

# US EPA Endocrine Disruptor Screening Program Overview

## Japan MOE EXTEND 2022 Public Seminar

February 14, 2023

Scott Lynn, Ph.D.  
Office of Pesticide Programs  
U.S. Environmental Protection Agency



This presentation and the views expressed do not necessarily represent or reflect US EPA policy.  
Reference to any product or trade name does not imply endorsement by the US EPA.



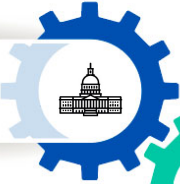
御紹介ありがとうございました。まず初めに、環境省の皆様方には、今回のこの公開セミナーでお話をする機会をくださったことに御礼申し上げます。また、本日御参加の皆様方に感謝を申し上げます。このウェビナーに参加して下さってありがとうございます。午前11時ということではありますが、おはようございますと申し上げます。そして、この発表後の質疑応答を楽しみにしています。

# Overview of U.S. EPA's Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP)



## Statutes & Organization

Congress passed the Food Quality Protection Act in 1996, which required EPA to screen pesticide chemicals for endocrine activity. In 2020, EDSP was integrated into the pesticide program.



## Tiered Testing

EDSP uses a tiered approach to screen chemical. Tier 1 involves *in vitro* and *in vivo* screens for potential activity. Chemicals that move to Tier 2 are screened for adverse endocrine effects.



## Chemical Lists

List of substances covered by the program and status on screening lists.



## Alternative Methods

Cutting-edge technologies are used to prioritize chemicals and reduce, refine, or replace vertebrate animal testing. These are needed to increase the pace of chemical screening and testing.



## Enhancing Efficiencies

EDSP is enhancing efficiencies through use of artificial intelligence, machine learning, natural language processing.



2



御覧いただいているスライドは、私の話の概要です。現在、米国環境保護庁（U.S.EPA）にどのような法規制と組織があるのかについてお話しします。その上で、枠組みについて、またこのプログラムで対象となる化学物質のリスト及びそれぞれの現況についてお話しします。また、現在開発されている様々な代替法にも言及し、最後に、私たちがどのようにして効率性を向上しようとしているのかについて御説明します。



## Statutes



Federal Food, Drug and  
Cosmetic Act (FDCA)  
Section 408(p)

Federal Insecticide,  
Fungicide, and Rodenticide  
Act (FIFRA)

Safe Drinking Water Act  
(SDWA)  
Section 1457

amended by

U.S. Food Quality Protection Act (FQPA)

### Legislative Mandate (Priority):

- Requires EPA to screen pesticide chemicals for their potential for estrogenic effects in humans

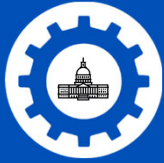
### Discretionary Authority:

- Authorizes EPA to include other endocrine effects similar to an estrogen effect (expanded to androgen and thyroid)
- Addresses human health (expanded to include aquatic and terrestrial vertebrate wildlife)
- Authorizes EPA to screen any other substances similar to a pesticide chemical

3



この内分泌かく乱物質スクリーニングプログラム（EDSP）ですが、この基になっているのが米国食品品質保護法（FQPA）でして、こちらにあります連邦食品医薬品化粧品法（FDCA）、連邦殺虫剤・殺菌剤・殺鼠剤法（FIFRA）、そして安全飲料水法（SDWA）による改正で行われたものです。法的義務といたしましては、EPAに対して農薬化学物質がヒトにエストロゲン作用を及ぼす可能性についてスクリーニングすることを義務づけています。そして、様々な関係当局が関わっていますが、その他の内分泌作用につきましても、アンドロゲン作用と甲状腺ホルモン作用にも拡張しています。また、ヒト健康以外につきましても、水生及び陸生の野生脊椎動物を含めることにもなりました。また、その他の物質として、農薬化学物質に類似した物質につきましても拡張されて入っています。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）の最後のレポートによりますと、EPAによってEDSPを行い、アンドロゲン作用、甲状腺ホルモン作用にも拡大することとなりましたが、EPAが今現在注力しているのは、農薬化学物質のスクリーニングであり、ヒトに対するエストロゲン作用を示す物質が主たる対象となっています。



## Statutes



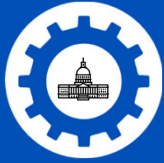
### Legislative Mandate – Food Quality Protection Act of 1996

- FQPA mandates that EPA “*develop a screening program, using appropriate validated test systems and other scientifically relevant information [OSRI], to determine whether certain substances may have an effect in humans that is similar to an effect produced by a naturally occurring estrogen*”  
Sec. 408(p)(1)
- Requires EPA to screen all pesticide chemicals for their potential for estrogenic effects in humans using validated test systems. Sec. 408(p)(3)(A)

4



御覧いただいているのは、食品品質保護法の中にEPAに対する義務づけが行われている内容を示す文書です。適切に検証されたシステム、検証済みの研究及びその他の科学的関連情報を用いてスクリーニングプログラムを策定することが義務づけられています。すなわち、天然由来のエストロゲンの作用と類似した作用を示す物質ということです。そして、EPAに対し、検証済みの試験系を用いて、ヒトへのエストロゲン作用の可能性について、全ての農薬化学物質をスクリーニングするように要求した法律となっています。



## Endocrine Disruptor Definition



2002 World Health Organization (WHO)  
definition of “endocrine disruptor”

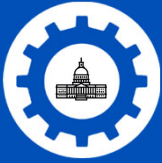
An endocrine disruptor is an exogenous substance or mixture that alters function(s) of the endocrine system and consequently causes adverse health effects in an intact organism, or its progeny, or (sub)populations.

[http://www.who.int/ipcs/publications/new\\_issues/endocrine\\_disruptors/en/](http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/)

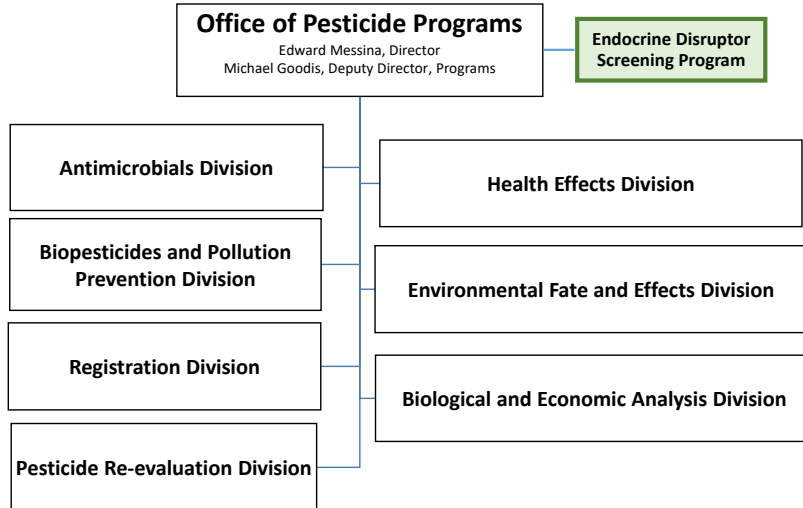
5



WHOが内分泌かく乱物質の定義を決めておりまして、EPAもそれに従っていますが、その定義によりますと、「内分泌かく乱物質とは、内分泌系の機能に変化をもたらし、その結果として未処置生物、子孫、(準)個体群に有害な健康影響をもたらす外因性の物質または混合物」とされています。



# Organization

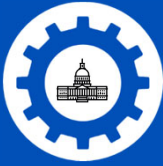


OPP  
Organizational  
Structure

6

6

そして、EDSPIは、2022年の10月にサイエンスコーディネーションポリシー部から、この図に示している、農薬プログラム部へと移行しました。ですから、今現在はこれは農薬プログラムの管轄下に入っています。そして、プログラムの実施の必要性に応じて、様々な課と対話を行って、全ての農薬についてスクリーニングを行うという義務に対応すべく活動しています。



## US Pesticide Legislation



- **Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA)**
  - Registration/Licensing, registration review
- **Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FFDCA)**
  - Tolerances/maximum residue levels (MRLs) for residues in food
- **Food Quality Protection Act (FQPA)**
  - Primarily amended FFDCA by establishing new standard
- **Pesticide Registration Improvement Act (PRIA)**
  - Amended FIFRA by adding registration fees and decision review periods
- **Endangered Species Act**
  - Protect endangered wildlife and plants

7

農薬は、アメリカにおいても極めて高度に規制されている物質です。御覧いただいているのは、アメリカにおける農薬に関連した法律です。先ほどお話をしたような経過が FFDCA、FQPAなどがその対象です。また農薬登録改良法（PRIA）、そしてこの絶滅危惧種保護法も対象となります。最近、農薬に関して、EPAとして絶滅危惧種保護法に関連して多くの改正を加えました。それにつきましては、また後でお話しますが、この内分泌かく乱物質スクリーニングプログラムに注力しています。



# Tiered Testing



EDSP's tiered approach to screen chemicals includes a Tier 1 battery of assays and Tier 2 tests.

