化審法セミナー
OECDテストガイドラインの動向

2017年にガイドライン化された生物試験

Test No. 244: Protozoan Activated Sludge Inhibition Test

Test No. 245: Honey Bee (Apis Mellifera L.)（セイヨウミツバチ）, Chronic Oral Toxicity Test (10-Day Feeding)

Test No. 246: Bumblebee（マルハナバチ）, Acute Contact Toxicity Test

Test No. 247: Bumblebee, Acute Oral Toxicity Test

2017年テストガイドラインワークプラン（AUGUST 2017）

- 2.39: EDTA Activity – New TG: Xenopus Embryonic Thyroid Signalling Assay (フランス）
- 2.46: New TG for the Detection of Endocrine Active Substances, acting through estrogen receptors using transgenic cyp 19a1b-GFP Zebrafish Embryos (EASZY assay)(フランス）
- 2.47: New TG on Determination of Effects on Earthworms in Field Studies(ドイツ）

2017年テストガイドラインワークプラン（AUGUST 2017）

- 2.50: Revision of TG 203 Fish Acute Toxicity Test(スイス、イギリス）
- 2.51: Guidance Document on Aquatic (and Sediment) Toxicity Testing of Nanomaterials(カナダ、米国）
- 2.54: Guidance Document on IATA for Fish Acute Toxicity Testing(オーストリア、ICAPO)
- 2.55: Use and analysis of control fish in toxicity studies(欧州委員会、米国）

2017年テストガイドラインワークプラン（AUGUST 2017)

- 2.57: Guidance Document on Juvenile Medaka Anti-androgen Screening Assay(日本）
- 2.58: New Test Guideline on a Short-term Juvenile Hormone Activity Screening Assay using Daphnia magna(日本）
- 2.59: New Test Guideline on Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT)(ドイツ）

2.50: REVISION OF TG 203 FISH ACUTE TOXICITY TEST　TG203改定の経緯

- TG改定のドラフトを Fish Drafting Group と VMG-ecoに提出（ September 2014）
- VMG-eco meeting （October 2015）で検討
- モリバンドについての議論がVMG-eco会議で行われた （October 2016.）
- VMG-Eco ではモリバンドについて合意に達しなかった
- WNT-29にて、試験機関からモリバンドについて追加データの収集の必要性が議論された
- リード国とOECD事務局は、2017年の前半に道筋を確立する。

2.54: GUIDANCE DOCUMENT ON IATA FOR FISH ACUTE TOXICITY TESTING　魚類急性IATAの経緯

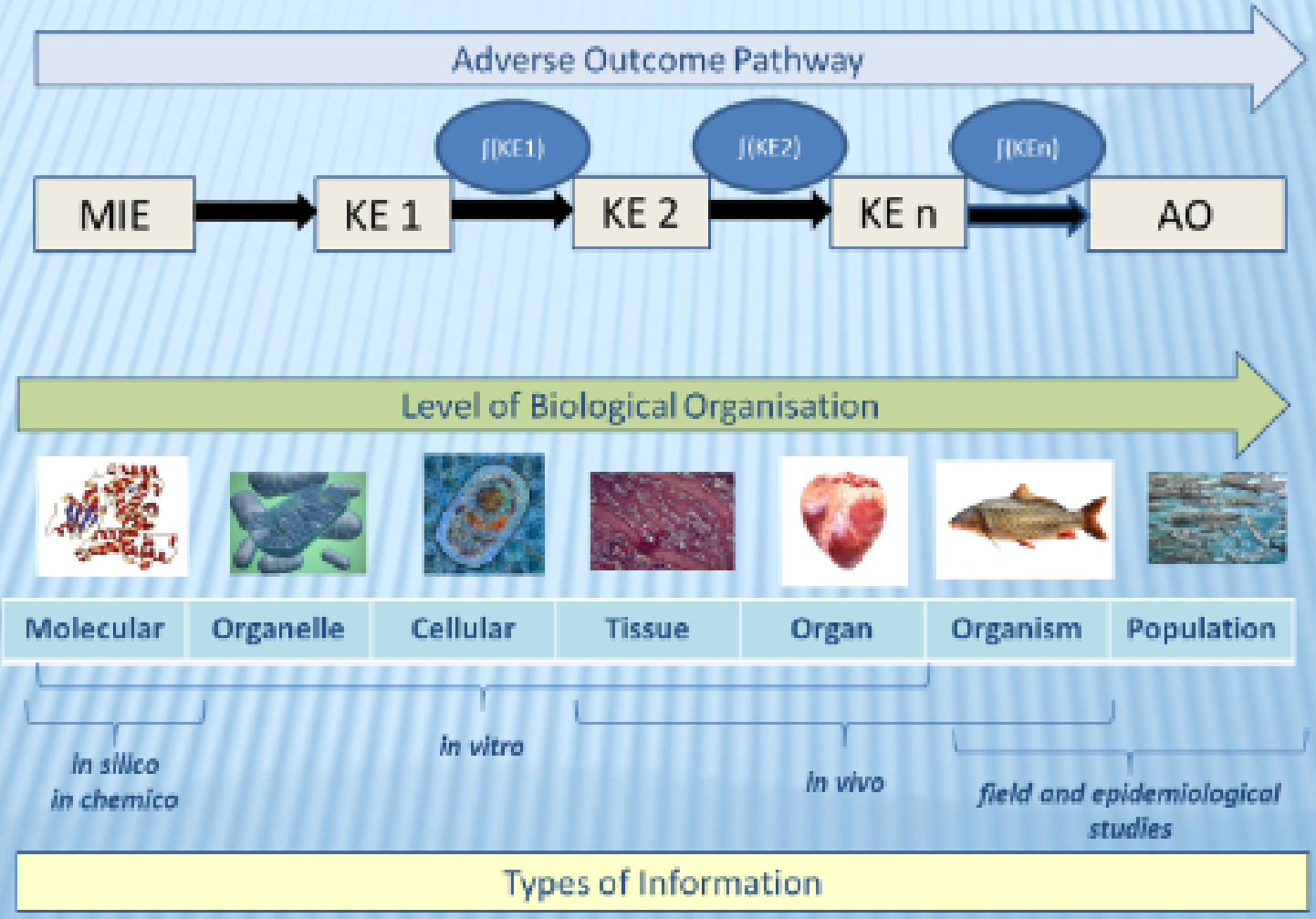
- 2016年の中旬までに、FETを含む魚類急性毒性試験“threshold approach（閾値アプローチ）” (GD 126)のドラフトを作成
- GD126のための新規・背景データを集めて、GDを精密化する
- GD 126 について、2017年のVMG Eco/FDGで話し合う.
- その後、リード国がどのように進めていくか決める。.

