



The Development of OECD and U.S. Testing Methods for Endocrine Disrupting Chemicals and Future Directions

OECD及び米国における化学物質の内分泌作用の試験法開発と今後の展望

Leslie W. Touart, Ph.D.
レスリー W. トウオアート Ph. D

Senior Ecotoxicologist
米国環境保護庁 (EPA)
Office of Science Coordination and Policy/OPPTS
科学政策調整企画部／農薬・有害物質防止局
U. S. Environmental Protection Agency
上席生態毒性学者



EPA's Statutory Authority

EPAの法定権限



Food Quality Protection Act (FQPA) 食品品質保護法(FQPA)

- Requires EPA to: Develop a screening program using validated assays to identify pesticides that may have estrogenic effects in humans.

EPAの義務: 有効性を確認された試験法を使用して人体にエストロゲン様作用を持つと考えられる殺虫剤を特定するスクリーニング計画を作成すること

- Authorizes EPA to include: EPAに以下の権限を与える:
 - Other endocrine effects, as designated by the EPA Administrator (e.g., androgen and thyroid; endocrine effects in species other than humans).
EPA長官により指定される他の内分泌かく乱性作用(アンドロゲン、甲状腺、人間以外の種への内分泌性作用など)
 - Other non-pesticide chemicals that:
他の殺虫剤以外の物質で以下のもの
 - Have “an effect cumulative to that of a pesticide,” and
 - To which a substantial human population may be exposed.

「殺虫剤の影響に対して累積的な作用」を有し、更に人口の多くが曝露されるもの

Safe Drinking Water Act (SDWA) Amendments

飲料水安全法(SDWA)改正条項

- Allows EPA to require testing of chemical substances found in sources of drinking water, if a substantial human population may be exposed.

多くの人口が曝露される可能性がある場合、EPAが飲料水源に含まれる化学物質の試験を義務付けることを可能にする。



Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP)

内分泌物質スクリーニング・プログラム(EDSP)



Established in 1999 following recommendations of:

以下の推薦を経て1999年に制定

- the Federal Advisory Committee Act (FACA) chartered Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) of 1996-1998;
連邦諮問委員会法(FACA)により1996～1998年の内分泌かく乱物質スクリーニング及び試験諮問委員会(EDSTAC)発足
- public comment; and
一般コメント
- EPA's Science Advisory Board & FIFRA Scientific Advisory Panel
EPA科学諮問委員会および殺虫剤・殺菌剤・殺鼠剤法(FIFRA)科学諮問委員会



Two-Tiered Approach

二段階アプローチ



- **Tier 1 第1段階**

- *In vitro* and *in vivo* screens
生体外・生体内スクリーニング
- Detect potential to interact with
endocrine system
内分泌系との相互作用可能性の検知

- **Tier 2 第2段階**

- Multi-generation studies covering a
broad range of taxa
広範囲の分類群を網羅する多世代研究
- Provide data for hazard assessment
有害性評価に関するデータ提供



Tier 1 – What it is

第1段階- 目的

“The goal of T1S is to detect chemical substances or mixtures capable of interacting with estrogen, androgen, or thyroid (EAT) hormone systems.”

「T1Sの目的はエストロゲン、アンドロゲンおよび甲状腺ホルモン系(EAT)と相互作用する化学物質を特定することである。」

(EDSTAC 1998)



Tier 1 – What it is not

第1段階- 除外事項



“The objective of T1S is not to determine dose-response relationships, confirm the mechanism of action, or determine the adversity of the chemicals’ effect on reproduction and/or development...”

「T1Sの目標は用量反応関係の特定、作用メカニズムの確認や生殖・発達などへの化学物質の有害性の特定ではない。」

(EDSTAC 1998)



Screening battery considerations スクリーニングー連に関する考慮事項



Given the complex interactive nature of the endocrine system, it is clear that chemicals should be screened for their apical activity (e.g., the ability to alter growth, development or reproductive processes) rather than just for their sex steroid activity in *in vitro* assays if the objective is to effectively detect their potential to disrupt endocrine regulated processes.

