



European Cluster to  
Improve Identification  
of Endocrine Disruptors

## EURION cluster presentation

Henrik Holbech, SDU

Coordinator of ERGO



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDpoINTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FREIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

過分な御紹介ありがとうございました。本日は発表の機会をありがとうございました。Henrik Holbechと申します。今、御紹介いただきましたが、EURIONクラスターのプロジェクトの1つでコーディネーターをしております。このEURIONの活動について皆様にお話ができることを楽しみにしています。

# The EURION Cluster



## EU Horizon 2020 Topic-SC1-BHC-27-2018

### New testing and screening methods to identify endocrine disrupting chemicals

The largest funding of research on endocrine disruptors in EU

50 mill € ~ 6.5 bill ¥. Period 2019-2023.

Eight projects forming The EURION Cluster

Acronym: Star constellation Orion



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No 825762 (EDCMET), No 825759 (ENDpoiNTs), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FREIA), No 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

それではまず、EURIONクラスターについて簡単に御説明します。最新情報です。

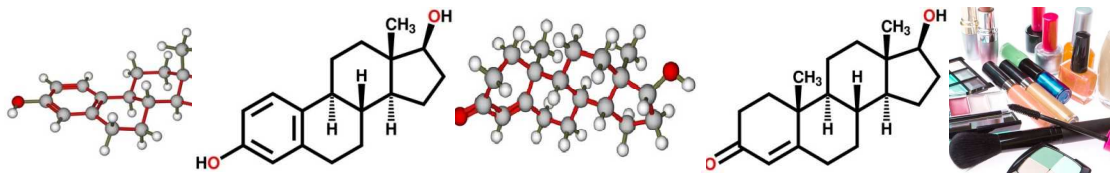
欧州連合の研究プログラムがありまして、これがHorizon2020と呼ばれているものです。その健康に関するトピックの下で新たな試験、スクリーニング方法、内分泌かく乱物質を同定するためのということで2018年に生まれました。これは内分泌かく乱物質研究についてEU内では最大の資金提供プログラムとなりました。5,000万ユーロ～65億ユーロという金額になりまして、2019年～2023年までの期間ですから、今ちょうどこのプロジェクトの期間の真ん中にいます。8つのプロジェクトがあって、これがEURIONクラスターを構成しています。

なぜこのような名前になったかということですが、星座のオリオン座が8つの星から構成されるということでこの名前がつけました。御覧いただいているロゴのとおり、8つのプロジェクトがあります。それぞれのプロジェクトの活動についてはまた後で発表の中で御説明いたします。

## Definition of an endocrine disruptor (ED)

An endocrine disruptor is an exogenous substance or mixture that alters function(s) of the endocrine system and consequently causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub) populations.

• (WHO/ICPS 2002)



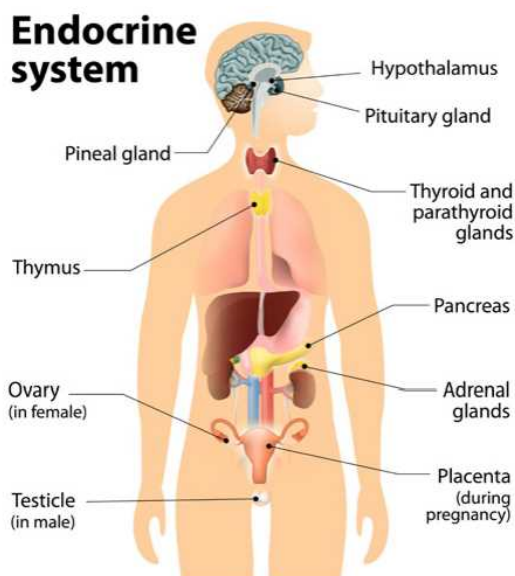
These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPNTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FHEIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825732 (ONERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

それでは、まず最初に、Mariaさんから内分泌かく乱物質（ED）の定義についてお話がありました。ただ、非常に重要なことで、私たちもこのEURIONで扱っているので定義をもう一度申し上げますが、「内分泌かく乱物質とは、内分泌系の機能を変化させ、その結果、未処置の生物、その子孫、又は（準）個体群における有害な健康影響を引き起こす外因性の物質又は混合物である」（WHO/IPCS 2002）となっています。したがって、内分泌系への影響と有害作用との関連性があるということが非常に重要となります。

# Hormones – the endocrine system



© Designua / Shutterstock.com



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPHNTs), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FHEIA), No. 825880 (GLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (ONERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

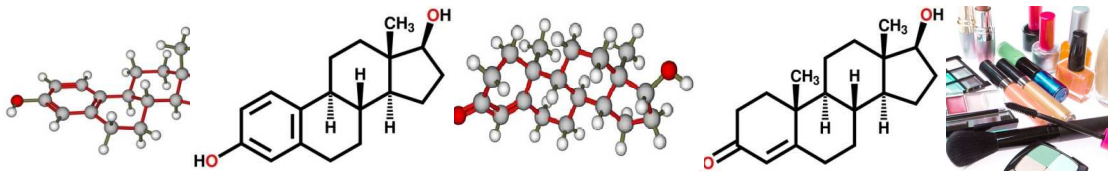
www.eurion-cluster.eu

もちろん皆様方、このホルモン系について、内分泌系については御存じだと思いますが、ホルモンというのが内分泌系においては非常に重要なものであるということで、それを簡略化したヒトの内分泌系を図に示しています。異なる様々な種類の内分泌系がありますが、話の中心となりますのは甲状腺系と代謝性疾患に関わる膵臓系ということでお話をしますが、ただ、系としては非常に複雑でありまして、様々な相互作用が内分泌系の間にも存在していて、そのためにデータの評価が非常に複雑になっているのです。

## ED mechanisms of action and effects

Hormone receptor  
Transport proteins  
Hormone synthesis  
Hormone turnover

Female and male sexual development  
Female and male Reproduction  
Developmental neurotoxicity  
Metabolic disruption



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPONTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (PREDA), No. 825489 (GOLARIT), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (OSERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

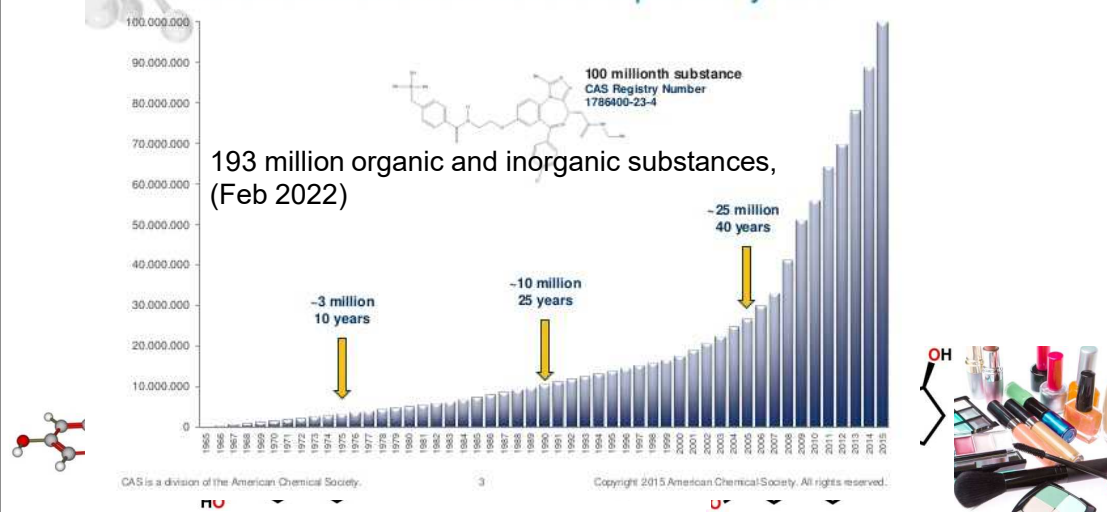
それでは、この内分泌系のかく乱のメカニズムがどのような機序があって、どのような影響があるのかということですが、まずホルモン受容体があって、これが輸送タンパク、ホルモン合成、ホルモン代謝、様々に影響しています。これはそれぞれ関連していますし、先ほどMariaさんから話がありましたが、エストロゲン（E）、アンドロゲン（A）、ステロイド産生（S）の部分、特に雌雄の性的な発達・生殖に影響を与えます。それ以外にも発達神経毒性もあります。代謝のかく乱も引き起こすということで、これについてはまた後で詳しく御説明いたします。

# EURION Cluster



## CAS

Approximately 75 million substances were added to CAS REGISTRY<sup>SM</sup> over the past 10 years



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPHNTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FREA), No. 825480 (GOLIATH), No. 825745 (SCHEDULED), No. 825732 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

まず、懸念すべき、憂慮すべき事態なのか、また、なぜ試験を行ってEDの同定を行うことが必要なのかということです。この図はCASから取ってきたものです。CASというのは化学物質の登録レジストリであって、それぞれの個々の化学物質について登録をしたものです。御覧のように、登録された物質の数は指数関数的に伸びてきていて、特にこの数年だけでもこれだけ多くなっています。過去10年間で約7,500万件が追加登録されていますし、1億件を超えたのが2015年でした。そして、数日前に確認したところでは今はそれからさらに1億もの化学物質が増えているということです。2月の時点で1億9,300万件でした。これが全て環境中に放出されるわけではなく、多くがラボの中にとどまりますが、ただ、非常に複雑な化学物質の環境があることを示していると思いますし、だからこそ試験を行って有害な危険な作用があるかどうかの評価を行う必要性があるということも分かると思います。

## Signs on problems with sexual development observed since 1970's

- Humans and wildlife



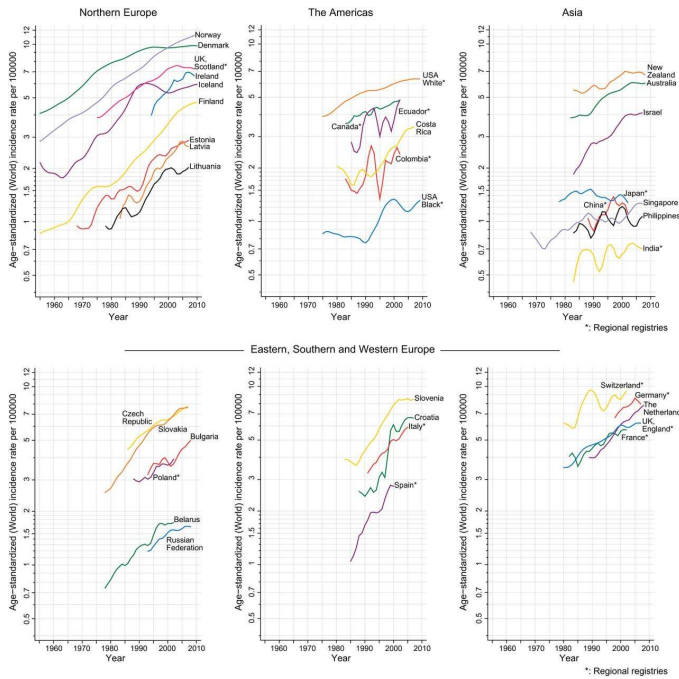
These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPONTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FREIA), No. 825689 (GLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825732 (ONERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