IATA: INTEGRATED APPROACHES TO TESTING AND ASSESSMENTとは

- OECD化学品合同会合ハザード評価タスクフォース共同化学物質評価プログラム（CoCAP: Cooperative Chemicals Assessment Programme）では、異なる試験結果や情報（*in vitro*、*in vivo*、*QSAR,Omics*など）を用いて統合的に化学物質の安全性を評価するアプローチを提案している

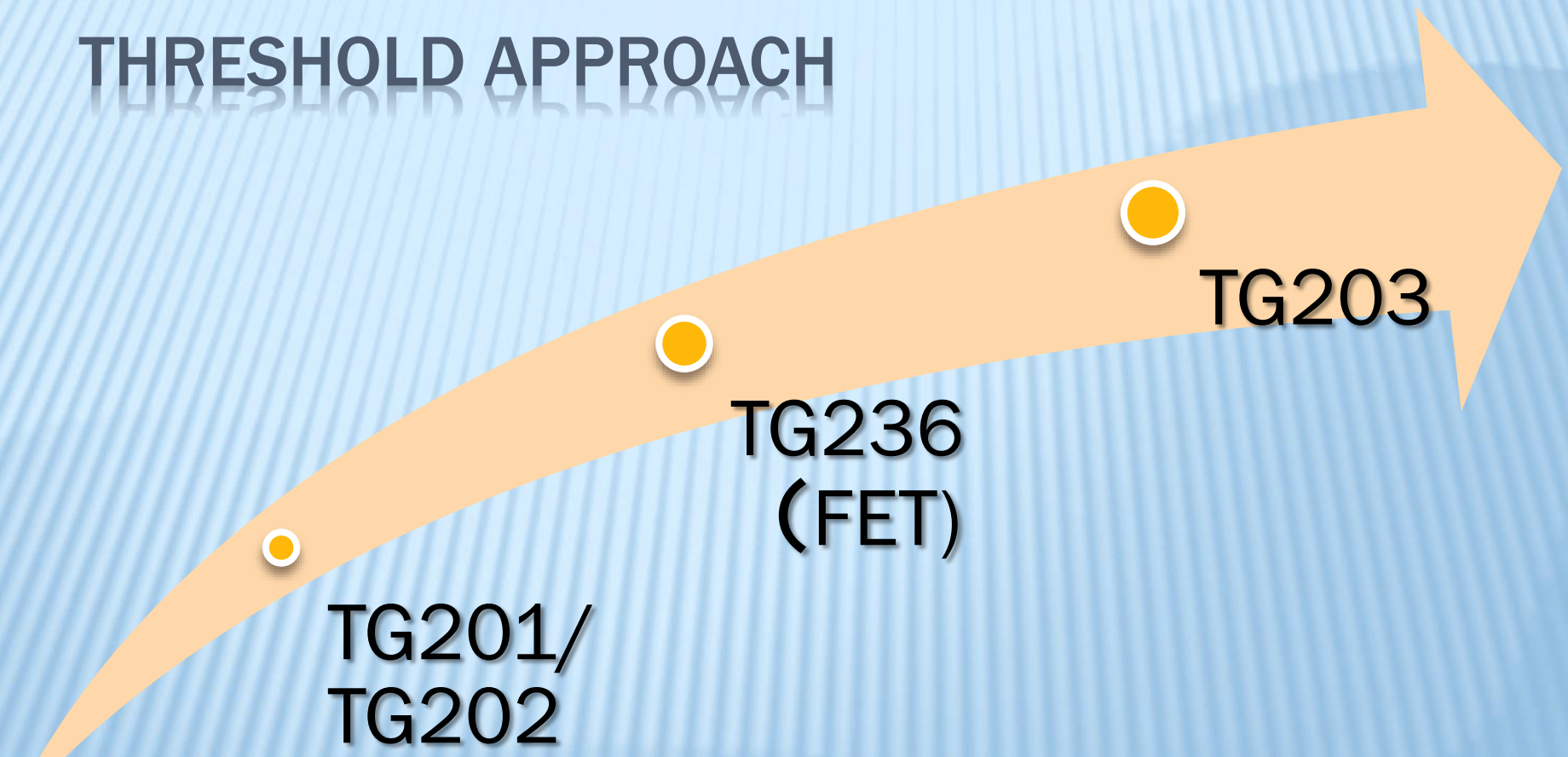
- 現在の規制毒性テストと評価アプローチは、大部分はOECD Test Guidelinesのような標準化された試験指針またはプロトコルに従って実行されている。
- しかし評価される化学物質の増加、使用される試験動物の増加、などから効率的に評価される必要がある。
- 新しいアプローチは、使用中の化学物質の数と評価される数間のギャップを閉じるのに必要である。