内分泌系の複雑な相互作用性を考慮すると、内分泌系により制御される過程をする可能性を効果的に検知することを目的とする場合、生体外分析による性ホルモン作用を調査するよりも頂部での作用(成長、発達や生殖過程を変化させる作用など)についてスクリーニングを行うべきであるのは明白である。



Proposed screening battery

提案されているスクリーニング一連



- Designed to ensure detection of EAT hormonal systems interaction
EATホルモン系との相互作用を確実に検知するよう設計
- Fulfills EDSTAC recommendation that a range of taxonomic groups be included
広範囲の分類群を含むEDSTACによる推奨事項に準拠
- Includes sufficient diversity of endpoints to maximize sensitivity and minimize false negatives
感受性を最大にし、偽陰性を最低限にとどめるためエンドポイントは充分に多様性を持たせる
- Emphasizes apical assays to provide more comprehensive assessment
より総合的な評価とするため頂部分析に重点を置く
- Meets overall objective of detecting potential endocrine-mediated effects regardless of MOA
MOAに関係なく内分泌系を介する作用として考えられるものを検知するという全般的目標を満たす



EPA Tier 1 Screening Battery

EPA第1段階スクリーニング一連



- Steroidogenesis (*in vitro*)
ステロイド産生(生体外)
- Estrogen receptor binding assay (*in vitro*)
エストロゲン受容体結合試験(生体外)
- Estrogen transcriptional activation assay (*in vitro*)
エストロゲン転写活性化試験(生体外)
- Androgen receptor binding assay (*in vitro*)
アンドロゲン受容体結合試験(生体外)
- Aromatase (*in vitro*) アロマターゼ(生体外)
- Uterotrophic assay 子宮肥大試験
- Hershberger assay Hershberger試験
- Pubertal female assay 成熟期雌試験
- Pubertal male assay 成熟期雄試験
- Amphibian metamorphosis assay
両生類の変態試験
- Fish short-term reproduction assay
短期魚類生殖試験

Modalities

Hypothalamus-Pituitary-Gonadal

視床下部－下垂体－生殖腺

- Male pubertal 雄性成熟期
- Female pubertal 雌性成熟期
- Fish reproduction 魚類の生殖

Hypothalamus-Pituitary-Thyroid

視床下部－下垂体－甲状腺

- Male pubertal 雄性成熟期
- Female pubertal 雌性成熟期
- Amphibian metamorphosis
両生類の変態

Estrogen エストロゲン

- ER binding
ER結合
- ER TA
- Uterotrophic
子宮肥大
- Female pubertal
雌性成熟期
- Fish reproduction
魚類の生殖

Androgen アンドロゲン

- AR binding
AR結合
- Hershberger
- Male pubertal
雄性成熟期
- Fish reproduction
魚類の生殖

Steroidogenesis ステロイド産生

- Aromatase
アロマトラーゼ
- H295R
- Male pubertal
雄性成熟期
- Female pubertal
雌性成熟期
- Fish reproduction
魚類の生殖





Tier 2 Assays recommended by EDSTAC



EDSTACにより推奨される第2段階試験

Multi-generational tests in 以下についての多世代試験

- - Mammals* ほ乳類*
- - Birds 鳥類
- - Fish 魚類
- - Invertebrates 無脊椎動物
- - Amphibians** 両生類
- Rat 2-generation Reproductive and Fertility Effects assay already used for food-contact pesticides, perhaps with additional endocrine endpoints

ラットによる二世代生殖・繁殖能力への影響試験は既に食品に接触する殺虫剤に使用されているため、内分泌系のエンドポイントを追加することが考えられる。

** Partial life-cycle
部分的ライフサイクル



Organization for Economic Co-operation and Development (OECD)

経済協力開発機構



❖ WHAT IT IS

目的

- Forum for policy dialogue and development
政策対話と開発のためのフォーラム
- Centre for policy analysis
政策解析の中心
- Facilitator to achieve harmonisation, co-operation and work sharing
調和・協力および共同作業を達成するための推進役

❖ WHAT IT IS NOT

目的に含まれない事項

- Provider of technical assistance
技術援助の提供
- Supranational rule-making body
超国家的規則制定
- Bank
銀行機能



