



ASSESSMENT OF ENDOCRINE DISRUPTING PROPERTIES OF PESTICIDES ACTIVE SUBSTANCES IN EUROPE

Laura VILLAMAR-BOUZA

Ecotoxicology Team
Pesticides Peer-review Unit



それでは、主催の皆様方には、本日私の組織を代表した話をする機会を頂いたことに御礼申し上げます。欧州食品安全機関（EFSA）を代表して、内分泌かく乱特性と非標的生物についてのお話をしたいと思います。このプレゼンテーションの時間どおりに終わることができればと思っています。ただ、非常に多くの情報が入っていますので、少し難しいのですが、皆様方には、具体的で実際の観点からお話を申し上げたいと考えています。また、この発表は1つの事例としてお話をいたします。そして、関心がおありの方は、詳細につきましては御質問など、必要な場合にはまた御連絡をいただければお答えしたいと考えます。

TABLE OF CONTENT

EFSA's role in ED
assessment



What's an EDC?



Case study B



Key features of the ED
guidance



ED assessment in
numbers



Case study A



Q&A session



これが最初のスライドで、講演内容一覧になりますが、今日の講演の中ではこのような話をしていきます。中でも事例研究として、甲状腺ホルモン介在様式とエストロゲン、アンドロゲン、ステロイド産生（EAS）介在様式の話が中心となります。そして、この評価についてお話をした後で、最終的には幾つか具体的な数字を申し上げます。Webページのリンクもあります。定期的に透明性をもって評価結果について公表しています。非常に貴重な価値のある情報ではないかと私どもは考えていますし、これは一般の人たちに対しても、またいろいろな組織、機関にとっても重要な情報ではないかと考えています。



EFSA's role on ED assessment

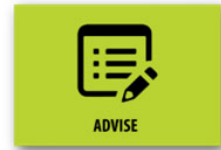


それでは、まず最初に、内分泌かく乱特性（ED）評価におけるEFSAの役割をお話したいと思います。

WHAT DOES EFSA DO?



EFSA



Risk assessor
Scientific advisor

4



欧州食品安全機関（EFSA）の役割は、EFSAとしてリスク評価の実施を行う立場にあります。様々な問題が出てまいりますので、いろいろな化学物質について、また環境への影響などについての評価を行うためのリスク評価になります。

また、ED評価は、欧州規制に基づいて行われるハザードベースの評価についても、その任務を負っています。また、この任務の2つ目の部分ですが、科学的な情報の提供で、これを一般の人たちにも分かるように評価をすることです。私たちは科学者の立場でリスクを評価します。規制の目的のために検討を行っていますが、私たちは意思決定のプロセスに介入することはありません。私たちの日常の仕事は、リスク管理を行う人たちに独立した科学的な助言を提供して、その人たちが判断を下すわけですので、私たちはその判断に介入することはありません。



What is an endocrine disruptor?



そして、2 番目ですが、これは内分泌かく乱物質（ED）とは何かということです。もちろん皆様方は御存知の事柄です。このセミナーは、まさに内分泌かく乱物質がテーマになっているからですが、基本的に私たちにとってこの内分泌かく乱物質の定義は次のスライドにあるとおりです。

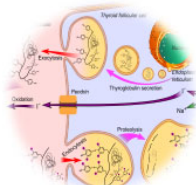
WHAT'S AN EDC (ENDOCRINE DISRUPTOR COMPOUND)?

i)



it shows an adverse effect in an intact organism or its progeny, which is a change in the morphology, physiology, growth, development, reproduction or life span of an organism, system or (sub)population that results in an impairment of functional capacity, an impairment of the capacity to compensate for additional stress or an increase in susceptibility to other influences;

ii)



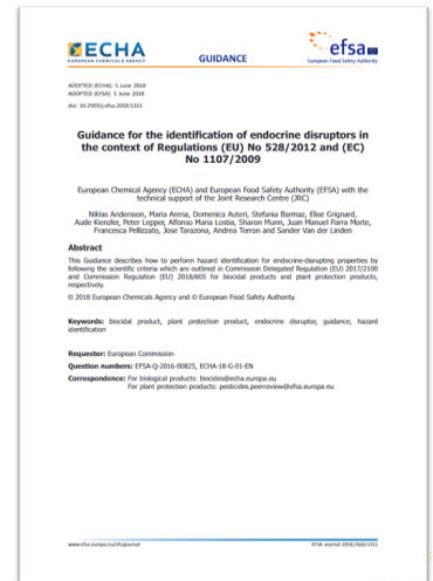
it has an endocrine mode of action, i.e., it alters the function(s) of the endocrine system; and

iii)



the adverse effect is a consequence of the endocrine mode of action.

WHO/IPCS, 2002
Regulation 2018/605
ECHA/EFSA Guidance 2018

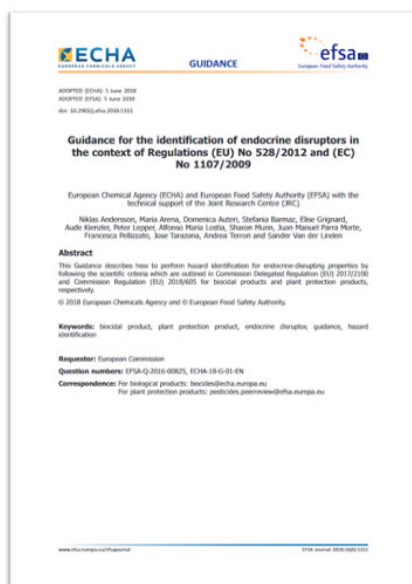


6

内分泌かく乱物質とは何か、ということですが、内分泌かく乱物質は、ここに示したWHOの3つの条件を満たすものである、と私たちは考えています。そして、農薬の規制を欧州レベルで行うことから、ED評価に入るものです。欧州化学品庁（ECHA）がその担当となります。そして、この根拠として、私たちはガイダンス文書を公表しています。これによりましてEDの評価、これを調和の取れた形で実施できるようにしています。

内分泌かく乱物質というのは、ここに示したWHOの3つの条件を満たす物質となります。i) 健全な生物個体やその子孫に有害影響を示す物質であるということです。そして、それが個体または集団のレベルになるわけですが、ii) 内分泌系の作用機序を有する物質であるということです、内分泌系への活性を持つ物質とされています。そして3番目ですが、iii) 有害影響というのは、これは内分泌系の作用機序の結果であるとされています。つまり、生物学的にこの有害作用と内分泌系への作用との間に関連性があることが示されるということです。右側の書類が、先ほどガイダンス文書と申し上げましたが、EFSAの同僚と作成して、ECHAとの共同で出した文書で、また欧州委員会の共同研究センター（JRC）も関わっています。この文書のタイトルにもありますが、農薬にも関わるものであり、植物保護剤にも関わります。基本的には農薬物質であるということです、殺生物剤となります。

ECHA/EFSA ED GUIDANCE (2018)



Due to certain limitations on the current knowledge and available methodologies, the ED criteria and ECHA/EFSA ED guidance apply to:

- EATS-modalities (Estrogen, Androge, Thyroid and Steroidogenesis) in vertebrates;
- ED criteria for **humans** (based on a mammalian toxicology dataset)
- ED criteria for **non-target organisms** including wild mammals (same dataset as the one for humans but considering the population relevance) and non-mammalian species (specific dataset for fish and amphibians)



このガイダンス文書は欧州レベルでEDクライテリアに対応するためにつくられたものです。どの文書も同じですが、やはりこれにも限界があります。このガイダンスは、現在分かっている知見に基づいてつくられたものです。また方法論によってつくられたものであって、エストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン、ステロイド産生の介在様式のみに関わるものです。ガイダンス文書のクライテリアはヒトにあるいは標的生物を対象にしたものです。ヒトの場合と非標的生物のための、哺乳類が主となりますが、データセットは同じものが使われています。しかしながら、検討項目が違う場合があります。というのは、御存知のようにヒトは個体のレベルで検討が行われますが、生態毒性の場合にはこれは集団で見ることになるからです。したがって、ある物質が、その分類がヒトの毒性に鑑みてED作用があると考えられた場合には、これは同時に集団のレベルにおいても適切であると考えられれば、この哺乳類に対してもED作用があると判断されることになります。

しかしながら、非標的生物の場合には、同時に個別の評価も行われます。これは非哺乳類に対する検討が行われますが、この場合は主として魚類と両生類が対象となります。



Key features of the ED assessment



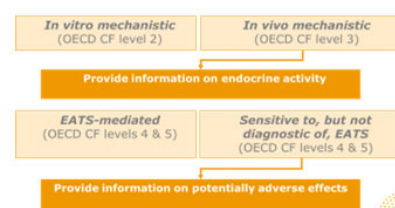
次のスライドですが、この情報を御提供することによって私たちが何をED評価と考えているか、主立った特徴についてお話をします。

KEY FEATURES OF THE ED ASSESSMENT

- Assessment is based on ‘**all available relevant scientific data**’
- **Weight of evidence approach** is applied in the assessment, considering factors such as:
 - **Relevance of the study** design for the assessment of adverse effects and endocrine activity
 - Positive and negative results (i.e., **consistency of the results**)
 - **Coherence** of the (pattern of) results within and between studies and across species
 - **Biological plausibility** of the link between the endocrine activity and the adverse effects, i.e., the endocrine mode of action
- The parameters relevant for ED identification are grouped in **four groups**¹:

in-vitro and in-vivo **mechanistic data** for identification of endocrine activity and EATS-mediated and “sensitive to, but not diagnostic of, EATS” parameters for the identification of adversity.

