

A historical perspective and US approach to screening and testing of chemicals for endocrine disruption

Leslie W. Touart, PhD

Equiparent Consulting

EDC Tokyo Seminar

21 February 2020

1

化学物質の内分泌かく乱作用の スクリーニング及び試験に関する 歴史的経緯と米国の取り組み

Leslie W. Touart, PhD

Equiparent Consulting

EDC 東京セミナー

2020年2月21日

2

Overview

- Brief history of the endocrine disruption issue
- EDSTAC and development of EDSP in US
- Ecotoxicity assays in EDSP
- Initial EDSP screening results
- Future directions

3

概要

- 化学物質の内分泌かく乱作用問題の歴史を手短に
- 米国における内分泌かく乱化学物質スクリーニング及び試験法諮問委員会(EDSTAC)とその後の内分泌かく乱化学物質スクリーニングプログラム(EDSP)への展開
- EDSPにおける生態毒性試験法
- EDSP 初期スクリーニング結果
- 今後の方向性

4

Endocrine Disruption Issue Emerges

- Evidence that synthetic chemicals can mimic or otherwise interfere with natural hormones has existed for half a century (Bitman *et al.* 1968; Bitman and Cecil 1970; Nelson *et al.* 1978; McLachlan 1980; Hertz 1985).
- Early attention was given to estrogen mimics, but it became apparent that the homeostatic function of the endocrine system can be disrupted at many points.

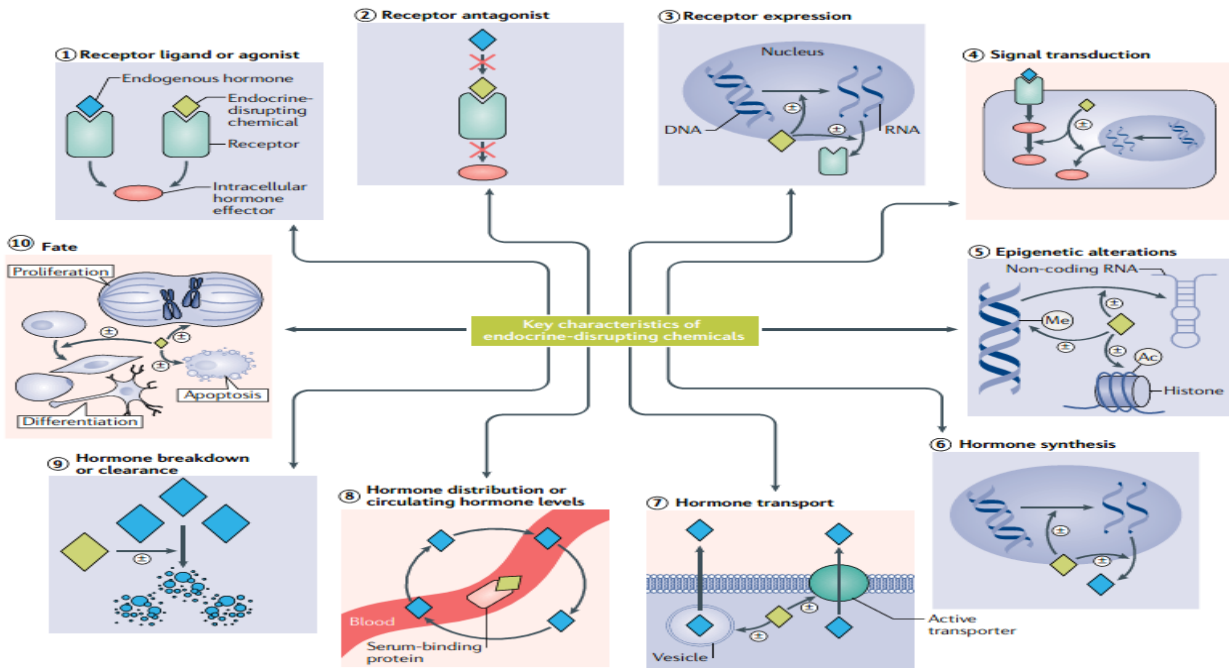
5

化学物質の内分泌かく乱作用問題の出現

- 合成化学物質が天然ホルモンに対して模倣的にあるいは妨害的に作用する可能性を示す科学的根拠は、既に半世紀前から存在していた (Bitman *et al.* 1968; Bitman and Cecil 1970; Nelson *et al.* 1978; McLachlan 1980; Hertz 1985)。
- 初期の注目は女性ホルモン(エストロゲン)模倣物質によせられたが、内分泌系の恒常的機能が多くの作用点でかく乱を受ける可能性が明らかとなった。

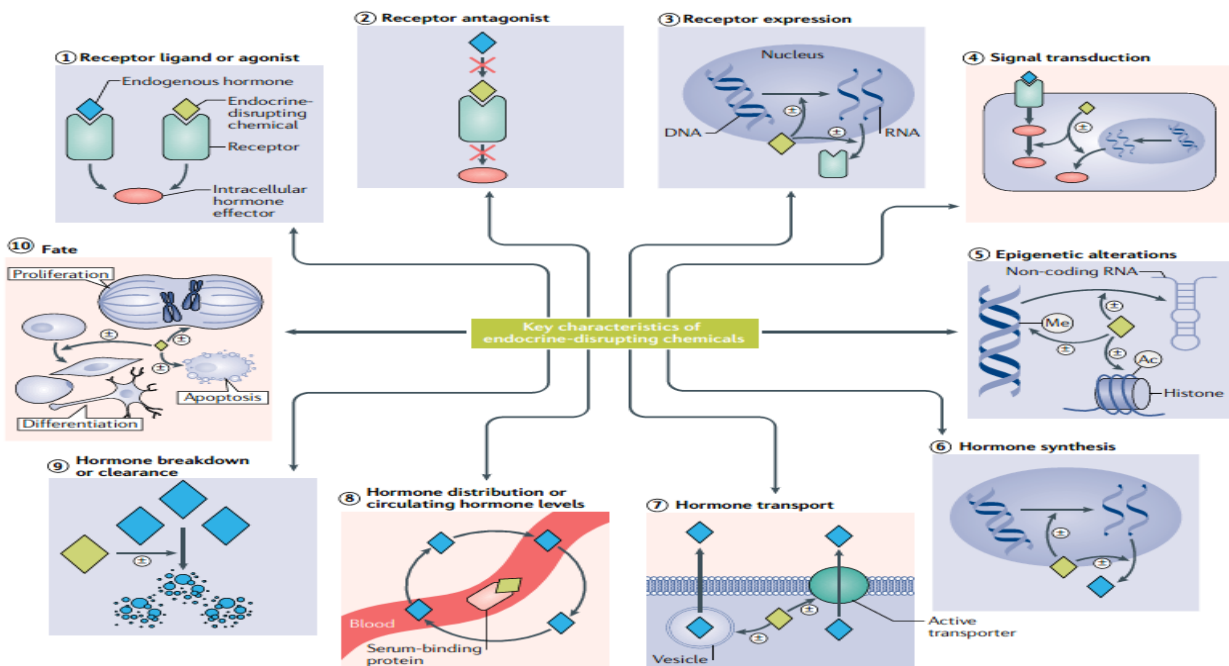
6

Key Characteristics of Endocrine Disrupting Chemicals



From: La Merrill, M.A., Vandenberg, L.N., Smith, M.T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H.B., Guyton, K.Z., Kortenkamp, A., Cogliano, V.J., Woodruff, T.J. and Rieswijk, L., 2019. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nature Reviews Endocrinology*, pp.1-13.