[www.eurion-cluster.eu](http://www.eurion-cluster.eu)

なぜ心配しなければならないのか、内分泌系のかく乱が重要なのかということですが、1970年代から様々な発達における問題が、特に性発達においてヒトでも野生生物でも認められるようになりました。

# Testicular cancer/100.000



Testicular cancer  
 Decreased sperm counts  
 Cryptorchidism  
 Hypospadias  
 The 4 phenomena's  
 'Testicular Dysgenesis Syndrome'  
 (TDS)



Skakkebaek et al., 2016 physiological reviews Vol. 96 no. 1, 55-97



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMEI), No. 825759 (ENDOPHNTS), No. 825753 (ERGI), No. 825100 (FREA), No. 825480 (GOLIATH), No. 825745 (SCHEDULED), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

1つ具体的な事例を挙げてヒトの場合をお話ししますが、少し複雑な図とはなっていますが、これを見ていただきますと、精巣がんの患者の数、発生頻度が10万人当たりでどうかを見ているものです。60年代から今までの変化を追いかけています。

基本的な傾向としては、まず、これはヨーロッパの北部のデータです。精巣がんの患者の数が50年の間にほぼ倍増しています。また、北米全体の状況ですが、基本的には同じような状況ですが、ヨーロッパ北部ほど明確ではありません。デンマークとノルウェーがここにありますが、御覧のように主要な、主要と言っているのかどうか分かりませんが、精巣がんの患者数が最も多いところであると言えます。

アジアはそれほど顕著な結果が出ているわけではありません。ただ、国によっては同じような傾向が認められるところもあります。日本は一定した低い発生頻度となっています。ただ、全般的な傾向としては増加にあるというのがこの精巣がんの状況です。しかも急速に増えていますので、遺伝的な変化だけではこのような変化は起きないはずですが、また、このような精巣がんの発達とともに精子数の減少も認められています。このような変化というのは精巣の Dysgenesis Syndrome (TDS) と呼ばれていますが、この症候群の議論の1つの中にやはりEDの化学物質が入っているのではないかとということが言われています。



## Signs on problems with sexual development observed since 1970's

- Egg shell thinning in birds of prey – DDT/DDE
- Feminized/hermaphroditic fish – Alkyl phenols - estrogenic chemicals
- Imposex in snails – TBT
- Decline in alligator populations – DDT/dicofol



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPHNTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FREA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCHEMED), No. 825712 (ONERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

それでは、環境中生物への影響を見てみますと、やはり性発達において70年代から問題の兆候が認められています。中でもよく知られている事例としては猛禽類の卵殻の薄化で、DDTとDDEに係るのではないかとされています。農薬に関するばく露が原因ではないかということです。

また、多くの河川あるいは湖沼では雌化あるいは雌雄同体魚が認められています。その原因としてはアルキルフェノール類と言われていて、これがエストロゲンのような作用をもたらしているのではないかと、弱いエストロゲンとして働いていると言われています。

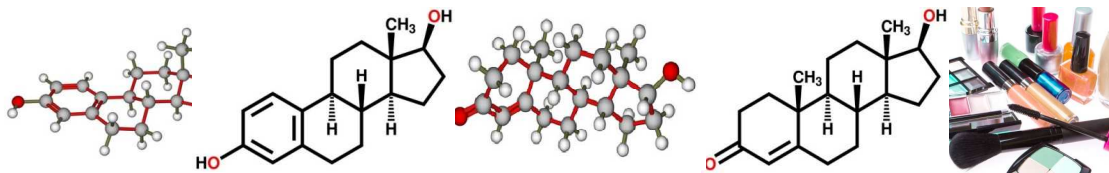
また、有名な事例として知られているのは巻貝類のインポセックスで、TBTによるものであって、防汚（antifouling）のための船の塗料として使われています。TBTは最初のED物質として世界中で禁止されたものです。それはこの海洋の巻貝類に影響があったということが示されたからであり、この雌が死滅してしまって死に絶えてしまったということがあります。

もう一つは、アメリカのミシシッピワニの個体数の減少でして、環境中にDDTが流れたこと、また、ジコホルという農薬が環境中に放出されたことによるものです。

# Increasing evidence that chemicals caused endocrine disruption in humans and wildlife.

## Challenges:

- No available test methods to discover ED effects
- New chemicals were not tested for endocrine disrupting properties
- 100 000+ existing chemical compounds have not been tested!
- Development of test guidelines for testing of new and existing chemicals needed



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMEI), No. 825759 (ENDOPHNTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FIBIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCHEMEDI), No. 825712 (ONERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

ということで、この化学物質が、ヒトでも、それから野生生物で破綻を引き起こしているということが分かっていました。

そして、この段階では問題となったのはEDの作用を見るための試験法がありませんでした。全身毒性を見るための試験法ばかりだったからです。ということで、EDを見いだすために新しい試験法が必要ということになりまして、端的に考えなければならないのは、少なくとも西洋諸国において通常ばく露されるのは10万種以上の化学物質になるということです。ただ、このことはもちろん分かっておりませんでした。このような既存の化学物質は少なくともつい最近までは、Mariaさんからも話がありましたが、試験は行われていませんでした。したがって、ここまでの合意事項としては、新規及び既存の化学物質を試験するためには今後新しい試験法のガイドラインを開発していかなければならないという点であります。

## Development of test systems to detect EDC's



- Major players on the market
  - OECD (The Test Guidelines Programme (TGP))
  - EU, European EPAs
  - US EPA,
  - Japan, Ministry of the environment
  - Industry: BIAC, ECETOC
  - NGO's: CHEM trust, WWF



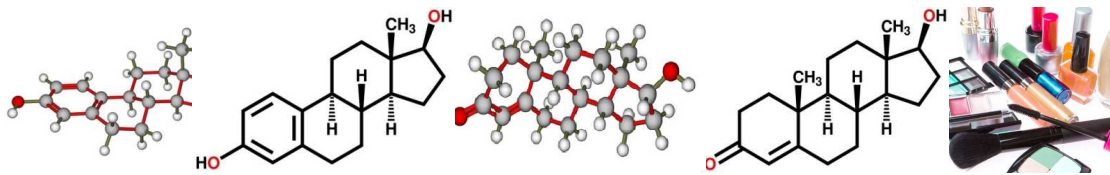
These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCNET), No. 825759 (ENDPOINT), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FREIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

日本の場合、OECDでの話が非常に重要だと思います。OECDの試験法開発プログラムがあって、日本も深く関わっておられます。EDC系の試験だけではなく、一般的な化学物質の試験法開発にも関わっています。また、ヨーロッパの環境保護機関、アメリカの環境保護庁があります。日本の環境省もOECDの中で活躍しておられます。また、産業界の様々な組織もあります。例えばBIAC（ビアック）もその1つです。そしてECETOC（エセトック）というのは欧州化学物質生態毒性及び毒性センターですが、これもまた産業界をベースにした組織ということで試験系の開発に関わっています。NGOとしてはCHEMトラスト、あるいはWWFなどが関与しています。

- OECD members: 35 Industrial Countries ~ production of more than half of world products and services.
- OECD coordinates development of test guidelines for testing of chemicals (TGP).
- Great advantages of unified testing strategy
- Some political interference challenges the cooperation as all countries have veto-right
- Mutual Acceptance of Data (MAD) in the Assessment of Chemicals



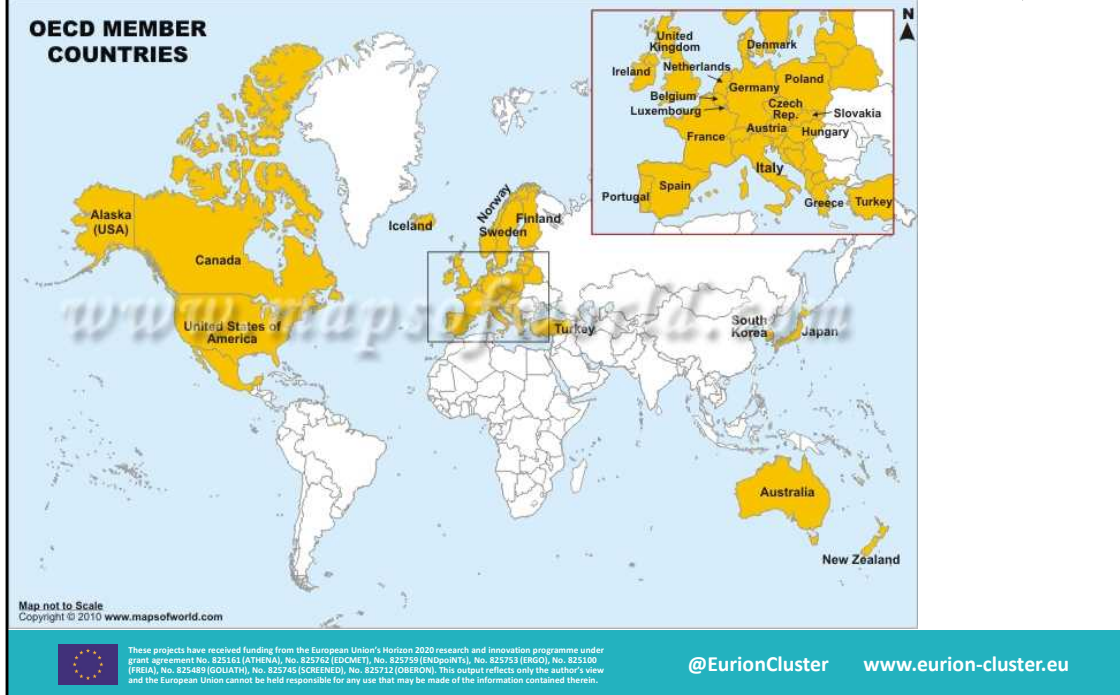
These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPNTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FHEIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCHEMED), No. 825712 (ONERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

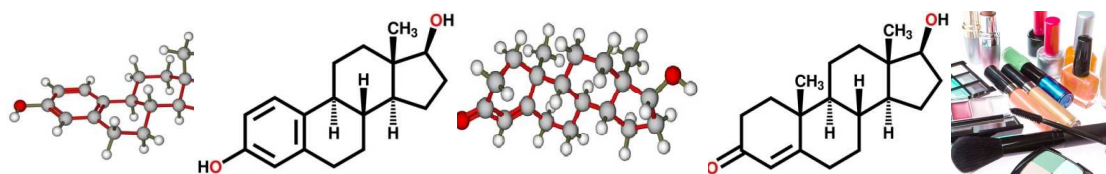
さて、OECDです。経済協力開発機構ですが、現在35の先進国が加盟しています。そしてそこが半分以上の製品及びサービスを生み出す工業国となっています。試験ガイドラインの開発も調整しています。これは化学物質の試験のガイドラインというものでありますが、その利点としては、統一された試験戦略といったものができるということがあります。

もちろん政治的な干渉は時々起きています。それぞれの国が拒否権を持っていますので、そういったことも起きます。新しいガイドラインを受け入れられないという場合もあります。しかし、一旦受容されると、データの相互受容（MAD）というものが化学物質評価においてあります。このMADの原理原則は非常に重要です。なぜかという、試験の結果がOECD加盟国全てに適用されるからです。



これは加盟国を示しています。北米、ほとんどのヨーロッパ、オーストラリア、ニュージーランド、日本、そして韓国等が網羅されています。また、ガイドラインをフォローしている国も何か国があります。

- Mutual Acceptance of Data (MAD) in the Assessment of Chemicals
  - Data generated in accordance with OECD Test Guidelines and OECD principles of Good Laboratory Practice (GLP) shall be accepted in other Member countries (or non member economies) for purposes of assessment and other uses relating to the protection of man and the environment”.