¹The grouping based on OECD Conceptual framework (OECD GD 150) & JRC screening methodology to identify potential EDs



ED評価を行う際には、あらゆる関連する科学データを採用します。そして科学的根拠の重みづけアプローチを活用しています。試験の重要性、デザイン、関連性を考慮しますし、有害作用や内分泌かく乱の評価との関連性を検討します。また、あらゆる情報の確認を行います。それは陽性であっても陰性であっても考慮することになります。また、パターンも検討します。この有害作用のパターンについて、試験間、生物種間における結果の一貫性についても評価を行いますし、また内分泌かく乱と有害影響の関連性についても評価を行います。これを行うことによって、その物質にED作用があると判別されることになります。

最後の項目は、これは皆様方も御存知かと思いますが、このようなED評価において私たちが採用している方式です。このような種類の評価を始めるときには、私にとっては新しい分野でしたが、そのときに同時に事例研究で具体的なデータが入ったものを御説明するようにしています。したがって、EDの評価、EDの同定のためには、パラメータがあります。様々な試験、いろいろなデータから入手することができたパラメータであり、これを分類しています。機序に関する情報、そしてin vivoの情報も見ていますし、またメカニズムのデータはin vitroのデータでもあります。メカニズムデータを見る、または内分泌活性についてのデータ、これは陽性、陰性に関わらず評価を行います。そして、有害性についての評価を行います。これについてはin vivoのデータも使います。そのためのパラメータについては、感受性のあるパラメータあるいは診断的なパラメータ、EATS介在様式のパラメータとして分類されるものがあります。

ED TESTING STRATEGY FOR NON-TARGET ORGANISMS

Table 15: Fish: main investigated parameters - parameters 'in vivo mechanistic' (highlighted in orange); 'EATS-mediated' (highlighted in blue) and parameters 'sensitive to, but not diagnostic of, EATS' (highlighted in purple)

Test guideline	Section A					Section B				REACTIV
	OECD TG 229 ⁽¹⁾	OECD TG 230	OECD TG 234	OECD TG 240 ⁽¹⁾	OPPTS 850.1500 ⁽¹⁾	OECD GD 148	EASZY ⁽¹⁾	RADAR ⁽¹⁾	JMAGA ⁽¹⁾	
Test duration	21 days	21 days	60 days post-hatch	133 days	120-150 days	21 days	96 h	72 or 96 h	28 days	24h
Life stages	Sexually mature male and spawning female (PG)	Sexually mature male and spawning female (PG)	From newly fertilised egg until completion of sexual differentiation of the F2	From sexually mature males and females of PG to hatching of the F2	From sexually mature males and females of PG to juvenile stage of the F1	Sexually mature female (PG)	Embryonic	Embryonic	Juveniles	Embryonic
Species	Fathead minnow, Japanese medaka, zebrafish	Fathead minnow, Japanese medaka, zebrafish	Japanese medaka, three-spined stickleback, zebrafish, fathead minnow (partially validated)	Medaka; can be adapted to zebrafish (ZEOGRT, under validation)	Fathead minnow or shortheaded sturgeon (marine). Can be adapted to medaka and zebrafish	Stickleback	Zebrafish	Medaka	Medaka	Medaka (highly specific transgenic line)
Parameter name	Indicative of: (a)									
VTG in females	E, A, S	X	X	X	X				X	Survival/Fluorescence
VTG in males	E, A, S	X	X	X	X				X	
Sex ratio	A	X	X	X ⁽¹⁾			X			
Male SSC in females	E, A, S	X	X	X ⁽¹⁾				X		
Male SSC in males	E, A, S	X	X	X ⁽¹⁾						
Specific gonad histopathology ^(b)	E, A, S	X (optional)	X (optional)						X	
Sex ratio (female biased)	E, A		X	X	X				X	
Sex ratio (male biased)	E, A, S		X	X	X				X	

The table is divided into two sections. Section A lists parameters from tests for which guidance is provided in OECD GD 150. Section B lists parameters from tests that have not yet been validated, or not formally assigned for detection of endocrine disruption, for which limited guidance is given in OECD GD 150. (a) Based on OECD GD 150 (OECD, 2018b), indicator of the OTCrogen (Adipogen, Developmental, or Thyroid) pathway. (b) Not applicable to a specific model. (c) Histopathological examination of the gonads should enable identification of chronic gonoviruses of male and female gonads. It should be noted that some specific gonad histopathological findings are EATS-mediated but some other are not (e.g. complete atrophy). More detailed guidance on specific gonad histopathological examination in fish is given in OECD, 2018b.

Table 16: Amphibians: main investigated parameters for which guidance on the interpretation is provided in the OECD GD 150. Parameters 'in vivo mechanistic' (highlighted in orange); 'EATS-mediated' (highlighted in blue) and parameters 'sensitive to, but not diagnostic of, EATS' (highlighted in purple)

Test guideline	Section A		Section B
	OECD TG 231	OECD TG 241	
Test duration	21 days	16 weeks	72 h
Life stages	Tadpole NF (NF 51)	Embryo, tadpoles, early juvenile	Tadpole (NF 45)
Species	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Parameter name	Indicative of: (a)		
Plasma level of VTG	E, A, S	X (optional)	
Developmental stage ^(b)	T		
Hindlimb length ^(c)	T	X	
Thyroid histopathology (amphibian) ^(d)	T	X	
Histopathology ^(d) (gonad ^(e) , reproductive ducts)	E, A	X	
Sex ratio (phenotypic (gonad histology), genetic)	E, A	X	
Time to metamorphosis (NF stage 62)		X	
Transcriptional activity of THbZIP			X
Body weight	N	X	
Snout-vent length/ Growth	N	X	
Malformations	N	X	
Mortality	N	X	X
Behaviour	N	X	
Histopathology (liver, kidney) ^(d)	N	X	
Liver weight, liver somatic index	N	X	

このスライドはEFSAのガイダンスになります。これは私たちが行ったED試験実施の戦略になりますが、150ありまして、これが基本文書になります。この表では、カラーコードを用いて、パラメータによって色分けされていて、そして感受性あるいはEATSというふうに分類を進めた場合にはその色分けがされます。2018年に公表されたパラメータになっています。

このガイドラインは定期的に更新しています。そして、戦略の評価、試験実施、戦略評価も網羅することになっています。両生類に関するデータも反映するという事になっています。

この文書は、ここには書かれていませんが、既存の方法によって実施した試験に基づいて、継続的に更新されており、貴重な情報が入っています。



General information on the case studies

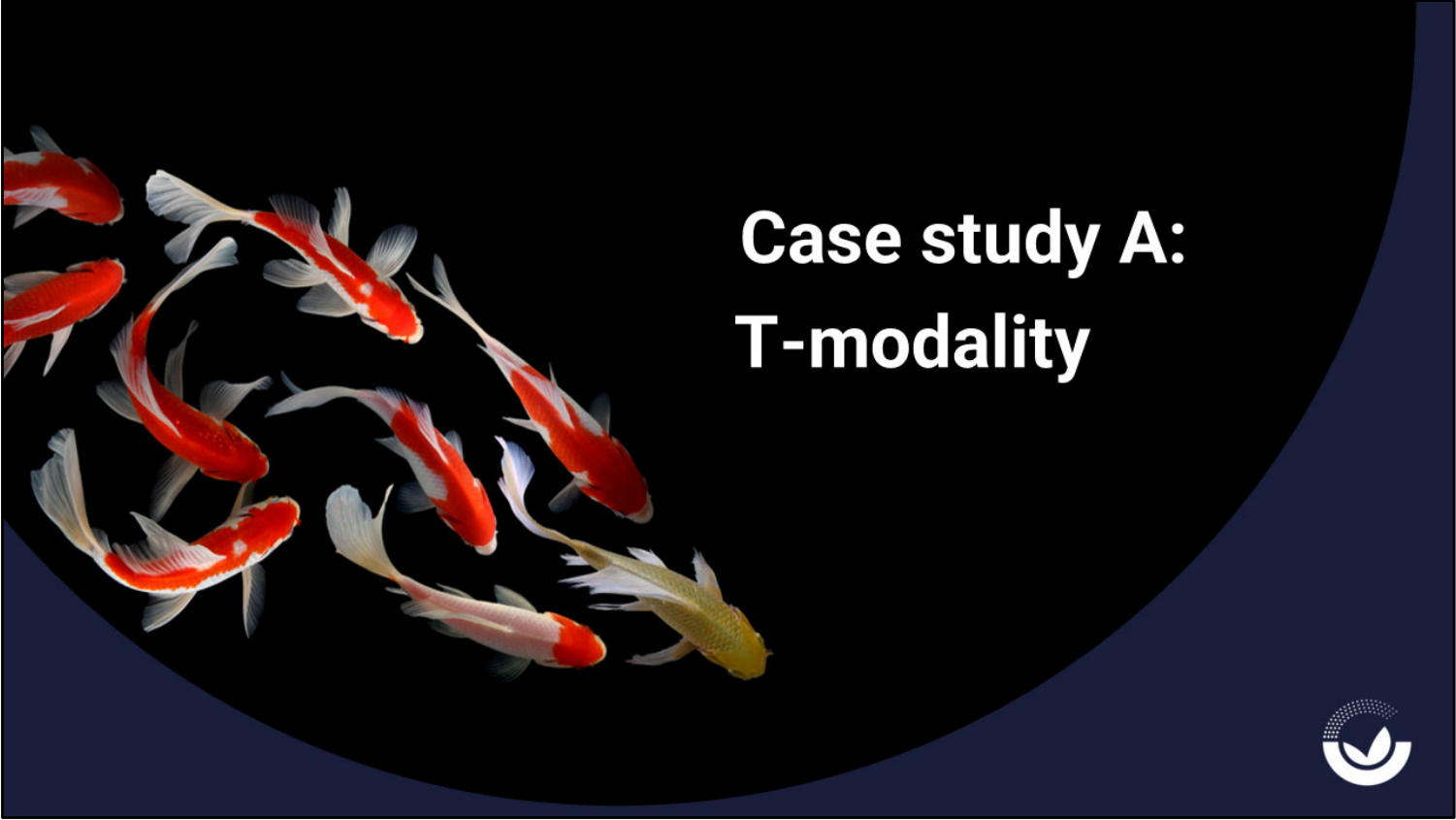


では、ケーススタディにもう少し詳しく言及していきたいと思います。

GENERAL INFORMATION ON THE CASE STUDIES

- **Disclaimer:** the case study does not use data attributable to a single substance for the T and EAS modalities. It has to be considered as an example aiming at illustrating challenging situations and the possible way forward.
- The case studies to be presented focus on the EATS-modalities for non-target organisms. E.g., non-mammalian species.
- **App E** of the ECHA/EFSA ED guidance is strongly recommended to be used:
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.2903/j.efsa.2018.5311>