内分泌かく乱化学物質の主な特徴



出典: La Merrill, M.A., Vandenberg, L.N., Smith, M.T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H.B., Guyton, K.Z., Kortenkamp, A., Cogliano, V.J., Woodruff, T.J. and Rieswijk, L., 2019. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nature Reviews Endocrinology*, pp.1-13.

In 1972, the U.S. and Canada created the first “Great Lakes Quality Agreement” pledging to clean up and protect the Great Lakes Ecosystem.



In the late 1980's after evidence of human and wildlife health impacts emerged, the Canada/US International Joint Commission (IJC) requested a report on the state of the environment of the entire Great Lakes ecosystem which brought a new investigator to the issue – Theo Colborn.



9

1972年、米国及びカナダが、五大湖生態系の浄化及び保全を誓約した初の「五大湖水質協定」を作成した。



1980年代後半にヒト及び野生生物への健康影響を示す科学的根拠が顕在化した後、カナダ/米国の国際共同委員会 (IJC)が五大湖生態系全体の環境の現状に関する報告を求めた。このことが、この課題に関する新たな研究者をもたらした。
– Theo Colbornである。



10

Adverse health effects reported in fish and wildlife in the Great Lakes

- Obvious reproductive impairment or loss of fertility in many taxa;
- Eggshell thinning in birds, a disturbance of endocrine-controlled calcium metabolism;
- Metabolic changes that led to wasting and early death even before chicks hatched or fry could swim up;
- Obvious birth defects such as crossed bills and clubbed feet;
- Abnormal thyroid and male and female sex glands in almost all animals examined;
- Abnormal thyroid hormone production in all fish and birds studied;
- Behavioral changes in birds, such as lack of parenting, nest inattentiveness, males forming fraternities rather than establishing territories and attempting to mate, and female/female pairing;
- Immune suppression, evidenced by increased rates of internal and external parasitism; and
- Transgenerational exposure, where the maternal animals were passing the persistent organochlorine chemicals in their bodies to their offspring before they were born, through their blood *in utero* in mammals, or with fish and birds through the liver to their eggs before they were laid.

11

五大湖の魚類及び野生生物について報告されている健康に対する悪影響

- 多くの生物分類群において顕著な生殖不全又は繁殖力喪失；
- 鳥類での卵殻厚の薄化、内分泌系により調節を受けているカルシウム代謝へのかく乱；
- 雛鳥が孵化する前や稚魚が遊泳する前に減耗や死を引き起こす代謝変化；
- 嘴の交差、肢の彎曲等の顕著な先天性欠損症；
- ほぼすべての調査動物における甲状腺及び雌雄生殖腺の異常；
- 研究対象の魚類及び鳥類のすべてにおいて甲状腺ホルモン産生の異常；
- 鳥類での親行動の消失、営巣意欲低下、縄張りをもたず交尾もせず群をなす雄、雌同士のつがい等の行動異常；
- 免疫抑制、体内及び体外における寄生虫寄生率の上昇が証拠、そして；
- 経世代的ばく露、母動物が体内の残留性有機塩素系化学物質を子宮内血液を経由して出産前の仔動物に移行、魚類や鳥類においては肝臓経由で産卵前の卵に移行

12

A Little Bit of History

- 1991 Wingspread Conference --
Chemically-Induced Alterations
in Sexual Development: The
Wildlife/Human Connection
- 1994 National Academy of Science
forms Endocrine Modulators
Panel
- 1996 "Our Stolen Future" published
by Theo Colborn and
colleagues to sensitize the
general public



13

もう少しだけ歴史を

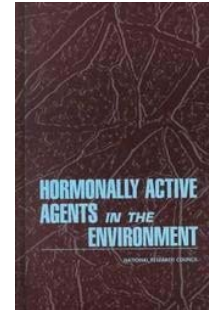
- 1991 ウィングスプレッド会議 — 化学物質が
引き起こす性発達上の変化: 野生生物とヒ
トとのつながり
- 1994 米国科学アカデミー(NAS)内に内分泌モ
ジュレーターに関する委員会を結成
- 1996一般市民に意識させるためにTheo
Colbornらによる「奪われし未来」が出版
された



14

A Little More History

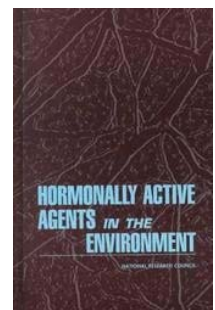
- 1996 Endocrine Disruptors Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC)
- 1996 Weybridge workshop, report on impact of ED on human health and the environment
- 1998 EDSTAC Committee issues its Final Report (August) and validation begins
- 1999 NAS releases report "Hormonally Active agents in the Environment" (August)
- 2009 ECETOC publishes guidance for evaluating ED effects and weight of evidence approaches
- 2009 Initial list of 67 chemicals for screening in US



15

もう少しだけ歴史を

- 1996 内分泌かく乱化学物質スクリーニング及び試験法諮問委員会(EDSTAC)
- 1996 ウエイブリッジワークショップ、EDがヒト健康及び環境に及ぼす影響に関する報告
- 1998 EDSTAC 最終報告書を編集 (8月) し、バリデーション開始
- 1999 NAS が報告書「ホルモン活性を有する環境中物質」を公表
- 2000 欧州化学物質生態毒性及び毒性センタ(ECETOC)が、ED影響評価と証拠の重み付け(WoE)アプローチのためのガイダンスを公表
- 2009 米国においてスクリーニング対象67化学物質初期リスト



16

Wildlife - Human Connection



Canary in the coal mine



Intelligent Aquatic
Biomonitoring System (iABS)

17



炭鉱中のカナリア



インテリジェント水生
バイオモニタリングシステム (iABS)

18

EPA's Statutory Authority

Food Quality Protection Act (FQPA) August 3, 1996

Amended the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FFDCA)

Requires EPA to develop a screening program (EDSP)

*“develop a screening program, using appropriate **validated** test systems and other scientifically relevant information, to determine whether certain substances may have an effect in humans that is similar to an effect produced by a naturally occurring estrogen, or other such endocrine effect as the Administrator may designate.”*

19

米国環境保護庁(EPA)の法律上の権限

食品品質保護法(FQPA) 1996年8月3日

連邦食品・医薬品・化粧品法(FFDCA)の改正

EPAに対しスクリーニングプログラム (EDSP)の開発を求める

*「天然エストロゲンによる影響に類似した何らかの影響又は **EPA長官が指定するその他の内分泌影響を、ある物質がヒトに及ぼすかかどうかを判断するために、適切に検証された試験系及び他の科学的関連知見を用いたスクリーニングプログラムを開発せよ**」*

20

EPA's Statutory Authority

Amendments to the Safe Drinking Water Act (SDWA)

“the Administrator may provide for testing under the screening program ... any other substance that may be found in sources of drinking water if the Administrator determines that a substantial population may be exposed to such substance.”