IATA BASED ON THE AOP CONCEPT

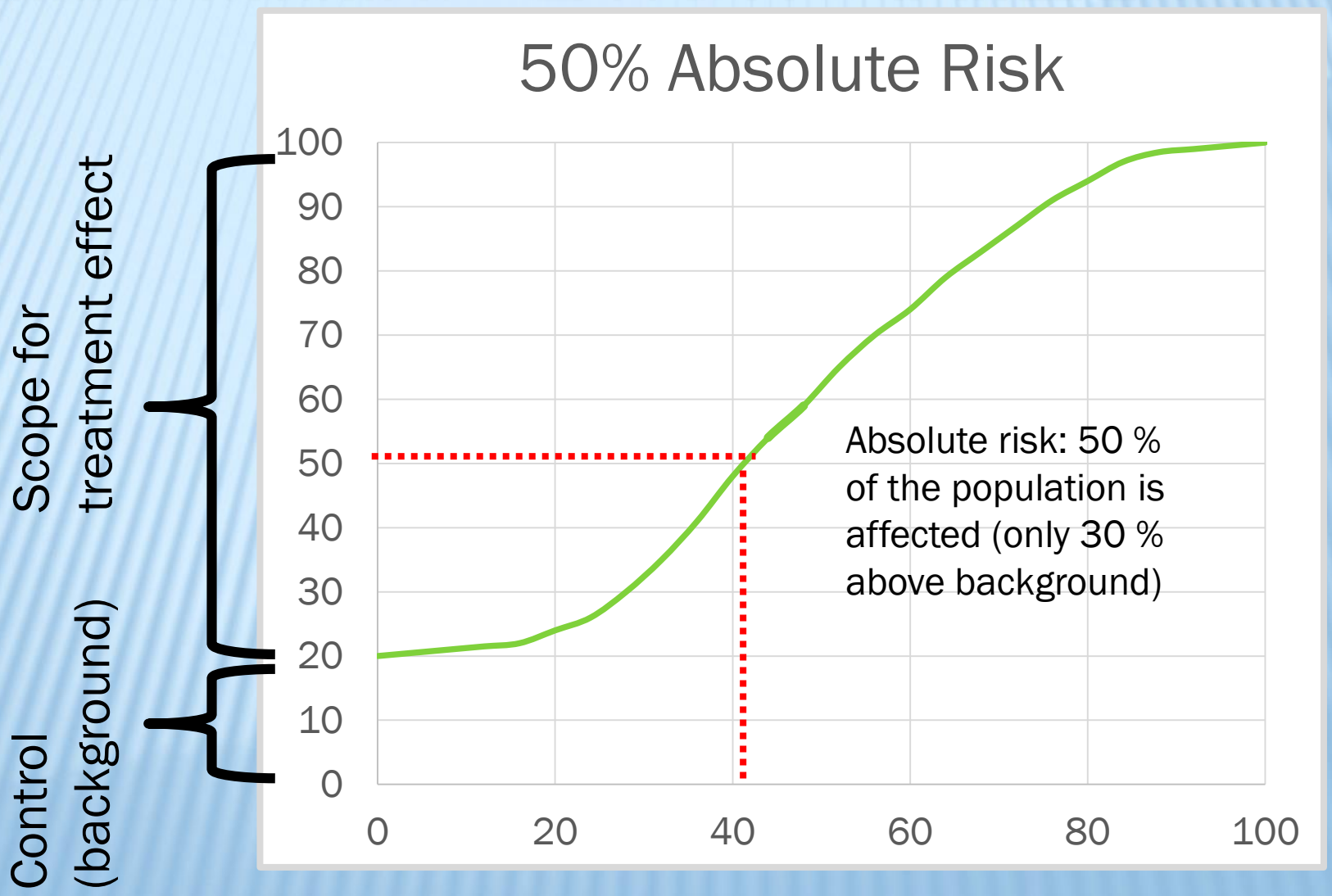


IATA FOR FISH ACUTE TOXICITY TESTING

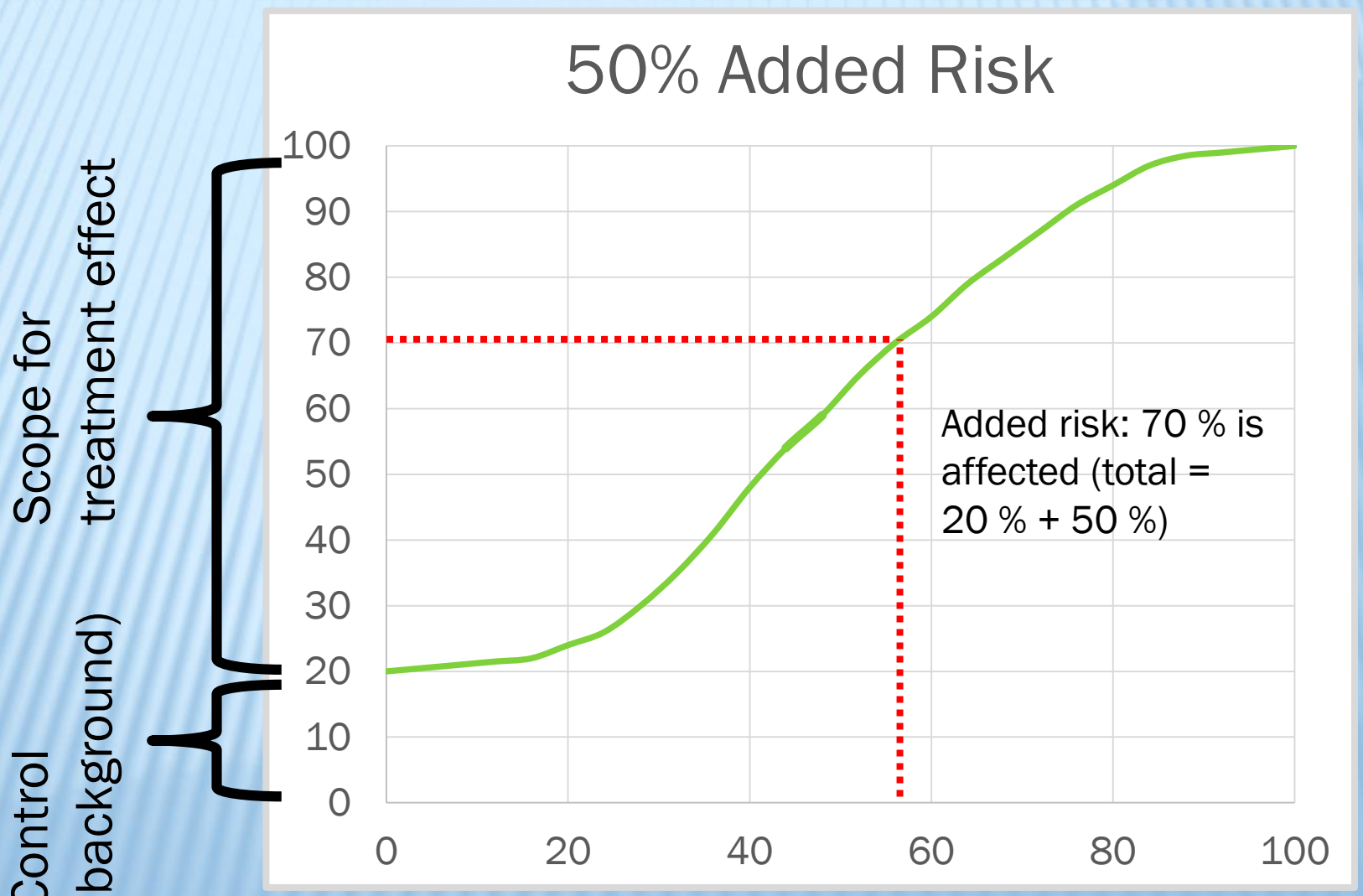
THRESHOLD APPROACH



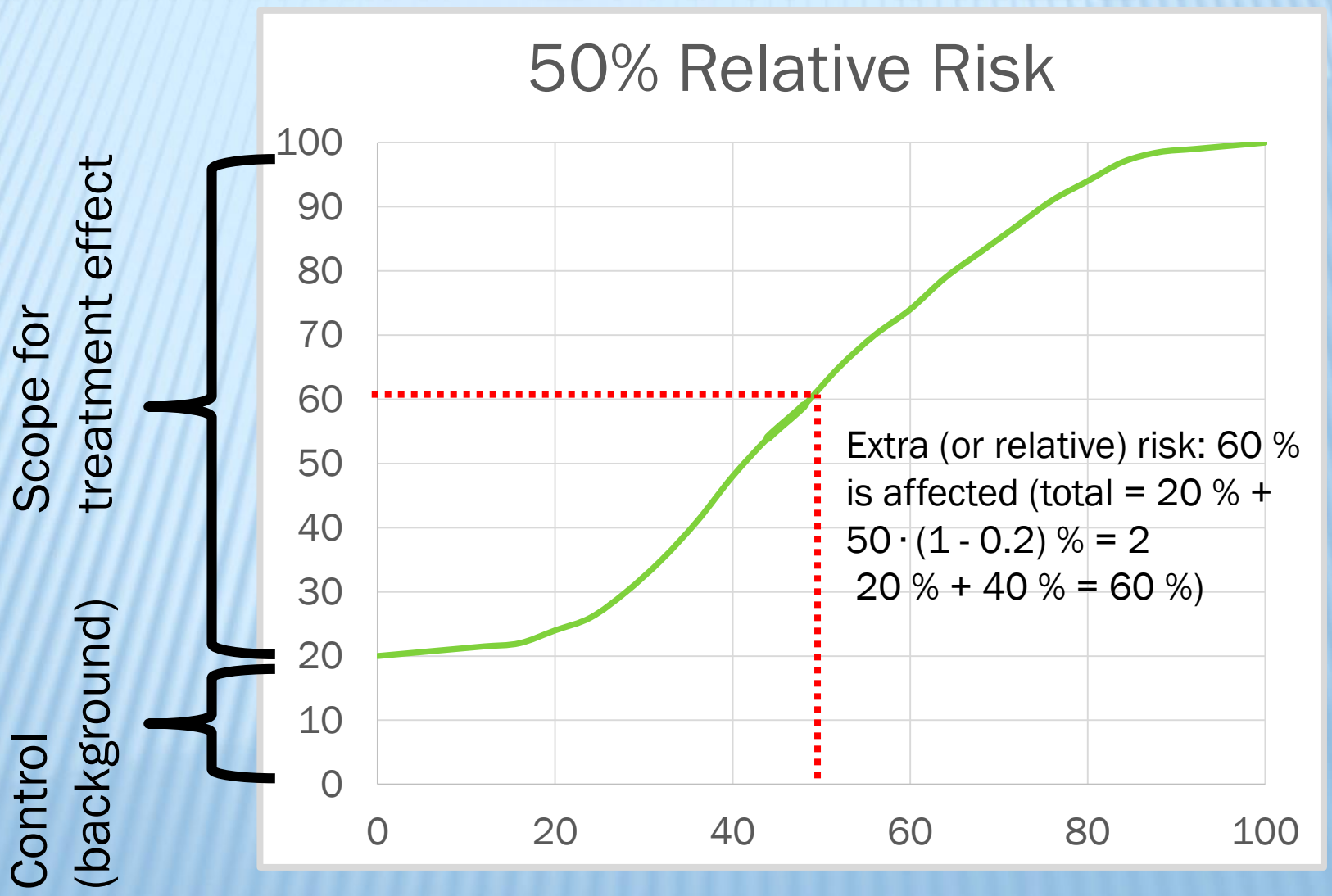
2.55: USE AND ANALYSIS OF CONTROL FISH IN TOXICITY STUDIES　コントロールの考え方



2.55: USE AND ANALYSIS OF CONTROL FISH IN TOXICITY STUDIES　コントロールの考え方



2.55: USE AND ANALYSIS OF CONTROL FISH IN TOXICITY STUDIES　コントロールの考え方



OECD ENVIRONMENT, HEALTH AND SAFETY PUBLICATIONS
SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT

No. 150

内分泌かく乱化学物質評価のガイダンスドキュメント

UPDATE v2

July 2017

The second edition was approved by WNT at its meeting in [April 2018].