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPHNTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (PREIA), No. 825589 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (ONERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

非常に重要な概念であるデータ相互受容（MAD）ですが、定義として、OECDの優良試験所基準（GLP）の原則に従って生成されたデータというのは全ての加盟国で受け入れられるということです。多くの動物実験を回避することができますということになるわけです。

## Development of test systems to detect EDC's



OECD have coordinated Test Guideline development since 1981

In 1996, an Advisory Group on Endocrine Disruptors Testing and Assessment (EDTA) was set up at the OECD to develop new or update existing OECD Test Guidelines to identify chemicals with endocrine disrupting properties.

A Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disruptors consisting of information measured at different biological levels, ranging from biochemical, to organism and population was developed.

© OECD March 2018



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPHNTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FIBRA), No. 825889 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825732 (ONERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

[www.eurion-cluster.eu](http://www.eurion-cluster.eu)

OECDはかなり長い期間テストガイドラインの開発を調整してきました。1981年以來、私たちがEDの試験を始める前からです。1996年、OECDに諮問委員会（EDTA）というものができました。EDTAという評価に関する諮問グループですが、内分泌かく乱特性を持つ化学物質の同定を行う際に使用する新しいまたは改良されたテストガイドラインを開発するものです。

また、概念フレームワークというものが開発されましたが、これは内分泌かく乱物質の試験に関する評価の概念フレームワークでして、全ての生物学レベルで測定されたデータが網羅されています。生化学的レベルから生物及び個体群に至るまでのそういったレベルで測定された情報になります。

## Development of test systems to detect EDC's



### Conceptual Framework for testing and assess endocrine disrupters

Mammalian and non-mammalian Toxicology	
Level 1 Existing Data and Non-Test Information	
Level 2 <i>In vitro</i> assays providing data about selected endocrine mechanism(s) / pathway(s)	
Mammalian Toxicology	Non-mammalian Toxicology
Level 3 <i>In vivo</i> assays providing data about selected endocrine mechanism(s) / pathway(s)	
Level 4 <i>In vivo</i> assays providing data on adverse effects on endocrine relevant endpoints	
Level 5 <i>In vivo</i> assays providing more comprehensive data on adverse effects on endocrine relevant endpoints over more extensive parts of the life cycle of the organism	

© OECD March 2018



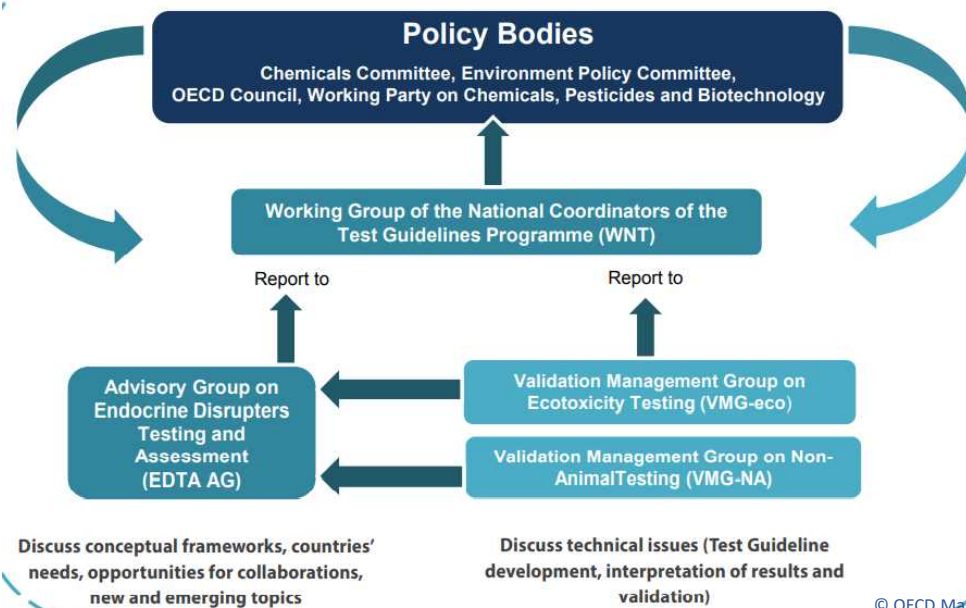
These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPNTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FREIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (OSERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

こちらはこの概念的な枠組みです。最初のレベルは既存のデータ、それから非試験の情報も入ります。QSARデータとか計算データなども含まれます。Level 2が試験管内試験（*in vitro* 試験）でして、内分泌系の機序、経路（pathway）などといったものが入ります。そして最後の幾つかのLevelですが、既にMariaさんから説明があったように、哺乳類の毒性、そして非哺乳類の毒性、つまり環境毒性に分かれています。生物試験（*in vivo* 試験）がその内分泌系の作用機序だったりとかそういったところを見ている。そして*in vivo*の試験、そしてLevel 5は、先ほども話が出た環境側面から、そして1世代の拡張試験、ラットの試験、哺乳類の試験などの有害影響に関する内容となっています。





These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPNTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FHEIA), No. 825480 (GLUATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825732 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

内分泌かく乱作用に関するOECDでの検討は、マネジメントグループで実施されています。生態毒性の試験をやっているところ、それから非動物の試験をやっているところがありますが、それらがEDTAにデータを送って、そしてそれぞれの国のコーディネーター作業部会（WNT）にその結果を送るわけです。最終的には政策を決定する機関があります。試験法のガイドラインといったものがそこで承認されるという手順になっています。

## Development of test systems to detect EDC's



OECD have coordinated Test Guideline development since 1981

In 1996, an Advisory Group on Endocrine Disruptors Testing and Assessment (EDTA) was set up at the OECD to develop new or update existing OECD Test Guidelines to identify chemicals with endocrine disrupting properties.

A Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disruptors consisting of information measured at different biological levels, ranging from biochemical, to organism and population was developed.

© OECD March 2018



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPNTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FHEIA), No. 825589 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (ONERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

[www.eurion-cluster.eu](http://www.eurion-cluster.eu)

こちらは試験系の開発です。毎年新しいテストが導入されますが、生化学的なアプローチということで全てが進化しているわけですから、毎年この内分泌毒性学の理解が高まっているわけです。新しい方法論を開発するということが大事になってきます。

## Development of test systems to detect EDC's



Every year, new projects are proposed to develop state-of-the-art scientific approaches reflecting the increasing understanding of endocrine toxicology.

There is an ongoing need to develop new methodologies or update existing ones to

Gaps in the TG program was identified at several OECD and EU workshops and the EC made a call to close some of these gaps:

**EU Horizon 2020 Topic-SC1-BHC-27-2018: New testing and screening methods to identify endocrine disrupting chemicals**

**EURION was established 1/1-2019 based on 8 funded projects**

© OECD March 2018



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPHNTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FHEIA), No. 825589 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (OECD/ION). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

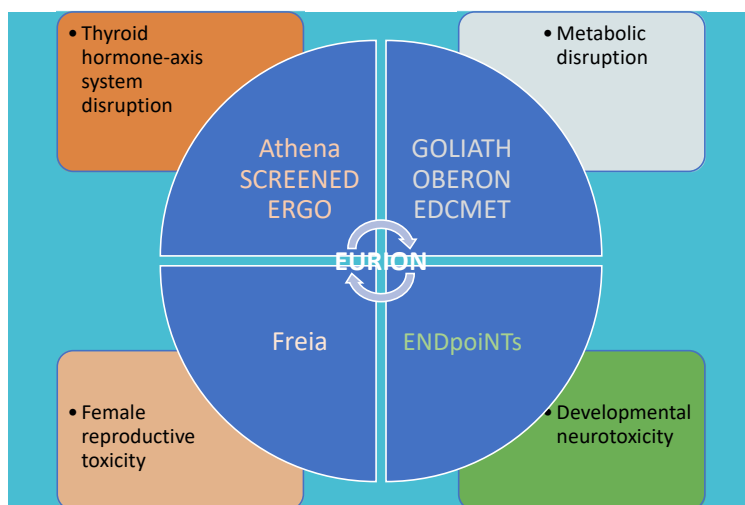
[www.eurion-cluster.eu](http://www.eurion-cluster.eu)

例えば、今は10年、15年前に比べるとかなり進んでいますが、テストプログラムには格差があります。OECD及びEUでのワークショップにて特定もされていますが、EC（欧州委員会）としては、EURIONを使ってテストガイドラインの格差を何とか縮めよう、埋めようということをしています。2018年、そして2019年がその格差を埋めるということを始めたわけですが、2019年の初めにEURIONがこの資金提供を受けて8つのプロジェクトを実施するということになったわけですが。

# EURION Cluster



## Projects



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDpoiNTs), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FREIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

これが8つのプロジェクトのスキームになっています。

Athena、SCREENED、ERGOですが、これは甲状腺ホルモン軸系のかく乱が対象になります。これはかく乱だけではなく、このシステム全てに関連するものが対象になります。

それから、新しい分野として代謝のかく乱という分野がありますが、3つのプロジェクトがあります。GOLIATH、OBERON、EDCMETです。

そして、ENDpoiNTsプロジェクトで、これは発達神経毒性が対象になります。

そして、Freiaのプロジェクトで、これは雌性生殖毒性が対象になっています。

# EURION cluster

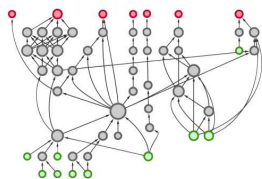


## Approach



Development of **down-stream markers** of adverse outcomes that are currently overlooked

Improve existing and/or develop new test methods, including ***in vitro* assays**, computational models



Development of **testing strategies** based on Adverse Outcome Pathway networks and read-across between vertebrate classes



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPoNTs), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FHEIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (ONERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

このクラスターのアプローチの考え方はどうなっているのでしょうか。これは有害アウトカムの下流マーカを開発する、今まで私たちが見落としていたものが対象になります。*in vitro*試験や計算モデル等含む既存の試験法を改良したり、新たな試験法を開発するものです。例えばMariaさんがおっしゃったような脊椎動物もその対象です。非常に複雑なタスクになっていますが、*in vivo*でやらずにそういった*in vitro*での改良も行います。

また、試験戦略というのも非常に重要です。Adverse Outcome Pathway (AOP) のネットワークに基づいています。特にERGOのプロジェクトでは脊椎動物の分類学上の網間の推測に基づく試験戦略が開発されています。

# EURION Cluster



## Common activities

- Common kick-off, annual and final meetings
- **Thematic workshops/training**, in cooperation with JRC when relevant, on issues such as AOPs, IATA, (pre)validation of tests, data sharing, selection of chemicals, methodologies;
- **14 Cross-project working groups**
- Common International Regulatory Advisory Panel
- **Common dissemination activities** to increase the impact.