21

米国環境保護庁の法律上の権限

飲料水安全法(SDWA)の改正

「ヒト集団が相当な範囲でばく露しているとEPA長官が判断した場合は、飲料水源中に見出される化学物質についてEPA長官はスクリーニングプログラムのもとで試験の実施を定めることができる。」

22

EDSTAC describes an **endocrine disruptor** as

“an exogenous chemical substance or mixture that alters the **structure or function(s)** of the endocrine system and causes adverse effects at the level of the organism, its progeny, the populations, or subpopulations of organisms, based on scientific principles, data, weight-of-evidence, and the precautionary principle.”

EDSTACは内分泌かく乱化学物質を次のように記載

「科学的な原則、データ、証拠の重み付け及び予防原則に基づき、内分泌系の構造又は機能を改変し、生物の個体、子孫、個体群、準個体群のレベルで悪影響を引き起こす外因性の化学物質または混合物。」

Screening battery considerations

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

25

スクリーニングバッテリーの考え方

内分泌系が調節するプロセスへの潜在的かく乱を効率的に検出することが目的であるのなら、内分泌系の複雑な相互作用性を考慮すれば、単なる試験管内試験(*in vitro* 試験)による性ステロイド活性よりもむしろ、明確な活性(例えば、生育、発達、生殖プロセス改変能)を対象に化学物質のスクリーニングを行うべきことが明らかである。

26

Endocrine Disruptor Screening Program

Established following recommendations of:

The Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) of 1996-1998

Findings:

Include androgen and thyroid hormone systems, in addition to estrogen.

Include fish and other wildlife, in addition to human health.

Include commercial chemicals, and other environmental contaminants, in addition to pesticides.

27

内分泌かく乱化学物質スクリーニングプログラム

次のような勧告を策定

1996-1998年の内分泌かく乱化学物質スクリーニング及び試験法諮問委員会(EDSTAC)

所見(又は、見解)の対象:

エストロゲン(E)に加え、アンドロゲン(A)及び甲状腺ホルモン系(T)を含める。

ヒト健康に加え、魚類等の野生生物を含める。

農薬に加え、商業用化学物質及びその他の環境汚染物質を含める。

28

Proposed screening battery

- Designed to ensure detection of EAT hormonal systems interaction
- Fulfills EDSTAC recommendation that a range of taxonomic groups be included
- Includes sufficient diversity of endpoints to maximize sensitivity and minimize false negatives
- Emphasizes apical assays to provide more comprehensive assessment
- Meets overall objective of detecting potential endocrine-mediated effects regardless of MOA

29

提案されたスクリーニングバッテリー

- EATホルモン系相互作用の検出を確実にする設計
- 広範な生物分類群を取り込んだEDSTAC勧告を満たす
- 検出感度を最大限に引き出し、偽陰性を最小限にするに足りる広範なエンドポイントの取り込み
- より包括的評価を提供するような明確な試験法を重要視
- 作用機序(MOA)に関わりなく潜在的内分泌関連影響を検出するという本質的目的に合致する

30

FIFRA Scientific Advisory Panel review of the recommended Tier 1 screening battery (3/2008): Conclusions

- Chemicals testing positive in the Tier 1 battery would be identified as potential E, A, and T active substances
- The ability to identify EAS is enhanced because the battery provides adequate replication and redundancy
- The inclusion of the amphibian metamorphosis assay and fish short-term reproduction assay are important to detect EAS that may operate by mechanisms yet to be discovered
- The 15-day adult male assay is not an appropriate substitute for the rat pubertal assays

31

FIFRA 科学諮問委員会によるTier 1 スクリーニングバッテリー勧告へのレビュー(3/2008): 結論

- Tier 1バッテリーにおいて陽性を示す物質が、潜在的E、A及びT 活性物質として同定されることになる
- バッテリーは適切な反復性や重複性を提供するので、内分泌活性化学物質(EAS)の同定能力が強化される
- 両生類変態試験及び魚類短期繁殖試験を取り込んだことは、未知の機序で作動するEASを検出する上で重要である
- 15日間成熟雄ラット試験は、ラット思春期試験の適切な代替とはならない

32

- Multiple assays required to comprehensively screen E, A, and T hormone systems
- *In vitro* assays good for well understood mechanisms (*e.g.*, receptor binding)
- *In vivo* assays with intact HPG/HPT axes good for efficiently screening complex processes
- Multiple taxa and MOA endpoints provide range of metabolism and needed corroboration
- Complete battery needed to support WOE finding of low or no potential for EAT activity

33

- E、A及びTホルモン系を包括的にスクリーニングするために必要な複数試験
- よく知られたメカニズム (例えば、受容体結合) に適する *in vitro* 試験
- 複雑なプロセスの効率的なスクリーニングに適する、無処置の視床下部-下垂体-生殖腺(HPG)軸/視床下部-下垂体-甲状腺(HPT)軸を対象とした生物試験(*in vivo* 試験)
- 複数の生物分類群及びMOAエンドポイントが代謝の範囲及び必要な証拠を提供する
- EAT活性が低いまたは無いとするWOE知見を裏付けるために必要となるバッテリー全体

34

Endocrine Disruptor Screening Program

Uses a Tiered Approach

Tier 1

In vitro and *in vivo* screens to detect the potential to interact with endocrine system

Tier 2

Definitive organism tests to provide information for hazard assessment

35

内分泌かく乱化学物質スクリーニングプログラム

段階的取り組みを用いている

Tier 1

内分泌系に作用する潜在的な能力を検出するための*in vitro*及び*in vivo*スクリーニング試験法

Tier 2

ハザード評価のための情報を提供する確定生物試験

36

Tier 1 – What it is

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

(EDSTAC 1998)

37

Tier 1 –該当範囲

「Tier 1 screening(T1S)の最終目的は、エストロゲン、アンドロゲン又は甲状腺 (EAT) ホルモン系に作用することが可能な化学物質又は混合物を検出することである。」

(EDSTAC 1998)

38

Tier 1 – What it is not

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

(EDSTAC 1998)

39

Tier 1 –該当範囲外

「T1Sの目的は、用量反応関係の決定、作用機序の確定又はその化学物質の生殖・発達の悪影響を決定することではない...」

(EDSTAC 1998)