30-31, October, 2017
13th VMG-eco meeting

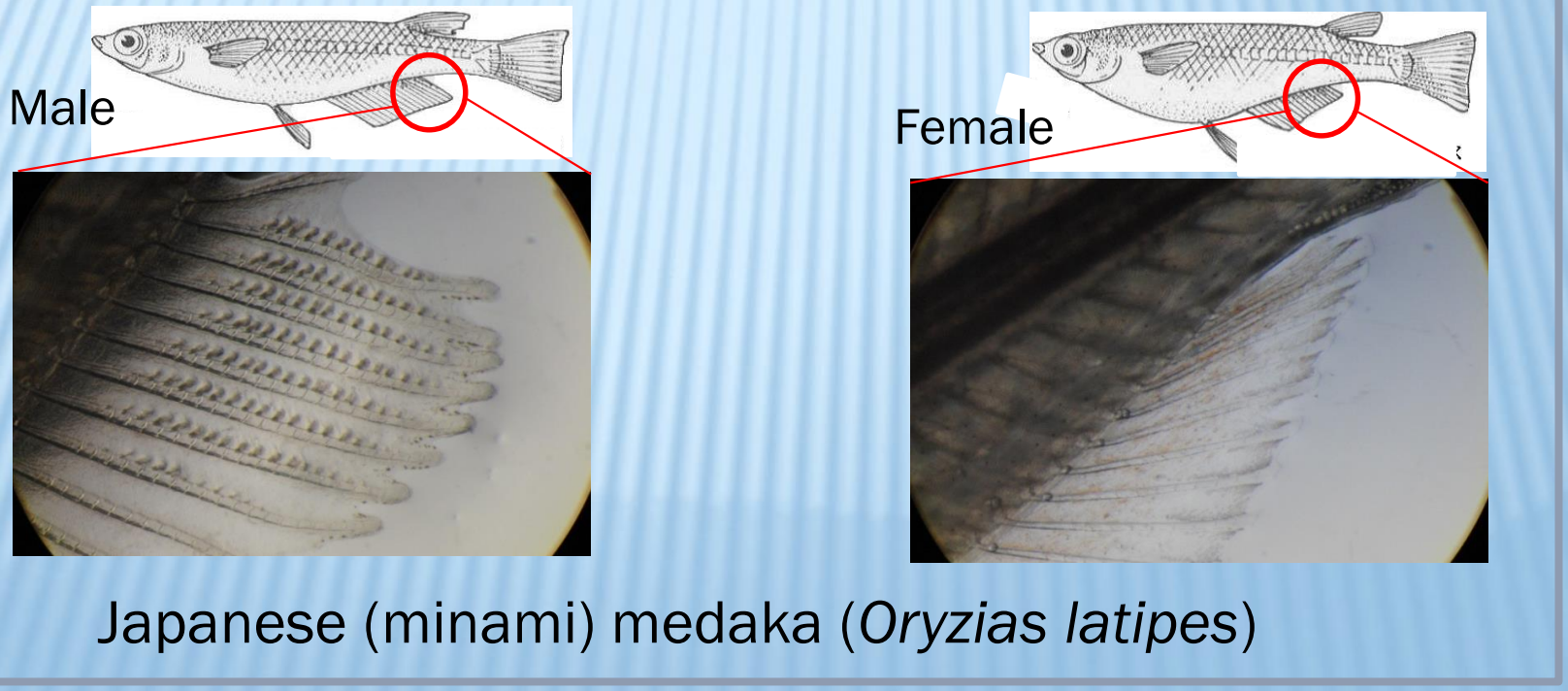
メダカを用いた抗男性ホルモンのスクリーニング試験

Juvenile Medaka anti-Androgen Screening Assay (JMASA)

BIOLOGICAL BACKGROUND

Papillary processes on anal fin

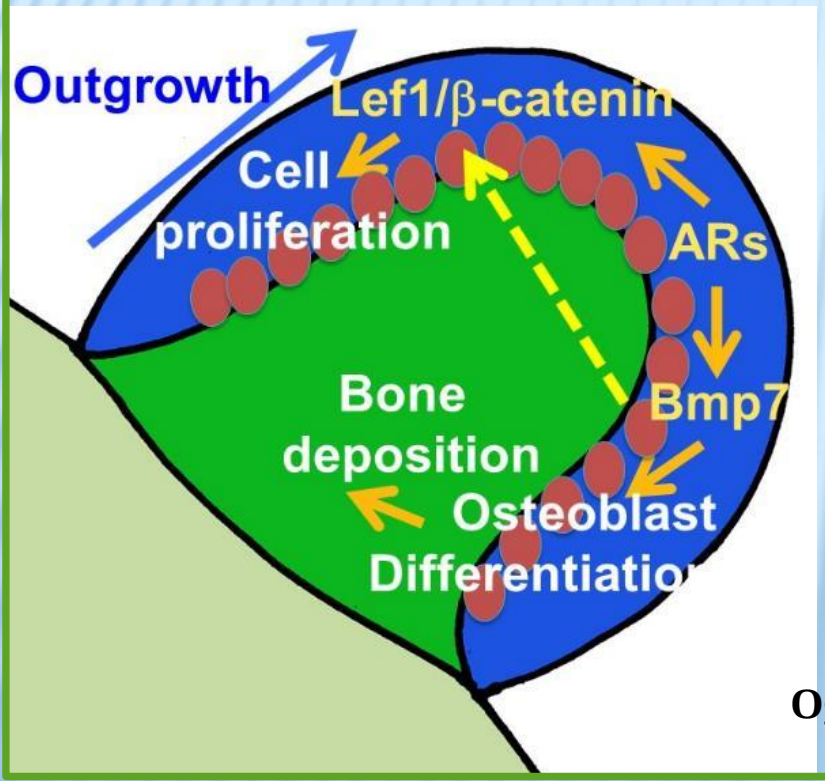
- メダカでは、乳頭状小突起がオスの2次性徴として現れる
- それは男性ホルモンの支配を受けている
- 関連遺伝子(*Lef1*, *Bmp7*) が判明している