時間があまりありませんので、2つのことをお伝えしたいと思います。これらのケーススタディは単一の物質に対応しているものではなく、これは私たちがやっていることがどんなものなのかということを御理解いただくための事例となります。そして、これは哺乳類以外の生物、魚類が対象になっています。そして、私どもの専門性といったものが反映されます。このスライドにはリンクが張ってありますが、ぜひこちらをお使いいただければと思います。これはガイダンス、付属資料Eになっておりますので、こちらを用いることをお勧めします。データを入力し、そして異なる科学的根拠を、その介在様式に基づいて構築していくことができます。このようなテンプレートをベースに、私たちが入力したデータを見ていくことができます。これは大変に有用です。特に複雑な状況あるいはデータ量がある場合には有用です。



Case study A: T-modality



では、最初のケーススタディに移りたいと思います。

AVAILABLE DATASET FOR T-MODALITY

The available information is summarized as follows:

OECD level	Study	Species
3	Amphibian metamorphosis assay	Amphibians – African clawed frog
1	ToxCast data	

これは、甲状腺ホルモンの介在様式についてです。
このデータセットですが、Level 3の試験は、両生類で1つしかありません。残念ながら多くの場合この試験結果をもとに結論を出さなければなりません。データセットが十分ではないということで、最初の事例になりますが、私たちがこの中で評価したデータになっています。

LINES OF EVIDENCE FOR T-MODALITY

Study ID	Effect classification	Effect target	Species	direction	(positive and negative)	Assessment of each line of evidence	Assessment on the integrated line of evidence	Modality
28	In vitro mechanistic	Thyroid receptor	Human liver cells	No effect	No effect observed	No effect observed	Overall, no evidence of in-vitro thyroid activity	T
29	In vitro mechanistic	Thyroid receptor	Human (Cell free)	No effect	No effect observed	No effect observed		
30	In vitro mechanistic	Thyroid receptor	Rat pituitary gland cell line	No effect	No effect observed	No effect observed		
31	In vitro mechanistic	Thyroid receptor	Rat pituitary gland cell line	No effect	No effect observed	No effect observed		
42	In vitro mechanistic	Thyroid receptor	HepG2 cells	Change	Change	A change provide very little information		
55	EATS-mediated	Developmental stage	Xenopus laevis	No effect	No effect	No effect observed in developmental stage	No evidence of T-m adversity in presence of T-m parameters. Mortality has been observed at the highest tested dose up to 5% indicating that the effects occur at/above the MTC.	T
55	EATS-mediated	Hind limb length	Xenopus laevis	Decrease	Decrease	Decrease on HLL at day 7 at highest tested concentration		
55	EATS-mediated	Thyroid histopathology (amphibian)	Xenopus laevis	No effect	No effect	No effect observed in T histopathology		
55	Sensitive to, but not diagnostic of, EATS	[Not in list]	Xenopus laevis	No effect	No effect	No effect observed in morphology		
55	Sensitive to, but not diagnostic of, EATS	Body weight (amphibian)	Xenopus laevis	No effect	No effect	No effect observed in body weight		
55	Sensitive to, but not diagnostic of, EATS	Snout-vent length/growth	Xenopus laevis	No effect	No effect	No effects observed in SVL	Mortality up to 5% at highest tested concentration	T
55	Systemic toxicity	Mortality (amphibian)	Xenopus laevis	Increase	Increase	Mortality up to 5% at highest tested concentration		

Several in-vitro test with target on the T- receptor. Overall, there is no evidence of the in-vitro thyroidal activity. However, no standardized in-vitro test for the T modality are available.

さて、科学的根拠、甲状腺ホルモン介在様式に関するデータセットということで、これは少し小さくて見づらくかもしれませんが、個人的にもし御関心があればぜひこちらの科学的根拠を自分で見ていただければと思います。ここで御覧いただいているのは、甲状腺ホルモン介在様式に関する一連の科学的根拠ということで、限られたデータセットになっています。データの構築方法ですが、*in vitro*のメカニスティックデータがあります。そしてその後に感受性に関連するデータがあります。基本的に最初の*in vitro*のメカニスティック情報ですが、ED活性が見られます。この情報に基づいて非常に限定された根拠しかありませんが、この物質はこの甲状腺ホルモンの受容体では限定された活性だということが分かります。そして、その図の下の方を見ますと、今度は*in vivo*のデータになります。情報が非常に限られています。

LINES OF EVIDENCE FOR T-MODALITY

Study ID Main	Effect classification	Effect target	Species	Effect direction	Observed effect (positive and negative)	Assessment of each line of evidence	Assessment on the integrated line of evidence	Modality
28	In vitro mechanistic	Thyroid receptor	Human liver cells	No effect	No effect observed	No effect observed	Overall, no evidence of in-vitro thyroid activity	T
29	In vitro mechanistic	Thyroid receptor	Human (Cell free)	No effect	No effect observed	No effect observed		
30	In vitro mechanistic	Thyroid receptor	Rat pituitary gland cell line	No effect	No effect observed	No effect observed		
31	In vitro mechanistic	Thyroid receptor	Rat pituitary gland cell line	No effect	No effect observed	No effect observed		
42	In vitro mechanistic	Thyroid receptor	HepG2 cells	Change	Change	A change provide very little information	No evidence of T-m adversity. Mortality has been observed at the highest tested dose up to 5% indicating that the effects occur at/above the MTC. Other effects in sensitive parameters were observed also concomitant to mortality.	T
55	EATS-mediated	Developmental stage	Xenopus laevis	No effect	No effect	No effect observed in developmental stage		
55	EATS-mediated	Hind limb length	Xenopus laevis	Decrease	Decrease	Decrease on HLL at day 7 at highest tested concentration		
55	EATS-mediated	Hind limb length	Xenopus laevis	No effect	No effect	No effect in HLL at day 21		
55	EATS-mediated	Thyroid histopathology (amphibian)	Xenopus laevis	No effect	No effect	No effect observed in T histopathology		
55	Sensitive to, but not diagnostic of, EATS	Not in list	Xenopus laevis	No effect	No effect	No effect observed in morphology		
55	Sensitive to, but not diagnostic of, EATS	Body weight (amphibian)	Xenopus laevis	No effect	No effect	No effect observed in body weight at day 7		
55	Sensitive to, but not diagnostic of, EATS	Body weight (amphibian)	Xenopus laevis	Decrease	Decrease	Decrease in body weight observed at day 21 at highest tested concentration		
55	Sensitive to, but not diagnostic of, EATS	Snout-vent length/growth	Xenopus laevis	No effect	No effect	No effects observed in SVL		
55	Sensitive to, but not diagnostic of, EATS	Snout-vent length/growth	Xenopus laevis	Decrease	Decrease	Decrease in SVL observed at day 21 at the highest tested concentration		
55	Systemic toxicity	Mortality (amphibian)	Xenopus laevis	Increase	Increase	Mortality up to 5% at highest tested concentration		

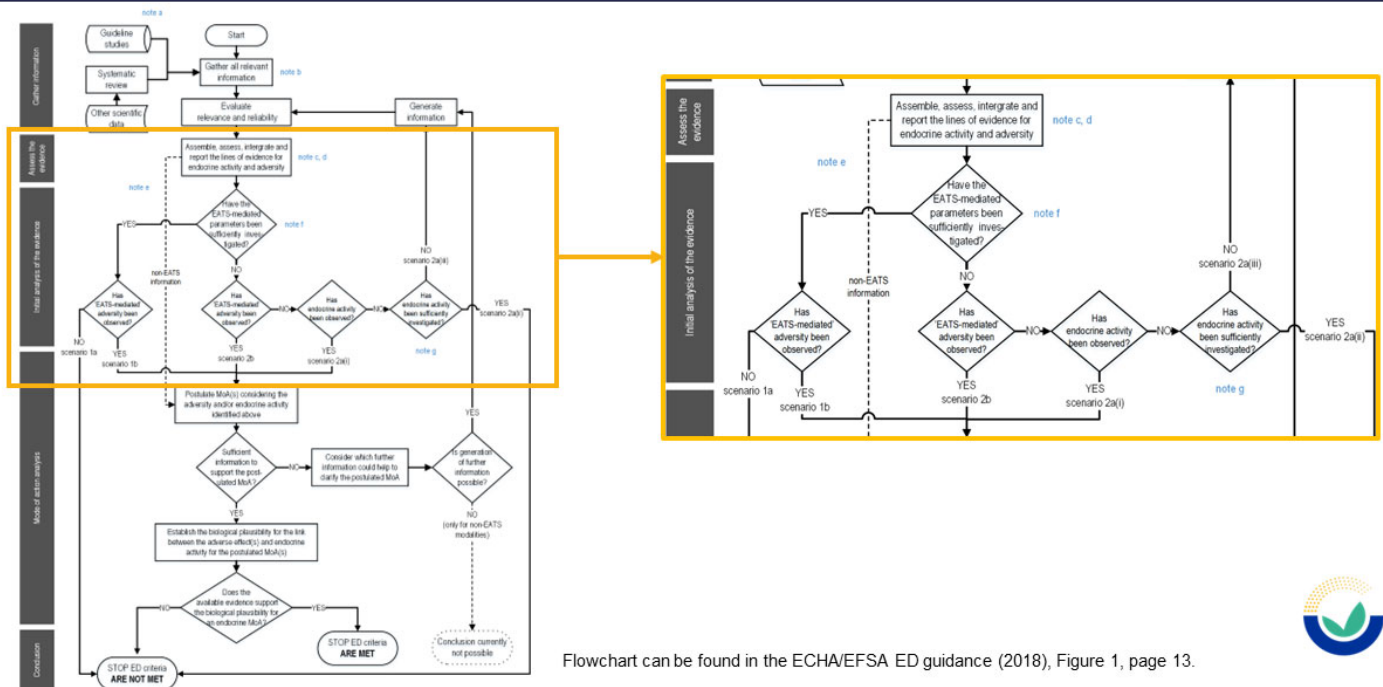
In-vivo information available from one amphibian metamorphosis assay.