40

US EPA Tier 1 Screening Battery

http://www.epa.gov/ocspp/pubs/frs/publications/Test_Guidelines/series890.htm

Tier 1 Assay	Guideline
Estrogen Receptor Binding	890.1250
Estrogen Receptor Transactivation	890.1300/OECD 455
Androgen Receptor Binding	890.1150
Aromatase	890.1200
Steroidogenesis	890.1550/OECD 456
Uterotrophic	890.1600/OECD 440
Hershberger	890.1400/OECD 441
Male Pubertal	890.1500
Female Pubertal	890.1450
Fish Short-Term Reproduction	890.1350/OECD 229
Amphibian Metamorphosis	890.1100/OECD 231

41

US EPA Tier 1 スクリーニングバッテリー

http://www.epa.gov/ocspp/pubs/frs/publications/Test_Guidelines/series890.htm

Tier 1試験	ガイドライン
エストロゲン受容体結合	890.1250
エストロゲン受容体転写活性化	890.1300/OECD 455
アンドロゲン受容体結合	890.1150
アロマターゼ	890.1200
ステロイド産生	890.1550/OECD 456
子宮肥大	890.1600/OECD 440
ハーシュバーガー	890.1400/OECD 441
雄思春期	890.1500
雌思春期	890.1450
魚類短期繁殖	890.1350/OECD 229
両生類変態	890.1100/OECD 231

42

Possible Modes of Action Evaluated by the Screens

Screening Assays	Modes of Action							
	Receptor Binding				Steroidogenesis		HPG ³ Axis	HPT ³ Axis
	E ²	Anti-E	A ²	Anti-A	E ²	A ²		
<i>In vitro</i>								
ER Binding ¹	■	■ ⁴						
ERα Transcriptional Activation	■							
AR Binding ¹			■	■				
Steroidogenesis H295R					■	■		
Aromatase Recombinant					■			
<i>In vivo</i>								
Uterotrophic	■							
Hershberger			■	■		■		
Pubertal Male			■	■		■	■	■
Pubertal Female	■	■ ⁴			■		■	■
Amphibian Metamorphosis							✓	■
Fish Short-term Reproduction (male & female)	■	■ ⁴	■	■	■	■	■	✓

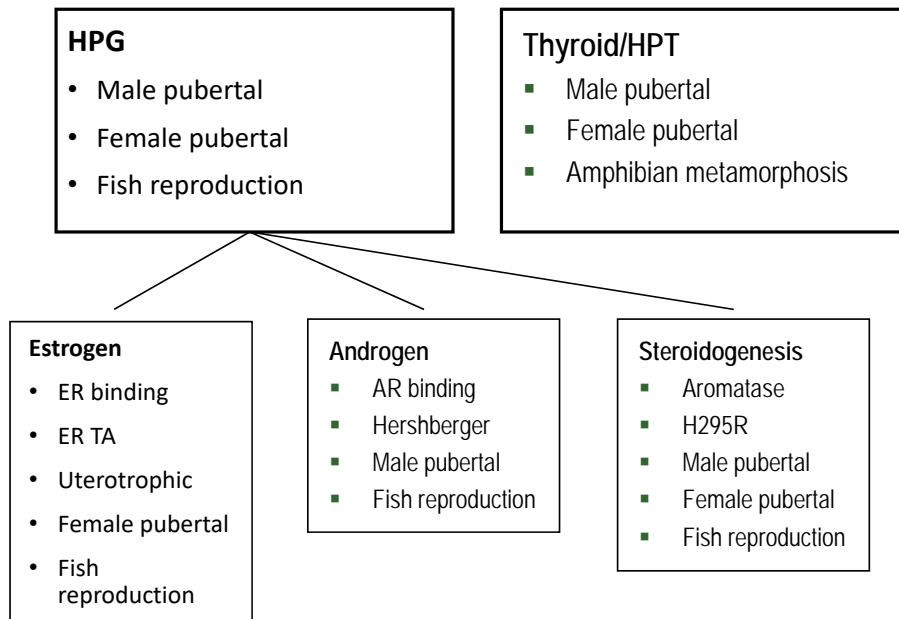
43

スクリーニングによって評価され得る作用機序

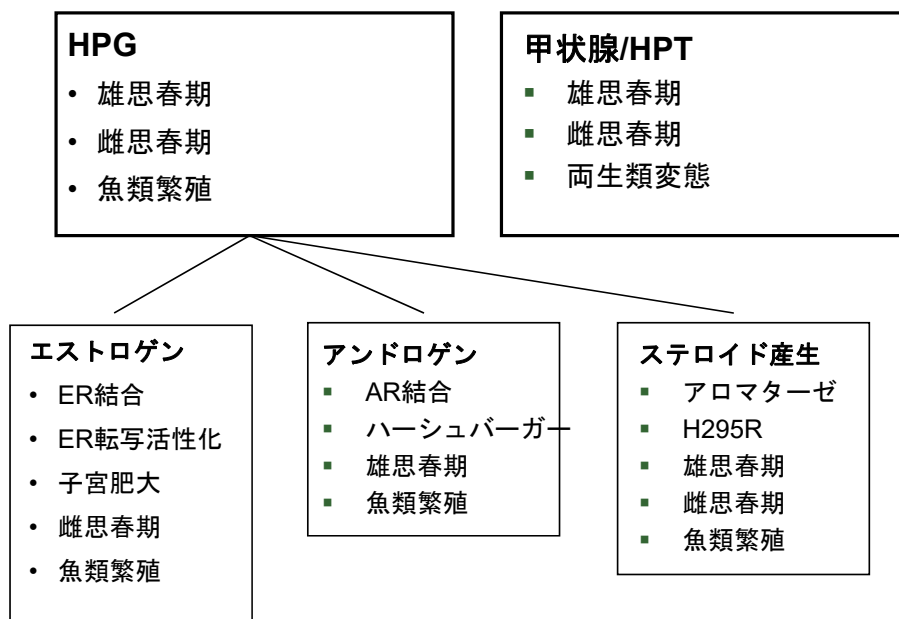
Screening Assays	Modes of Action							
	Receptor Binding				Steroidogenesis		HPG ³ Axis	HPT ³ Axis
	E ²	Anti-E	A ²	Anti-A	E ²	A ²		
<i>In vitro</i>								
ER Binding ¹	■	■ ⁴						
ERα Transcriptional Activation	■							
AR Binding ¹			■	■				
Steroidogenesis H295R					■	■		
Aromatase Recombinant					■			
<i>In vivo</i>								
Uterotrophic	■							
Hershberger			■	■		■		
Pubertal Male			■	■		■	■	■
Pubertal Female	■	■ ⁴			■		■	■
Amphibian Metamorphosis							✓	■
Fish Short-term Reproduction (male & female)	■	■ ⁴	■	■	■	■	■	✓

44

Modalities



作用様式



Fish Short-term Reproduction Assay

Endocrine-related endpoints

- Fecundity (egg production)
- Fertilization success
- Secondary sex characteristics
 - number, size, and location of nuptial tubercles
 - coloring, pattern, body shape
- Vitellogenin
- Gonadal/somatic index (gonad/body weight)
- Gonadal histology
- (Estradiol and testosterone recommended)

