 3_Supplementary Data.xlsx - Excel

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R | S |
|-----|----------|------------|---------------------------|--------------|--------|--------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------|-------------------------|-------------------------|-----------------|----------|----------|--------------------|-----------------------|
| | CODE | CASRN | Name | Final List 1 | List 2 | ERagonistAUC | ERAntagonistAUC | ERpseudooACcmin | ARagonistAUC | ARAntagonistAUC | ARpseudooACcmin | HTTKCs95% | HTTKEquwERpseudooACcmin | HTTKEquwARpseudooACcmin | ExpoCastTotal95 | ER IBER | AR IBER | ERagonistReference | ERAntagonistReference |
| 23 | C104405 | 104-40-5 | 4-Nonylphenol | | | 0.109 | 0 | 1.069472 | 0 | 0 | 1000000 | | | 7.16E-05 | | | | | very weak |
| 95 | C1307179 | 13071-79-9 | Terbufos | Y | | 0.064 | 0 | 3.849912 | 0 | 0 | 1000000 | | | 5.09E-06 | | | | | |
| 254 | C333415 | 333-41-5 | Diazinon | 1 | | 0.044 | 0 | 1.435665 | 0 | 0 | 1000000 | 7.285496 | 0.197058 | 1000000 | 5.1E-06 | 38615.26 | 1000000 | | |
| 289 | C50282 | 50-28-2 | 17beta-Estradiol | | | 1.01 | 0 | 3.09E-07 | 0.785 | 0.06 | 3.01E-05 | 1.024212 | 3.01E-07 | 2.94E-05 | 4.45E-06 | 0.067728 | 6.614861 | strong | SA |
| 304 | C5153253 | 5153-25-3 | 2-Ethylhexylparaben | | | 0.513 | 0.006 | 0.007727 | 0 | 0 | 1000000 | | | 1.27E-05 | | | | | |
| 312 | C521186 | 521-18-6 | Alpha-Dihydrotestosterone | | | 0.502 | 0 | 0.030143 | 1.06 | 0 | 9.08E-08 | 0.46118 | 0.065361 | 1.97E-07 | 1.49E-05 | 4372.936 | 0.013169 | weak | inactive AC |
| 449 | C80057 | 80-05-7 | Bisphenol A | | | 0.655 | 0 | 0.048664 | 0 | 0.136 | 0.766777 | 0.356629 | 0.136454 | 2.15007 | 0.002193 | 62.22238 | 980.4187 | weak | inactive AN |
| 476 | C8485215 | 84852-15-3 | 4-Nonylphenol, branched | | | 0.595 | 0 | 0.005598 | 0.023 | 0.0341 | 0.391754 | | | 0.001123 | | | | | |

Appendix 3; Endocrine Activity and Exposure-based Prioritization and Screening (December 2014)
<http://www.regulations.gov> (Search under EPA docket ID: EPA-HQ-OPP-2014-0614)

EXTEND2010 January 15, 2014 Slide 26 of 34

こちらが附属文書の3になります。先ほど少し述べましたが、すべてのデータが入っています。皆さんに先ほど御紹介したデータで、スプレッドシートで示されています。これもピア・レビュー・パネルのドーナットで検索できます。化学物質名もありますし、最終的にリスト1に入っているのか、リスト2に入っているのかということも示されています。エストロゲン受容体アゴニストのスコア、アンタゴニストのスコア等、そういった情報もすべてこちらに網羅されています。アンドロゲン受容体、そして最終的にはエストロゲン受容体のIBERのスコアは何なのかということもわかるようになっています。

我々は、ExpoCast及びToxCastを含めた全データを透明化、すなわち公開しようとしています。そしてエクセル、スプレッドシートですべてを提供しようとしています。

Advantages of IBER

- Models will continue to be revised and improved as more data are available
 - Provides predictions for thousands of chemicals
- Allows resources to be focused on chemicals more likely to have endocrine effects
 - List 1 chemicals have limited estrogen and/or androgen receptor-mediated bioactivity
 - Prioritizes chemicals based on bioactivity and exposure