Only effects were observed in one T-mediated parameters (Hind-limb length at day 7, not confirmed at day 21) in absence of histopathological findings in the thyroid and on the developmental stage. Since mortality was observed, the effects were concomitant to systemic toxicity and it is concluded that the ED is unlikely to be the primary MoA.



7つの結果があります。そしてその評価なのですが、特に死亡率はある程度あります。この試験は、適切な手法で実施されていますが、唯一のマイナスの情報としては、感受性の高いパラメータが対象であるということから、例えば体重を見たときには、結論としてこの物質、このT-介在様式におけるEDではないという結論になっています。この試験では5つの概念をED評価として紹介しています。

AVAILABLE DATASET FOR T-MODALITY



Flowchart can be found in the ECHA/EFSA ED guidance (2018), Figure 1, page 13.

これは非常によく知られている概念になります。フローチャートになっていて、EFSAのガイダンスにあります。これを用いてED評価の結論を出す方法を説明します。データが全て構築されると、この初期の科学的根拠の解析を見て、いろんな設問がありますが、私たちが持っているデータに基づいてこの設問に答えていくという形を取ります。それがスライドでも示されております。

T-MODALITY: INITIAL ANALYSIS OF THE EVIDENCE

- **Is the dataset complete for the ED assessment in line with the ED GD?**

No - the dataset is not considered complete because a LAGDA test according to OECD TG 241 is not available.

- **Has EATS-mediated adversity been observed?**

No

A study according to OECD TG 231 (AMA) was available and it was considered as negative (only effects on HLL observed at the highest tested concentration without effects on thyroid histopathology and developmental stage and in presence of systemic toxicity).

- **Has endocrine activity been sufficiently investigated?**

Yes

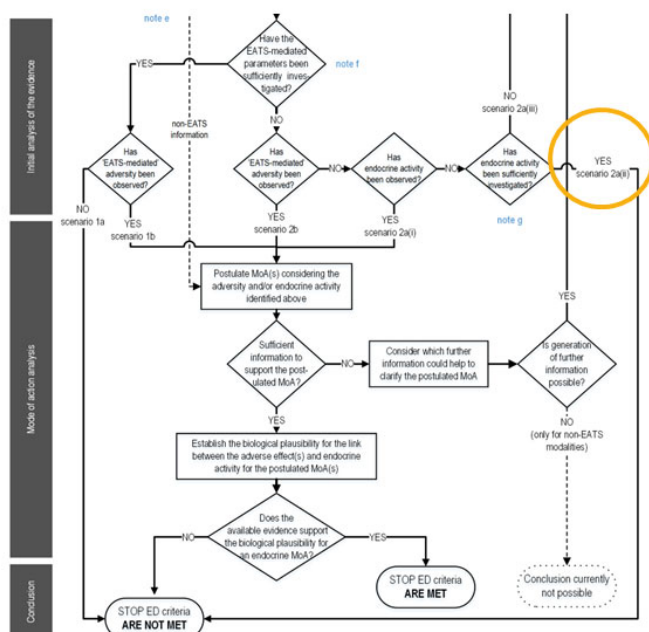


最初の設問は、このデータセットは完備しているのかどうかということです。EDの評価に対してデータセットが完備しているのかどうか。有害性を調べるための両生類の確定試験であるLAGDAが行われていないので、データセットが完備しているとはみなされず、ノーになります。これは介在する有害性というのは認められているかという設問に対して、甲状腺ホルモンの介在様式というものをベースに考えているわけです。

2つ目の設問ですが、このEATSが介在する、有害性が認められているかどうかということに対して、有害性を調べるためのLAGDA試験が行われていないので、答えはノーになります。

そして最後の設問ですが、内分泌活性は検査されているかどうかという設問です。これはAMA試験が行われているのでイエスになります。（結果としては、甲状腺病理組織、体長、発生段階など甲状腺ホルモン系への影響はありません）。

OVERALL CONCLUSION FOR THE T-MODALITY



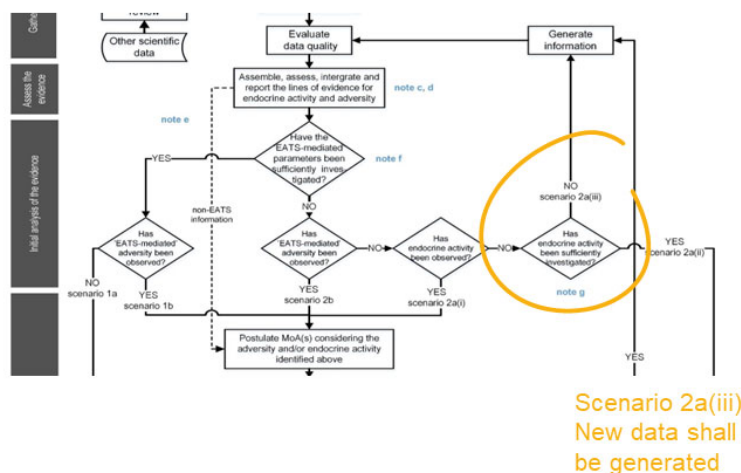
- Scenario 1a and 2a(ii) applies in this case
- Overall the substance **does not meet** the ED criteria for the T-modality.

しかし、内分泌活性というのは認められていないので、次のフローチャートに移るわけです。そしてこれは、甲状腺ホルモン介在様式のEDクライテリアを満たさないという結論になります。

WHAT IF...?

- What if there is no mortality in this study and no effects are observed?

We need to question whether the choice of the tested concentrations was appropriate. When signs of toxicity are observed, it means that we are at or above the MTC. Therefore, any other possible effects on ED mediated parameters observed at that concentration are just considered secondary to systemic toxicity. Ideally, we shall see effects in absence of systemic toxicity.



そして申し上げましたように、EDにとって非常に重要な概念があります。多くの生態毒性学者にとって、私もそうですが、この概念はED評価に導入されています。私たちが通常の生態毒性評価について行うものではなく、なかなか難しいのが、この全ての毒性評価について、最大許容濃度（MTC）で全ての理解を得ていただくのは非常に難しいことだと思います。ただ、概念としては大変に重要です。というのは、ここからMTCで分かれば、そこにより適切な試験が適切な試験濃度範囲の中で行われていることが分かるからです。そして、この全身毒性の徴候がない場合、また全く検査で作用が無い場合には、この検査あるいは実験デザインそのものが適切であったかどうかを疑問視しなければなりません。そして、EDは全身毒性があるというのが一番分かりやすいものではありませんが、ただ、必ずしもそのような作用が認められるわけではありません。したがって、ED評価においてはMTCについて質問が極めて重要です。



Case study B: EAS-modalities



それでは、次のスライドに進みます。これはケーススタディBとなりますが、より複雑な事例でありまして、説明にはもう少し時間がかかります。EASの介在様式を見ているのがケーススタディBです。

AVAILABLE DATASET FOR EAS-MODALITIES

The available information is summarized as follows:

OECD level	Study	Species	Tested concentrations
5	FFLCT1	Fish – Fathead minnow	0, 7, 9, 21, 63, 188, 558 µg/L
5	FFLCT2	Fish – Fathead minnow	16, 38, 68, 150, 290, 550 µg/L
4	Reproductive toxicity study (2 studies)	Bird – Bobwhite quail/ Mallard duck	NA
4	ELS	Fish- Fathead minnow	NA
3	Fish short-term reproduction assay (FSTRA)	Fish- Fathead minnow	10, 120, and 1200 µg/L
3	21-d fish assay	Fish- Fathead minnow	0, 5, 50, 500, 1000 µg/L
1	ToxCast data		

御覧のように、より完全なデータセットがそろっています。この講演の目的として、主として魚類のデータを見ていきます。御覧のように、グレーになっている部分にありますように、この評価は、ほかの生物種についてもあてはまることが分かります。魚類のデータについては完全なデータセットがありますので、今日のところは結論を導き出すために魚類のデータを見ていこうと考えています。次のスライドでお示ししたいのがEASの内分泌かく乱について、どのような科学的根拠がこれまでに存在しているかということを示す表になります。この表はToxCastのデータも入っていますが、それ以外にも*in vitro*あるいは*in vivo*のメカニズムのデータも入っており、*In vivo*の試験も入っています。