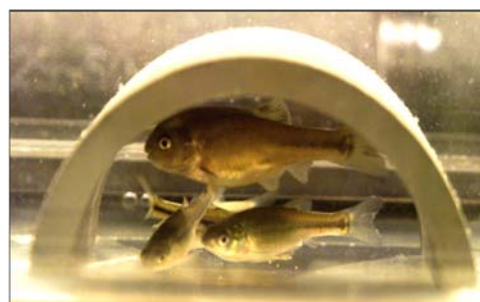


47

魚類短期繁殖試験

内分泌系関連エンドポイント

- 受胎性 (産卵数)
- 受精率
- 二次性徴
 - 繁殖結節の数、大きさ、部位
 - 色、様式、体形
- ビテロゲニン
- 生殖腺体指数 (生殖腺重量/体重)
- 生殖腺組織学
- (エストラジオール及びテストステロンの測定を推奨)



48

Amphibian Metamorphosis Assay

- Detect chemicals interfering with thyroid hormone (HPT) axis
- Not a frog assay rather a thyroid assay
- Initiated with tadpoles at onset thyroid function
- 21 days exposure
- Major endpoints:
 - developmental stage
 - thyroid histology
 - hind limb length



49

両生類変態試験

- 甲状腺ホルモン (HPT) 軸に作用する化学物質を検出する
- カエルための試験というよりも甲状腺のための試験
- 甲状腺機能が始動した幼生を用いて試験開始
- 21日間ばく露
- 主なエンドポイント:
 - 発達段階
 - 甲状腺組織学
 - 後肢長



50

Endocrine Disruptor Screening Program Initial List (EDSP List 1)

67 Chemicals Selected for Initial Screening

58 Pesticide Active Ingredients

9 High Production Volume (HPV) Chemicals that were also Pesticide Inerts

FR Notice April 15, 2009

Not a list of “known” or “likely” endocrine disruptors

Based on potential human exposure

Pesticide Active Ingredients with food, water, residential, occupational exposure, or exposure through multiple routes

HPV Pesticide Inerts

Human and eco biomonitoring

Water and air monitoring

51

内分泌かく乱化学物質スクリーニングプログラム 初期リスト(EDSP List 1)

初期スクリーニングで選定された67化学物質

58農薬活性成分

9 農薬不活性成分を含む高生産量(HPV) 化学物質

2009年4月15日 連邦官報

「既に知られた」又は「おそらくそう思われる」内分泌かく乱化学物質のリストではない

ヒトばく露の可能性に基づく

食品、水、住居、職業からのばく露、あるいは複数の経路からのばく露による農薬活性成分

HPV 農薬不活性成分

ヒト及び生態バイオモニタリング

水及び大気モニタリング

52

Endocrine Disruptor Screening Program Initial List (EDSP List 1)

- **Approximately 750 Test Orders issued to:**
 - Registrants of the 58 pesticide active ingredients
 - Manufacturers and importers of the 9 inert ingredients
- 15 of the 67 chemicals voluntarily canceled their pesticide registrations (actives) or opted out of pesticide market (inerts)
- Approximately 500 studies were received and reviewed for the 52 chemicals remaining in List 1

53

内分泌かく乱化学物質スクリーニングプログラム 初期リスト(EDSP List 1)

- **約750件の試験命令の対象者:**
 - 58農薬活性成分の登録業者
 - 9不活性成分の製造業者及び輸入業者
- 67化学物質の中の15化学物質については自主的な農薬登録抹消(活性成分)又は農薬市場からの撤退(不活性成分)
- List 1に残った52化学物質を対象としたに約500件の試験結果が受理され、レビューされた

54

Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) Tier 1 Assessments

- Of the 52 chemicals evaluated, there was no evidence for potential interaction with any of the endocrine pathways for 20 chemicals
- For 14 chemicals that showed potential interaction with one or more pathways, EPA determined it has enough information to conclude that they do not pose risks.
- Of the remaining 18 chemicals, all 18 showed potential interaction with the thyroid pathway, 17 of them with the androgen pathway, and 14 also potentially interacted with the estrogen pathway.

55

内分泌かく乱化学物質スクリーニングプログラム (EDSP) Tier 1評価

- 評価対象52化学物質の中の20化学物質については、どのような内分泌経路への潜在的作用を示す科学的根拠がなかった。
- ひとつ以上の潜在的作用を示した14化学物質については、EPAはリスクを引き起こさないと結論付けるのに十分な情報があると判断した。
- 残る18化学物質中、全18化学物質で甲状腺経路への、17化学物質でアンドロゲン経路への、そして14化学物質でエストロゲン経路への潜在的作用が示された。

56

Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) Tier 1 Assessments: Additional (Tier 2 assays) Required

- A comparative thyroid assay on four chemicals that showed interaction with the thyroid pathway in mammals.
- A medaka one-generation reproductive test (MEOGRT) on 13 chemicals that showed interaction with the estrogen and/or androgen pathways in wildlife.
- A larval amphibian growth and development assay (LAGDA) on five chemicals that showed interaction with the thyroid pathway in wildlife.

57

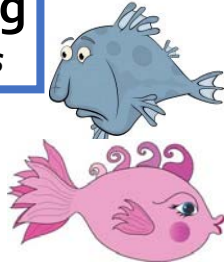
内分泌かく乱化学物質スクリーニングプログラム (EDSP) Tier 1 評価: 追加 (Tier 2試験) 要求

- 哺乳類の甲状腺経路への作用が示された4物質については、比較可能な甲状腺試験。
- 野生生物のエストロゲン及び/又はアンドロゲン経路への作用が示された13物質についてはメダカ拡張1世代繁殖試験 (MEOGRT)。
- 野生生物の甲状腺経路への作用が示された5物質については幼生期両生類成長発達試験 (LAGDA)。