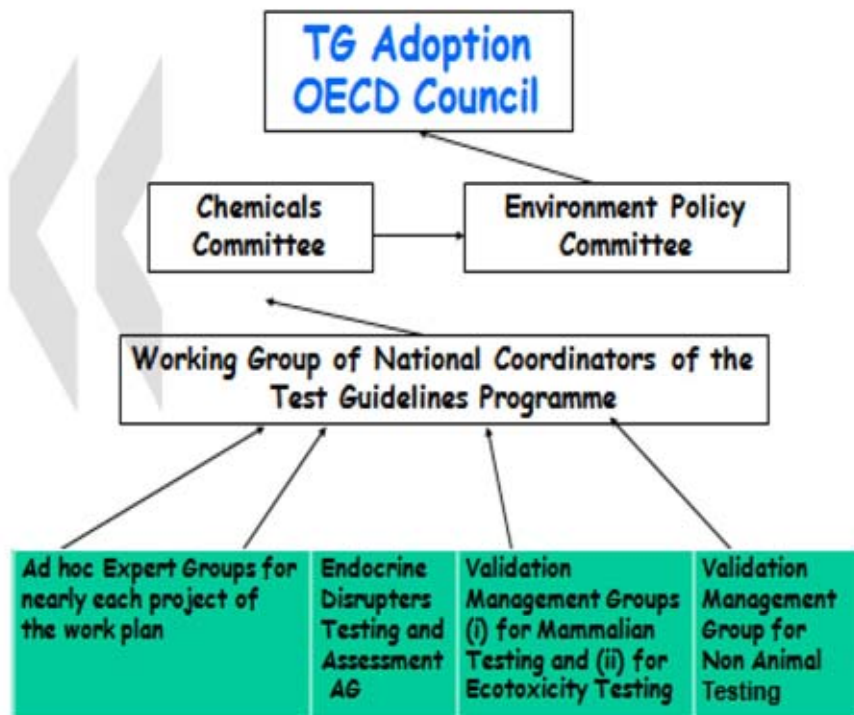
OECD



(Organisation for Economic Co-Operation and Development)
Intergovernmental Organisation grouping 30 industrialised countries

(経済協力開発機構)
産業国30か国をメンバーとする政府間機関

- | | | | | | |
|-------------------|---------|-------------------|----------|-----------------|----------|
| ■ Austria | オーストリア | ■ Poland | ポーランド | ■ Canada | カナダ |
| ■ Belgium | ベルギー | ■ Portugal | ポルトガル | ■ Mexico | メキシコ |
| ■ Czech Republic | チェコ共和国 | ■ Slovak Republic | スロバキア共和国 | ■ United states | 米国 |
| ■ Denmark | デンマーク | ■ Spain | スペイン | ■ Australia | オーストラリア |
| ■ Finland | フィンランド | ■ Sweden | スウェーデン | ■ Japan | 日本 |
| ■ France | フランス | ■ United Kingdom | 英国 | ■ New Zealand | ニュージーランド |
| ■ Germany | ドイツ | | | ■ South Korea | 韓国 |
| ■ Greece | ギリシャ | ■ Iceland | アイスランド | | |
| ■ Hungary | ハンガリー | ■ Norway | ノルウェー | | |
| ■ Ireland | アイルランド | ■ Switzerland | スイス | | |
| ■ Italy | イタリア | ■ Turkey | トルコ | | |
| ■ Luxembourg | ルクセンブルク | | | | |
| ■ The Netherlands | オランダ | | | | |





OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals

内分泌かく乱化学物質の試験評価に対するOECDの概念的枠組み



- Level 1 – Sorting and prioritization based upon existing information
既存情報に基づく分類および優先付け
- Level 2 – *In vitro* assays providing mechanistic data
力学的データを提供するための生体外試験
- Level 3 – *In vivo* assays providing data about single endocrine mechanisms and effects
単一内分泌メカニズムと作用についてデータを提供するための生体内試験
- Level 4 – *In vivo* assays providing data about multiple endocrine mechanisms and effects
複数の内分泌メカニズムと作用についてデータを提供するための生体内試験
- Level 5 – *In vivo* assays providing data on effects from endocrine and other mechanisms
内分泌および他のメカニズムによる影響に関するデータを提供するための生体内試験



VMG for Mammalian Testing

ほ乳類による試験に対するVMG



- Uterotrophic Bioassay TG 440: adopted October 2007
子宮肥大バイオアッセイTG 440:2007年10月に採用
- Updated TG 407: adopted in October 2008 (Guidance Document on Histopathology under development)

改良型TG 407:2008年10月に採用(組織病理学指導文書を現在作成中)

- Hershberger Assay (castrate/adult/immature):

Hershberger試験(去勢動物／成熟動物／未成熟動物)

- Background review document available on public website
公共ウェブサイトにて背景評価文書が入手可能
- Validation completed (report published)
妥当性検査完了済み(報告出版済み)
- Adoption of TG expected in 2009
TGの採用は2009年を予定