LINES OF EVIDENCE FOR EAS-MEDIATED ENDOCRINE ACTIVITY

Study ID Matrix	Effect classification	Effect target	Species	Duration of exposure	Duration unit	Lowest Effect dose	Dose unit	Effect direction	Observed effect (positive and negative)	Assessment of each line of evidence	Assessment on the integrated line of evidence	Modality
1		Androgen receptor	Chinese Hamster Ovary cells			4.2 R1C20 μM		Decrease	Decrease	Inhibitory effects of AR transcriptional effects induced by DHT		
6		Androgen receptor	Human (HepG2)	24 Hours		inactive μM		No effect	No effect	No effect on androgen agonism		
8		Androgen receptor	Human (Cell free) [from LNCaP]	20 Hours		66.5 μM		Change	Change	change in androgen binding		
10		Androgen receptor	Rat (tissue-based cell free)	18 Hours		inactive μM		No effect	No effect	No change in receptor binding in the rat cellular line		
11		Androgen receptor	Human (HEK293T)	8 Hours		inactive μM		No effect	No effect	no effects on AR interaction with protein after 8 hours		
12		Androgen receptor	Human (HEK293T)	16 Hours		34.9 μM		Change	Change	change in AR interaction with protein after 16 hours		
13		Androgen receptor	Human (CHO-K1)	24 Hours		inactive μM		No effect	No effect	No effect on AR agonist		
22		Androgen receptor	Chinese hamster	20 Hours		3 μM < IC25 μM		Decrease	Decrease	Inhibitory effects of AR transcriptional effects induced by DHT		
23		Androgen receptor	Human	24 Hours		7.0 μM		Decrease	Decrease	Inhibitory effects of AR transcriptional effects induced by DHT		
28		Androgen receptor	Chinese hamster	24 Hours		2 μM		Decrease	Decrease	Inhibitory effects of AR transcriptional effects induced by DHT		
29	In vitro mechanistic	CYP19	Human placental microsomes	20 Minutes		IC50 6.5 μM		Increase	Increase	Inhibitory effects of AR transcriptional effects induced by DHT	Positive evidence for androgen antagonism and inhibition of steroidogenesis including aromatase inhibition in vitro. The evidence for ER are negative	A/S
30		CYP19	Human (Cell free)	0.5 Hours		0.0275 μM		Change	Change	Increase in the inhibition of aromatase in several cell lines observed		
31		CYP19	1295R cells (Human adrenocortical)	24 Hours		IC50 5 μM		Increase	Increase			
33		CYP19	Human choriocarcinoma JEG-3 cell line	24 Hours		μM		No effect	No effect			
34		CYP19	Microsomes	40 Minutes		μM		No effect	No effect			
24		Estradiol synthesis	Human	48 Hours		μM		Change	Change	change in the estradiol synthesis		
25		Androgen receptor	Chinese Hamster Ovary cells			inactive 10 μM		No effect	No effect	no effect on ER		
15		Androgen receptor	Human	24 Hours		5 μM		Increase	Increase	Increase in the ER transactivation (information not available if agonism or antagonism)		
27		Testosterone synthesis	Human NCH1295R cells	48 Hours		μM		Change	Change	Change in testosterone level (not clear if increase or decrease)		
16		Testosterone synthesis	Human	48 Hours		10 μM		Decrease	Decrease	Decrease in testosterone synthesis		
17		Inhibition of human CYP11	Human CYP11	40 Minutes		IC50 8.2 μM		Change	Change			
26		CYP11 activity	Human	40 Minutes		8.2 μM		Decrease	Decrease	Inhibition of CYP 11		
29		CYP11 enzyme binding constant	Zebrafish (D. rerio)	60 Minutes		0.4 μM		Change	Change			
20		Estradiol level ex vivo	Fathead Minnow (Pimephales promelas)	21 Days		500 μg as/L		Decrease	Decrease	Decrease in estradiol level in ovary in a dose response manner	Decrease in the estrogen level in vivo in a dose response manner in 1 species and 1 study. The level of testosterone is only decreasing in the ex vivo assay but not in plasma and is considered overall to be unaffected. VTG level in females decreased in 3 studies with the same species in a dose response manner. Although there are some deviations in the dose response these may be explained by the study design and dose spacing.	S
20		Estradiol level	Fathead Minnow (Pimephales promelas)	21 Days		500 μg as/L		Decrease	Decrease	Decrease in estradiol level in a dose response manner		
25		Testosterone level ex vivo	Fathead Minnow (Pimephales promelas)	21 Days		50 μg as/L		Decrease	Decrease	Decrease in testosterone level in testis		
26		Testosterone level	Fathead Minnow (Pimephales promelas)	21 Days		>1000 μg as/L		No effect	No effect	No effect in testosterone in vivo		
19		Vitellogenin (VTG) in females	Fathead Minnow (Pimephales promelas)	21 Days		1200 μg as/L		Decrease	Decrease	Decrease in VTG level at the highest tested concentration in 2 sexes and in a dose-response manner in one of the tests in which it was measured		
25	In vivo mechanistic	Vitellogenin (VTG) in females	Fathead Minnow (Pimephales promelas)	25 Days		50 μg as/L		Decrease	Decrease			
19		Vitellogenin (VTG) in males	Fathead Minnow (Pimephales promelas)	21 Days		>1000 μg as/L		No effect	No effect	No effect on the vitellogenin levels in males		
26												

Several *in vitro* assays were available from literature, ToxCast and other databases showing positive evidence for androgen antagonism and aromatase inhibition (inhibition of CYP19). In addition, a FSTRA and a 21-d assay (from literature) were available. In the 2 available FFLCTTs *in vivo* mechanistic parameters were also measured. Estradiol and testosterone were only measured in the 21-d assay. Decrease in the level of estradiol were observed in a dose response manner (500 and 1000 μg/L) both *ex vivo* and in plasma. A decrease in Testosterone was only observed *ex vivo* at the highest tested concentration.



御覧のように、この表は細かくて非常に見にくいものであるとは承知しています。これを見ていただくとどういふものかが大体お分かりいただけると思います。一貫性のあるパターン、そして全ての存在する情報を私たちは評価します。データセットの中で非常に豊かな情報が入っているものもあります。1つの方向に、あるいは別の方向に進むものもいろいろとデータが示されますので、多くのデータが入ることによって結果がまちまちであるために非常に評価は複雑となります。

これをまとめて申し上げますと、*in vitro*の試験の数がここにありますが、*in vitro*の試験で特に見ていただきたいのが、そのアロマトターゼ阻害剤で得られる情報です。アロマトターゼの阻害が増えているのが、幾つかのラインで認められます。また、それ以外にもアンドロゲン受容体に対する作用についても認められています。

さらに、今入手できる*in vivo*のデータから言えることといたしましては、エストラジオール、テストステロンについて測定が行われており、これらの減少が認められています。濃度依存的にエストラジオールの減少が、血漿でも卵巣でも認められています。テストステロンについても変化が認められますが、これは*ex vivo*のみであって、最も濃度が高い場合にのみに限定されています。それ以外にも幾つかのパラメータが入っていて、これが魚類のライフサイクル試験で検討されました。*In vivo*のデータであります、バイオマーカとしては非常によいビテロゲニンが使われています。次のスライドでお示するのが、より詳細なデータになります。

A CLOSER LOOK TO ENDOCRINE ACTIVITY THROUGH EAS-MODALITIES

Tested conc. µg/L	21-d assay	FSTRA	FFLCTT1
0	-	-	-
5	-		
7			-
9			-
10		-	
21			-
50	↓		
63			-
120		-	
188			-
500	↓		
558			↓
1000	↓		
1200		↓	

VITELLOGENIN (VTG)

VTG was measured in 3 studies and decrease was observed in all of them. The decrease observed is empirically supported by the dose response. Difference between studies can be explained by the study design and dose spacing.

The endocrine activity gives indication of activity through A and S modalities

ビテロゲニンのデータが、このスライドです。御覧のように、3つの試験でビテロゲニンを測定をし、減少が認められました。そして濃度反応的な変化が認められました。しかし、試験方法の違いがあります。試験濃度としては同じであったのになぜこのような差がついたのかという説明ですが、これは試験デザイン及び濃度の設定間隔によって説明がつくと考えられています。

そして非常に重要なのは、このいろいろな試験のいろいろな結果の背景、文脈を考えることです。この濃度の設定間隔などについて常に十分に理解をした上で、この影響について考慮する。なぜ違いが出たかを考えることが必要であると考えています。ただ、全体的に今入手できる情報から、ED作用について検討を行ってみますと、御覧のようにアンドロゲンとステロイド産生介在様式に影響があることが考えられます。アンドロゲン受容体を見てみますと、アロマトラーゼで何かが起きていることが分かります。また、ホルモンのレベルについても影響を受けていますし、ビテロゲニンのバイオマーカーについても影響を受けていることが分かります。

LINES OF EVIDENCE FOR EAS-MEDIATED ADVERSITY

Study ID Matrix	Effect classification	Effect target	Species	Duration of exposure	Duration unit	Route of administration	Lowest Effect dose	Dose unit	Effect direction	Observed effect (positive and negative)	Assessment of each line of evidence	Assessment on the integrated line of evidence	Modality
26	EATS-mediated	Male 2nd sex characteristics in males	Fathead Minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	21 Days	Days	Uptake from water	>1000 µg as/L		No effect	No effect	No effect in males SSC	Evidence for histological changes on gonads of both sexes in several studies with the same species. The effects were observed in a dose response manner and there is dose concordance for the majority of the evidence. When the dose concordance was not there, this was explained by the difference in study design and dose spacing. No effects on SSC and sex ratio	A.S
34		Sex ratio (Female biased)	Cyprinodon variegatus	100 Days	Days	Uptake from water	>550 µg as/L		No effect	No effect	No effect in sex ratio		
34			Fathead Minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	250 Days	Days	Uptake from water	>550 µg as/L		No effect	No effect			
19		Specific gonad histopathology (females)	Fathead Minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	21 Days	Days	Uptake from water	1200 µg as/L		Increase	Increase	Increased oocyte atresia at the highest tested concentration		
26		Specific gonad histopathology (males)	Fathead Minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	21 Days	Days	Uptake from water	1000 µg as/L		Increase	Increase	Increased prevalence of spermatozoa and distended seminiferous tubules at the highest tested concentration		
34		Specific gonad histopathology (males (interstitial cell hyperplasia/hypertrophy))	Fathead Minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	250 Days	Days	Uptake from water	60 µg as/L		Increase	Increase	Increase in interstitial cell hyperplasia/hypertrophy in a dose response manner		
34		Specific gonad histopathology	Fathead Minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	250 Days	Days	Uptake from water	550 µg as/L		Increase	Increase	Increase number of spermatozoa in testis in a dose response manner		
34		Specific gonad histopathology	Fathead Minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	250 Days	Days	Uptake from water	550 µg as/L		Decrease	Decrease	Decrease in yolk formation in females in dose response manner		
34		Specific gonad histopathology	Fathead Minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	250 Days	Days	Uptake from water	550 µg as/L		Decrease	Decrease	Decrease in post ovulatory follicles in dose response manner		
34		Specific gonad histopathology	Fathead Minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	250 Days	Days	Uptake from water	550 µg as/L		Decrease	Decrease	Decrease in mean ovarian stage score in dose response manner		
26	Systemic toxicity	Survival (fish)	Fathead Minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	21 Days	Days	Uptake from water	>1000 µg as/L		No effect	No effect	No mortality observed in adult fish	No evidence of systemic toxicity	N.A.
34			Fathead Minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	250 Days	Days	Uptake from water	>550 µg as/L		No effect	No effect	No mortality observed in adult fish		
34			Fathead Minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	250 Days	Days	Uptake from water	>550 µg as/L		No effect	No effect	No mortality observed in adult fish		
5		Larval survival	Cyprinodon variegatus	100 Days	Days	Uptake from water	>550 µg as/L		No effect	No effect	No effect on mortality in fish larvae		
34			Fathead Minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	35 Days	Days	Uptake from water	970 µg as/L		Decrease	Decrease observed in a dose response manner	Decrease observed in a dose response manner		
34			Fathead Minnow (<i>Pimephales promelas</i>)	250 Days	Days	Uptake from water	>550 µg as/L		No effect	No effect	No effect on mortality in fish larvae		
31		Mortality	Anas platyrhynchos (mallard duck)	20 weeks	Weeks	Oral	>1000 ppm		No effect	No effect	No mortality in the 2 avian spp tested		
37			Colinus virginianus (Bobwhite quail)	20 weeks	Weeks	Oral	>1000 ppm		No effect	No effect			
208		Cellular proliferation	Rat	10 Minutes	Minutes	Uptake from the medium	100		Decrease	Decrease	Decrease hepatocytes proliferation		
208		Cellular proliferation	Human	10 Minutes	Minutes	Uptake from the medium	100		Decrease	Decrease	Decrease hepatocytes proliferation		
3	Additional in vitro information	Agonist of human PXR receptor	Human HeLa cells stably transfected with hPXR			Uptake from the medium	10		Increase	Increase	Agonism of huma PXR receptor	N.A.	N.A.