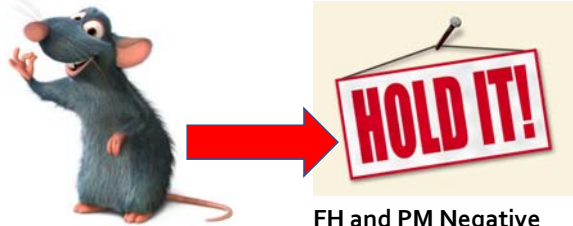
58

Tier 1 Screening Gatekeeper Assays

Fathead minnow
Primary assay for SIS, E, A



Pubertal male - Primary assay for T, A anti-A

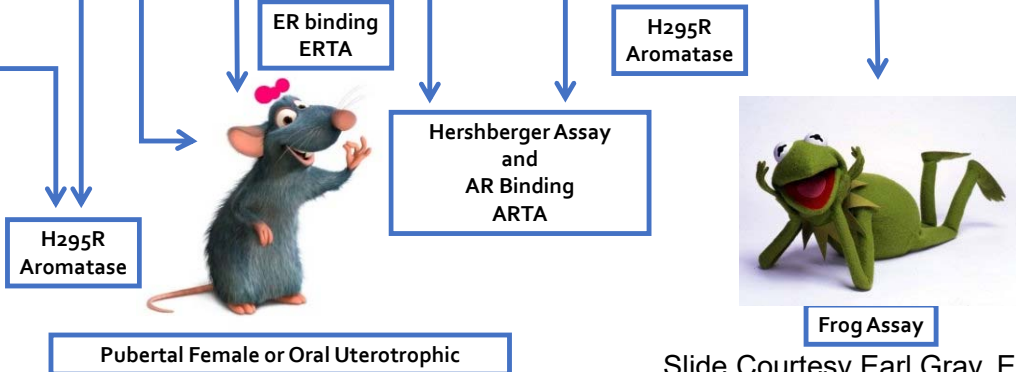


+ Responses in Gatekeepers

FH and PM Negative

Altered T, KT or E2	↓ Vitellogenin E2	↑ Vitellogenin	↑ Male Traits	Altered T, PPS, Sex Accessory Glands or LH	Altered T4, T3, TSH, thyroid histology
---------------------	-------------------	----------------	---------------	--	--

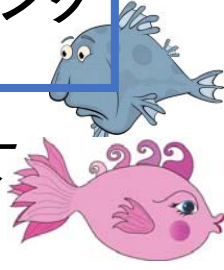
Triggered T1S Assays



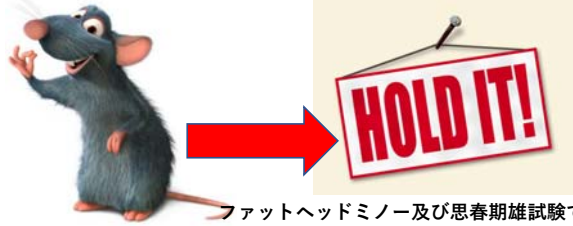
Slide Courtesy Earl Gray, EPA/ORD

Tier 1 スクリーニング 門番的試験

ファットヘッドミノー
SIS、E及びA作用のための一次試験



思春期雄 T、A 抗A作用のための一次試験

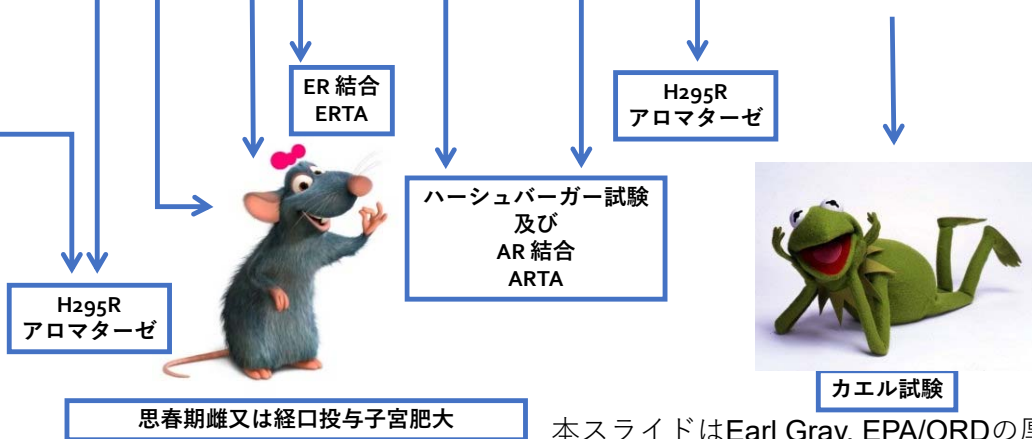


門番の反応

ファットヘッドミノー及び思春期雄試験で陰性

T, KT, E2 の変化	↓ ビテロゲニン E2	↑ ビテロゲニン	↑ 雄性徴	T, PPS、付属生殖腺、LHの変化	T4、T3、TSH、甲状腺組織の変化
---------------	-------------	----------	-------	--------------------	--------------------

派生する T1S 試験



本スライドはEarl Gray, EPA/ORDの厚意による

EDSP List 2 Chemicals

134 Chemicals proposed

SDWA Priority Chemicals

Chemicals regulated with a national primary drinking water regulation (NPDWR) (aka Six Year Review List)

Contaminants listed on Third Contaminant Candidate List (CCL 3)

After a public comment period, EPA announced in a Federal Register Notice a revised list containing 109 chemicals

Test Orders ON HOLD

61

EDSP List 2 化学物質

134化学物質が候補

飲料水安全法(SDWA)優先化学物質

第一種飲料水規則(NPDWR) (別名Six Year Review List)によって規制されている物質

第三次汚染物質候補リスト (CCL 3)に記載されている汚染物質

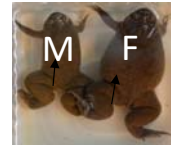
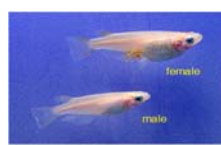
パブリックコメント期間を経た後、EPAは連邦官報にて109化学物質を掲載した改訂リストを公告した

試験命令は保留中

62

EDSP Tier 2 Test Methods

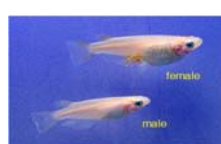
- Rat: Two-generation rat reproduction test (OECD TG 416)
 - Rat: Extended F1-Generation (OECD TG 443)
- Bird: Japanese Quail Two-generation Test (EPA 890.2100)
- Frog: Larval Amphibian Growth and Reproduction Assay (LAGDA) (EPA 890.2300)
- Fish: Medaka Extended One-generation Reproduction Test (MEOGRT) (EPA 890.2200)
- Invertebrate: Mysid Two-generation Toxicity Test



63

EDSP Tier 2 試験方法

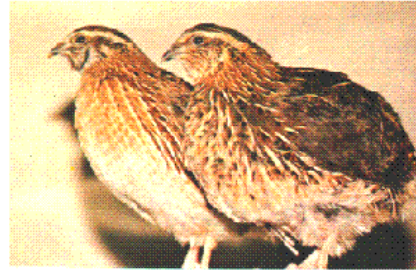
- ラット: 2世代ラット繁殖試験 (OECD TG 416)
 - ラット: 拡張F1世代 (OECD TG 443)
- 鳥類: ニホンウズラ 2世代試験 (EPA 890.2100)
- カエル: 幼生期両生類成長発達試験 (LAGDA) (EPA 890.2300)
- 魚類: メダカ拡張 1世代繁殖試験(MEOGRT) (EPA 890.2200)
- 無脊椎動物: アミ類 2世代毒性試験



64

Avian two generation Tier 2 test

- Detect chemical disruption of hormonally controlled sexual differentiation in birds
- Oviparity in birds affects retention and transfer of chemicals
- Test designed to determine long-term effects of maternal transfer and *in ovo* exposure
- Japanese quail



