

## Examples of Cross Cutting Issues Emerging from the Case Studies:



### Challenges in assigning endocrine-specific modes of action: eg EE2, Propiconazole, 17 $\beta$ -trenbolone

- For example: What Do We Need to Know to assign a MoA
  - Does the empirical evidence support that a change in a Key Event<sub>upstream</sub> leads to an appropriate change in a Key Event<sub>downstream</sub>?
  - Does the Key Event<sub>upstream</sub> occur at lower exposures and earlier time points than the Key Event<sub>downstream</sub>?
  - Are there inconsistencies in responses between taxa and stressors that do not align with an expected pattern for the hypothesized mode of action?

SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY  
ENVIRONMENTAL QUALITY THROUGH SCIENCE®

まず、内分泌系に特異的な作用機構の確証を得る取組ということですが、特定の作用機構について、経験的にキーイベントがあって、これが上流で何かイベントが起きて、それがだんだんと下流での大きなイベントにつながっていくのかどうかということを確認しなければなりません。上流のイベントというのは、ばく露が少なくても起きるのか、そしてもっと早い段階でも下流でもできるのか、アドバース・アウトカム・パスウェイを考えていかなければなりません。

また、もう一つ一貫性が欠けているのは、生物種間での応答性、ストレス間での応答性であります。作用機構仮説において予測されるパターンと相容れないような不整合性が存在するのか。メカニズムレベルと有害事象とでどのようにつながるのか。先ほどもお話がありましたが、国際的に受け入れられた定義によりますと、この二つの鍵が両方あると理解されなければならないとされています。

## Cross Cutting Issues: Uncertainties in biological responses that influence hazard and risk approaches to the regulation of EAS/EDS



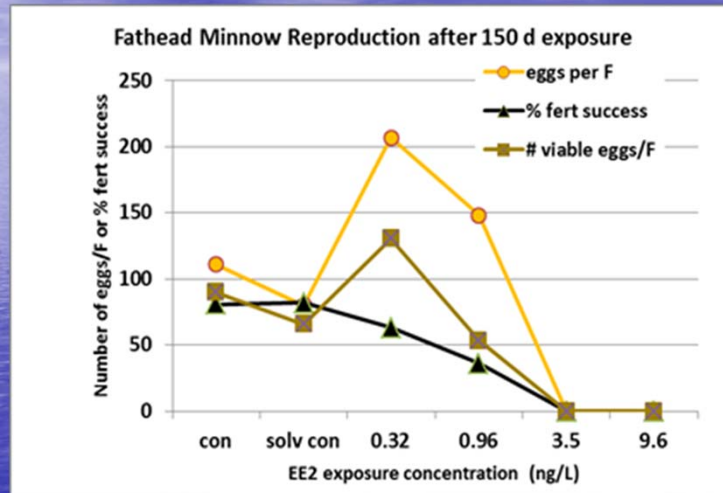
### ○ For example:

- Are there specific and profound effects manifest at a later life stage, following exposure during sensitive windows of life cycle? *e.g.* sex reversal in fish.
- Are multigenerational effects reflected in the design of extended one-generation designs for fish and mammals?
- Transgenerational effects
  - Widely publicised mammalian examples are controversial
  - Recent aquatic lit. rev. showed no clear examples for EAS.
- Non-monotonic dose-responses (NMDR's)

SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY  
ENVIRONMENTAL QUALITY THROUGH SCIENCE®

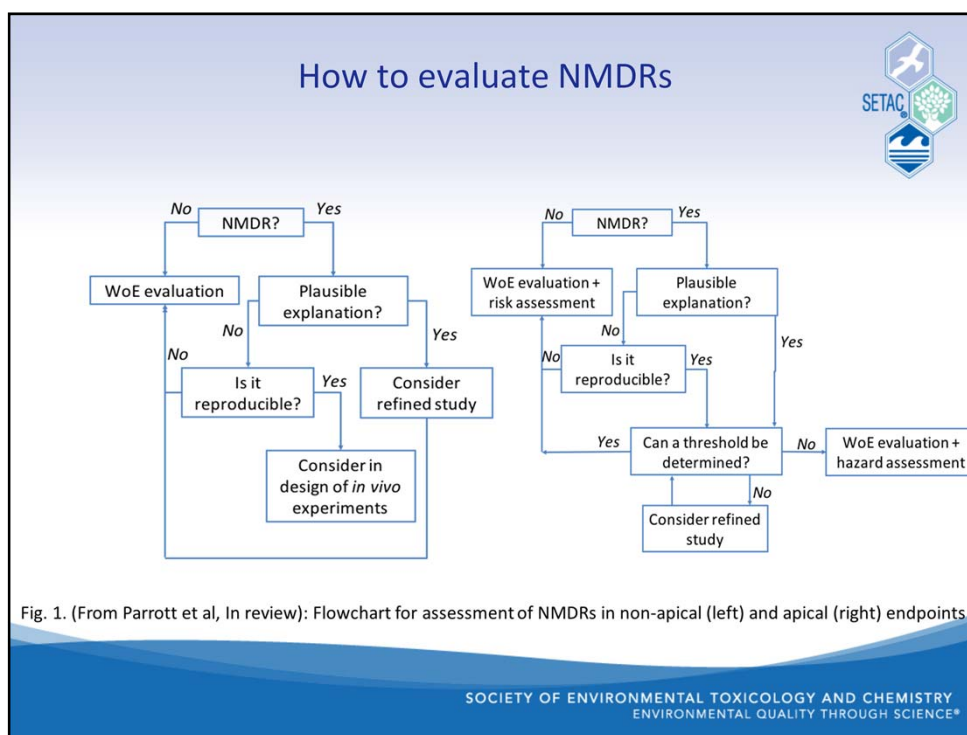
そして次の大きな問題であります、生物学的応答です。実際にライフサイクルの後期での影響はどうかということ。例えば、短期的なばく露の場合はどうかということ、こういったばく露のウィンドウ、窓としてはどうか。例えば、幼少期だけの短期のばく露なのか、あるいは複数世代への影響は反映されているのかどうか。そして経代影響、トランスジェネレーショナルな効果はどうか。そして非単調用量の反応はどうかということ。

## What is a non-monotonic dose-response (NMDR)?



After Parrott and Blunt (2005)

そして非単調用量の反応ということで実例がここにあります。用量反応関係ですが、ほとんどの化学物質は、濃度を上げれば、濃い方ですね、濃度を上げると、反応はどんどん上昇します。例えば、この場合は卵、雌の生殖率を見えています。そして、ファットヘッドミノーなんです、繁殖率、生殖率が上がると当然のことながら生存率も上がるということです。ところが、U字型の逆相関というのがここでは見られます。この下の方で何が起きているのかということを上流から予測できるのかどうかということです。ヒトの毒性の問題なんです、このような低濃度のデータがないというのが問題であります。



ということで、面白いNMDRの評価方法を確立しました。このフローチャートですが、試験管内試験のデータに基づいて確立しました。非単調用量反応を試験管内試験で見た場合です。

まず、もっともらしい説明がつくのかどうか。もしなければ、その影響というのは再現性があるのか。もしノーであった場合は、証拠を待つしかないということになります。しかしながら、もっともらしい説明がつく場合、このフローチャートではより精密な毒性試験を実施する必要があるとなっています。特に*in vivo*の試験デザインを検討する必要があります。

さて、*in vivo*の実験ではどうでしょうか。非単調用量反応ですが、*in vivo*ではそれほど多くはないのですが、2つのオーバーラップする用量反応関係によってこのような応答反応が導き出されます。再現性があるのかということで、リスクアセスをするわけですが、もっともらしい説明があった場合、その影響に閾値があるのかどうかということを検討します。そして精密な*in vivo*の試験を実施することによって、例えば濃度を上げて、その濃度範囲内すべてにおいての影響力というものを測定するわけです。この濃度というものがきちっと測定できなければリスクアセスもできないわけですから、ハザードだけでの評価ということになってしまいます。

ということで、このNMDRの評価方法というのは非常に有益だと考えます。

## Cross Cutting Issues: Issues of concern in the need for improved methods for assessment of EAS/EDS



A number of *in vivo* test systems have been developed. However, there are inherent limitations to collection and interpretation of data from these assays.

- a lack of certainty regarding:
  - 1) adequately sensitive species and life-stages,
  - 2) mechanistic endpoints that are diagnostic for endocrine pathways of concern,
  - 3) the linkage between mechanistic responses and apical, adverse outcomes.
- Resource intensity in regard to time, cost, and use of animals.

SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY  
ENVIRONMENTAL QUALITY THROUGH SCIENCE®

そして、この評価方法の改良なんですけど、試験システムを改良するというところで、*in vivo* の試験系が数多く開発されてきました。しかし、当然のことながら限界があります。例えば、確実性が存在しないとか、例えば、感受性が高い生物種のライフステージは何なのか。あるいはメカニズム的エンドポイント、これは診断に役立つものなのかどうか。それによって経路から有害事象が導き出されるのかどうかというふうにつながるわけです。

そして最も大事なところが、メカニズム的な応答と最終的な有害アウトカムとのつながりということになります。

そして、もちろんこの試験というのはどのぐらい費用がかかるのかということになります。当然のことながらまだまだすべての問題が解決されていませんけれども、私はこの毒性試験、OECDのワークショップでやっております、過去15年間でかなりの新しいテストなども開発しています。EDCの毒性についてもそうですし、長期の実験、そして有害事象を完全に理解するための試験、そういったものも開発しています。



## Cross Cutting Issues: Issues of concern in the need for improved methods for assessment of EAS/EDS



There are opportunities to improve approaches to, and guidance for, existing test methods, and to reduce uncertainty e.g.:

- *in vitro* high throughput screening to prioritize chemicals for testing and provide insights as to the most appropriate assay(s) for characterizing hazard and risk.
- adding endpoints for elucidating connections between mechanistic effects and adverse outcomes,
- identifying potentially sensitive taxa for which test methods currently do not exist
- addressing key endocrine pathways of possible concern in addition to those associated with estrogen, androgen and thyroid signalling.

SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY  
ENVIRONMENTAL QUALITY THROUGH SCIENCE®

さて、この評価方法ですが、このアプローチを改良する方法ということで幾つかここに列挙しております。例えば、*in vitro*のハイスループットのスクリーニング、これも将来重要になってくると思いますし、また、エンドポイントを追加することも考える必要があると思います。メカニズム的影響と有害アウトカムとの間で見落とされがちつながりをそこから理解するということ。

それから、そんなに興味がない生物種の場合、例えば無脊椎動物などの試験というのはそんなに興味がないと思うのかもしれませんが、そういった試験法が確立していないものも洗い出すということ。

それから、エストロゲン、アンドロゲン、甲状腺のシグナリング以外にも、懸念対象となり得るような主要内分泌経路についても対応するということ。私が現在実践しているリサーチです。

## Cross Cutting Issues: Identifying Population-relevant Endpoints in the Evaluation of EAS for Ecological Hazard and Risk Assessment



- There are a few examples of population level impacts from EAS exposure (e.g. gastropods and TBT; fish and EE2)
- Greater understanding of the relationship between mechanistic (*in vitro*, non-apical) endpoints and adverse population-level effects is needed.
- Need to consider severity and prevalence of response
- Using newer endpoints (e.g. behaviour) from current / newly designed studies will assist in predicting population effects.
- Development of adverse outcome pathways (AOPs) and population modeling will increase this understanding.
- Recovery process should be considered when evaluating population-level effects.

SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY  
ENVIRONMENTAL QUALITY THROUGH SCIENCE®

さて、次にポピュレーション、個体群に関してですが、非常に重篤な影響が及ぼされているという環境ハザード・リスクがあるものもあります。そしてメカニズム的な*in vitro*のアピカルなエンドポイントと個体群レベルでの有害影響との関連について理解を深めることが必要です。まだまだわからないことがあります。コンピュータ化したモデリングというのが将来の道だと思います。今までポピュレーションモデリングはあまりやってこなかったのですが、モデル開発がどんどん始まっていますので、今後予測が可能になってくるだろうというふうに推測されます。

そして応答の重篤度だけではなくて発生率を考察する必要もあります。

また、新しいエンドポイント、つまり行動ですね。そういったことが今まで測定されていません。このエコトキシシティでは測定されていませんが、これを新規に導入することが大事です。

それから有害性の発現経路、EDCは有害性発現経路で非常に活発に研究をやっています。このようなメカニズム的なリンクというものが確立されることによって、かなりの研究の進化が期待できるでしょう。

そして個体群レベルでの影響を評価するときには、回復過程についての考察が必要になります。個体群レベルで回復経路、回復過程が重要だということです。

## Proposed decision-making scheme

What are the key questions to ask of an EDS to decide if risk assessment is safe and scientifically sound?

- Is exposure of wildlife probable?
- Is prediction (or measurement) of exposure reliable?
- Have the most appropriate taxa been tested?
- Have the most sensitive life-stages been tested?
- Have delayed and multi-generational effects been considered?
- Do unusual dose-response curves affect prediction of no-effect-concentrations?
- Does a threshold for adverse endocrine-mediated effects exist?