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDPOINTs), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FREIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCHEENED), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

共通の活動（common activities）という活動がEURIONの各プロジェクト横断的に存在しています。共通のキックオフ会合であったり、年次会合であったり、最終会合といったものが開催されます。また、ワークショップや訓練も欧州共同研究センター（JRC）の協力を得て、行われています。ワークショップとしては、AOPsやIATAや試験結果の検証について、結果の共有や化学物質の選択や方法論についてを主題として行っています。

現在14のプロジェクト間のワーキンググループ（WG）が形成されています。また、共通の国際規則諮問委員会も設置されています。EU以外のところも入ります。そして共通の普及活動も実施しています。影響力を高めようということが目的です。このクラスターでは研究が重複しないようにということが目的でもありますし、その結果の改善・向上も行っています。

## Partners and working groups

+ 90 partners collaborating across EURION projects in  
14 Working Groups.

**Adverse outcome pathways (AOPs) WG**  
**Animal studies: Aquatic organisms WG**  
**Animal studies: Rodents WG**  
**Chemicals WG**  
**Data management WG**  
**Dissemination and communication WG**  
**Epidemiology WG**  
**In silico WG**  
**Integrated approaches to testing and assessment (IATA) WG**  
**In vitro model studies WG**  
**Omics WG**  
**Regulatory affairs and policy (RAP) WG**  
**Validation WG**  
**Evidence-based WG (New!)**



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDPOINTs), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FREIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCHEENED), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

まとめになりますが、現在90以上のパートナーがこの14のWGで横断的に協力をしています。その幾つかが列挙されています。規則だとか政策のWGもあります。エビデンスベースのアプローチというWGもありますし、それから普及及びコミュニケーションのWGというのもあります。かなりの相互作用がそれぞれのプロジェクト間にあります。

## 3 projects address thyroid hormone system disruption



**SCREENED**  
SCREENING FOR ENDOCRINE DISRUPTORS

*A multistage model of thyroid gland function for screening endocrine-disrupting chemicals in a biologically sex-specific manner*

Coordinator Prof. Lorenzo Moroni, Universiteit Maastricht, NE



*Assays for the identification of Thyroid Hormone axis-disrupting chemicals: Elaborating Novel Assessment strategies*

Coordinator Prof. Andreas Kortenkamp, Brunel University London, UK



*Breaking down the wall between human health and environmental testing of endocrine disruptors: Endocrine Guideline Optimisation*

Coordinator Assoc. Prof. Henrik Holbech, University of Southern Denmark, DK



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPNTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FEDIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825732 (ONERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

では、詳細に移りたいと思います。この8つのプロジェクト、なるべく一生懸命説明しますが、私の専門はERGOプロジェクトになっていますので、何かもし私が答えられない質問があった場合にはコーディネーターにお送りします。

3つのプロジェクトで、これは甲状腺ホルモン系のかく乱に取り組んでいるプロジェクトになります。

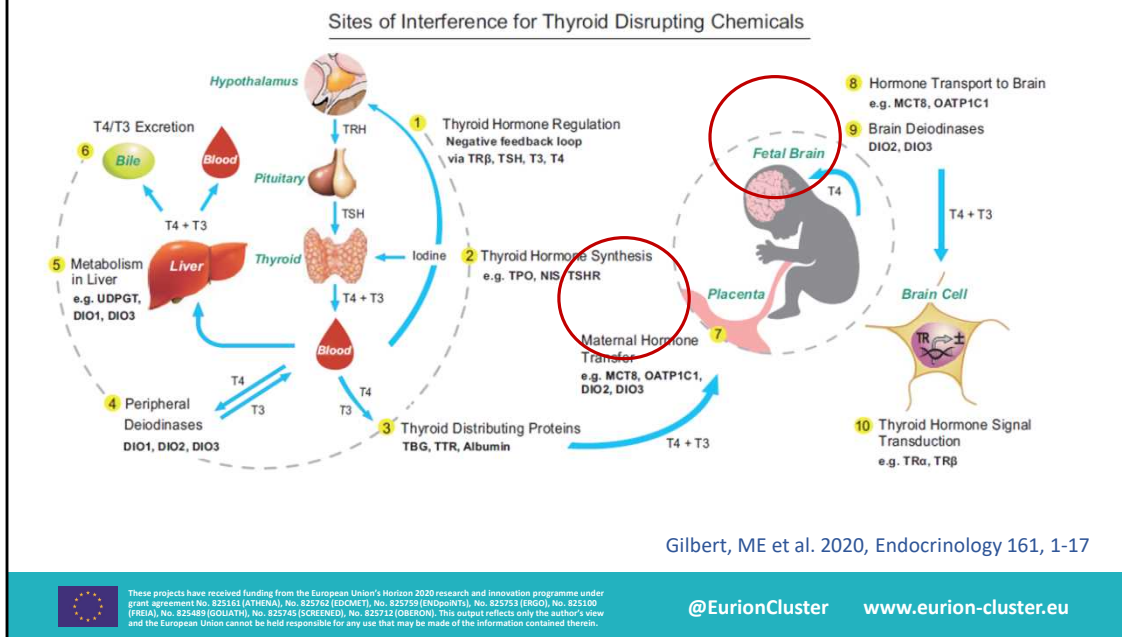
SCREENEDですが、これは生物学的に性特異的な方法で内分泌かく乱物質をスクリーニングするための甲状腺機能に関する多段階モデルになっています。

それからathenaプロジェクトです。これは甲状腺ホルモン軸のかく乱化学物質の同定のための試験法で、また、新規の評価戦略の精緻化などというものも行っています。

そして、私が関与していますERGOですが、「ヒトの健康に関する試験結果と環境生物試験の結果の障壁を打破する」というサブタイトルがありますが、お互いのデータからいろいろとメリットを享受するというのも目的になっています。内分泌系のかく乱、例えば鳥類、魚類、哺乳類等、非常に広範囲だということです。



## Novel in vivo endpoint for thyroid disruption



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCME1), No. 825759 (ENDPOINT1), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (PREIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCHEENED), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

最初にathenaについて少しお話をしたいと思います。甲状腺ホルモンかく乱に関するin vivoでの新しいエンドポイントです。図は詳しく甲状腺ホルモン系を示しているものです。非常に複雑であり、多くのフィードバックのメカニズムがありますが、基本的には全てが脳から始まります。この甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（TRH）からシグナルを送って様々な経路を通して重要なホルモンが産出されてきます。サイロキシン（T4、Thyroxine）とヨリヨードサイロニン（T3、Triiodothyronine）になります。T3は基本的にはこれが甲状腺ホルモン系で機能しているホルモンとなります。その活性としてはT4よりも10倍強いというのがT3であります。

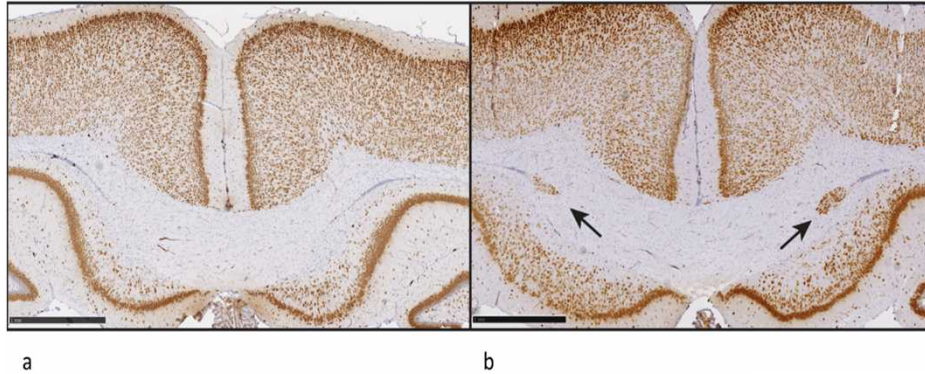
様々な異なる甲状腺ホルモン系があって、それぞれが化学物質による影響を受けます。合成から様々な種類のタンパク、輸送タンパクもそうですし、また、デヨージナーゼ（deiodinases）、脱ヨード酵素があって、これはT4からT3へと変換する酵素になります。また、代謝系があり、脳への輸送があり、脳でも脱ヨード化が起きるといった系であります。athenaが中心的に見ているのはこの胎児の部分です。甲状腺ホルモンは脳の発達において非常に重要だからです。したがって、ここの主要な甲状腺ホルモンに影響を与える化学物質がヒトにおいては脳の発達に影響を与えるということからこの系が大変重要となります。

# Novel in vivo endpoint for thyroid disruption

Misplaced neurons in white matter after gestational exposures to inhibitors of thyroid hormone synthesis (propylthiouracil, amitrole, a pesticide)

Control

Propylthiouracil, 2.5 mg/kg/d

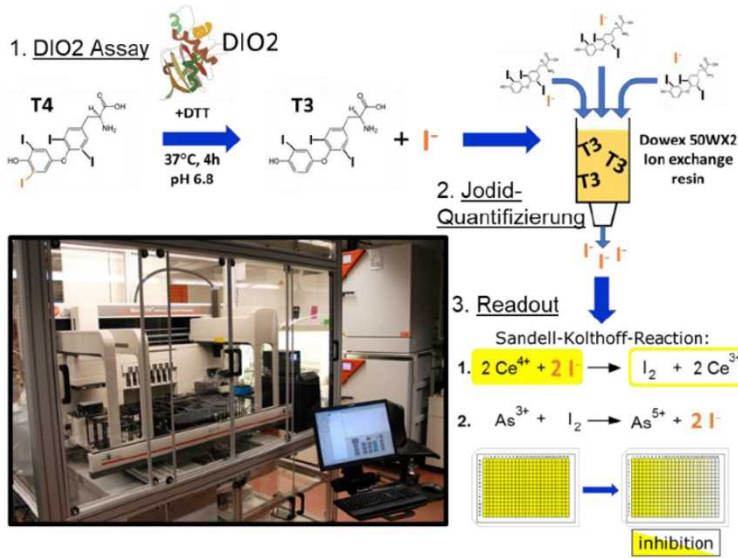


Ramhoj et al. DTU



また、新しいエンドポイントの検討も行っています。甲状腺ホルモンかく乱のエンドポイントですが、御覧いただいているのはラットの脳です。ラットの脳を甲状腺で産生される甲状腺ホルモンを減少させる化合物にばく露しています。プロピルチオウラシル（PTU）をラットの胎児にばく露した例ですが、脳が変化しています。コントロールの脳がこちら側であり、御覧のようにいわゆるヘテロトピア（heterotopia）と言われているものが見られます。つまり白質におけるニューロンの位置が変わっていて、PTUの量が非常に低くてもこのような変化が起きています。これは1つの事例として、これがもしかすると新しいエンドポイントとして甲状腺ホルモン系のかく乱が哺乳類で見られるものとなるのではないか、脳の発達における影響として考えられます。