### Tier 1:

- 5 *In vitro* and 6 *in vivo* screens
- Detect potential to interact with endocrine system

### Tier 2:

- Called in only after Weight of Evidence (WoE) review of Tier 1 data
- Multi-life stage/generational studies covering a broad range of taxa
- Determine adverse apical outcomes from endocrine effects

EDSP Tier 1 Battery	Type	Tier 1 Test Guideline
Estrogen Receptor (ER) Binding	In vitro	OCSPP 890.1250
Estrogen Receptor Transactivation (ERTA)	In vitro	OCSPP 890.1300
Uterotrophic (UT)	In vivo	OCSPP 890.1600
Androgen Receptor (AR) Binding	In vitro	OCSPP 890.1150
Aromatase	In vitro	OCSPP 890.1200
Steroidogenesis (STR)	In vitro	OCSPP 890.1550
Hershberger	In vivo	OCSPP 890.1400
Female Rat Pubertal	In vivo	OCSPP 890.1450
Male Rat Pubertal	In vivo	OCSPP 890.1500
Fish Short Term Reproduction (FSTRA)	In vivo	OCSPP 890.1350
Amphibian Metamorphosis (AMA)	In vivo	OCSPP 890.1100

EDSP Tier 2 Tests	Type	Tier 2 Test Guideline
Rat 2-generation Reproduction	In vivo	OCSPP 870.3800
Rat Extended 1-Gen Reproduction	In vivo	OECD TG 443
Medaka Extended 1-Gen Reproduction	In vivo	OCSPP 890.2200
Larval Amphibian Growth & Development	In vivo	OCSPP 890.2300
Avian Multi-Generation Reproduction	In vivo	OCSPP 890.2100

8

<https://www.epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances/series-890-endocrine-disruptor-screening-program>



御覧のスライドは、二段階試験の枠組みを示しています。Tier 1試験は11種類で、5種類が*in vitro*、そして6種類は*in vivo*のスクリーニング試験となります。そして、これらの内分泌系とどのような相互作用を起こすか、可能性を検出するための試験となります。

そして、Tier 2試験は5種類あります。Tier 2試験は、Tier 1の試験結果の、科学的根拠の重み付け審査をした物質のみに要求されます。広範な生物種を網羅した多世代試験として行われます。また幅広い動物種を対象としており、これには魚類、両生類なども含まれます。そして、内分泌作用に由来する有害事象を判定するための試験となります。この有害事象は何かということですが、化学物質に曝露された結果、実験系でどのような有害影響が検出されるかを示すものです。





## Universe of Chemicals



EDSP published a Universe of Chemicals list in 2012.

The updated list of chemical substances covered by the EDSP include:

- ~ 1,200 pesticide active ingredients,
  - ~ 2,500 pesticide inert ingredients,
  - ~ 6,000 drinking water contaminants,
- } Statutory Required: FFDC§408(p)(3)(A)  
} Discretionary Authority: SDWA§1457

with some overlap between these lists.

9

<https://www.epa.gov/endocrine-disruption/universe-chemicals-potential-endocrine-disruptor-screening-and-testing>

EDSPには、化学物質の母集団があります。これは2012年に公表されたリストです。このリストには約1,200の農薬活性成分が含まれています。2,500の農薬不活性成分も網羅されていまして、こちらはFTP AあるいはこのFFDCAの改定によって定義されています。また6,000の飲料水汚染物質がありますが、これは裁量権限となっております、これらのリスト間には重複があります。

EDSPはこういった活性物質に関してのスクリーニングをまず始めるわけです。そしてこの法令に準拠した形で農薬活性成分からスクリーニングを始めていくことになっています。



# Lists of Chemicals



EDSP screens pesticides, chemicals, and environmental contaminants for their potential effect on estrogen, androgen, and thyroid hormone systems. Designation on List 1 or List 2 does **not** mean a chemical will affect the endocrine system.

## First List of Chemicals for Tier 1 Screening (List 1) announced in 2009

- High exposure potential
  - Pesticide active ingredients
  - High Production Volume (HPV) chemicals used as pesticidal inert ingredients
- 67 chemicals on original list
- 15 chemicals were not supported by industry
- 52 chemicals were tested in Tier 1 battery

## Second List of Chemicals for Tier 1 Screening (List 2) announced in 2013

- Identified via EPA's drinking water and pesticide programs
  - Excluded biologic agents, naturally-occurring chemicals, and hormones
- 107 chemicals
- Approximately 60 chemicals are not pesticide chemicals

10

EDSPのスクリーニングですが、農薬化学物質などが対象になっています。そして、この化学物質のリストは2009年に一次リストが公表されています。高曝露の可能性のある物質、それから元のリストには67物質入っていたわけですが、15種類の化学物質が産業界から支援されなかったということで、52物質についてTier 1の一連の試験が実施されています。

そして、2013年には、Tier 1のスクリーニング対象化学物質の二次リストが公表されています。これは飲料水及びEPAの農薬プログラムを通して検出されている107の化学物質が入っていますが、そのうちの約60の化学物質は農薬化学物質ではありません。一次リストの決定について、まだ、何の行動も起こされていません。それから二次リストについても、特に行動は起こされていません。



## Need for Alternative Methods



**Goal:** Thousands of chemicals to be screened as quickly and accurately as possible.

New Approach Methods (NAMs) are being developed for enhancing efficiencies.

High-Throughput (HTP) Assays for :

- Estrogen Receptor, Androgen Receptor, Steroidogenesis, Thyroid Pathway

Other tools and approaches:

- SeqAPASS, Systematic Reviews, In Vitro to In Vivo Extrapolation (IVIVE), and Bioactivity Exposure Ratio (BER)

**Action:** EPA published a white paper outlining the availability of NAMs for EDSP.

<https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2021-0756-0002>

11 1



EPAは何千という化学物質を、なるべく迅速に、正確にスクリーニングすることになっています。従来の方式を使って進めると、かなり高額な投資と、何十年もの努力が必要になりますが、私どもは、適切な化学物質のスクリーニングを実施してきたわけです。

高額な費用と長期間の試験が必要であるため、新しいアプローチ（NAMs）が開発されつつあります。これは効率性を高めるということで、ハイスループット（HTP）の試験という、コンピューターを用いたモデルがありますし、その他のツールやアプローチなどもあります。

EPAが白書を公表していますが、これはEDSP向けにNAMsの実効性を概説するための白書です。私は本日は主に、このNAMsに着目をして話をしていきたいと思います。すなわちNAMsが現場でいかに活用されているかという話をしたいと思います。



## Validated Alternatives Full ER and AR Pathway Models



The Estrogen Receptor (ER) pathway model based on the full 18 *in vitro* assay ToxCast/Tox21 battery may be used as an alternative to performing three current EDSP Tier 1 screening assays:

- ER binding *in vitro* assay (OCSP 890.1250)
- ER transcriptional activation (ERTA) *in vitro* assay (OCSP 890.1300)
- *In vivo* Uterotrophic assay (rat) (OCSP 890.1600)

The Androgen Receptor (AR) pathway model based on the full 11 *in vitro* assay ToxCast/Tox21 battery may be used as an alternative for one current EDSP Tier 1 screening assay:

- AR binding *in vitro* assay (OCSP 890.1150)

12

この白書で検証している代替試験法ですが、これはエストロゲン受容体（ER）及びアンドロゲン受容体（AR）の全経路のモデルが対象となっています。ERの経路モデルは、*in vitro*の全18種類の試験に基づいています。そして、代替法として他の試験もあります。まずER結合*in vitro*試験、それからER転写活性化（ERTA）*in vitro*試験、そして*in vivo*のラット子宮肥大試験です。それからARの経路モデルを対象に、*in vitro*の試験が11種類あるわけですが、ここでは現行のEDSP、Tier 1のスクリーニング試験の代替として使えるであろうという結論が出ています。

化学物質によっては代替として活用できないものもあります。例えば農薬、あるいは化学物質で溶解性に制限がある場合があります。こういったものはそれぞれ個別にスクリーニングを行って、データが受け入れられるか否かを検証するわけです。