Sex ratio and SSC were not impacted in the available FFLCTs. However, changes in the gonads were noted in all available studies where this was further investigated.



それでは、次のスライドですが、有害性についてどのような科学的根拠があるのか、この介在様式を見ている。この表を2つに分けて考えなければなりません。2つ目の部分は、次のスライドに入っています。なぜスライドを分けたかということですが、非常に大きなスライドだったからということも1つですが、同時にまず最初にこのEASを介したパラメーターがどのようなものであるかを強調したかったからです。常に文脈を考えた上で全身毒性を考えなければなりません。

Study ID Matrix	Effect classification	Effect target	Species	Duration of exposure	Duration unit	Lowest Effect dose	Dose unit	Effect direction	Observed effect (positive and negative)	Assessment of each line of evidence	Assessment on the integrated line of evidence	Modality
	Sensitive parameters	Hatching success	Cyprinodon variegatus	100	Days	290	µg as/L	Decrease	Decrease observed in a dose response manner	Hatchling success decrease in one of the spp tested	Decrease on a number of parameters. Particularly important a decrease in fecundity of fish observed in a dose response manner in different studies.	S
33			Fathead Minnow (Pimephales promelas)	35	days	>970	µg as/L	No effect	no effect			
34			Fathead Minnow (Pimephales promelas)	253	Days	>558	µg as/L	No effect	no effect			
34			Fathead Minnow (Pimephales promelas)	253	Days	>558	µg as/L	No effect	no effect			
33		Larval length	Fathead Minnow (Pimephales promelas)	35	days	970	µg as/L	Decrease	Decrease observed at the highest tested concentration	Decrease of the larval length		
34			Fathead Minnow (Pimephales promelas)	253	Days	>558	µg as/L	No effect	No effect	No effects observed in the length of adult fish		
19		Gonado-somatic index	Fathead Minnow (Pimephales promelas)	21	Days	1200	µg as/L	Increase	Increase observed at the highest tested concentration in both sexes	Increase in the gonad-somatic index in both sex		
26			Fathead Minnow (Pimephales promelas)	21	Days	500	µg as/L	Increase	Increase observed in a dose response manner in both sexes			
26		Fecundity	Fathead Minnow (Pimephales promelas)	21	Days	1200	µg as/L	Decrease	Decrease observed at the highest tested concentration	Effects on fecundity observed in a consistent manner in both of the spp tested and over time		
34			Fathead Minnow (Pimephales promelas)	21	Days	50	µg as/L	Decrease	Decrease observed in a dose response manner			
34			Fathead Minnow (Pimephales promelas)	253	Days	558	µg as/L	Decrease F0	Decrease observed at the highest tested concentration			
34			Fathead Minnow (Pimephales promelas)	253	Days	558	µg as/L	Decrease F1	Decrease observed at the highest tested concentration			
5			Cyprinodon variegatus	100	Days	150	µg as/L	Decrease	Decrease observed in a dose response manner			
19		Fertility	Fathead Minnow (Pimephales promelas)	21	Days	1200	µg as/L	Decrease	Decrease observed at the highest tested concentration	Decrease in fertility observed in a short term study. No effects in fertility observed in the long term studies.		
34			Fathead Minnow (Pimephales promelas)	253	Days	>558	µg as/L	No effect F0	No effect			
34			Fathead Minnow (Pimephales promelas)	253	Days	>558	µg as/L	No effect F1	No effect			
5		Survival of embryos	Cyprinodon variegatus	100	Days	290	µg as/L	Decrease F1	Decrease observed in a dose response manner	Decrease of embryo survival in the F1 in a dose-response manner		
5			Cyprinodon variegatus	100	Days	>550	µg as/L	No effect F0	No effect			

Sensitive parameters were also impacted. Particularly, in all the available studies and in 2 species a decrease in fecundity was observed in a dose response manner.

これは感受性パラメータを示した表となります。現実的に私たちが評価を行うときには、全ての有害性について考えます。感受性のあるパラメータも、信頼性のパラメータも全て合わせて検討を行います。そして、文脈に照らし合わせて全身毒性も考える必要があります。というのは、この全身毒性と同時に存在することが考えられるからです。この場合ですが、科学的根拠のサマリーになります。今お話ししたような信頼性のパラメータもありますが、この性比それから二次性徴については影響を受けなかったというのが、この入手可能なデータから結論づけられることです。しかしながら、生殖腺の変化について検査を行ってみた結果、変化が認められました。

A CLOSER LOOK AT THE EAS-MEDIATED ADVERSITY

Tested conc. µg/L	21-d assay		FSTRA		FFLCTT1	
	M	F	M	F	M	F
63					Interstitial cell hyperplasia and hypertrophy	-
120			-	-		
188					Interstitial cell hyperplasia and hypertrophy	-
500	-	-				
558					Interstitial cell hyperplasia and hypertrophy Increased spermatozoa in testis	Decrease yolk formation, decrease post-ovulatory follicles and decrease in mean ovarian stage scores
1000	Increased spermatozoa in testis	Oocytes atresia				
1200			-	Oocytes atresia		

GONAD HISTOPATHOLOGY

In all the studies where gonads histopathology were conducted, changes have been recorded.

Effects were seen in both males and females.

Effects were on the same type of observation and direction.

このスライドにはより詳細な情報を入れています。こちらは生殖腺の病理組織学的な検査のまとめとなります。生殖腺に対する影響が認められました。また、これは雌雄両方に認められた影響でした。また、この影響は、常に同じタイプの観察状況と、同じ方向性が認められました。精巣内精子の増加が、常に同じようなカテゴリーで観察されています。また次のステップを考えますと、最終的にはこのような有害性の関連性について、この物質について異なる作用機序を設定しなければならないことが言えます。



A CLOSER LOOK AT THE EAS-M ADVERSITY

Tested conc. µg/L	21-d assay	FSTRA	FFLCTT1	FFLCTT2
0	-	-	-	
120		-		
150				↓
188			-	
290				↓
500	↓			↓
550				
558			↓	
1000	↓			
1200		↓		

REPRODUCTION SUCCESS (FECUNDITY)

Decrease in fecundity was observed in all the studies and in 2 different species.

In the FFLCTT1 the decrease in fecundity was observed both in the F0 and F1 generation. In FFLCTT2, decrease in fecundity was observed in F0 and not assessed in F1.

より詳細な情報の、産卵数についてはこの表に示されています。先ほどもお話ししたように、これは私たちが持っているデータの全体像となります。これを見た上で幾つか考えなければなりません。これがEASの最初の解析結果となりますので、今後またいろいろな設問を考えていかなければなりません。

お話ししたように、ほかにも感受性のあるパラメータの情報もあります。EDの評価を行うときには、これらを合わせて検討を行います。ただこの場合は、スライドを作成する段階で2つに分けたというだけであり、一緒に考慮することが重要ですが、ただこのスライドの中で非常に重要なポイントとしては、御覧のように産卵数に対する影響は全体に認められますし、濃度依存的に認められます。ですから、産卵数の低下をほかの結果と合わせて見ることにより、産卵数、*in vivo*でも*in vitro*のメカニズムのデータにおいても、この病理組織に対する生殖腺の影響も、これは雄雌両方で認められましたので、何かがここで起きていることが分かります。

EAS-MODALITY: INITIAL ANALYSIS OF THE EVIDENCE

- **Is the dataset complete for the ED assessment in line with the ED GD?**

Yes - A test according to OECD TG 240 was not available. However, 2 FFLCTTs were available where all the parameters foreseen to be investigated in the OECD TG 240 were measured.

- **Has EATS-mediated adversity been observed?**

Yes - Overall, in all the available studies and in 2 species a decrease in fecundity was observed in a dose response manner. When assessed, this was accompanied by changes in gonads histopathology.

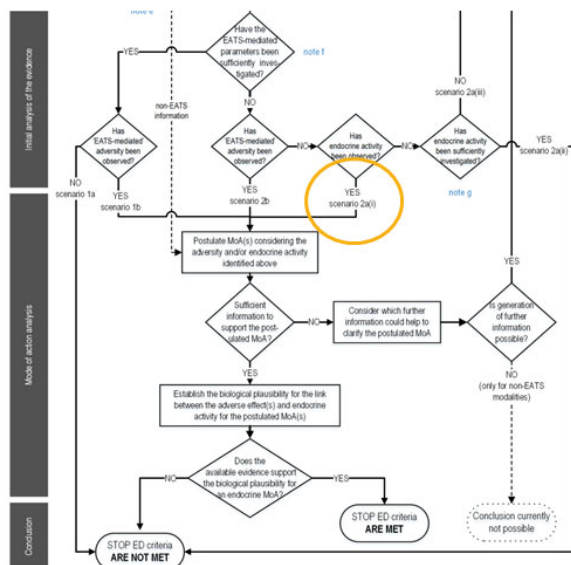
- **Has endocrine activity been sufficiently investigated?**

Yes - Endocrine activity was also observed *in-vitro* and *in-vivo*.