VMG for Ecotoxicity Testing (1)

生態毒性試験に対するVMG(1)



- 21-day Fish Screening Assay (E/A)
21日間魚類スクリーニング試験(E/A)
 - Peer review of the validation completed
妥当性検査のピア・レビュー完了
 - TG under discussion/comment
TG検討・コメント受付中
 - Adoption expected in 2009
2009に採用予定

- 21-day Amphibian Metamorphosis Assay (T)
21日間両生類変態試験(T)
 - Peer review of the validation completed
妥当性検査のピア・レビュー完了
 - TG under discussion/comment
TG検討・コメント受付中
 - Adoption expected in 2009
2009に採用予定



VMG for Ecotoxicity Testing (2)

生態毒性試験に関するVMG(2)



- 60-day Fish Sexual Development Test (E/A)
60日間魚類性的発達試験(E/A)
 - Phase 1 of validation completed
妥当性検査第1段階完了
 - Phase 2 of validation will start end 2008
妥当性検査第2段階は2008年末に開始
- Rev. *Daphnia magna* Reproduction Test TG 211:
改訂型*Daphnia magna*生殖試験TG 211
 - Sex ratio of offspring
子の性比
 - Adopted in October 2008
2008年10月に採用
- Invertebrate testing: Copepod Reproduction and Development (ongoing)
無脊椎動物試験:カイアシ類生殖・発達(進行中)



VMG for Non Animal Testing (1)

非動物試験に関するVMG(1)



- Draft TG for Stably Transfected Transcriptional Activation Assay approved be WNT provisionally
WNTにより暫定的に承認された安定トランスフェクション済み転写活性化試験のTG草案
- Other projects included in the work plan:
作業計画に含まれる他のプロジェクト:
 - STTA Assay for the Detection of Estrogen Receptors Agonist and Antagonists (LUMI-CELL)
エストロゲン受容体アゴニストおよびアンタゴニスト検知のためのSTTA試験 (LUMI-CELL)



VMG for Non Animal Testing (2)

非動物試験に関するVMG(2)



- Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha Binding Assays (2 protocols)
ヒト組み換えエストロゲン受容体 α 結合試験(2プロトコル)
- H295R Cell-based Steroidogenesis Assay
H295R細胞ベースのステロイド産生試験
- STTA Assay for the Detection of Androgenic and Anti-Androgenic Activity of Chemicals
アンドロゲン様および抗アンドロゲン様作用化学物質検知のためのSTTA試験
- STTA Assay for the Detection of Anti-Estrogenic activity of Chemicals
化学物質の抗エストロゲン様作用検知のためのSTTA試験



Current EDSP Activities

現在のEDSP活動



- **Assay Validation** - Development and validation of test assays (Tier 1 screening & Tier 2 testing)
試験の妥当性検査 試験法の開発と妥当性評価(第1段階スクリーニングおよび第2段階試験)
- **Priority Setting** - Selecting chemicals to be screened
優先順位設定-スクリーニングを行う化学物質の選択
- **Procedures** - Developing implementation procedures for requiring testing
手順-試験を必要とする場合の実行手順の開発



Validation Process for EDSP

EDSPに対する妥当性検査過程

- Consistent with OECD GD 34
OECD GD 34と一貫
- Method development and preparation of Detailed Review Paper (DRP)
方法の開発と詳細評価文書(DRP)の作成
- Pre-validation 妥当性検査前処理
 - Demonstration of relevance 関連性の実証
 - Development of standard optimized protocol
標準最適化プロトコルの開発
 - Determination of readiness for validation
妥当性検査について準備完了か否かの決定
- Validation in multiple laboratories 複数実験施設における妥当性検査
 - Demonstrate reliability across labs 複数実験施設における信頼性の実証
- Independent scientific peer review of validation effort: Integrated Summary Report (ISR)
妥当性検査の独立科学的ピア・レビュー:統合要約報告(ISR)
- Regulatory acceptance 規制の受け入れ



Validation Update on EDSP Tier 2 Assays



EDSP第2段階試験の妥当性 検査最新情報

- Mammalian 2-generation – Complete
ほ乳類二世世代試験-完了
- Mysid 2-generation – 2009
Mysid二世世代試験-2009年
- Fish 2-generation – 2010
魚類二世世代試験-2010年
- Amphibian Growth/Reproduction – 2010
両生類成長・生殖試験-2010年
- Avian 2-generation – 2010
鳥類二世世代試験-2010年