65

鳥類 2 世代 Tier 2 試験

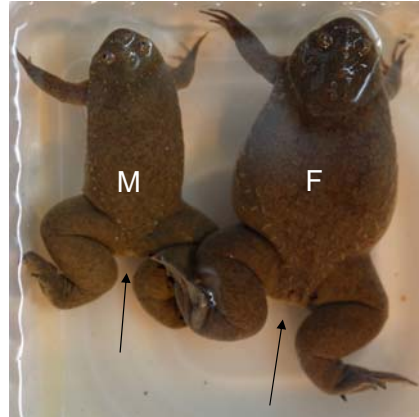
- 鳥類においてホルモン調節下にある性分化に及ぼす化学物質によるかく乱を検出する
- 鳥類が卵生であることは化学物質の滞留と移行に影響する
- 母鳥からの移行と卵内(*in ovo*)ばく露による長期的影響を判定するために設計された試験
- ニホンウズラ



66

Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)

- *Xenopus laevis*
- Detect life cycle effects on amphibians
- Major endpoints:
 - genotype, histology
 - growth, metamorphosis
 - hormones, VTG



67

幼生期両生類成長発達試験 (LAGDA)

- アフリカツメガエル
- 両生類のライフサイクルに及ぼす影響を検出する
- 主要なエンドポイント:
 - ・遺伝子型、組織学
 - ・成長、変態
 - ・ホルモン、ビテロゲニン



68

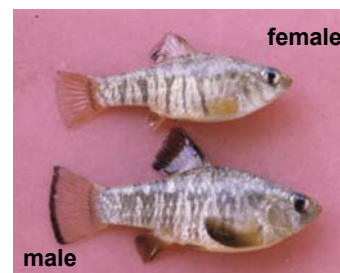
Multigeneration fish Tier 2 assays

- Test methods developed for freshwater (MEOGRT) and estuarine (SHMTG) species
- Standard test species, short life cycle
- Short-term and life cycle tests developed
- Survival, growth
- Reproduction (fecundity, fertility, hatch, behavior)
- Pathology, hormones, genomics

Medaka



Sheepshead minnow



69

多世代魚類Tier 2試験

- 淡水 (MEOGRT) 及び汽水(SHMTG) 生物種用に開発された試験方法
- 標準的試験生物種、短いライフサイクル
- 短期及びライフサイクル用に開発された試験
- 生存、成長
- 生殖 (受胎性、繁殖力、孵化、行動)
- 病理学、ホルモン、ゲノミクス

メダカ



シープスヘッドミノー



70

Invertebrate life-cycle/two generation Tier 2 assay

- Assess chemicals disrupting hormonal activity in invertebrates
- Major endpoints (F0, F1):
 - survival, growth
 - reproduction (#young)
 - maturation time. brood release
 - sex ratio
 - population growth rate λ
- Test species selection – mysid or copepod



71

無脊椎動物ライフサイクル/2世代Tier 2試験

- 無脊椎動物においてホルモン活性をかく乱する化学物質を評価
- 主要なエンドポイント (F0、F1):
 - 生存、生長
 - 繁殖 (仔数)
 - 成熟までの所要日数、産卵
 - 性比
 - 個体群繁殖率 λ
- 試験生物種の選択 – アミ類 又はカイアシ類



72

EDSP Future

Use of new High Throughput Screening Tools

EPA is working to develop and refine high throughput screening (HTS) tools to:

- Support prioritization of testing

- Build confidence in HTS tools to increase efficiency through prioritization for Tier 1 Screening.

Near term goal

- Prioritized list of chemicals for screening through EDSP Tier 1 Assay Battery

Longer term goal

- Enhance or replace current Tier 1 assays.

73

EDSPの今後

新たなハイスループットスクリーニングツールの利用

EPAは次の目的でハイスループットスクリーニング (HTS) ツールの開発と改良を行っている：

- 試験実施の優先順位付けを支援する

- Tier 1スクリーニングによる優先順位付けの効率向上のためにHTSツールの信頼性を構築する。

短期的なゴール

- EDSP Tier 1試験バッテリーによるスクリーニング対象化学物質の優先順位リスト

長期的なゴール

- 現行Tier 1試験を拡張又は代替する。

74

Efforts to Reduce Animal Testing at EPA



UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY
WASHINGTON, D.C. 20460

September 10, 2019

THE ADMINISTRATOR

MEMORANDUM

SUBJECT: Directive to Prioritize Efforts to Reduce Animal Testing

FROM: Andrew R. Wheeler
Administrator

TO: Associate Deputy Administrator
General Counsel
Assistant Administrators
Inspector General
Chief Financial Officer
Chief of Staff
Associate Administrators
Regional Administrators

During my March 2019 all-hands address, I reiterated the U.S. Environmental Protection Agency's commitment to move away from animal testing. We are already making significant efforts to reduce, replace and refine our animal testing requirements under both statutory and strategic directives. For example, the *Toxic Substances Control Act*, amended June 22, 2016, by the Frank R. Lautenberg Chemical Safety for the 21st Century Act, requires the EPA to reduce reliance on animal testing. Also, Objective 3.3 of the *FY 2018-2022 U.S. EPA Strategic Plan* outlines a commitment to further reduce the reliance on animal testing within five years. More than 200,000 laboratory animals have been saved in recent years as a result of these collective efforts.

Scientific advancements exist today that allow us to better predict potential hazards for risk assessment purposes without the use of traditional methods that rely on animal testing. These new approach methods (NAMs), include any technologies, methodologies, approaches or combinations thereof that can be used to provide information on chemical hazard and potential human exposure that can avoid or significantly reduce the use of testing on animals. The benefits of NAMs are extensive, not only allowing us to decrease animals used while potentially evaluating more chemicals across a broader range of potential biological effects, but in a shorter timeframe with fewer resources while often achieving equal or greater biological predictivity than current animal models.

Internet Address (URL) • <http://www.epa.gov>

Recycled/Recyclable • Printed with Vegetable Oil Based Inks on 100% Postconsumer, Process Chlorine Free Recycled Paper

The memorandum calls for the agency to:

- reduce its requests for, and funding of, mammal studies by 30 percent by 2025, and
- eliminate all mammal study requests and funding by 2035.

75

EPAにおける動物試験を減らす努力



UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY
WASHINGTON, D.C. 20460

September 10, 2019

THE ADMINISTRATOR

MEMORANDUM

SUBJECT: Directive to Prioritize Efforts to Reduce Animal Testing

FROM: Andrew R. Wheeler
Administrator

TO: Associate Deputy Administrator
General Counsel
Assistant Administrators
Inspector General
Chief Financial Officer
Chief of Staff
Associate Administrators
Regional Administrators

During my March 2019 all-hands address, I reiterated the U.S. Environmental Protection Agency's commitment to move away from animal testing. We are already making significant efforts to reduce, replace and refine our animal testing requirements under both statutory and strategic directives. For example, the *Toxic Substances Control Act*, amended June 22, 2016, by the Frank R. Lautenberg Chemical Safety for the 21st Century Act, requires the EPA to reduce reliance on animal testing. Also, Objective 3.3 of the *FY 2018-2022 U.S. EPA Strategic Plan* outlines a commitment to further reduce the reliance on animal testing within five years. More than 200,000 laboratory animals have been saved in recent years as a result of these collective efforts.