基本的に私たちが考えなければならないのは、データセットは完全なものなのかどうかということで、イエスです。このデータセットは完全だという場合に、要求されたものが今あるガイダンス文書の中には無いかもしれませんが、魚類のフルライフサイクル試験とで全て必要なパラメータが検討されて、測定されているので、この場合はデータセットは完全であると考えられます。メダカのTG240の確定試験結果はありませんが、完全にそろっていると考えられます。

また、有害性はどうか。EATSが介在する有害性は認められるかということで、イエスです。2種類の魚種で、濃度依存的に産卵数の低下が認められ、生殖腺の病理組織学的検査への影響もあり、内分泌活性も十分に検討されたという評価を行うことになります。

EAS-MODALITY: OUTCOME OF THE INITIAL ANALYSIS OF THE EVIDENCE



- Scenario 2a(i) applies in this case → **Postulate MoA(s)** to see if the available evidence supports that there is a biological plausible link between the adversity and the endocrine activity observed.
- If so, it can be concluded that the ED criteria are met.

Flowchart can be found in the ECHA/EFSA ED guidance (2018), Figure 1, page 13.



それが全てイエスということであれば、次のステップへ進むことになります。つまり作用機序を考えなければならないというのは、生物学的に可能性のある、関連性が有害性とそれから分子によって始まったイベント(Molecular Initiating Event)の間にあるということであれば、その関連性を考えなければなりません。この結果が陽性だとなれば、その物質は内分泌かく乱作用を持つと判断されます。

POSTULATE MOA(S)

Considering the observed endocrine activity and adversity, two MoA(s) can be postulated:

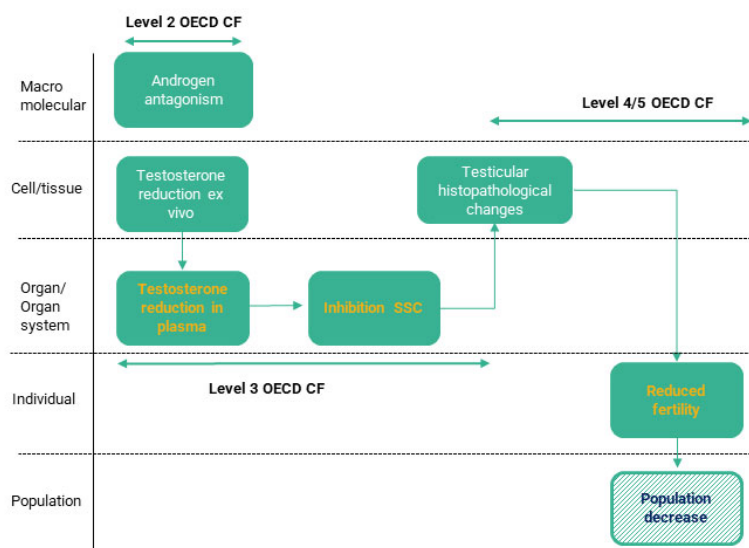
- Androgen antagonisms leading to reproductive failure, and
- Aromatase inhibition leading to reproductive failure

Further consultation, please see: [AOP wiki](#)



データによっては、1つ以上の作用機序を想定することができます。この場合は、2つの作用機序を仮定することができます。生殖機能不全につながるアンドロゲン拮抗性と、もう1つがアロマターゼ阻害による生殖機能の低下になります。また、AOP wikiのリンクがありますので、そちらも参照していただければと思います。ぜひそちらを参照してください。

MOA 1: ANDROGEN ANTAGONISMS LEADING TO REPRODUCTIVE FAILURE



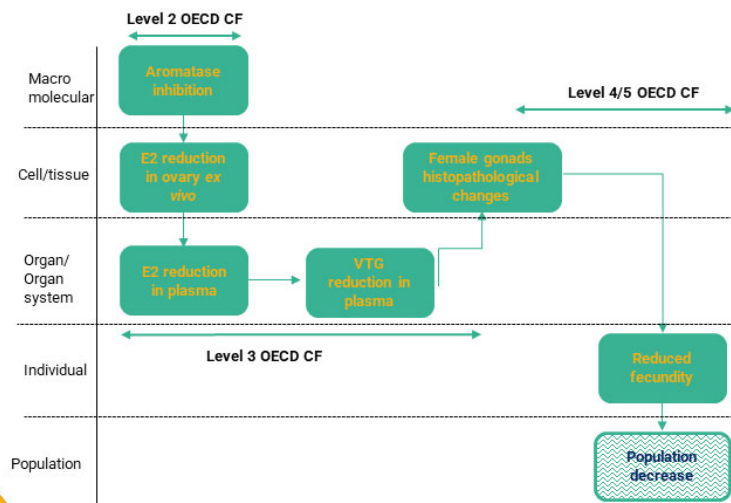
A MoA for androgen antagonism was postulated. However, this MoA is not completely supported by the available data.

No decrease in Testosterone was observed in vivo. No changes in male secondary sex characteristics were recorded as well as on fertility.

Therefore, the substance is not likely to be acting as androgen antagonist.

では、最初のMOA (Mode of action)、作用機序ですが、このフローチャートを見ていただきますと、こちらは私たちが今まで観察してきた入手可能なデータによって完全に裏づけられているわけではないという内容になっています。しかしながら、今まで分からなかったこと、変化、例えば白抜きで示されているところです。アンドロゲン拮抗作用、テストステロンの濃度低下、そして雄性の二次性徴の変化は見られなかったということが分かります。この作用機序が想定されましたが、十分な科学的根拠がないので、キーイベントの関連性というものをそこで構築することはできないという結論になります。したがって、この物質はこの作用機序では特にEDではないということになります。

MOA 2: AROMATASE INHIBITION LEADING TO REPRODUCTIVE FAILURE



Level of organization	Brief description of key event	Supporting evidence
MIE	Inhibition of aromatase	Several in vitro assays showing positive evidence
KE1	Decreased level of estradiol ex vivo in ovaries	Decrease observed in one 21-d assay with fish
KE2	Decreased level of estradiol in plasma	Decrease observed in one 21-d assay with fish
KE3	Decrease VTG level in plasma	Decrease observed in 2 level 3 studies and one FFLCTT
KE4	Change in female gonad histopathology	Change in gonad histopathology observed in 1 level 3 studies and one FFLCTT
AO	Decrease in fecundity	Decrease observed in 2 FFLCTTs and 2 level 3 studies

そして2つ目の作用機序になりますが、皆さんよく恐らく御存知だと思いますが、私が間違えていなければですが、非常に有名な阻害作用になります。これが生殖機能の不全につながるということになります。ここでのキーイベントがありますが、今現在入手可能な科学的根拠によってサポートされています。

MODE OF ACTION ANALYSIS FOR MOA 2

DOSE-RESPONSE AND TEMPORAL CONCORDANCE BETWEEN THE KEY EVENTS

Dose	KE1 decrease estradiol ex vivo	KE2 decrease estradiol in plasma	KE3 Decrease VTG level in plasma	KE4 Change in female gonad histopathology	AO Decrease fecundity
150					- 36 weeks (FFLCTT2)
188					
290					-36 weeks (FFLCTT2)
500			- 3 weeks (21-d assay)		-3 weeks (21 assay) -36 weeks (FFLCTT2)
558			- 36 weeks	+ 36 weeks	- 36 weeks (FFLCTT1)
1000	- (21 days)	- (21 days)	- 3 weeks(21-d assay)	+ 3 weeks (21-d assay)	- 3 weeks (21 assay)
1200			- 3 weeks (FSTRA)	+ 3 weeks (FSTRA)	- 3 weeks (FSTRA)

そして、作用機序の解析ですが、その解析について私たちがチェックしたのは、パラメータとファクターです。濃度反応と時間的な整合性になります。ほとんどのキーイベントが濃度でサポートされている。つまり関連性があるという結論になります。

MODE OF ACTION ANALYSIS FOR MOA 2

ESSENTIALITY, CONSISTENCY, ANALOGY AND SPECIFICITY OF THE EVIDENCE FOR THE ASSOCIATION OF THE KEs WITH THE ADVERSE EFFECT

Key event relationship					
	MIE to KE1	KE1 to KE2	KE2 to KE3	KE3 to KE4	KE4 to AO
Biological plausibility for the KERs	STRONG- the link between aromatase inhibition and estradiol level is supported by the available biological knowledge and available AOP	STRONG- The role of the gonad in the synthesis of estradiol is well known as part of the biochemistry of steroidogenesis	MODERATE-The role of estradiol in the regulation of the synthesis of hepatic VTG is well known. Therefore, it can be assumed that a decrease in estradiol also lead to a decrease of VTG in plasma	MODERATE-Based on the available knowledge, it is well known that a decrease in VTG may lead to decrease of yolk formation.	STRONG-The link between the observed changes in gonad histopathology and the decrease in fecundity is supported by the biological knowledge
Empirical support for the KERs	MODERATE-There is little direct support for dose-response concordance between in vitro and the KE1 in vivo.	STRONG-the decrease in estradiol level was observed as expected (i.e. decrease at 1000 ug/L ex vivo and at 500 and 1000 ug/L in plasma).	MODERATE-Although the decrease in estradiol and VTG levels were observed at the same concentration or in one case starting from lower concentration (50 ug/L), this may be explained by a number of factors (e.g., dose spacing in the different studies, higher variation of circulating VTG in plasma than of circulating steroids)	MODERATE-Histopathology changes were observed in almost all the available studies where it was measured. In some cases the changes were observed at the same concentrations as VTG. However, this may be explained by the different study designs in terms of dose spacing between the chosen concentrations	STRONG-Decrease in Fecundity was observed in all the studies at the same concentrations as gonad histopathology. However, this may be explained by the different study designs in terms of dose spacing between the chosen concentrations

これは、私は一番大事なスライドだと思っています。作用機序の解析では非常に重要だと考えています。それは、異なるキーイベントにおける科学的根拠の必須性ということになります。この表でみているのは、各ステップ、キーイベントの関係のステップに対して情報があります。生物学的なリンクがあるのかどうか、そして経験的な裏づけは何なのか、そして強い科学的根拠それから中程度の科学的根拠等に分かれていまして、その作用機序というのは十分にデータにサポートされているというふうに結論づけていくこととなります。

MODE OF ACTION ANALYSIS FOR MOA 2

ESSENTIALITY, CONSISTENCY, ANALOGY AND SPECIFICITY OF THE EVIDENCE FOR THE ASSOCIATION OF THE KEs WITH THE ADVERSE EFFECT

Key event relationship					
	MIE to KE1	KE1 to KE2	KE2 to KE3	KE3 to KE4	KE4 to AO
Essentiality	MODERATE- No data are available to support the assessment of essentiality. However, the available knowledge and available AOP support the essentiality of key events				
Consistency	The KEs have been observed in all the available studies, when measured. In addition, the 2 available FFLCTTs were done in 2 different species				
Analogy	Check whether the substance belong to a class of substance that are known to be aromatase inhibitor				
Specificity	There are no signs of systemic toxicity.				