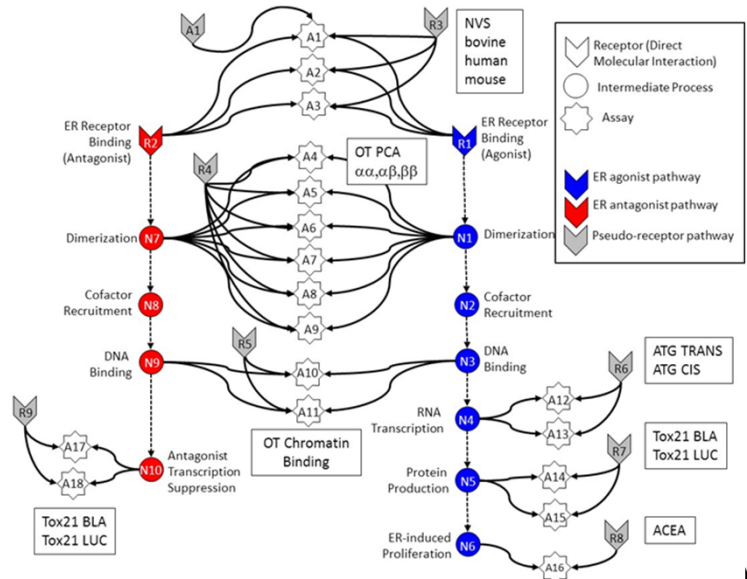
# High Throughput and Computational Methods



## ER Pathway Model

- Use multiple assays (18) for pathway coverage
  - Different technologies
  - Different points in pathway
- No assay is perfect
  - Assay Interference
  - Noise
- Use model to integrate assays
- Evaluate model against reference chemicals
- Methodology being applied to other pathways

US EPA. 2014. FIFRA SAP "Integrated Endocrine Bioactivity and Exposure-Based Prioritization and Screening"



13

このスライドは、ER経路モデルの全経路を示していますが、このギザギザつきの丸は、18の複数試験を使用しています。そしてその経路が何を網羅しているかということを示しています。いろいろな技術が活用されていまして、経路上のポイント、例えばこれはエストロゲンの受容体への結合であったり、二量体化であったり、その他様々なER結合であったり、転写、そういったものが対象になっています。

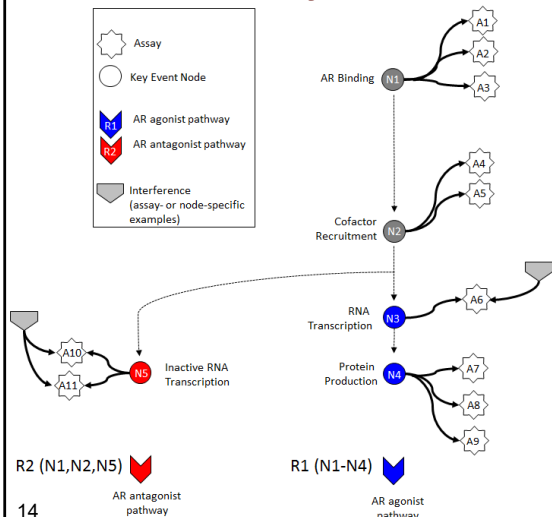
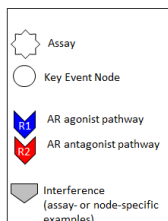
ER経路モデル、標準化学物質（作用の有無が既知の化学物質）が対象になっています。2014年には、単一アドバイザリーボードでのピアレビューの対象にもなっていますが、この方法はその他の経路にも適用されています。アンドロゲン受容体にも適用されています。



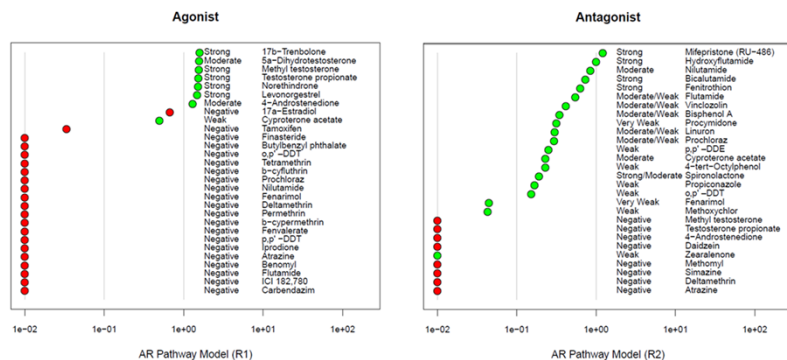
# High Throughput and Computational Methods



## AR Pathway Model



## AR Reference Chemical Performance



US EPA. 2017. FIFRA SAP "Continuing Development of Alternative High-Throughput Screens to Determine Endocrine Bioactivity, Focusing on Androgen Receptor, Steroidogenesis, and Thyroid Pathways"

同じプロセスがAR経路モデルにも適用されています。複数の試験を活用して、様々な技術を使って経路上のポイント、エンドポイントも複数あります。これらの試験を統合しなければならないので、標準化学物質のパフォーマンスも策定しています。こちらがその試験の概要とその経路のモデルになっています。右側は標準化学物質、すなわち、ARの標準化学物質のパフォーマンスで、これは文献情報から取得しています。標準化学物質の文献データと、それからモデルのパフォーマンスの間の整合性も非常に高いものが出ています。そしてこのNAMsについては、2017年にピアレビューが実施されています。



## High Throughput and Computational Methods



- The full ER and AR pathway models evaluated >1,800 chemicals.
- Of the >1,800 chemicals assessed in the full ER and AR pathway models, ~1,460 are in the EDSP Universe of Chemicals (UoC - EPA, 2012).
- Of the ~1,460 chemicals in the EDSP UoC with ER and AR data, ~300 are pesticide actives and ~200 are pesticide inerts
- Of the ~1,460 chemicals in the EDSP UoC with ER and AR data, ~1,200 are listed in the CCL Universe with ~60 on the CCL3 list

15

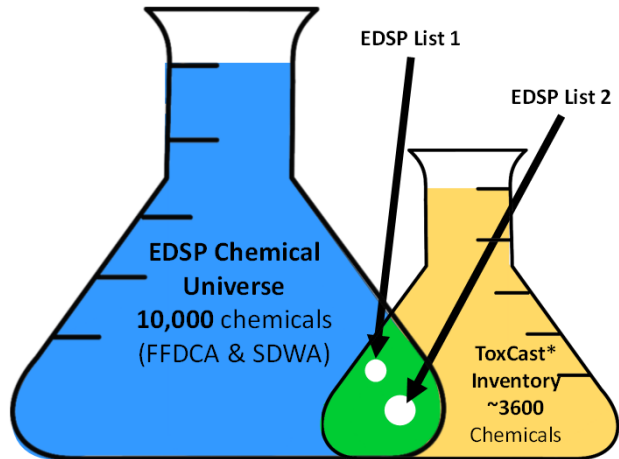
ARの全経路モデルですが、1,800を超える化学物質を評価しています。その化学物質中の1,460物質がEDSPのユニバースオブケミカルズに含まれています。その化学物質中の約300が農薬活性物質で、約200が農薬不活性物質です。そして、約1,200物質がCCL Universe（未規制の飲料水中混入物リスト）に登録されています。そして、約60物質がCCL3リストに登録されています。飲料水部がこの汚染化学物質の5番を2022年の夏に公表しています。66物質が対象となっています。CCL5の化学物質ですが、これは、ERあるいはARの全経路モデルの中に入っていないものは、向こう1～2年の間に試験を進める最優先の化学物質ということに設定されています。飲料水部はCCL6を開発し始めています。EDSPと共にこの優先物質となる化学物質、すなわち内分泌かく乱の対象になる物質を同定するという作業を始めています。



## EDSP's Evolution: New Approach Methods (NAMs)



- Rapidly **screen** chemicals in the EDSP Universe for endocrine bioactivity
- Provide **alternative data** for specific endpoints in the EDSP Tier 1 battery of assays
- Contribute to the **weight of evidence** screening level determination of a chemical's potential bioactivity



\* ToxCast is the Toxicity Forecaster developed by US EPA



16

EDSPは進化をしています。そして、活性化を迅速にスクリーニングするためのモデルも開発しています。これらのモデルは、Tier 1の一連の試験における代替データを提供することになります。そして、科学的根拠の重み付け、スクリーニングレベルの判定にTier 2の試験として起用することが想定されています。





# Tiered Testing



EDSP's tiered approach to screen chemicals includes a Tier 1 battery of assays and Tier 2 tests.