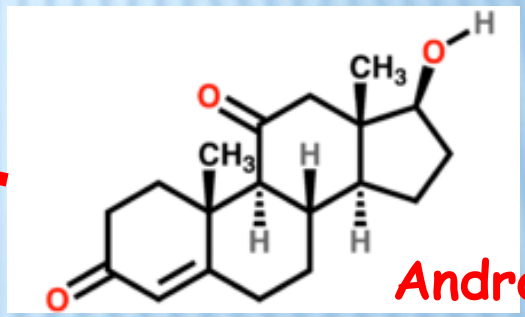


Japanese (minami) medaka (*Oryzias latipes*)

FORMATION OF ANDROGEN-INDUCED PAPILLARY PROCESS

- *Lef1*/b-catenin は骨の周りの組織形成に関係している
- *Bmp7* は骨形成に関係している
- 両方とも男性ホルモンの支配を受けている



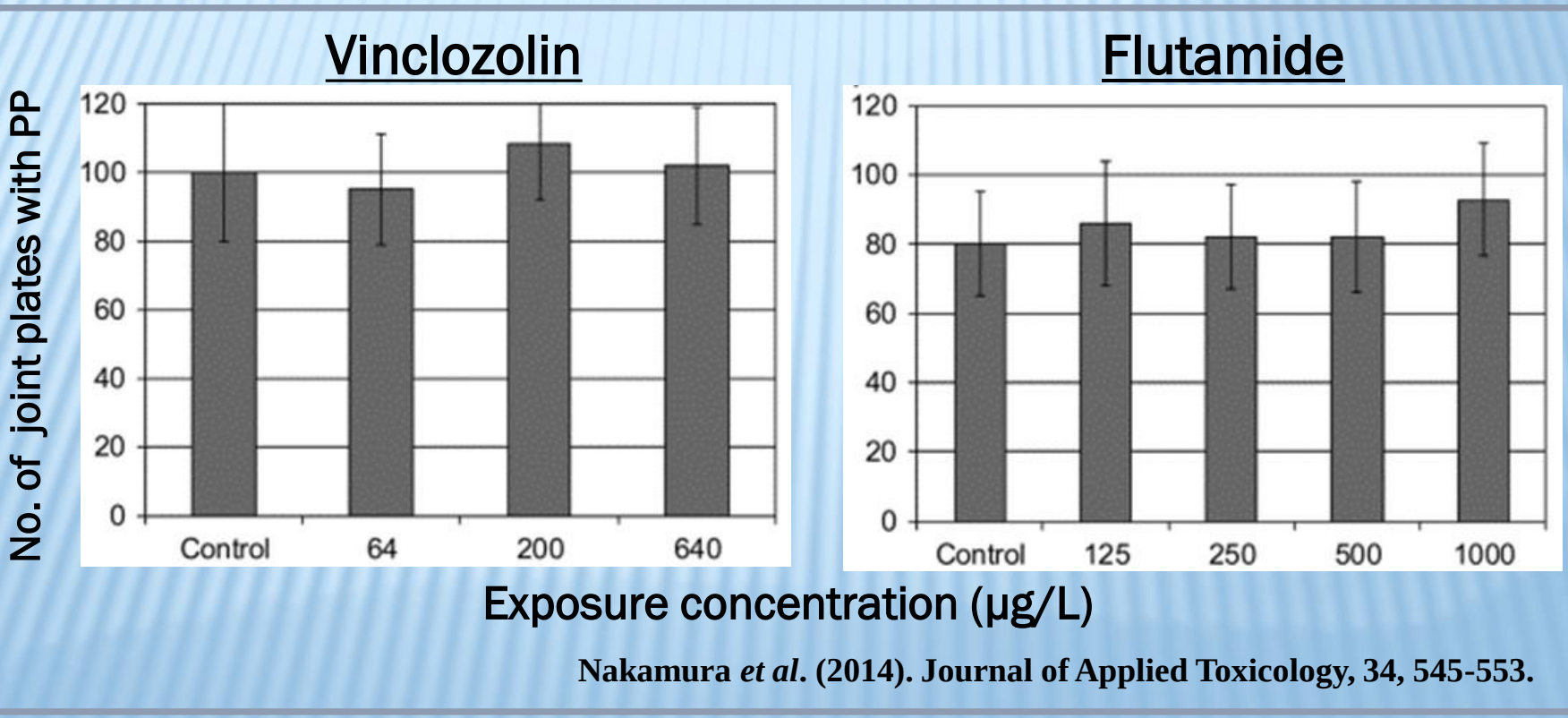


Androgens

Ogino *et al.* (2014). Endocrinology, 155(2), 449-62.