## High-throughput screening for deiodinase inhibitors



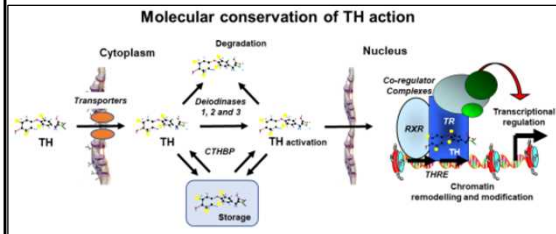
また、ハイスループットスクリーニングのアッセイも検討されています。これは脱ヨード酵素の阻害剤であって、T4をT3に変換するものですが、非常に重要です。非常に多くの化学物質について今後はスクリーニングをかけていかなければならない可能性があるからです。したがって、ハイスループットのスクリーニング試験法は大変重要になってきます。もし具体的な様々な試験法についての御質問があれば、それぞれのコーディネーターにおつなぎしますので御連絡いただければと思います。

## Breaking down the wall between human health and environmental testing of endocrine disruptors

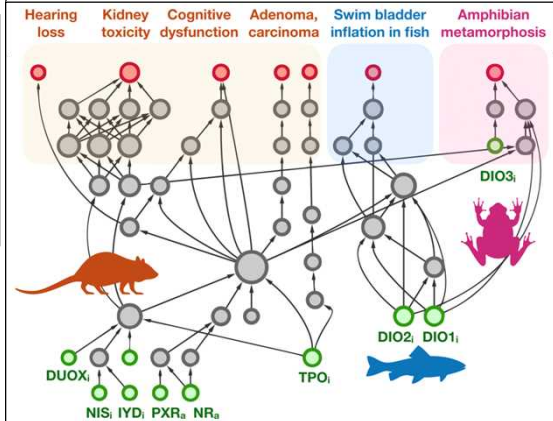


The thyroid hormone system is highly conserved among vertebrate classes as mammals, fish and amphibians sharing homologous proteins and mechanisms:

In ERGO, A cross-class Adverse Outcome Pathway network will provide the scientifically plausible and evidence-based foundation for the selection of thyroid sensitive biomarkers and endpoints in lower vertebrate assays predictive of human health outcomes



Modified from Sachs & Buchholz 2017



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825753 (ERGO). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@ERGO\_EU [www.ergo-project.eu](http://www.ergo-project.eu)

さて、これは私がよく知っているERGOプロジェクトでありまして、ヒトの健康に関する試験結果と環境生物に関する試験結果を見ているものですが、このプロジェクトをなぜ行うかという、甲状腺ホルモン系というのは両生類でも魚類でもよく保存されているからです。タンパク、酵素、様々なメカニズム、魚類と両生類との間でよく保存されていることから検討しているわけですが、この論文を見ますと様々な共通性を示しています。魚類と両生類と哺乳類との共通性です。これもトランスポーターから酵素、そして脱ヨード酵素まで、また、脳への作用・影響についてもダイマー化（二量化）があるレチノイドX受容体があり、レスポンスエレメントなどがあるということで、様々な種にまたがって検討を行っています。ただ、代謝が違う、あるいは薬物動態なども違うということで、これについてもERGOにおいて検討は行っています。

私たちが主にツールとして使っているのは生物の分類学上の綱（class）にまたがるAOPネットワークであって、これを使うことで科学的なエビデンスベースの基盤としてこれを基に甲状腺にセンシティブなバイオマーカー、エンドポイントを選ぶことができるのではないかと。特に魚類、両生類においては少なくとも1つの同じような作用をヒトの健康へのアウトカム、予測できるものがあればということで見ているわけです。

御覧いただいているのはネットワークを作ったものです。例えば両生類の変態について、これは両生類で起きるものであります。そして浮袋肥大（swim bladder Inflation）というのが魚類で認められ、また、それ以外にも様々な作用が哺乳類でも認められ、ラット、マウスなどが通常はモデルとして採用されています。

**Thyroid-related endpoints in fish are not yet validated. Such endpoints, also predictive of effects in other classes are under development**

**EURION**  
European Cluster to Improve Identification of Endocrine Disruptors

**ERGO**  
Endocrine Guideline Optimisation

Control PTU

swimbladder

thyroid

Swimbladder inflation

Eye development

Pigmentation

Thyroid histopathology

Fin development

+ Thyroid hormone levels and gene expression in target systems

<https://ergo-project.eu/media/ergo-project-video/>

Pictures: L. Gözl, L. Reger

This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825753 (ERGO). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.


@ERGO\_EU www.ergo-project.eu

最初の成果の1つが出てきていますが、御覧のように、例えばこれは甲状腺機能亢進症の治療薬として開発された医薬品（PTU）ですが、魚類にも非常に大きな作用があります。Mariaさんから先ほどお話がありましたが、これまでに検証されたエンドポイントというのは魚類のガイドラインには存在しません。甲状腺ホルモン系の破綻についての試験法がないということで、それがERGOの目的の1つであります。


御覧いただいている事例としては、ゼブラフィッシュをモデルとして使っています。メダカもモデルとして採用しています。影響としては、例えばこのようにイボが認められます。甲状腺機能亢進症で認められるような症状も認められますし、また、組織を見ましても、御覧のように甲状腺の濾胞の場所が変わっています。

魚の眼球の発達ですが、この場合はPTUにばく露した結果で、眼球の構造が変化しています。また、同じくPTUにばく露した魚の場合ですが、浮き袋が発達することがありません。そして浮き袋と眼球への影響ですが、ゼブラフィッシュが受精してから3日から5日目で既に認められています。

この試験についてはゼブラフィッシュの受精4日目まで96時間見えています。化学物質に関する規則はそれぞれ違っていますが、*in vivo*試験には当たりませんので、例えば化粧品などの規則に使うことはできます。通常化粧品の検査においては動物試験はヨーロッパでは認められていませんので、そういった場合に使うことが可能です。ほかにも様々なエンドポイントについて我々の研究として進めています。




**SCREENED**  
SCREENING FOR ENDOCRINE DISRUPTORS



**EURION**  
European Cluster to Improve Identification of Endocrine Disruptors

## OBJECTIVES?


SCREENED will advance new test methods to identify endocrine disrupting chemicals that are toxic to the thyroid gland



Develop 3D assays that mimic the complex structure and function of the thyroid gland

**WP 1 to WP5**


- Organoids
- Decellularized ECM
- Bioprinted Thyroid
- Microbioreactor
- Magnetized cells



Gain understanding into adverse effects of ED on the thyroid

**WP 6**

- Proteogenomics analysis
- Computer simulation models for in vivo extrapolation



Engage in dialogue with regulatory agencies to ensure that the assays developed are fit for risk assessment

**WP 7 & 8**

- AOPs development
- Collaboration with the EURION cluster

These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPONTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FIBRA), No. 825480 (GOLIATH), No. 825749 (SCREENED), No. 825712 (OEDROM). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster    www.eurion-cluster.eu

それから次がSCREENEDです。甲状腺関連のプロジェクトの最後のプロジェクトです。様々な目的がありまして、まず上からとしては3次元の試験法を作りたいと考えています。いわゆるオルガノイドと言われる甲状腺の複雑な構造・機能を3次元で見ることができるようなものにしたいということで、そうすることによってEDの甲状腺に対する有害な影響を見たいということです。こちらとしてはヒトに関連した開発・研究となります。

さらに、規制当局との対話も進めたいと考えております。様々な試験法を開発してリスク評価に使うことができるようにしていきたいということで、ここに付け加えてあるのですが、EURIONクラスターとしても規制当局との連絡は取っていて、OECDともEFSA、ECHA、また欧州共同研究センターともコンタクトを取っています。我々としても規制当局が使うことができないような検査法を開発しても仕方がありませんので話をしています。

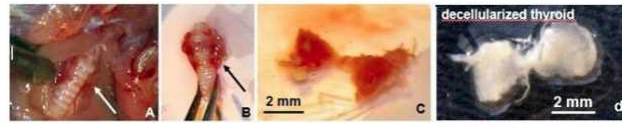


## Develop 3 different 3D in vitro assays with different degree of complexity:

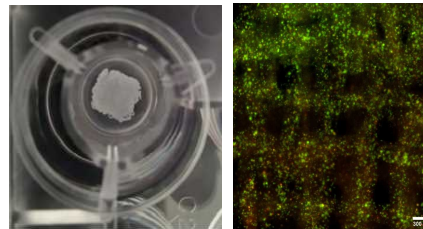
### Thyroid follicles organoids



### Decellularized extra cellular matrix (ECM) repopulated with thyroid stem cells



### Bioprinted constructs mimicking thyroid architecture

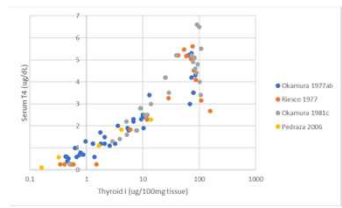


SCREENEDでは3つの異なる*in vitro*試験法を開発しています。その複雑度はそれぞれに異なっています。最初がオルガノイドで、甲状腺濾胞オルガノイドと呼ばれるものです。バイオ系でこれを育てることができます。写真の質はそれほどよくありませんが、それぞれが小さなオルガノイドであって、甲状腺のオルガノイドとして作られています。また、この甲状腺幹細胞が増殖した細胞外マトリックスというのがあります。幹細胞を生体外で育てます。また、甲状腺の構造を模倣したバイオプリントがあります。これによってチップ状のオルガノイドでハイスループットのスクリーニングを進めることができるようにしたいという目的があります。

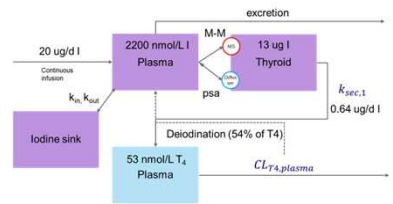


Progress in novel mathematical modelling

*In silico*  
modelling



T4 plasma concentration depends on iodine concentration in the thyroid



Initial model for physiological iodine balance in the rat on standard chow

**Ob#1: To integrate the impacts of EDs with the effects of dietary iodine status on the synthesis of thyroid hormones**

- Reviewed literature on iodine dietary intake, plasma and thyroid concentrations, and concentrations of THs in plasma in the rat.
- Developed model of iodine physiology to extend model of TH synthesis.
- Initialised model with measured concentrations in rat tissues, organs and excreta.
- Optimisation to determine model parameter values is underway.