### Tier 1:

- 5 *In vitro* and 6 *in vivo* screens
- Detect potential to interact with endocrine system

### Tier 2:

- Called in only after Weight of Evidence (WoE) review of Tier 1 data
- Multi-life stage/generational studies covering a broad range of taxa
- Determine adverse apical outcomes from endocrine effects

EDSP Tier 1 Battery	Type	Tier 1 Battery Alternatives
Estrogen Receptor (ER) Binding	In vitro	ER Model (Alternative)
Estrogen Receptor Transactivation (ERTA)	In vitro	ER Model (Alternative)
Uterotrophic (UT)	In vivo	ER Model (Alternative)
Androgen Receptor (AR) Binding	In vitro	AR Model (Alternative)
Aromatase	In vitro	STR Model (Future)
Steroidogenesis (STR)	In vitro	STR Model (Future)
Hershberger	In vivo	AR/STR Model (Future)
Female Rat Pubertal	In vivo	ER, STR, THY Models (Future)
Male Rat Pubertal	In vivo	AR, STR, THY Models (Future)
Fish Short Term Reproduction (FSTRA)	In vivo	ER, AR, STR Models (Future)
Amphibian Metamorphosis (AMA)	In vivo	THY Model (Future)
EDSP Tier 2 Tests	Type	Tier 2 Test Alternatives
Rat 2-generation Reproduction	In vivo	ER, AR, STR, THY (Future)
Rat Extended 1-Gen Reproduction	In vivo	ER, AR, STR, THY (Future)
Medaka Extended 1-Gen Reproduction	In vivo	ER, AR, STR (Future)
Larval Amphibian Growth & Development	In vivo	THY (Future)
Avian Multi-Generation Reproduction	In vivo	ER, AR, STR, THY (Future)



17 7

このスライドはEDSPの試験の枠組みになります。白書でハイスループットの代替の検証が実施された試験が緑色でハイライトされています。また、ここでは必要なモデル、Tier 1、Tier 2の試験に必要なとされるものを掲載しています。



## Other NAMs Covered in Whitepaper



The following NAMs may be used for priority setting or as Other Scientifically Relevant Information (OSRI) in WoE evaluations:

- Reduced assay subset (4-7 assays) ER & AR pathway models
- QSAR models for ER and AR
- SeqAPASS – Sequence Alignment to Predict Across Species Susceptibility tool
- IVIVE – In Vitro to In Vivo Extrapolation
- iBER – integrated Bioactivity and Exposure Ratio

Tools for Future Development

- Steroidogenesis HT assay
- Thyroid Adverse Outcome Pathway Network

18

次に、白書に掲載されている、その他のNAMsを説明していきたいと思います。これは検証されたNAMsではありません。しかし、この優先順位を設定するときに、あるいはその他の科学的関連情報として使用できることが考えられます。例えばER、AR経路モデルの試験のサブセットの削減、18とか11の試験ではなくて、4～7の試験だけ、というように各経路に対して割り当てることも考えられます。

また白書では、QSARモデルも説明されています。ER、ARの予測、活性化、また、生物種の横断的な感受性を予測するためのアミノ酸配列モデルのツールであるSeqAPASSもあります。それから*in vitro*から*in vivo*への外挿。そして、iBER、結合した生物活性と曝露の比、も含まれます。また、今後の展開のためのツール、例えばステロイド産生のハイスループット試験、あるいは甲状腺の有害事象経路ネットワークなどについてもこれから説明いたします。



## ER and AR Subset Models



- The full ToxCast ER and AR pathway models are proposed as alternatives to Tier 1 assays
- However, these models would be very expensive to run and some of the assays are no longer commercially available
- Assay subsets were assessed, and 4 to 7 assays provided equivalent performance (e.g., balanced accuracy) to the full pathway models
- The goal now is to validate assay subsets (4 - 5 assays per pathway) using reference chemicals and a set of 'validation' chemicals
- Once the subset models are validated, then screening of pesticide chemicals will begin

19

このToxCastのER及びAR全経路モデルは、Tier 1の試験の代替法として提案されていますが、実証するには非常に高価な試験です。ERには18試験とARには11試験が必要になります。また、元のモデルの試験が既に市販されていないという状況もあります。したがって、今現在、EPAが試験のサブセットを開発中です。4～7種類の試験となります。これがあることによって、全経路モデルと同等のパフォーマンスが得られることを目指しています。

サブセットにつきましては、これは標準化学物質と、別のセットの検証用の化学物質のセットを用いて検証を行うこととしています。一旦サブセットのモデルの検証を済ませた後に農薬化学物質のスクリーニングを開始することとなります。



# ER Subset Models



Assay #	ER Assay type	Species
1	receptor binding	bovine
2	receptor binding	human
3	receptor binding	mouse
4	receptor dimerization	human
5	receptor dimerization	human
6	receptor dimerization	human
7	receptor dimerization	human
8	receptor dimerization	human
9	receptor dimerization	human
10	DNA binding	human
11	DNA binding	human
12	transcriptional activity	human
13	transcriptional activity	human
14	gene expression	human
15	gene expression	human
16	cell proliferation	human
17	gene expression	human
18	gene expression	human

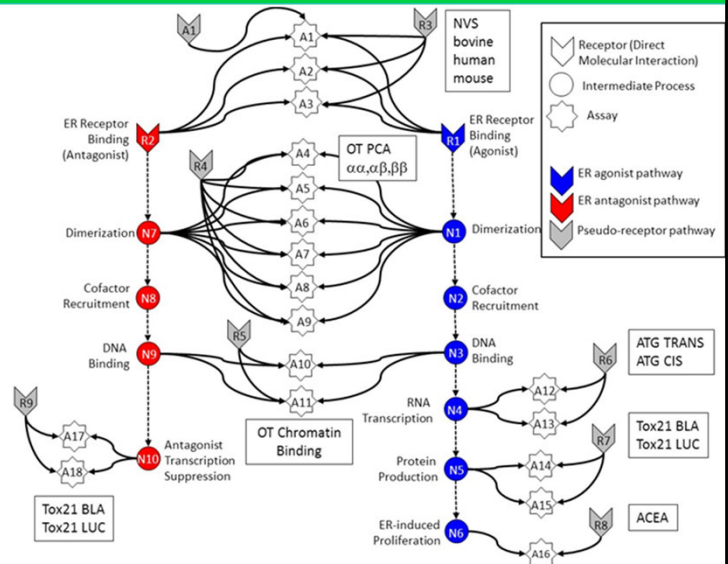
## Key events

Binding

Dimerization

Transactivation

Proliferation



20

このスライドは、ERの全経路モデルに関する試験を示しています。左側は18試験のリストです。ERのサブセットモデルはここに適用されます。そして種類は少ないのですが、これについてはまた後でお話をします。

目的としては、アッセイの中心を4つのキーイベント、すなわち、受容体の結合、二量体化、転写活性化と細胞増殖を対象とすることとなります。



## AR Subset Validation Strategy



- Divide AR agonist, antagonist and negative chemicals each into 3 sampling strata using evenly spaced breaks across the appropriate range of AUC values
- Chemicals will be randomly selected by strata
- Ensures full range of activity is adequately sampled
- Any reference chemicals not in random selections will be added separately

	AR Agonist	AR Antagonist	AR Negative
AUC type	Agonist	Antagonist	Max Interference
Min AUC	0.102	0.101	0.000
Max AUC	1.290	1.00	1.060
Stratum 1 range	0.100 - 0.496	0.10 - 0.40	0.000 - 0.354
Stratum 2 range	0.496 - 0.892	0.40 - 0.70	0.354 - 0.709
Stratum 3 range	0.892 - 1.290	0.70 - 1.00	0.709 - 1.06