EXTEND2010

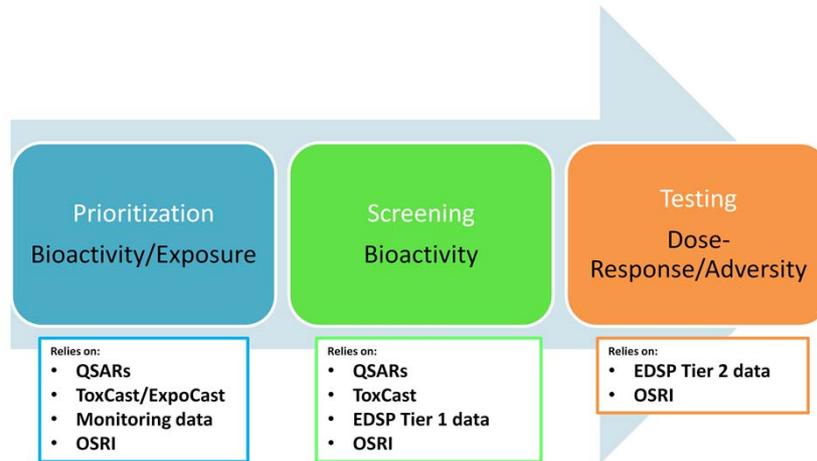
January 15, 2014

Slide 27 of 34

IBERの利点ですが、データの増加に伴ってモデルが常に改良されていく点です。何千もの化学物質に関する予想が提供されるので、従来の毒性試験、すなわち Tier 1試験よりもはるかに多い化学物質数になります。そして、内分泌系への影響を有する可能性がより高い化学物質に絞り込むことが可能になりますし、生物活性とばく露に基づいた優先順位付けが可能になります。

EDSP

Prioritization, Screening & Testing



EXTEND2010

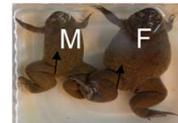
January 15, 2014

Slide 28 of 34

こちらはEDSPのまとめです。

Tier 2 Test Methods

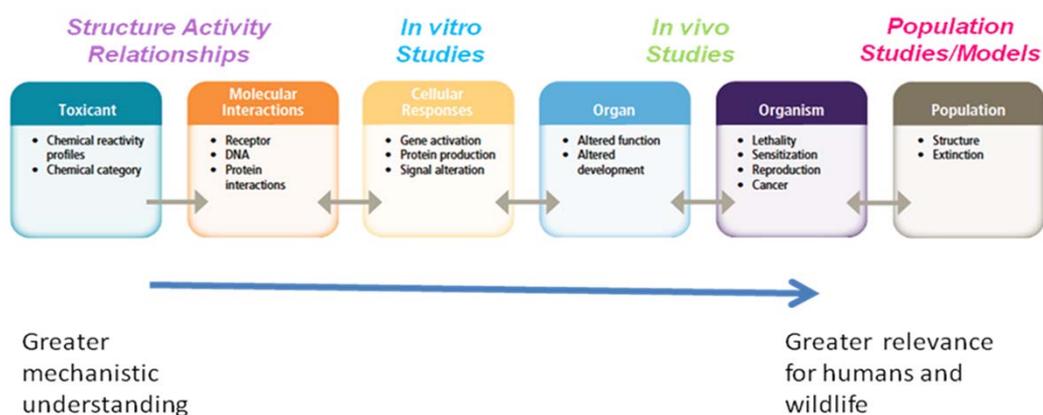
- Rat: Two-generation rat reproduction test (OECD TG 416)
 - Rat: Extended F1-Generation (OECD TG 443) – validated
- Bird: determine long-term effects of maternal transfer and *in ovo* exposure – Japanese Quail
- Frog: characterize perturbations of normal development and growth – *Xenopus laevis*
- Fish: Medaka Extended One-generation Reproduction Test (MEOGRT) (Referred to as MMT in current OECD draft TG)