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDopINTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FREIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

それから、新しい数学的なモデリングも進歩しています。ヨードの濃度がそれぞれの組織あるいは部位によってどのように違うかを見て、これに基づいてモデルを開発して甲状腺ホルモン合成のモデルに拡張したいという研究が行われています。



# Metabolic disrupting chemicals



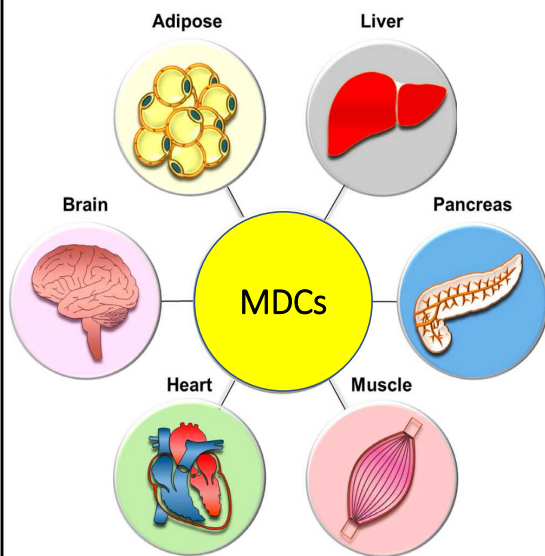
## EDCs with effects on:

- Energy homeostasis
- Mechanisms and cell types implicated in metabolic control
- Gene expression and biosynthesis of key enzymes, hormones and adipokines essential for controlling energy homeostasis

## Definition:

‘any EDC that alters susceptibility to metabolic disorders (eg. obesity, diabetes, nonalcoholic fatty liver disease) and includes the terms ‘obesogens’, ‘diabetogens’ and ‘diabesogens’

Nadal et al, 2017, Nature Rev Endo  
Heindel et al, 2017, Repro. Tox.



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPHITS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FEDIA), No. 825480 (GOLIATH), No. 825745 (SCHEMED), No. 825732 (OSERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

また、代謝のかく乱についても3つのプロジェクトがあります。これが内分泌かく乱プログラムの中にあります。この分野については試験ガイドラインが欠けています。EDCで代謝系に影響を与えるもの、例えばエネルギー恒常性に影響を与える、細胞の種類にも影響を与える、代謝コントロール、代謝制御に影響を与えるというものもあります。様々な酵素、ホルモン、そしてエネルギーの恒常性の制御に不可欠な様々な要素の合成が行われていますが、定義としては、少なくともこのプロジェクトの中で採用されているのは、かく乱物質というのは代謝障害に対する感受性を変化させるものであるということ、例えば肥満、糖尿病、非アルコール性脂肪肝疾患などのリスクを上げるものであるということです。これが代謝かく乱物質の対象となります。また、これらの化学物質の作用は様々な臓器に出る可能性があります。膵臓、肝臓、また脂肪組織などが重要となります。

## 3 projects addressing metabolic disruption



*Generation Of Novel, Integrated and Internationally Harmonised Approaches for Testing Metabolism Disrupting Compounds*

Coordinator Prof. Juliette Legler, Utrecht University, NE



**OBERON**  
EDCs • TESTING • METABOLISM • IATA

*An integrative strategy of testing systems for identification of EDs related to metabolic disorders*

Coordinator Assoc. Prof. Karine Adouze, INSERM, FR



*Metabolic effects of Endocrine Disrupting Chemicals: novel testing METHODS and adverse outcome pathways*

Coordinator Dr. Anna-Liisa Levonen, University of Eastern Finland, FI

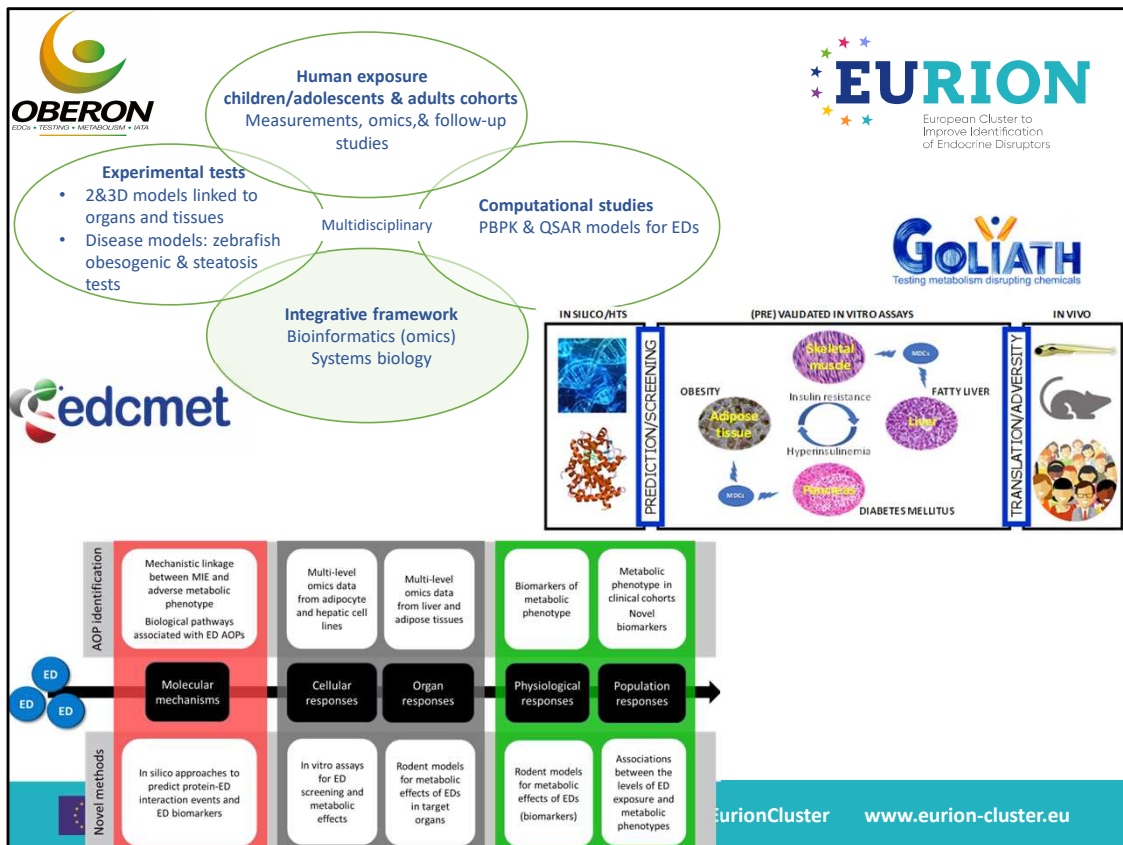


These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDPOINT), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (PREIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

3つのプロジェクトで代謝かく乱に対応しています。GOLIATH、OBERON、edcmetですが、これは国際的に調和したアプローチの案を出しているというもので、共通した特徴が認められます。各プロジェクトが連携できるのはいいことだと思います。OBERONというのは試験系の統合的な戦略を立てて代謝障害関連EDの同定を行うというものです。edcmetは、かく乱物質の代謝影響、新規試験法及びAOPを検討するというもので、これはほかの様々なプロジェクトでも検討が進んでいます。



もう少し詳細にお話ししますが、OBERONの取り組んでいるパッケージは幾つかあります。疫学的な検討も行われていますし、ヒトのコホートも対象にしています。例えばここでは化学物質のばく露の比較を行う様々なエンドポイント、代謝性疾患についても検討しています。また、2次元、3次元のモデルもあって、これは組織・臓器に関連したものであるということ、さらに、ゼブラフィッシュをモデルとして肥満、また脂肪症の試験を行っています。バイオインフォマティクスにも取り組んでおります。生理学的薬物速度論とQSARモデルの検討も行っています。

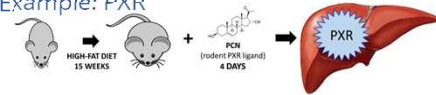
GOLIATHの場合は *in silico* の部分とそれから *in vitro* の試験法を使っているものもあります。 *in vivo* 試験ではげっ歯類、魚類などを見ています。

また、edcmetの検討も非常に様々にあって、AOPを見ている事例の1つですが、分子メカニズムがまず最初のイベントとなって、その後、主要なイベントがあって、細胞・臓器の反応があり、その後、有害性が認められて個体群への悪影響へとつながっていくものです。

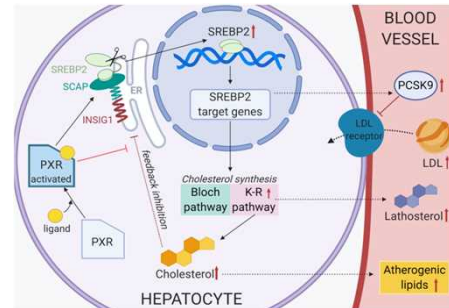
## In vivo rodent models for the assessment of metabolic effects of EDs

- Characterization of mode of action and AOPs for MDCs

- Example: PXR



- PXR activation potentiates HFD-induced liver steatosis
    - RNA-seq indicates induction of cholesterol synthesis
    - RIF increases plasma LDL cholesterol and cholesterol synthesis in humans



Br J Pharmacol 2021, 178, 2461-2481; 10.1111/bph.15433



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDPOINT), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (PREIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

edcmetですが、そのうちの1つがin vivoのげっ歯類モデルであって、検討しているのは代謝かく乱物質です。この事例で見ているのは、作用機序をこのような代謝かく乱物質について見るものです。非常によい試験が行われていて、このpregnane X receptor (PXR)の活性化が起きることによって例えば脂肪肝が増悪するという事です。HFD誘導性であります。したがって、TCNというような化学物質があれば、例えばリファンピシンなどもそうですが、これらはPXRを誘導します。そうしますと、その結果として肝の脂肪量が増えて脂肪肝へとなっていくということから高脂肪食による脂肪肝の増悪が認められるということであり、機序については幸い非常に詳しいものがありまして、見ていただくと大変面白いと思います。

# Human data linking pesticide exposure to metabolic outcomes

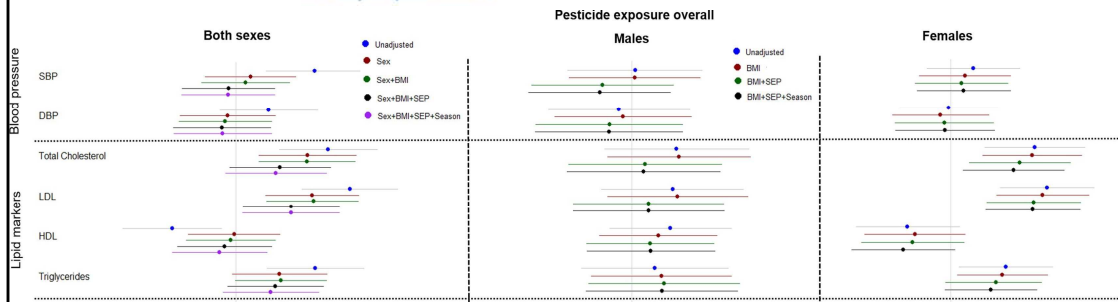


Environment International  
Volume 156, November 2021, 106766



## Non-occupational exposure to pesticides and health markers in general population in Northern Finland: Differences between sexes