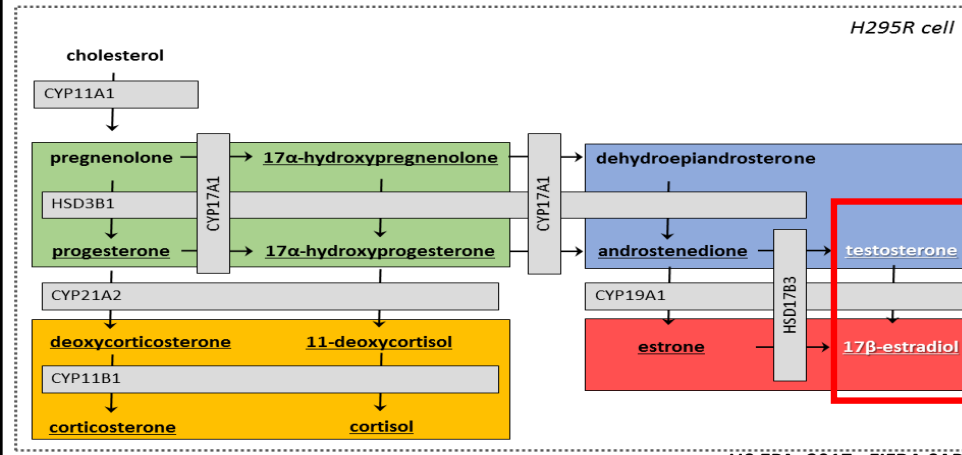
21

ARについては、ARアゴニスト、アンタゴニスト、それから陰性化学物質ですが、それぞれ3つのサンプリング層に分割しています。その範囲につきましては、表のとおりです。それぞれのタイプの化学物質について、このような分類を行いました。そして、この層の間は同等でして、これらのAUC、曲線下面積の適切な範囲中で区切ったものです。そして化学物質につきましては、層ごとにランダムに選択されます。その上で、適切に検証のためにサンプリングが行われていること、全領域がサンプリングされていることの確認が必要となります。

また、一連の標準化学物質がありまして、これが無作為では選択されていない場合につきましては、別途に追加されます。このプロセスですが、エストロゲン受容体（ER）とよく似た方法ではありますが、ただエストロゲンにつきましてはアゴニストと陰性物質のみについてサンプリングが行われます。したがって、ERの場合はサブセットモデルはアンタゴニストは入りません。



# High Throughput and Computational Methods



## Steroidogenesis

A key difference between the HT-H295R assay and the LT-H295R assay is the # of steroid hormone analytes measured

US EPA. 2017. FIFRA SAP "Continuing Development of Alternative High-Throughput Screens to Determine Endocrine Bioactivity, Focusing on Androgen Receptor, Steroidogenesis, and Thyroid Pathways"



22

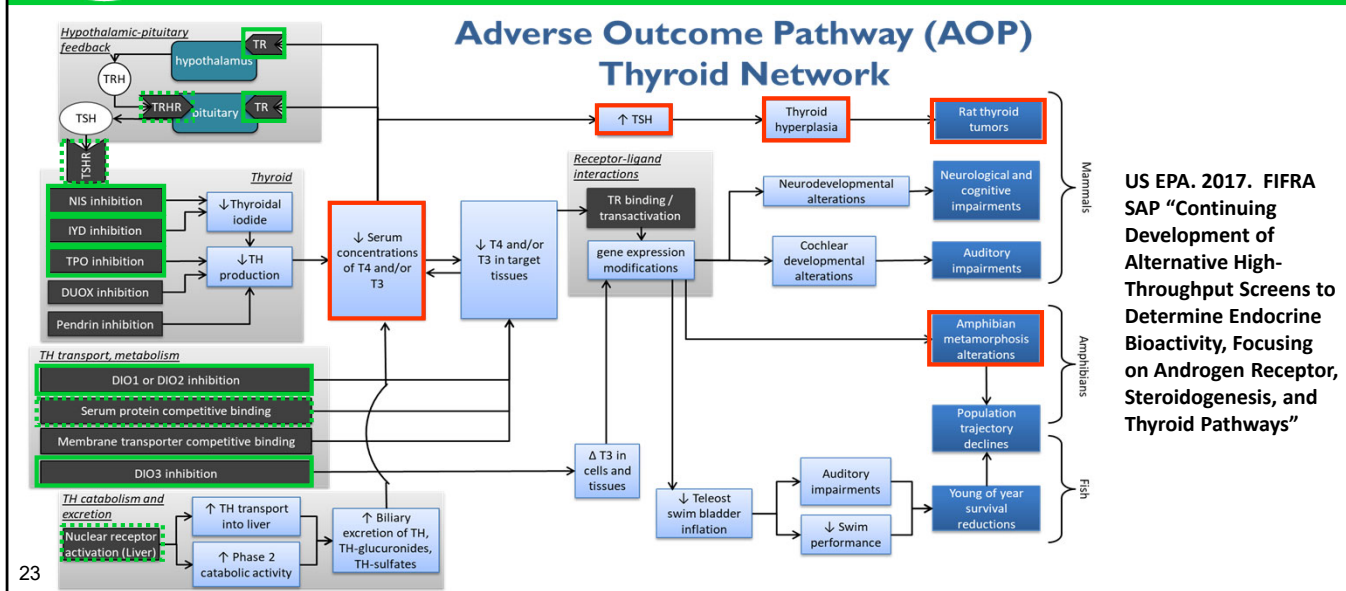
それでは、次のステロイド産生に話を進めます。EPAが開発したハイスループットのステロイド産生の試験があります。使われているのはH295Rの細胞株ですが、この同じ細胞株はロースループットの試験にも使われています。Tier 1にこちらは含まれておりますし、OECDの試験もこちらが使われています。

ハイスループットのこの試験ですが、ここで測定しているのは、18の異なる成分です。ここでホルモンの産生をステロイド産生経路で検討しています。これにつきましては、ピアレビューが2017年に行われました。一連の参照物質がこの試験においては使われています。しかしながら、EPAは今新しいハイスループット試験、ステロイド産生について同じ細胞株を使ったものを、今後発表する予定です。しかしながら、こちらで中心になるのは、テストステロンとエストラジオールのみです。評価項目としては同じ、ロースループットの試験と同じ評価項目が設定されています。そしてハイスループット試験について、これは容易にアクセスできる検出方法としてテストステロンとエストラジオールの検討が行われます。

私たちは、この試験がピアレビューの文献にもうすぐ発表されることを期待しているところでして、その後バリデーション、検証に向かって次の作業が行われることとなります。



# High Throughput and Computational Methods



US EPA. 2017. FIFRA SAP "Continuing Development of Alternative High-Throughput Screens to Determine Endocrine Bioactivity, Focusing on Androgen Receptor, Steroidogenesis, and Thyroid Pathways"

図が示しているのは、現在の甲状腺軸のAdverse Outcome Pathway (AOP、有害事象経路)と呼ばれるものです。この左側にある大きなボックスが示しているのが組織、臓器あるいはコンパートメントとして甲状腺の生理学に関連した部分を表しています。黒のボックスで示しているのは、分子により始まるイベント(分子開始イベント: MIE, Molecular Initial Event)を表しています。黒の枠で囲ったMIEは、EPAとして既に関発、発表した試験を表しています。黒の枠で破線がついているものは、MIEとしての試験は、今現在開発中である、あるいはまだ公表されていないことを示しています。

水色のボックスは、このAOPの主要なイベントです。そして青色は、実際のAdverse Outcome (有害事象)を表しています。赤枠で囲っているのは、エンドポイントを表しており、*in vivo*のEDSP、Tier 1、Tier 2試験における測定が行われたものです。EPAが今現在検討をしているスクリーニングアプローチは、包括的にこの甲状腺の破綻、かく乱、これをヒトあるいは野生生物で何を示すのかを明らかにしようとしています。





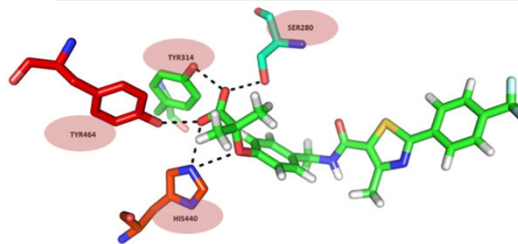
# SeqAPASS: The Basics



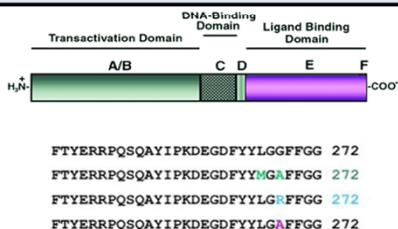
## Level 1 Primary Amino Acid Sequence Alignments