また、ほかの重要な作用機序もチェックしていくことになります。例えば必須性、一貫性、類似性、特異性といった項目になりますが、これらの情報というのは作用機序をかなりサポートしている関係だと思えます。これはもう既に検証済みですし、同じような科学的根拠がハイライトされているということで一貫性があります、異なるキーイベント間に一貫性があります、そして、1つの試験だけではなくて複数の試験の中のパラメータで、その一貫性が認められます。そしてこの想定というのは、この場合は、これはある特定の化合物特有のアロマターゼ阻害剤として知られている物質群に属するかどうかなを確認することが必要だという結論が出ています。類似する化合物と比較したときに、作用機序ですが、この全身毒性というのは認められていませんが、しかしEDのパラメータそれ自体に関してはここにあるとおりです。

OUTCOME OF MOA 2: UNCERTAINTIES AND CONCLUSION

Identified uncertainty	Description of the uncertainty
Uncertainty 1	A clear dose and temporal concordance could not be established due to the study design of the available studies
Uncertainty 2	Many evidence were only available for 1 species or only investigated in one study (hormones levels)

OVERALL CONCLUSION

The overall biological plausibility is strong and it is supported by a moderate to strong empirical support. Therefore, **the substance meets the ED criteria for non-target organisms for the S-modality.**

この評価の結論ですが、生物学的な蓋然性が強いということで、それは科学的根拠によって裏づけられています。したがって、この物質はステロイド産生介在様式に関するEDクライテリアを満たしていることとなります。そのデータセットに基づいてその結論を出していますが、パラメータで欠落しているものもあります。その研究のレベルが全て網羅されていたわけではなく、また濃度反応等ですが、これも完璧ではありません。先ほど説明したとおりです。全ての影響を含めて考えなくてはなりません。それから、その濃度、時間的な位置というのは確認ができなかったということになります。この物質の結論というのはOverall conclusionに書いてあるとおりになります。



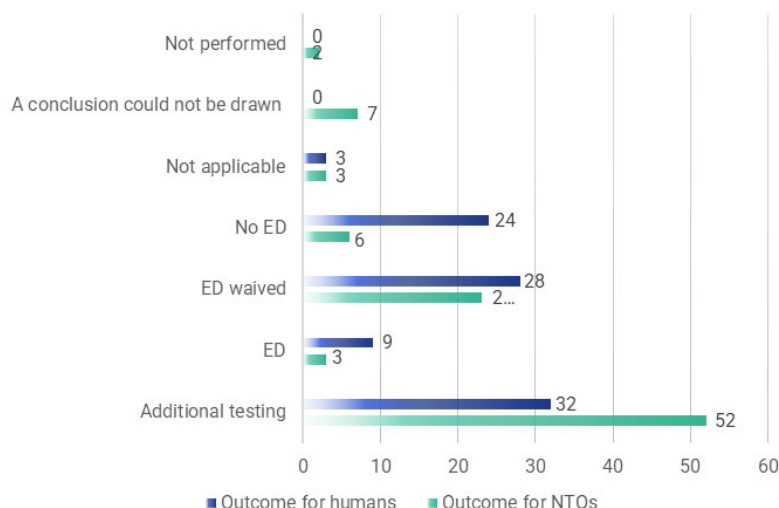
ED assessment in numbers



さて、最後になりますが、こちら、私たちが行った数字で見るED評価です。

ED ASSESSMENT IN NUMBERS

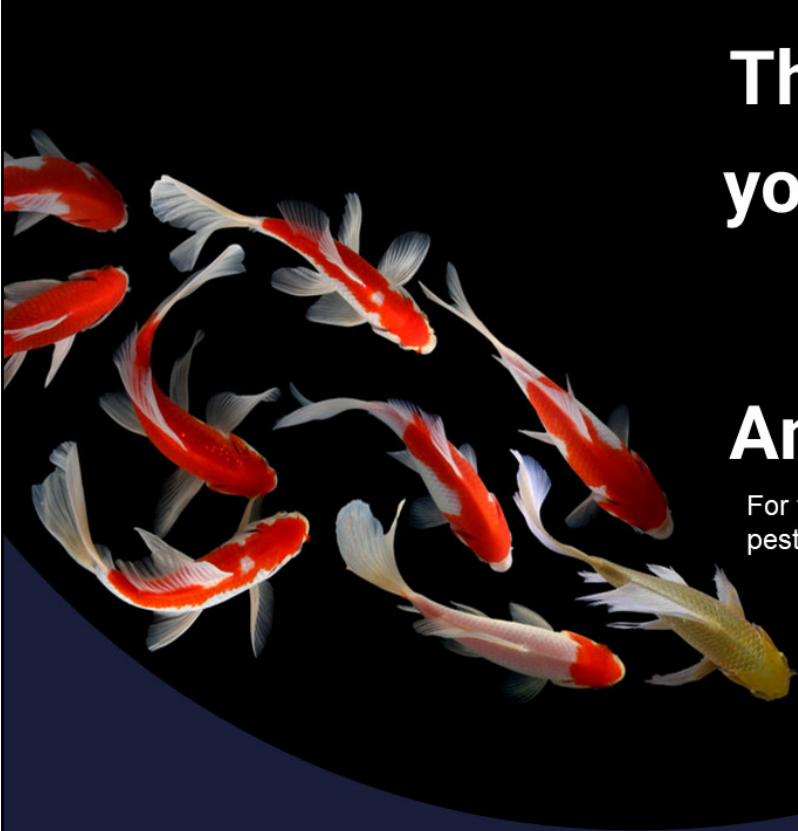
ED ASSESSMENT IN NUMBERS



- Nine a.s. could be classified as ED for humans.
- Only 3 out of 9 could be classified as ED for NTOs as well due to the population relevance of the adversity identified in mammals
- Additional data needed was the main outcome of the 1st ecotox assessments
- ED assessment waived when testing is not scientifically possible or other information suggests that ED is not a primary MoA.
- So far, for **40** a.s. the ED assessment was finalized, on-going for **29** and **21** a.s. are still under clock stop.
- Outcome of the ED assessment for A.S. is [publicly available](#).

現在の状況として、今まで行った評価に対しての分類をしていかなければならないのですが、物質、これはヒトに対するEDとして分類された9つの活性物質です。これはヒトに対するEDとして分類されています。そして、100物質が評価対象になっていますが、その中の9の活性物質のみが生物に対するEDとして分類されました。9物質中3物質のみが、これが野生哺乳類に対してのEDとしての分類ということになります。100物質の初期評価を行い、40の活性物質について完了しています。そして、この手続なのですが、物質はまだ情報が全て入手できておらず、そして欧州のクライテリアは法律で定義をしなければなりません。そうでないと、それを活性物質として定義できないということになります。

そして最後のポイントになりますが、全ての評価というのは公表されるということです。これが非常に有益な点だと思います。それは一般にも公開されますし、世界にも公表されます。そして、どこからでもリンクからその結果を見ていただくことができることになっています。



Thank you for your attention!

Any question?

For future contact:
pesticides.peerreview@efsa.europa.eu



これが私の最後のスライドになります。少し私たちが行っていることを御理解いただけたのではないかと思います。非常に複雑な内容になっていますが、恐らく重要な内容をそこから見出していただければと思います。データセットが管理されているのかどうか、そういったことも見ながら、そのガイダンス文書も見ていただければと思います。非常に読みやすいですし、かなり完備されていると思いますし、非常に有益だと思います。ベースラインとしてはいい文書ではないかと思っています。ED評価に御関心があれば非常に有用だと思います。

何か御質問があれば、これから御質問をお受けしたいと思います。もし何か個別に御質問があれば、将来ぜひ私たちにコンタクトしていただければと思います。メールアドレスがこちらに書いてありますので、事務局の皆様のほうから私たちに連絡をしていただければと思います。そして、フィードバック等についてもぜひ御提供いただければと思います。

御清聴大変にありがとうございました。何か御質問があれば、お受けしたいと思います。

STAY CONNECTED

SUBSCRIBE TO

efsa.europa.eu/en/news/newsletters
efsa.europa.eu/en/rss
[Careers.efsa.europa.eu](https://careers.efsa.europa.eu) – job alerts



LISTEN TO OUR PODCAST

Science on the Menu – Spotify, Apple Podcast and YouTube



FOLLOW US ON TWITTER

[@efsa_eu](https://twitter.com/efsa_eu) [@methods_efsa](https://twitter.com/methods_efsa)
[@plants_efsa](https://twitter.com/plants_efsa) [@animals_efsa](https://twitter.com/animals_efsa)



FOLLOW US ON LINKEDIN

[Linkedin.com/company/efsa](https://www.linkedin.com/company/efsa)



FOLLOW US ON INSTAGRAM

[@one_healthenv_eu](https://www.instagram.com/one_healthenv_eu)



CONTACT US

efsa.europa.eu/en/contact/askefsa