Saranya Palaniswamy<sup>a,b</sup>, Khaled Abassi<sup>c,d</sup>, Jaana Rysä<sup>e</sup>, Jon Øyvind Odland<sup>f,g</sup>, Joan O. Grimalt<sup>h</sup>, Arja Rautio<sup>c</sup>, Marjo-Riitta Jävelin<sup>a,b,i,j,k,l,m</sup>



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPINTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (PREIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

また、ヒトのデータと農薬ばく露との関連性も様々な研究の中で行われています。御覧いただいているのは農薬と健康マーカーの1つ、脂質のマーカーと血圧との関連性を見ています。対象となっているのはフィンランド北部の男性・女性です。主要なアウトカムとしては性差が脂質マーカーにおいて認められたということであり、大変に興味深いものであると思っておりますので、この違い、農薬ばく露に関連するものを見ていただければと思います。

**Whole organism test systems**

**In vitro cellular models**

**Zebrafish obesogenic test (ZOT)**

- optimized ZOT protocol
- chemicals and pharmaceuticals identified to alter the adipocyte size and adiposity in zebrafish is being delivered



**Steatosis assay on zebrafish (StAZ)**

- currently under optimisation

**Intra- and inter-laboratory reproducibility of ZOT and StAZ**

- demonstration in progress

**Increase toxicological knowledges**

- Analytical chemistry & omics are on going

**Optimization of culture conditions for liver, adipose and pancreatic cell models (2D variants) & Development of improved 3D hepatic models**

2D and 3D HepaRG  
2D MIHA  
2D, 3D HepG2

SGBS

Endo-βH1  
MIN6  
α-TC1-9

- Set up functional assays e.g. cytotoxicity, glucose metabolism, lipid accumulation, mitochondrial energy metabolism, pancreatic cell function ...
- Induction of steatosis method development
- ED screening on viability, lipid accumulation, glucose consumption, glycogen content, glycolytic and mitochondrial respiratory activities, pancreatic insulin/glucagon secretion, ... (\*posters 47 & 48)
- Set up conditions for metabolomics and transcriptomics studies



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPANTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (PREIA), No. 825480 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

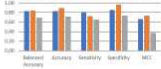
www.eurion-cluster.eu

OBERONです。これは生物全身での試験系とゼブラフィッシュの肥満試験というのがあります。ゼブラフィッシュの脂肪症試験法ですが、肝臓への影響も評価をします。

それから、*in vitro*の細胞モデルですが、肝臓細胞、脂肪細胞、膵臓細胞モデルの2次元のバイオ変異株といったものを見ています。

### Predictive computational methods

#### QSAR models to predict ED potential of compounds

- Model to address steroidogenesis ongoing 
- Models for Thyroperoxidase inhibition (TPO) published
- Implementation phase: TPO model and an existing fragment-based QSAR model for Glucocorticoid receptor will be soon available in VEGA

#### Toxicokinetic model for in vitro in vivo extrapolation

- Human cells: Models to predict the freely dissolved concentration on going
- Zebrafish embryo: Model to account for the influence of hatching on the TK. Applied to BPs and PFAAs (\*poster 50)

#### PBPK modeling for predicting internal exposure

- Metabolic pathways, internal dose in liver, pancreas & adipose tissues organs for the 10 EDs (\*poster 49)

### Data infrastructure, bioinformatics and ITS

#### Bioinformatics infrastructure

- Tested with OBERON human data (metabolomics), ZOT & liver cells (metabolomics and transcriptomics)
- OBERON Integrated Data Management (IDM) system on going

#### Multi-omics analysis & pathways enrichment

- On 3D HepaRG -> significant pathways: biological oxidation, lipid metabolism and metabolism (\*poster 51)

#### AOP-helpFinder tool



- Optimization & Webserver on an intelligence artificial tool allowing automatic screening of the literature – applied to ED and metabolism events for AON (\*poster 52)

#### Systems biology-based AOP models

- Model for PFOS /PFAS and metabolism on going using data integration from various sources



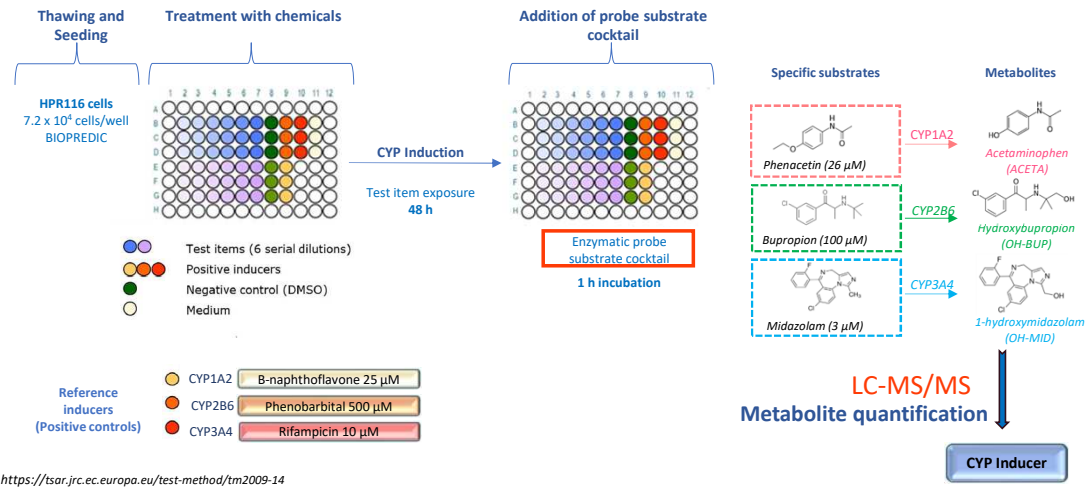
These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPHITS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FREA), No. 825889 (GOLIATH), No. 825745 (SCHEMEDI), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

それから、コンピューターの予測的な方法、QSAR（構造活性相関）モデルといったものもやっていますし、また、*in vitro*、*in vivo*外挿のためのトキシコキネティクスモデルといったものも扱っています。例えばそれぞれの細胞における内部ばく露予測などもやっています。バイオインフォマティクスのインフラということで、データの統合的な管理のシステムなども進めています。また、複数オミックスの分析及び経路の集積、文献のFinderツールというもので自動スクリーニングを可能にする人工知能ツールの最適化などもやっています。AOPモデルの開発なども行っています。

# CYP induction assay: extension of chemical applicability domain to MDCs



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCME1), No. 825759 (ENDPOINTs), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (PREIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCHEENED), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

GOLIATHです。いろいろなことが行われていますが、これはCYPの誘導試験で、これを拡張しようということで、これは非常に重要なのですが、製薬の分野で重要であります。CYPの誘導においてはいろいろな干渉が考えられます。異なるサブタイプ、CYP1A2など、これは代謝の分野で非常に重要だということで、これを拡張したいということを考えておりました、化学的な応用をするということを考えています。代謝のかく乱の原因となる化学物質の同定につなげていきたいということです。



1 project addressing developmental neurotoxicity  
1 project addressing female reproductive toxicity



*Novel Testing Strategies for  
Endocrine Disruptors in the Context  
of Developmental NeuroToxicity*  
Coordinator Prof. Joëlle Rüegg,  
Uppsala University, SE



*Female Reproductive toxicity of EDCs: a  
human evidence-based screening and  
Identification Approach*  
Coordinator Prof. Majorie van Duursen,  
Vrije Universiteit Amsterdam, NE



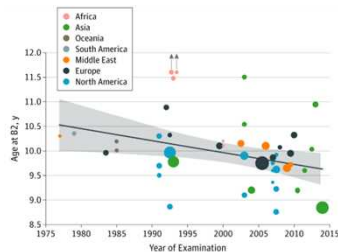
These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDpoiNTs), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FREIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

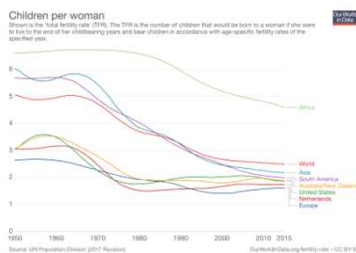
[www.eurion-cluster.eu](http://www.eurion-cluster.eu)

今、代謝のかく乱の話をしました。発達神経毒性に関するプロジェクトと雌性生殖毒性に取り組むプロジェクトがあります。

# EDCs and female reproductive toxicity



The age at thelarche has decreased a mean of almost 3 months per decade from 1977 to 2013. *JAMA Pediatr.* 2020;174(4):e195881



Fertility rates are declining world-wide <https://ourworldindata.org/fertility-rate#the-global-decline-of-the-fertility-rate-since-1950>



Trends show earlier onset of **puberty** in girls, increase incidence of **endometriosis** and **breast cancer**, a decline in **fertility** and increase in assisted reproductive technologies needed to establish a pregnancy.



**Ovarian disorders** account for infertility in 1 out of 4 infertile couples.



Early (developmental) exposure to EDCs is linked to these diseases and disorders, yet **pathological mechanisms** are unclear.



None of these effects are covered (well) by existing chemical test strategies.



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDPOINT), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FREIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCHEENED), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

これに非常に興味を持っているのが、傾向として女子の二次性徴、生理開始の早期化というのが、遺伝的には説明できないのですが、例えば乳腺の発達開始年齢が女子で10年ぐらいの期間をかけて平均約3か月ほど短期化したという結果があります。1977年～2013年の間を見たときに乳腺の発達開始が早期化しているという結果が出ています。

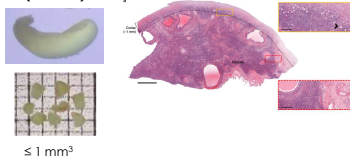
また、乳がんであったり出産率の低下などといった結果も出ています。卵巣障害ですが、4組に1組の不妊夫婦における不妊症の原因となっているということも言われています。若いときにEDCにばく露されることが原因ではないかと。病理学的な機序はまだ不明であります。

それから、不妊の傾向なのですが、これは化学物質へのばく露が若いときにあるということが原因ではないかと言われています。

# Improving testing for female reproductive effects



HUMAN FETAL OVARY (7-12 DW)

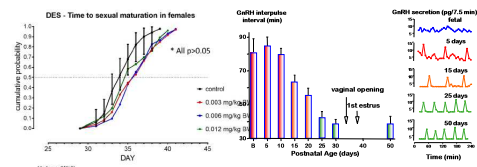


≤ 1 mm<sup>3</sup>

Fetal germ cell pool is affected by EDCs, adult ovaries lack germline stem cell population.

Perform *in vitro* cultures of **human fetal and adult ovaries** to identify biomarkers of effect

Rat studies to determine additional, **sensitive endpoints** of effect in existing test guidelines.



Hypothalamic GnRH release and mammary gland development are sensitive endpoints *in vivo*

Develop **mechanistic descriptions** of pathological effects, and use these to develop or further improve *in vivo*, *in vitro* and *in silico* test capabilities, to predict female reproductive toxicity.