## Level 3 Critical (Close Contact) Amino Acid Conservation



## Level 2 Conserved Functional Domain Alignments



Percent Similarity  
 Conserved  
 YES or NO

24

SeqAPASSと呼ばれる、タンパク質のアミノ酸配列の類似性を利用して動物種の感受性を予測する、迅速なオンラインのスクリーニングツールがあります。行政当局あるいは研究者が毒性の情報について様々なシーンにまたがって外挿できるようにしたものです。3つのレベルがあり、まず1つ目のレベルは、これは主たるアミノ酸の配列を比べて、類似性の比較を行います。2つ目のレベルは、これは類似性を特定の機能的領域について比較します。3つ目のレベルは、個々のアミノ酸の残基を比べます。タンパク質の相互作用に重要なアミノ酸残基が対象となります。

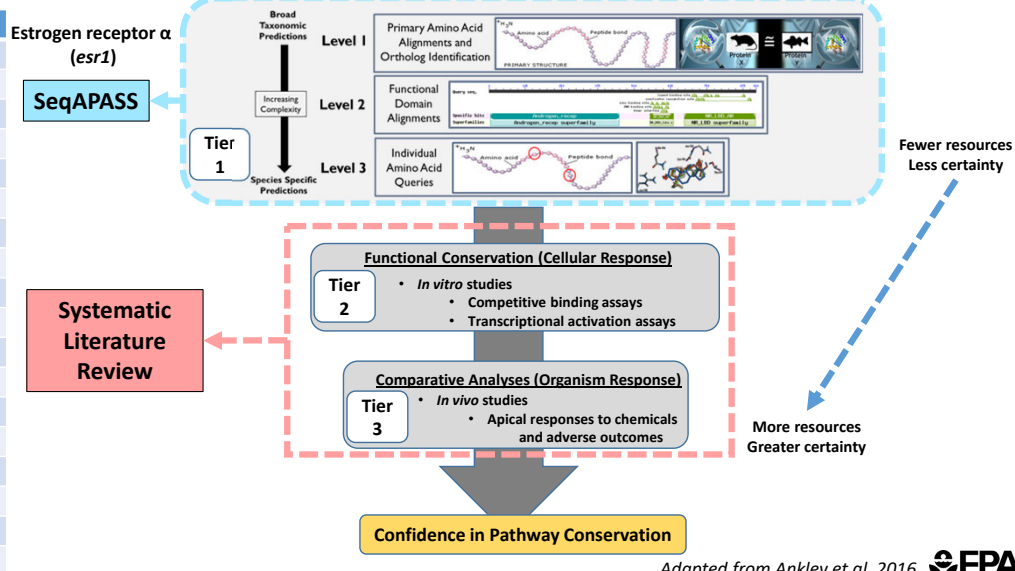




# Species Extrapolation Method



Assay #	ER Assay type	Species
1	receptor binding	bovine
2	receptor binding	human
3	receptor binding	mouse
4	receptor dimerization	human
5	receptor dimerization	human
6	receptor dimerization	human
7	receptor dimerization	human
8	receptor dimerization	human
9	receptor dimerization	human
10	DNA binding	human
11	DNA binding	human
12	transcriptional activity	human
13	transcriptional activity	human
14	gene expression	human
15	gene expression	human
16	cell proliferation	human
17	gene expression	human
18	gene expression	human



25

Adapted from Ankley et al. 2016

このSeqAPASSはエストロゲン受容体 $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) に適用できます。この情報は、Ankleyらが2016年に発表しました。図の左側はER試験のリストで、どのような種がカバーされているかを表しています。これについては、まだERのフルパスウェイモデルの中では多様な種がまだ含まれていないことから、他の種に対しても適用できるものであるかどうかについては、今後の確認が必要です。

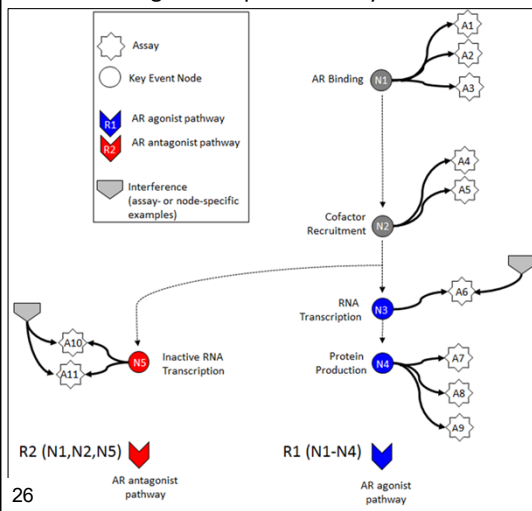
右側の図は、パスウェイの保存についての枠組みとなります。SeqAPASSのツールがここでも使われています。系統的な文献レビューを行うことによって、*in vitro*の試験結果を明らかにし、また*in vivo*の試験結果も明らかにします。次いで、物質のエストロゲン活性を見るもので、これはERのパスウェイモデルで明らかになったものとの比較を行います。最終的には、信頼性を持って、この経路が保存されていることが確認できます。また、ERパスウェイモデルから得られるERデータを活用して、他の種、例えば、哺乳類に対しての検討が行えます。



# Species Extrapolation Method



Androgen Receptor Pathway Model



EDSP Tier 1 Battery	Type	Tier 1 Battery Alternatives
Estrogen Receptor (ER) Binding	In vitro	ER Model (Alternative)
Estrogen Receptor Transactivation (ERTA)	In vitro	ER Model (Alternative)
Uterotrophic (UT)	In vivo	ER Model (Alternative)
Androgen Receptor (AR) Binding	In vitro	AR Model (Alternative)
Aromatase	In vitro	STR Model (Future)
Steroidogenesis (STR)	In vitro	STR Model (Future)
Hershberger	In vivo	AR/STR Model (Future)
Female Rat Pubertal	In vivo	ER, STR, THY Models (Future)
Male Rat Pubertal	In vivo	AR, STR, THY Models (Future)
Fish Short Term Reproduction (FSTRA)	In vivo	ER, AR, STR Models (Future)
Amphibian Metamorphosis (AMA)	In vivo	THY Model (Future)
EDSP Tier 2 Tests		
	Type	Tier 2 Test Alternatives
Rat 2-generation Reproduction	In vivo	ER, AR, STR, THY (Future)
Rat Extended 1-Gen Reproduction	In vivo	ER, AR, STR, THY (Future)
Medaka Extended 1-Gen Reproduction	In vivo	ER, AR, STR (Future)
Larval Amphibian Growth & Development	In vivo	THY (Future)
Avian Multi-Generation Reproduction	In vivo	ER, AR, STR, THY (Future)

ERαと同じアプローチを、ARの経路モデルにも採用しています。このARの種間外挿法は、最近、Environmental Toxicology and Chemistryに受理されました。(LaLone *et al.*, Environ Toxicol Chem., 42, 463-474, 2023.)

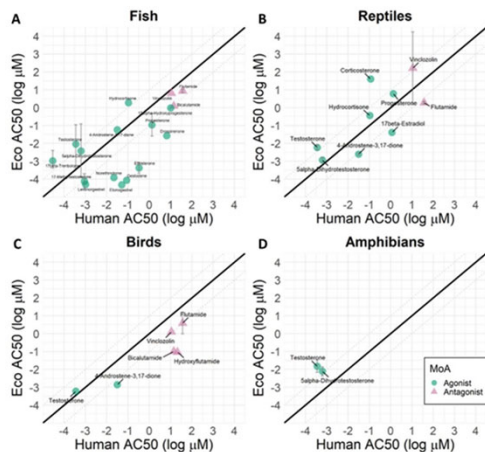
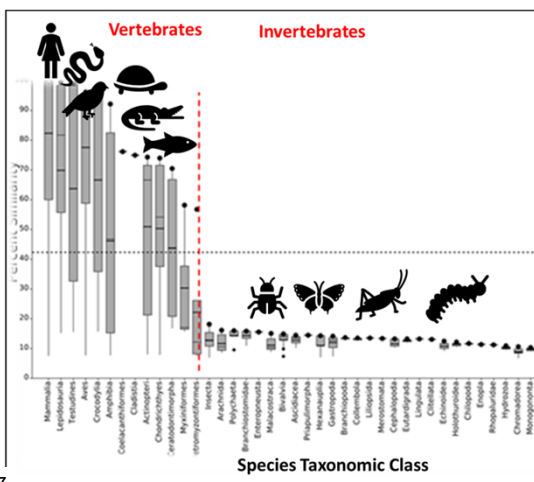


# Species Extrapolation Method



## Case Study: Cross-Species Extrapolation of the Androgen Receptor

Based on SeqAPASS predictions, *in vitro* and *in vivo* data, chemicals that bind and activate AR in mammalian-based assays, are likely to interfere with AR in other vertebrate species