Limitations of FSTRA for anti-androgen screening

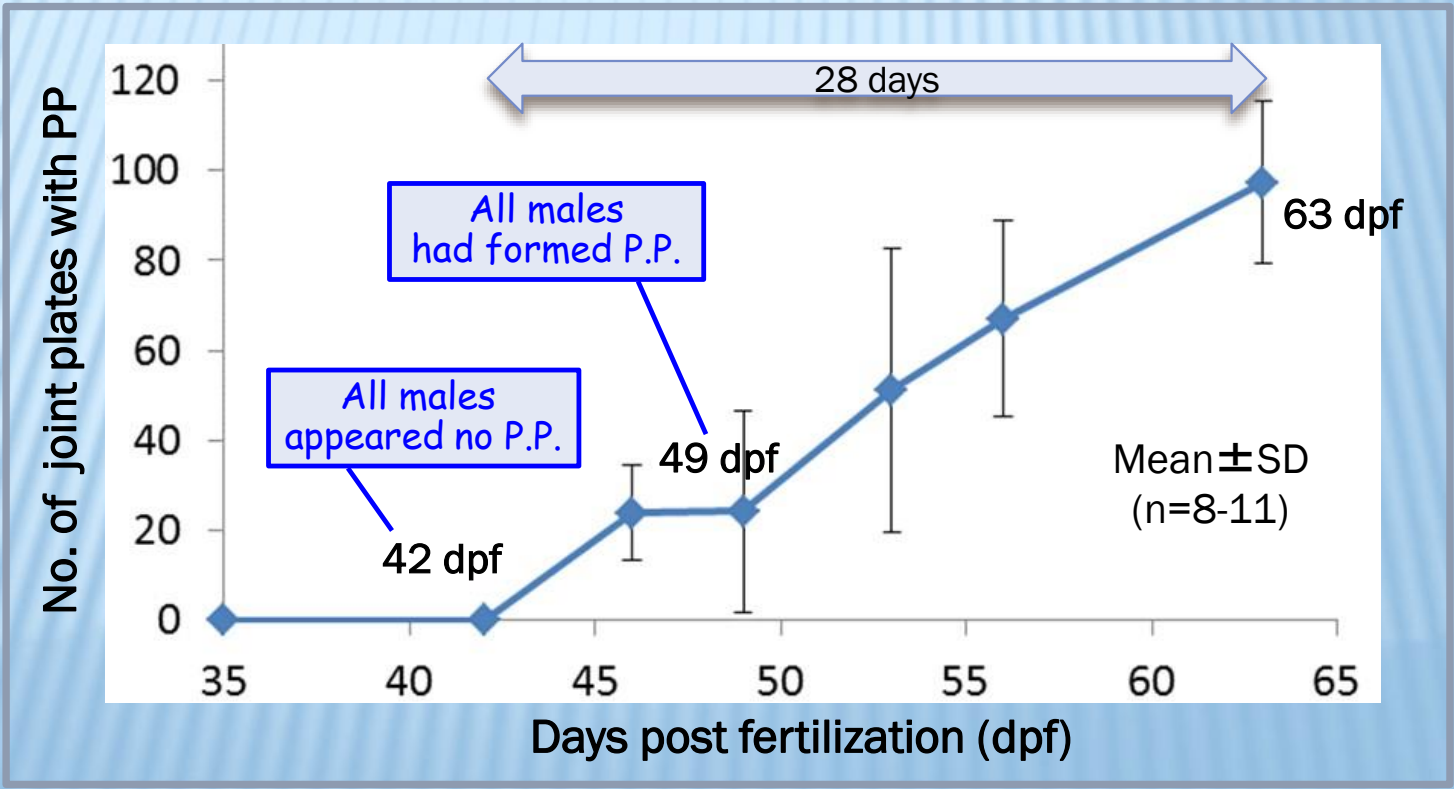
- Fish Short-Term Reproduction Assay (OECD TG229) では抗男性ホルモン作用物質の検出はできない。
- 一度形成された乳頭状小突起は、消えることがないため。



Nakamura *et al*. (2014). Journal of Applied Toxicology, 34, 545-553.

Development of papillary process

- オスのメダカで乳頭状小突起papillary process (PP) は孵化後42日齢まで観察されない（2次性徴前）.
- 孵化後49日齢では全ての雄メダカで乳頭状小突起が観察された.
- PPの発達は、餌、水温、生物系統などの諸条件で変動する (グラフはNIES一R系統の場合のデータを示している).



新しい試験法のコンセプト

JMASA (New test method)

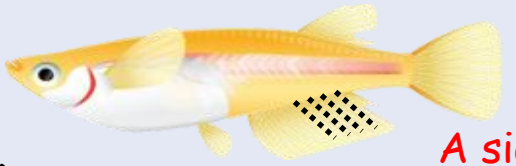
Juveniles

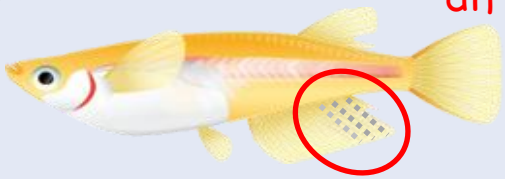
- sexually immature
- no papillary process

Control (no treatment)

Exposure (Growth)

Chemical treatment

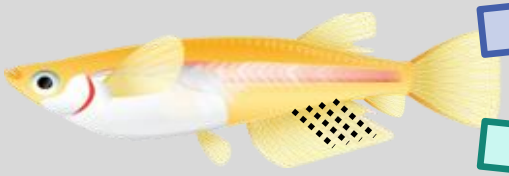




A significant difference

Inhibition of formation
(Disappearance)

FSTRA (TG 229)



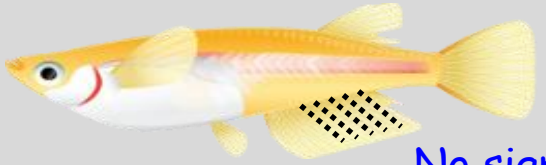
Adult males

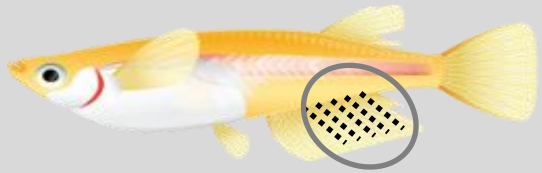
- sexually matured
- sufficiently developed papillary process

Control (no treatment)

Exposure (3 weeks)

Chemical treatment





No significant difference

No alteration
(No disappearance)

JMASAのプロトコール

Culturing and Acclimation						Chemical exposure				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	(wpf)

* Fish should be acclimated for 2 weeks prior to the assay under test conditions.

Initiation of assay

juveniles at 6 wpf
(42 ± 2 dpf)

Completion of assay

Determination of genotypic sex (*dmy* gene)

Endpoints assessment

- No. of palte with papillary process
- Vitellogenin (option)
- (growth: body length & weight)

* The measurements of each endpoint are analysed based on genotypic sex.