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCNET), No. 825759 (ENDPOINTs), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FREIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCHEENED), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

www.eurion-cluster.eu

そして、試験の改良ということではありますが、幹細胞群が欠落している胎児生殖細胞プールというのがあり、それに関しての感受性のエンドポイントを決定するためのラット試験なども実施されています。また、その機序として視床下部の性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）の放出及び乳腺発達の感受性の高い*in vivo*のエンドポイントなどが挙げられます。

# EDC exposure affects cognition and behaviour

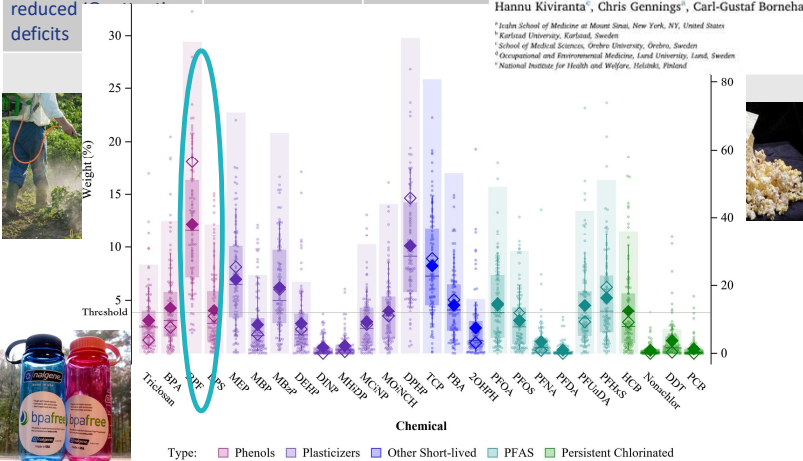
**Pesticides**      **Bisphenol A**      **Phthalates**

Lower mental developmental index, reduced deficits      Impaired attention girls

Early prenatal exposure to suspected endocrine disruptor mixtures is associated with lower IQ at age seven

Eva M. Tanner<sup>a</sup>, Maria Unenge Hallerback<sup>b</sup>, Sverre Wikström<sup>b,c</sup>, Christian Lindh<sup>d</sup>, Hannu Kiviranta<sup>e</sup>, Chris Gennings<sup>f</sup>, Carl-Gustaf Bornehag<sup>a,b,f,\*</sup>

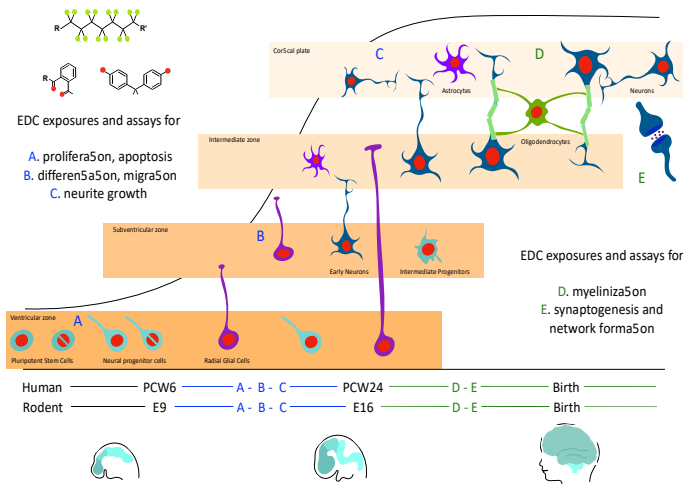
<sup>a</sup> Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, United States  
<sup>b</sup> Karolinska University, Karolinska, Sweden  
<sup>c</sup> School of Medical Sciences, Örebro University, Örebro, Sweden  
<sup>d</sup> Occupational and Environmental Medicine, Lund University, Lund, Sweden  
<sup>e</sup> National Institute for Health and Welfare, Helsinki, Finland



ENDpoiNTsプロジェクトなのですが、これは神経毒性とEDCばく露によって認知と行動に影響を及ぼすというものです。例えば農薬によっては精神発達指数が低下したり、IQが低下したり、注意欠陥という症状が出たりということもあります。また、非常に不安が増大するとか、あるいは女性の注意力の低下であったり、あるいは男子における行動変容であったりIQの低下、あるいは注意欠陥などというも挙げられています。

EDC（内分泌かく乱化学物質）に非常に若いときに、7歳でしょうか、そのぐらいの年齢でばく露されるということはIQの低下につながるという結果も出ています。非常に興味深いのは、IQの低下の原因として、フタル酸エステル類ではないか、あるいはビスフェノールAも挙げられていますので、これはより詳細に検討していく必要があります。

# Cellular key events in neurodevelopment



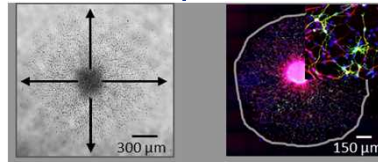
```

    graph LR
      A[EDCs associated with impaired neurodevelopment in human data] --> B[In silico predictions]
      B --> C[List of potential hormonal targets]
  
```



そして、ENDpoiNTsプロジェクトですが、神経発達における細胞キイベントも調査の対象にしています。例えば髄鞘形成は脳の発達において非常に重要で、マーカーなどといったものを見て神経突起などを見るということも行っています。そして最終的にはEDCに関連するヒトデータにおける神経発達障害関連を見たりということもやっています。それはホルモンのターゲット、標的につなげていくということです。

# Human neurosphere assay



Endocrine pathway	Modulation	Proliferation (sphere size)	Proliferation (BrdU)	Radial glia migration (72h)	Radial glia migration (120h)	Neuronal migration	Oligodendrocyte migration	Neurite length	Neurite area	Neuronal differentiation	Oligodendrocyte differentiation	Nuclei count
Androgen receptor	activation									0.438	3.439	
	inhibition											
Aryl hydrocarbon receptor	activation	2.330						1.558	1.323	1.213	0.500	2.473
	inhibition									0.061	0.018	
Estrogen receptor	activation									1.680		
	inhibition										0.093	
Glucocorticoid receptor (male)	activation	0.005	0.007							0.379		
	inhibition	5.347		6.524						<0.015	0.273	2.664
Liver X receptor	activation									0.216	0.021	
	inhibition							0.539	0.271	0.580	1.549	
PPARα	activation		1.010					0.313	0.123	0.343	0.356	
	inhibition			3.015							0.131	
PPARβ/δ	activation				4.606	3.410		3.465	4.259	0.620	0.340	3.657
	inhibition											
PPARγ	activation									0.147		
	inhibition			4.207	4.206			2.130	2.794	4.654	0.314	1.698
Progesterone receptor	activation										0.863	
	inhibition		2.585		9.308						2.837	3.357
Prostaglandin E2 receptor	activation	11.736						8.744	9.424	9.719	1.636	17.778
	inhibition											
Retinoic acid receptor	activation	0.001	0.083		2.163					0.337	0.038	
	inhibition				0.896			0.848		0.746		0.936
Retinoic X receptor	activation	1.072		0.592	0.163			0.332	0.002	0.002	0.019	0.005
	inhibition			0.746	0.901					<0.0045	0.417	0.078
Thyroid hormone receptor	activation	0.0001	0.181							0.0903		0.001
	inhibition						0.695			0.128	0.320	0.281
Vitamin D3 receptor	activation								0.220	0.483	0.641	1.291
	inhibition											



最後のスライドですが、これはヒトニューロスフェアの試験です。これは非常に複雑な表になっていますが、このスフェアというのが拡散することによって、通常ホルモン経路だけではなく、この赤が強化をされる影響、そしてブルーが低減される影響です。例えばグルココルチコイドの受容体であったり、あるいはプロゲステロンの受容体、そういったところを見ますと影響が低減すると。それぞれのパスウエーというのが神経系の発達に関係あるということが分かります。

## In summary



- The EURION projects address an urgent regulatory need for better testing strategies for EDCs
- The projects integrate *in silico* models, *in vitro*, *in vivo*, and human data via molecular (OMICs) mechanisms to link endocrine modes of action to adverse effects
- Methods developed in the projects include novel approaches using state-of-the-art technologies as well as “repurposing” of established, regulatory accepted tests
- To accelerate regulatory acceptance and implementation of the developed testing strategies, EURION is continuously interacting with relevant stakeholders on EU, national, and international level



These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDOPNTS), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (FIBRA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (ONERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster

[www.eurion-cluster.eu](http://www.eurion-cluster.eu)

最後にまとめになりますが、EURIONプロジェクトというのはEDC試験改良戦略に向けた喫緊の規制的ニーズに対応しています。また、プロジェクトは、分子のメカニズムなどを介して*in silico*モデル、*in vivo*、*in vitro*、ヒトデータを統合して内分泌作用機序を有害影響に関連づけます。また、最先端技術を用いて新規のアプローチや確立された規制当局が承認した試験の再利用などというも行っています。

そして、規制への導入を加速させるために、EURIONはその関連するステークホルダーとともに継続的に対話を実施しているということで、以上が私のプレゼンテーションになります。




**CONTACT US:**

	<b>Current EURION coordinator</b>	<b>Communication &amp; Press</b>
Joëlle Rüegg ENDpoiNTs joelle.ruegg@ebc.uu.se	Andreas Kortenkamp ATHENA Andreas.Kortenkamp@brunel.ac.uk	Lorenzo Moroni SCREENED l.moroni@maastrichtuniversity.nl
		Avril Hanbidge ERGO avril@aquatt.ie

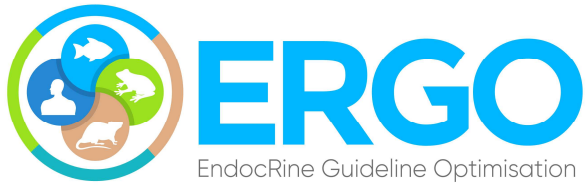

These projects have received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825161 (ATHENA), No. 825762 (EDCMET), No. 825759 (ENDpoiNTs), No. 825753 (ERGO), No. 825100 (PREIA), No. 825489 (GOLIATH), No. 825745 (SCREENED), No. 825712 (OBERON). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@EurionCluster    www.eurion-cluster.eu

EURIONのコーディネーターですが、SCREENEDプロジェクトだったりERGOのプロジェクトの人たちの写真もこちらに出ています。

御清聴大変ありがとうございました。





<https://ergo-project.eu/media/ergo-project-video/>

## Thank you!

### CONTACT US:

#### Communications

Avril Hanbidge  
avril@aquatt.ie

#### Project Coordinator

Henrik Holbech  
hol@biology.sdu.dk

#### Project Administration

Helle Lyngborg  
hely@sdu.dk



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No. 825753 (ERGO). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein.

@ERGO\_EU [www.ergo-project.eu](http://www.ergo-project.eu)

最後ですが、もしERGOに関心がある場合はぜひ私にコンタクトしていただければと思います。ビデオも御用意してあります。2分間のビデオがありますので、もし御関心があれば見ていただければと思います。大変ありがとうございました。