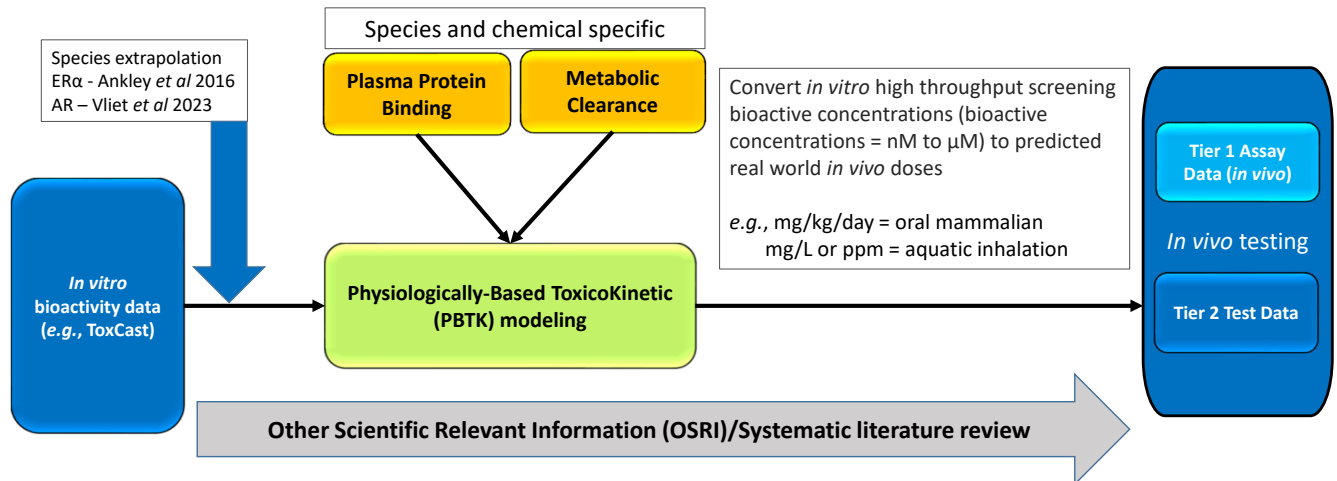


Vliet *et al.* 2023. Submitted for publication.

このスライドで御覧いただいているのは、その検討結果の一部です。左側の図は、各動物種のアンドロゲン受容体のアミノ酸配列の類似性の割合を見たものです。右側の図は、SeqAPASSの予測から、*in vitro* 及び *in vivo* データに基づく、哺乳動物のARに結合して活性化する化学物質は、他の脊椎動物種のARに干渉する可能性があることを示しています。この論文については、これから1~2か月後には公表されると期待しています。



# In Vitro to In Vivo Extrapolation (IVIVE)



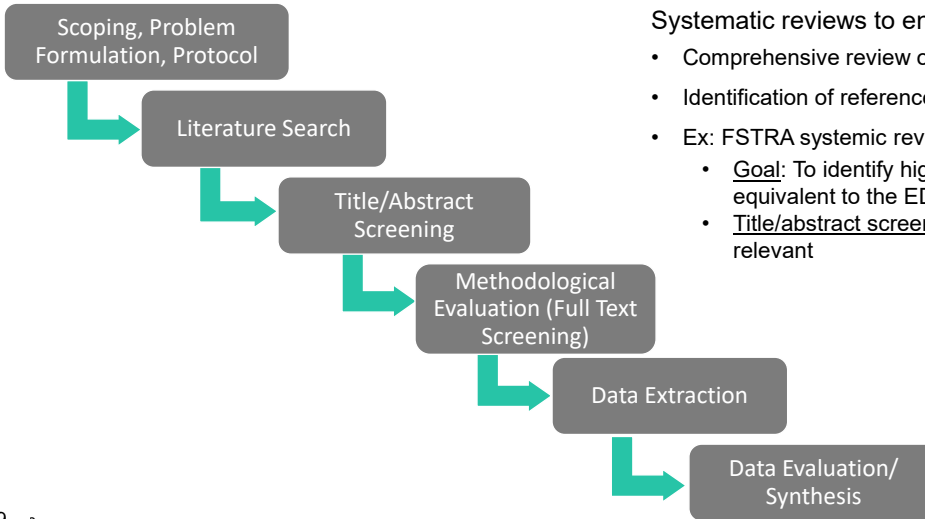
28



こちらのスライドは、*in vitro*から*in vivo*への外挿を示しています。左側はToxCastの層別活性データです。これは生理学的なトキシコキネティックモデリングを行います。例えば生物種及び化学物質に特異な血清たんぱく質結合あるいは代謝クリアランスなどを見て、それによって*in vitro*、ハイスループットスクリーニングの生物活性濃度を現実的に*in vivo*投与量に変換し、そしてTier 1の結果にそれを変換していくわけです。ハイスループットスクリーニングのNAMsのデータを使うことになります。



# Systematic Reviews



Systematic reviews to enhance efficiencies:

- Comprehensive review of the data and literature
- Identification of reference chemicals and benchmarks
- Ex: FSTRA systemic review
  - Goal: To identify high quality, guideline-like studies equivalent to the EDSP FSTRA
  - Title/abstract screening: **202 papers** identified as relevant

29 9



体系的な文献レビューも1つの非常に重要なツールで、このスクリーニングを実施する上で、すなわち外挿する上で非常に重要です。体系的なレビューというのは、包括的なデータ及び文献のレビューを実施します。そして、標準化学物質やベンチマーク濃度などを同定したり、種の外挿、SeqAPASSなどを特定することに使いますが、1つの例として、体系的なレビューをこのFSTRA（魚類短期繁殖アッセイ, OECD TG229）に対して行うというものです。その目標としては、ESPとFSTRA同等の高品質なガイドラインの試験を同定するという事です。

これが体系的な文献レビューの流れになりますが、まず文献検索、表題/要旨スクリーニング、そして最終的にデータ抽出、データの評価・統合というように繋がっていきます。



## Systematic Reviews - Example



[Sci Total Environ.](#) 2010 Dec 15;409(2):326-33. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.10.017. Epub 2010 Nov 5.

### Short-term exposure to the environmentally relevant estrogenic mycotoxin zearalenone impairs reproduction in fish.

Schwartz P<sup>1</sup>, Thorpe KL, Bucheli TD, Wettstein FE, Burkhardt-Holm P.

#### ⊕ Author information

#### Abstract

Zearalenone (ZON) is one of the worldwide most common mycotoxins and exhibits estrogenic activity in the range of natural steroid estrogens such as 17 $\beta$ -estradiol (E2). The occurrence of ZON has been reported in drainage water, soil, wastewater effluents and rivers, but its ecotoxicological effects on fish have hardly been investigated. In this study the estrogenic potency of the ZON was compared to E2 in a recombinant yeast estrogen screen (rYES) and the effects of waterborne ZON exposure on reproduction, physiology and morphology of zebrafish (*Danio rerio*) were investigated in a 42-day reproduction experiment. E2 as well as ZON evoked a sigmoid concentration-response curve in the rYES with a mean EC(50) of 2 and 500  $\mu$ g/L, respectively, resulting in an E2:ZON EC(50) ratio of 1:250. Exposure to ZON for 21 days reduced relative spawning frequency at 1000 and 3200 ng/L to 38.9 and 37.6%, respectively, and relative fecundity at 100, 320, 1000 and 3200 ng/L to 74.2, 41.7, 43.8 and 16.7%, respectively, in relation to the 21-day pre-exposure period. A 4.4 and 8.1 fold induction of plasma vitellogenin (VTG) was observed in male zebrafish at 1000 and 3200 ng/L ZON, respectively. Exposure to ZON did not affect fertility, hatch, embryo survival and gonad morphology of zebrafish. The results of this study demonstrate that although ZON possesses a moderate estrogenic potency in vitro, it exhibits a comparably strong effect on induction of VTG and reproduction in vivo. This indicates that ZON might contribute to the overall estrogenic activity in the environment and could therefore pose a risk for wild fish in their natural habitat.