Scientific advancements exist today that allow us to better predict potential hazards for risk assessment purposes without the use of traditional methods that rely on animal testing. These new approach methods (NAMs), include any technologies, methodologies, approaches or combinations thereof that can be used to provide information on chemical hazard and potential human exposure that can avoid or significantly reduce the use of testing on animals. The benefits of NAMs are extensive, not only allowing us to decrease animals used while potentially evaluating more chemicals across a broader range of potential biological effects, but in a shorter timeframe with fewer resources while often achieving equal or greater biological predictivity than current animal models.

Internet Address (URL) • <http://www.epa.gov>

Recycled/Recyclable • Printed with Vegetable Oil Based Inks on 100% Postconsumer, Process Chlorine Free Recycled Paper

このメモランダムはEPAに対し次の通り要請している：

- 哺乳動物試験の実施要請及び資金提供を2025年までに30%減らすこと、更に
- 哺乳動物試験の実施要請及び資金提供を2035年までに根絶すること。

76

Challenges

- Large number of chemicals with many possible adverse outcomes.
- Finite resources and time.
- Public expectations for scientific soundness, transparency, and timeliness.
- Science increasingly complex and changing.
 - New risk assessment and management challenges always arise.

77

今後の課題

- 多くの有害影響に関連する可能性がある膨大な数の化学物質。
- 限りある資源と時間。
- 科学的妥当性、透明性及び適時性を求める市民からの期待。
- 一層複雑化し、変化しつつある科学。
 - リスク評価及び管理上の新たな課題が常に生じる。

78

Use of *In Silico* Computational Models and *In Vitro* High Throughput Assays in the Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP):

Prioritization and Screening

EDSP21 Work Plan

**Executive Summary and Tasks
Part of Comprehensive Management Plan for EDSP
In Response to OIG Recommendations.**

79

内分泌かく乱化学物質スクリーニングプログラム (EDSP)における *In Silico* コンピューターモデル及び *In Vitro* ハイスループット試験の利用:

優先順位付けとスクリーニング

EDSP21 ワークプラン

**エグゼクティブサマリー及び任務
EDSP包括的管理プランの一部
OIG 勧告への返答.**

80

Objective

- Maximize use of existing data.
- Targeted *in vivo* toxicity testing.
- Use a variety of tools in a tiered testing and assessment framework.
- Systematically add new approach methodologies (NAMs).
- Advance understanding of key events in toxicity pathways.

81

目的

- 既存データを最大限に活用する。
- *in vivo*毒性試験が対象。
- 段階的試験実施と評価の枠組みにおいて様々なツールを利用する。
- 新たな取り組み方法論(NAMs)を体系的に追加する。
- 毒性経路におけるキーイベントへの理解を進展させる。

82

EDSP21 Status

- ER model to replace Estrogen Receptor Binding Assay, Estrogen Receptor Transactivation Assay, and Uterotrophic Assay
- AR model development to replace Androgen Receptor Binding Assay and Hershberger Assay
- Efforts underway to further develop Steroidogenesis model and Thyroid model

Current EDSP Tier 1 battery of assays	Alternative high throughput assays and computational model for EDSP Tier 1 battery
Estrogen Receptor (ER) Binding	ER Model (alternative).
Estrogen Receptor Transactivation (ERTA)	ER Model (alternative).
Uterotrophic	ER Model (alternative).
Female Rat Pubertal	ER, STR, and thyroid (THY) Models (Future).
Male Rat Pubertal	AR, STR, and THY Models (Future).
Androgen Receptor (AR) Binding	AR Model (Future).
Hershberger	AR Model (Future).
Aromatase	STR Model (Future).
Steroidogenesis (STR)	STR Model (Future).
Fish Short Term Reproduction	ER, AR, and STR Models (Future).
Amphibian Metamorphosis	THY Model (Future).

83

EDSP21の現状

- エストロゲン受容体結合試験、エストロゲン受容体転写活性化試験及び子宮肥大試験に替わるエストロゲン受容体モデル
- アンドロゲン受容体結合試験及びハーシュバーガー試験に替わるアンドロゲン受容体モデル
- ステロイド産生モデル及び甲状腺モデルについては鋭意開発中

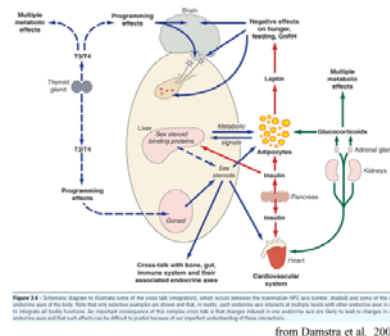
Current EDSP Tier 1 battery of assays	Alternative high throughput assays and computational model for EDSP Tier 1 battery
Estrogen Receptor (ER) Binding	ER Model (alternative).
Estrogen Receptor Transactivation (ERTA)	ER Model (alternative).
Uterotrophic	ER Model (alternative).
Female Rat Pubertal	ER, STR, and thyroid (THY) Models (Future).
Male Rat Pubertal	AR, STR, and THY Models (Future).
Androgen Receptor (AR) Binding	AR Model (Future).
Hershberger	AR Model (Future).
Aromatase	STR Model (Future).
Steroidogenesis (STR)	STR Model (Future).
Fish Short Term Reproduction	ER, AR, and STR Models (Future).
Amphibian Metamorphosis	THY Model (Future).

84

How to Reconcile with EU Regulatory Criteria for EDCs

Based on WHO definition of an endocrine disruptor and of an adverse effect, a relevant substance will be identified and therefore regulated as an endocrine disruptor if it meets all of the following criteria:

- An adverse effect is observed in an intact organism and
- An endocrine mode of action is identified and
- The adverse effect is a consequence of the mode of action

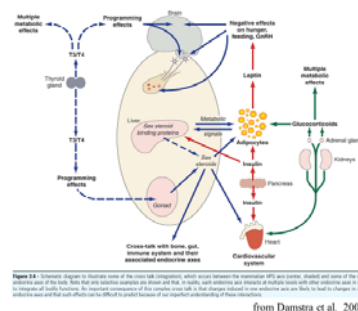


All three conditions must be met to regulate a relevant substance as an endocrine disruptor

EUにおけるEDCs規制クライテリアとの整合性をとるために

WHOによる内分泌かく乱化学物質及び悪影響の定義に基づき、当該化学物質が次のクライテリアのすべてに該当する場合には、内分泌かく乱化学物質として同定され、したがって規制されるであろう：

- 悪影響が無処置生物において認められ かつ
- 内分泌作用機序が同定され かつ
- 悪影響が作用機序の結果である



当該化学物質を内分泌かく乱化学物質として規制するためには、この3条件をすべて満たさなければならない。

Thank you for your attention!

87

ご清聴ありがとうございました!

88