最後にTier 2試験方法開発についてですが、この二つの試験方法については、日本の関係者の皆様と行いました。これはカエル、アフリカツメガエル、魚類ではメダカの拡張一世代繁殖試験でやっていますが、現在パブリックコメントということで、EPAで、OECDでもパブリックオピニオンを募集しています。それから鳥類ですが、これはニホンウズラで、卵内のばく露による長期影響の判定をしています。

Application of AOP Concept

Adverse Outcome Pathways (AOPs) Concept



EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 30 of 34

時間がもうなくなってきました。この経路の概念は2010年のもので、化学物質は、分子レベルで相互作用しています。そして、ヒトや野生生物へ強く関連してきます。したがって、蛋白質との相互作用から、最終的には個体群レベルでの影響まで判定していかなければなりません。ばく露、並びに*in vivo*及び*in vitro*影響を外挿することによって、HTTPを実施することで、そういったことが可能になると考えています。

Estrogen Adverse Outcome Pathway

| Study Type | HTS in vitro in Silico | | Tier 1 | | | | | | | Tier 2 | | | | |
|---------------------|------------------------|---------|---------------|------|-----------|-----------------|--------------|----------|-------|-----------------|--------|-------|-------|------------------------|
| | QSAR | ToxCast | ER Binding | ERTA | Aromatase | Steroidogenesis | Uterotrophic | Pubertal | FSTRA | Rat 2-gen/EOGRT | MEOGRT | LAGDA | Quail | |
| Physicochemical | x | x | | | | | | | | | | | | Toxicant |
| ER binding | x | x | x | | | | | | | | | | | Molecular Interactions |
| ER activation | x | x | | x | | | | | | | | | | |
| DNA Binding | x | x | | | | | | | | | | | | |
| Cell proliferation | | x | | | | | | | | | | | | Cellular Responses |
| Protein production | | x | | x | | | | | x | | x | | x | |
| Biochemistry | | | | | | | | x | x | x | x | | x | |
| Steroidogenesis | | x | | | x | x | | | | | | | | |
| Organ weight | | x | December 2014 | | | | x | x | x | x | | | x | Organ |
| Histopathology | | | | | | | | x | x | x | x | x | x | |
| Onset of Puberty | | | | | | | | x | | x | x | | x | Organisms |
| Estrous Cyclicity | | | | | | | | x | | x | | | | |
| Fertility/Fecundity | | | | | | | | x | x | x | x | | x | Population |
| Development | | | 2015 | | | | | x | x | x | x | x | x | |

EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 31 of 34

また、Tier 1、Tier 2の試験をこちらにまとめていまして、有害性の発現経路をまとめています。それぞれの有害性発現経路とエンドポイントが示されています。ToxCastを使うことによってこれらのエンドポイントをどうやってカバーしていくかということになります。2015年の終わりにはこの時点になる。臓器のあたりまでいくと思います。

Androgen Adverse Outcome Pathway

| Study Type | HTS in vitro & In Silico | | Tier 1 | | | | | | Tier 2 | | | | |
|------------------------|--------------------------|---------|------------|-----------|-----------------|-------------|----------|-------|-----------------|--------|-------|-------|------------------------|
| | QSAR | ToxCast | AR Binding | Aromatase | Steroidogenesis | Hershberger | Pubertal | FSTRA | Rat 2-gen/EOGRT | MEOGRT | LAGDA | Quail | |
| Physicochemical | x | x | | | | | | | | | | | Toxicant |
| AR binding | x | x | x | | | | | | | | | | Molecular Interactions |
| AR activation | x | x | | | | | | | | | | | |
| DNA Binding | x | x | | | | | | | | | | | |
| Biochemistry | | | | | | x | x | x | x | x | | x | Cellular Responses |
| Steroidogenesis | | x | | x | x | | | | | | | | Organ |
| Organ weight | | x | | | | x | x | x | x | | | x | |
| Histopathology | | | | | | | x | x | x | x | x | x | Organism |
| Onset of Puberty | | | | | | | x | | x | x | | x | |
| 2° Sex characteristics | | | | | | | | x | | x | | x | Population |
| Fertility/Fecundity | | | | | | | x | x | x | x | | x | |
| Development | | | 2015 | | | | x | x | x | x | x | x | |

EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 32 of 34

アンドロゲンに関しても同様です。

Thyroid Adverse Outcome Pathway

| Study Type | HTS in vitro & In Silico | | | Tier 1 ¹ | | | Tier 2 ² | | | |
|-----------------|--------------------------|------|---------|---------------------|------------|-----|---------------------|-------|-------|------------------------|
| | Chemical category | QSAR | ToxCast | M Pubertal | F Pubertal | AMA | Rat 2-gen/EOGRT | LAGDA | Quail | |
| Physicochemical | x | | | | | | | | | Toxicant |
| TR activation | | | x | | | | | | | Molecular Interactions |
| Biochemistry | | | | x | x | | x | | x | Cellular Responses |
| Organ weight | | | | x | x | | x | | x | Organ |
| Histopathology | | | | x | x | x | x | x | x | |
| Metamorphosis | | | | | | x | | x | | Organism |
| Development | | | | | | x | x | x | x | Population |

EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 33 of 34

それから甲状腺。2015年には甲状腺関連のツールがもっと増えることを期待しています。

Current Status of EPA Prioritization, Screening & Testing

- 52 List 1 chemicals with complete Tier 1 datasets undergoing weight-of-evidence determination of endocrine bioactivity, possible Tier 2 testing
- 107 List 2 chemicals being prioritized for EDSP screening using high throughput and computational methods
- EDSP universe of chemicals being prioritized for EDSP screening using high throughput and computational methods
- Interlaboratory validation of Tier 2 tests is complete and 890 guidelines are available for public comment
- FIFRA Scientific Advisory Panel peer reviews
 - Prioritizing the Universe of Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) Chemicals Using Computational Toxicology Tools (January 2013)
 - <http://www.regulations.gov> (Search under EPA docket number: EPA-HQ-OPP-2012-0818)
 - Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) Tier 2 Ecotoxicity Tests (June 2013)
 - <http://www.regulations.gov> (Search under EPA docket number: EPA-HQ-OPP-2013-0182)
 - Weight-of-Evidence: Evaluating Results of EDSP Tier 1 Screening (July 2013)
 - <http://www.regulations.gov> (Search under EPA docket number: EPA-HQ-OPP-2013-0230)
 - New High Throughput Methods To Estimate Chemical Exposure (July 2014)
 - <http://www.regulations.gov> (Search under EPA docket number: EPA-HQ-OPP-2014-0331)
 - Endocrine Activity and Exposure-based Prioritization and Screening (December 2014)
 - <http://www.regulations.gov> (Search under EPA docket ID: EPA-HQ-OPP-2014-0614)

EXTEND2010

January 15, 2014

Slide 34 of 34

こちらがEPAプログラムのまとめになりますが、現在の進捗状況です。

52の化学物質が対象になっています。生物活性及びTier 2試験の実施の可能性についてweight-of-evidenceによって判定中です。

計算方法、ハイスループットを使用しており、ラボ間の優先順位付けも進行中です。EPAやOECDのデータもすべて入ってきております。

これがピア・レビューの文書及び諮問パネルのWebサイトになっています。

Thank you!
(Domo arigato!)
どうもありがとう

Collaborators

- US EPA/OCSP/Office of Science Coordination and Policy
- US EPA/ORD/National Center for Computational Toxicology
- National Toxicology Program/NICEATM

Dr. Scott G. Lynn
lynn.scott@epa.gov

御清聴ありがとうございました。御質問があればお受けしたいと思います。