30

こちらのスライドでは、その要旨の事例になりますが、どのような用語がハイライトされるのか、スクリーンされるのか、これにはAI、マシンラーニングあるいは自然言語などの方式を活用しています。種の名称あるいは曝露レベル、あるいはエンドポイントなど、再生、繁殖能力などといったものがキーワードとしてピックアップされています。

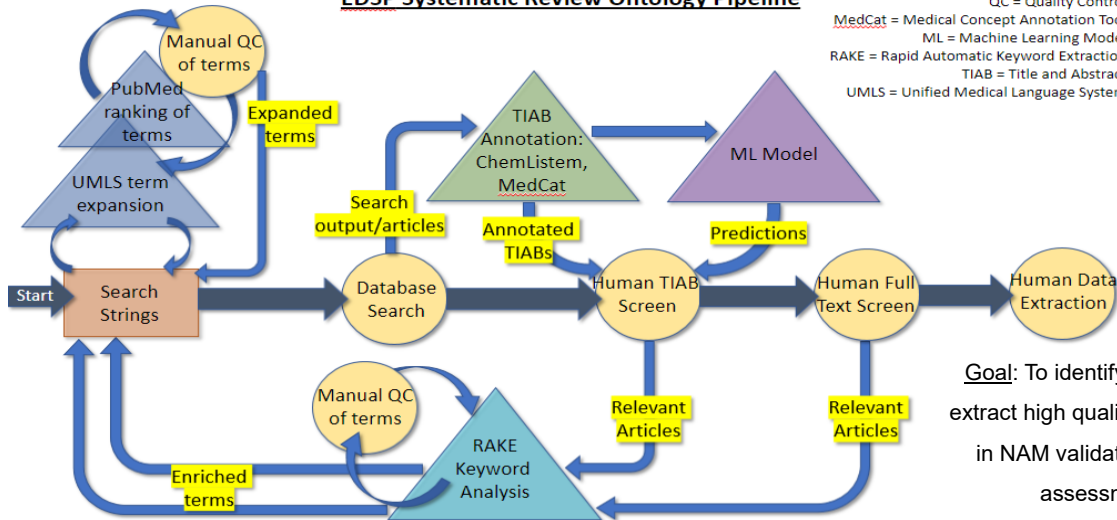


# Systematic Reviews



## EDSP Systematic Review Ontology Pipeline

Abbreviations:  
 QC = Quality Control  
 MedCat = Medical Concept Annotation Tool  
 ML = Machine Learning Model  
 RAKE = Rapid Automatic Keyword Extraction  
 TIAB = Title and Abstract  
 UMLS = Unified Medical Language System



Goal: To identify studies and extract high quality data for use in NAM validation and risk assessments



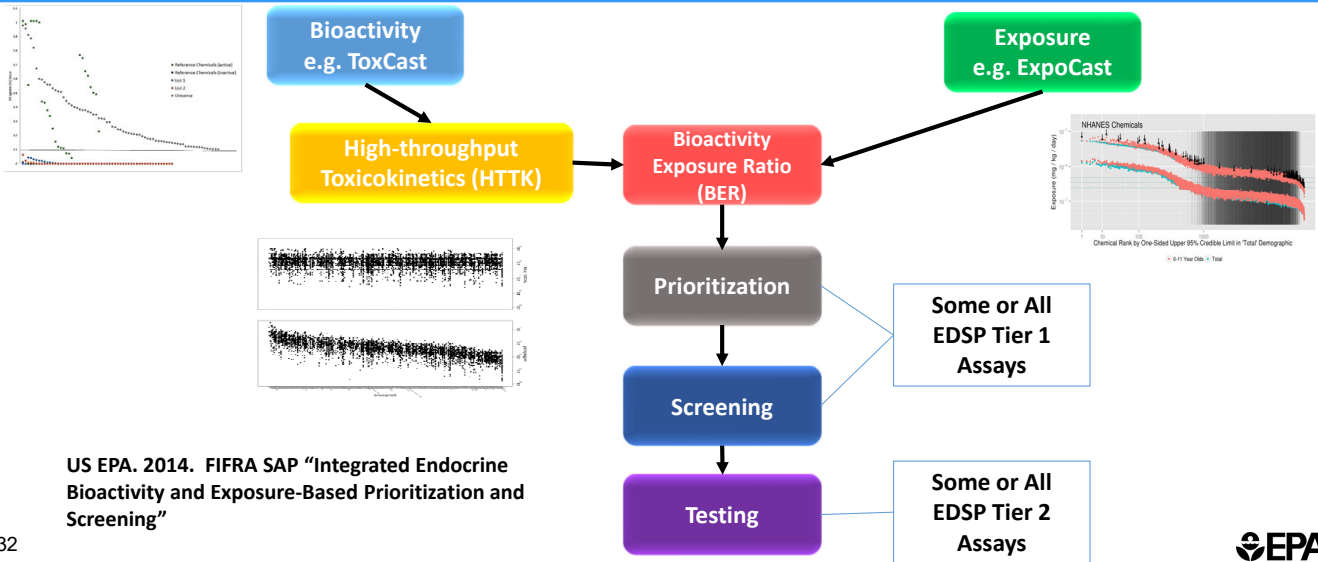
31

こちらのスライドでは、体系的なレビューとしてオントロジーの体系になります。サーチストリームによりデータベースを検索します。そしてタイトル、アブストラクトスクリーンを行います。そしてフルテキストのスクリーン、そしてヒトのデータを抽出します。幾つかの再現可能なプロセスがあります。それによって、その試験の数をより豊かにするという、目的があります。

そして、包括的な、体系的なレビューをすることを保証します。そして最も質の高いデータを確保するということが目標になっています。



# Bioactivity Exposure Ratio



白書の最後は生物活性と曝露の比になりますが、生物活性データを使ってハイスループットのトキシキネティクスも行い、そして生物活性と曝露の比を見ます。これは化学物質をスクリーニングのために優先順位を付け、そして将来的にはTier 1のスクリーニングの代わりに使えるようになれば、と考えています。





# Implementation



## Tool Application:

- Bioactivity Exposure Ratios (BERs) can be used to prioritize screening and testing
- SeqAPASS can be applied to all the molecular targets in the Tier 1 and Tier 2 assays/tests

In Vitro to In Vivo Extrapolation (IVIVE) can be applied for all in vivo assays/tests

EDSP Tier 1 Battery of Assays		Tier 1 Battery NAM Alternatives
Estrogen Receptor (ER) Binding	In vitro	ER Model (proposed)
Estrogen Receptor Transactivation (ERTA)	In vitro	ER Model (proposed)
Androgen Receptor (AR) Binding	In vitro	AR Model (proposed)
Aromatase	In vitro	STR Model (near future)
Steroidogenesis (STR)	In vitro	STR Model (near future)
Uterotrophic	In vivo	ER Model (proposed)
Hershberger	In vivo	AR/STR Model (future)
Female Rat Pubertal	In vivo	ER, STR, THY Models (future)
Male Rat Pubertal	In vivo	AR, STR, THY Models (future)
Fish Short Term Reproduction	In vivo	ER, AR, STR Models (future)
Amphibian Metamorphosis	In vivo	THY Model (future)
EDSP Tier 2 Tests		Tier 2 Battery NAM Alternatives
Rat 2-gen/EOGRT	In vivo	ER, AR, STR, THY (future)
Medaka Extended 1-Gen Reproduction	In vivo	ER, AR, STR (future)
Larval Amphibian Growth & Development	In vivo	THY (future)
Avian Multi-Generation Reproduction	In vivo	ER, AR, STR, THY (future)

33

少し戻りますが、こちらが枠組みになります。それから実装です。現在提案済みのもの、近い将来提案するものとして、ERの結合、ARの結合が掲げられています。これは優先順位付けに用いることができます。SeqAPASSは分子ターゲットに活用できますし、この生態系の野生生物種を保護ということが目的です。そして*in vitro*から*in vivo*への外挿はあらゆる*in vivo*のアッセイ試験に活用ができるものです。



## EDSP Targeted Goals



2023

- Publish the EDSP NAMs Whitepaper (January 19, 2023)
- Finalize a formal EDSP strategic plan
- Determine and publish need for List 1 Tier 2 data

2024

- Publish List 2 action plan
- Evaluate inclusion of Tier 1 in Part 158 registration

2025

- Initiate any List 1 Tier 2 test orders

34

EDSPには幾つかのターゲットとなる目標があります。NAMsの白書が2023年1月19日に公表されています。戦略的なプランも策定されています。これが現在レビューをされています。そして、一次リストのTier2データの必要性を判断して公表するという事にコミットしています。2024年に、二次リストのアクションプランを公表予定です。そしてTier1の試験を含めて、Part158の登録に対する評価をするということで、これは全ての農薬が通らなければならないものです。そして一次リスト物質のTier2の試験は、2025年に実施命令が開始されます。

# Thank you!

# Questions?



35

ご清聴ありがとうございました。ご質問はございますか。