では、どういったスキームが必要なのかということになりますが、EDCの場合、安全側の立場にあって、リスク評価ができるものは何なのか。科学的であるか否かを判断するために、問うべき点は何なのかということになりますが、野生生物がばく露する可能性は高いのか。ばく露の予測は信頼できるのか。その濃度が測定できなければ、信頼性のあるテストができません。ですから、濃度を測定するだけではなくて、環境におけるばく露も予測できなければなりません。

最も適した生物種、これはどのように実験するのか。

また、最も感受性の高いライフステージはどれなのかということで、確率として高いライフステージをきちっと把握してないと問題があると思います。

それから遅発影響、複数世代影響はどうなのか。同一世代なのか、一世代なのか等々ということです。

それから用量反応、用量依存曲線で通常ではない異常なものの場合はどうなのか。

そして閾値が存在、有害事象に対して影響するのかどうかということで、意思決定のためのスキームを私たちは構築しました。

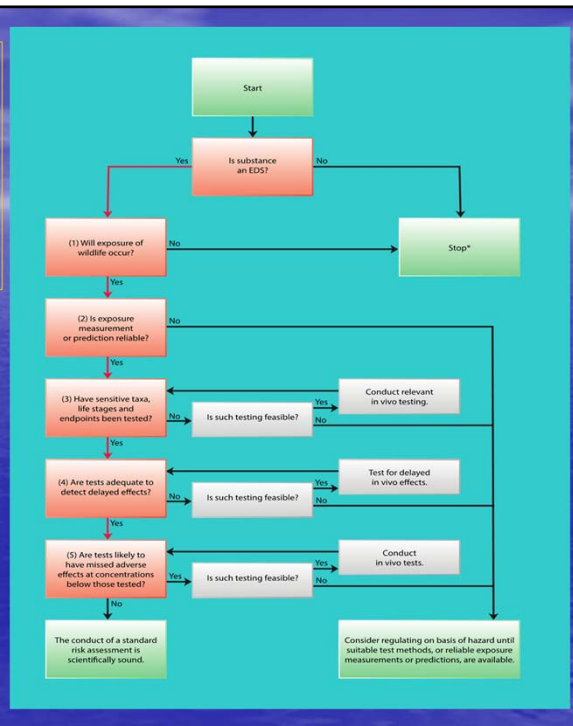


## Proposed decision-making scheme

Matthiessen *et al.* (in review)

...the question to be answered: is proceeding with a risk assessment sufficiently precautionary?

This scheme is suggested as a starting point to allow risk assessors to develop their own detailed evaluation methods



まず、リスク評価の進め方が安全かどうかということを検討しなければなりません。このスキームはあくまでも骨格でありまして、そして科学者に対して、それに基づいてリスクアセス、規制当局に対しては、このスキームでそこに肉付けしてもらおうということです。これはあくまでも骨格ということになります。あまり詳細には言及しませんが、時間もどんどん過ぎてきてまして、老眼なのでスキームが読めないのですが、まず、この物質はEDSなのかどうか。もしノーであれば、そこでやめます。中止です。

2つ目の質問です。野生生物へのばく露が今後発生するのか。ノーであればもちろん中止します。

その次です。ばく露の測定は信頼性があるのか。例えば、塩素系の化学物質、大気に浮遊していますし、どこにでも存在するような化学物質の場合ですが、ばく露予測はほとんど不可能だと思います。そこで、DDTのような化学物質はPOPsで禁止になっています。それがもしノーの場合には、一番下の方に行きます。つまり、適切なばく露測定はできない。もっとデータがなければ、ハザードベースの規制を検討するしかないということになります。しかし、測定ができた場合は、感受性の高い生物種、ライフステージ、エンドポイントについて試験実施が可能なのか、あるいはされてきたのかどうか。もし答えがノーの場合は、試験実施が実現可能か。イエスであればやる。もしできなければ、ツールがないということになると、一番下のところに進むわけです。

次の質問、ここまで来たのであれば、次に遅発性影響の検出に適した試験があるのかどうかということで、それは実現可能かどうか。実現可能であれば、*in vivo*をする。だめだったら下に行くということです。しかし、できなかったということは、有害影響を見落としていないかということも聞かなければなりません。そして同じような試験実施は再現性があるのかどうかということも聞かなければなりません。そういったことがすべてクリアされたのであればリスク評価を実施するということになるわけです。すべてをクリアしていくのはかなりハードルが高いです。しかし現代のテストであればこれは実現可能だと思います。