Multigeneration fish Tier 2 assays

多世代魚類第2段階試験



- Test development with freshwater (Medaka) and estuarine (sheepshead minnow) species
淡水魚(メダカ)および河口性魚(sheepshead minnow)を使用した試験法開発
- Standard test species, short life cycle
標準的試験様種、短期ライフサイクル
- Endpoints エンドポイント
 - Survival, growth
生存率、成長
 - Reproduction (fecundity, fertility, hatch, behavior)
生殖(繁殖力、生殖能力、孵化率、行動)
 - Pathology, hormones, genomics
病状、ホルモン、ゲノミクス



Mysid two generation Tier 2 assay

Mysid二世代第2段階試験

- Assess chemicals disrupting hormonal activity in invertebrates
無脊椎動物におけるホルモン活性をする化学物質の評価
- Initiated with <24 hr mysids (F0)
mysids < 24時間 (F0) から開始
- ~50 day exposure
~50日間までの曝露
- Major endpoints (Fo, F1):
主要エンドポイント (Fo, F1)
 - survival, growth 生存率、成長
 - reproduction (#young) 生殖 (#若年)
 - maturation time, brood release 成熟期、産子解放
 - sex ratio 性比



Amphibian partial life-cycle assay

両生類部分的ライフサイクル試験

- *Silurana (Xenopus) tropicalis*
- Optimize culture
培養最適化
- Detect life cycle effects on amphibians
両生類に対するライフサイクルへの作用検知
- Major endpoints: 主要エンドポイント
 - GSI, histology GSI、組織学
 - gonad maturation, fertility 生殖腺成熟、生殖能力
 - growth, metamorphosis 成長、変態
 - hormones ホルモン





Screening battery interpretation スクリーニング連の解釈

Weight-of-evidence (WOE) review

証拠の重み (WOE) 評価

- Uses professional judgment
専門家による判断を使用
- Some endpoints more diagnostic/specific than others
エンドポイントによっては他よりも診断的または具体的
- Effects seen in multiple-endpoints and multiple-assays carry most weight
複数エンドポイントおよび複数試験により観察される作用は重みが大きい

Two possible interpretation outcomes:

可能性のある二つの解釈結果

1. The potential for EAT activity, which will require further analysis in Tier 2 testing
第2段階試験により更なる分析を必要とするEAT活性の可能性
2. Low or no potential for EAT activity
EAT活性の可能性が低いまたは無い



Summary 要約



- Multiple assays required to comprehensively screen E, A, and T hormone systems
E、AおよびTホルモン系について総合的スクリーニングするために必要な複数試験
- *In vitro* assays good for well understood mechanisms (*e.g.*, receptor binding)
良く理解されたメカニズムを対象とする生体内試験法(受容体結合など)
- *In vivo* assays with intact HPG/HPT axes good for efficiently screening complex processes
複雑な過程を効率的にスクリーニングするための完全なHPG/HPT軸を使用する生体内試験
- Multiple taxa and MOA endpoints provide range of metabolism and needed corroboration
複数分類群およびMOAエンドポイントにより代謝の範囲と必要な確証を提供
- Complete battery needed to support WOE finding of low or no potential for EAT activity
EAT活性の可能性が低いまたは無いとするWOE見解を支持するのに必要な完全一連

Next steps

次の段階

- Initiate screening for the initial chemicals
初期化学物質に関するスクリーニングの開始
- Complete validation for additional Tier 2 tests
追加的な第2段階試験に関する完全な妥当性検査
 - Japan-US bilateral collaboration
日米両国間協力
- Complete standard evaluation procedures for all assays
全試験についての完全な標準評価手順
- Evaluate performance of Tier 1 battery on initial group
初期グループに対する第1段階一連の性能評価





OECD new work regarding Endocrine Disruptors

内分泌かく乱物質に関連するOECDによる新課題



Work on assessment of endocrine disruptors:
Development of a <<case study>> report on
assessment of ED followed by a workshop in
Denmark (September 2009)

内分泌かく乱物質評価作業：デンマークにおけるED評価およびその後のワークショップに関する《事例研究》報告書の作成（2009年9月）

For information on other projects, see the TGP work plan on the public website at:

他のプロジェクトの情報詳細については、以下のアドレスの公共ウェブサイトにてTGP作業計画をご覧ください

www.oecd.org/env/testguidelines



US EDSP website



<http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/>