Test conditions

Test type:	Flow-through test (>5 volume/day)
Test organisms:	Japanese medaka (*Oryzias latipes*) (juvenile fish at 6 weeks post fertilization)
No. of treatment	3 (test substance) + control
No. of replicates	4 tanks/treatment
No. of fish	7 fish/tank (28 fish/treatment)
Test chamber size	Minimum of 1.8 L
Water temperature	25 ± 2 deg C
Feeding	brine shrimp, 2-3 times/day
Exposure duration	28 days

JMASAの概要

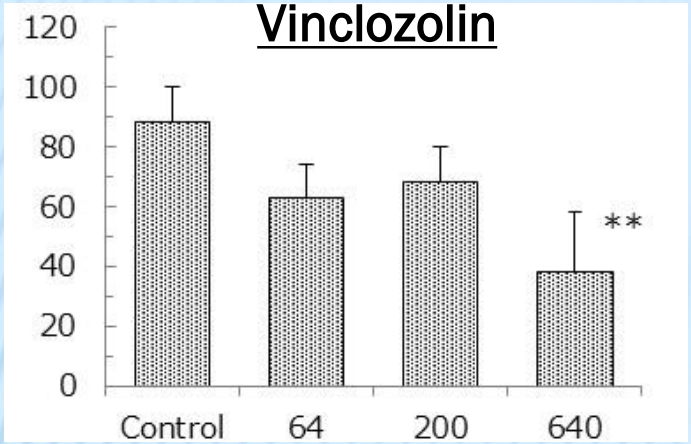
- JMASAでは、2次性徴前の幼若メダカを用いて、28日間曝露したのちに乳頭状小突起の数を数える.
- 乳頭状小突起をもつ節板数を数える。ビテロジェニンも測定す
- 一つのタンクに7個体いれ、繰り返し数は3とする。TG229を参考にしている。
- 遺伝的な性は*dmy* geneを測定する。.
- 男性ホルモンの合成、代謝、レセプター結合等を阻害する化学物質を検出できる。
- ビテロジェニンも測定しているため、女性ホルモンのアゴニスト、アンタゴニストについても検出できる

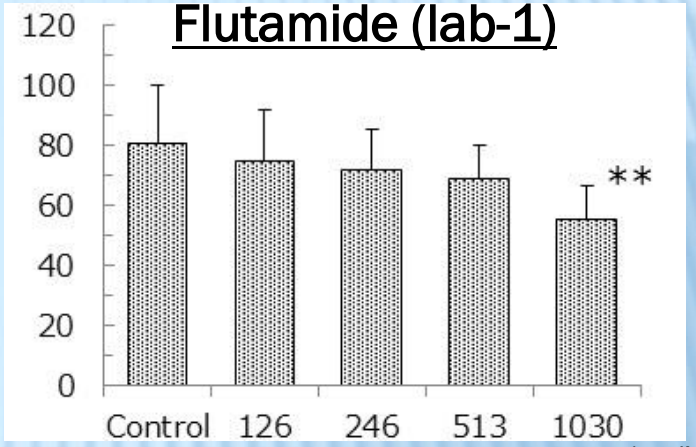
Validation and optimization

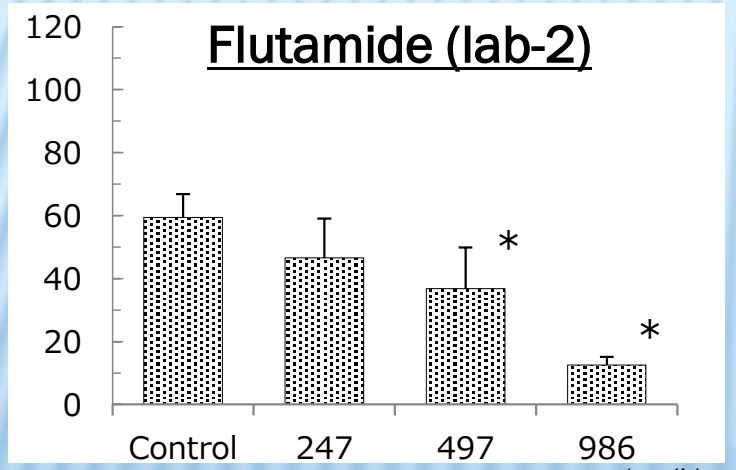
- 2つのラボにて、JMASAを用いて、抗アンドロゲン、エストロゲン、ネガコンについてのバリデーションを行っている.
- バリデーション試験の目的は、この試験法の有効性、限界、再現性を明らかにし、プロトコールを作成することにあった。
- 抗アンドロゲンの候補物質として
  - ✓ Flutamide
  - ✓ Vinclozolin
  - ✓ Fenitrothion
  - ✓ Cyproterone acetate
  - ✓ Linuron
- バリデーション試験の時には、17β-estradiol (reference estrogen) とsodium dodecyl sulfate（negative substance）も用いられた

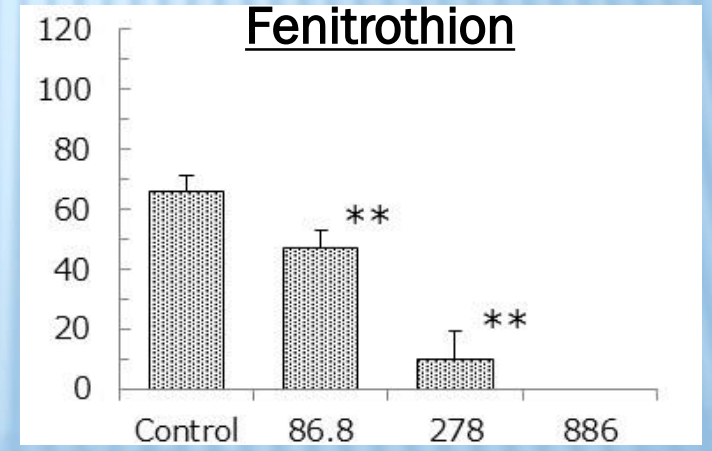
Results of validation studies (1)

Number of joint plates with papillary process



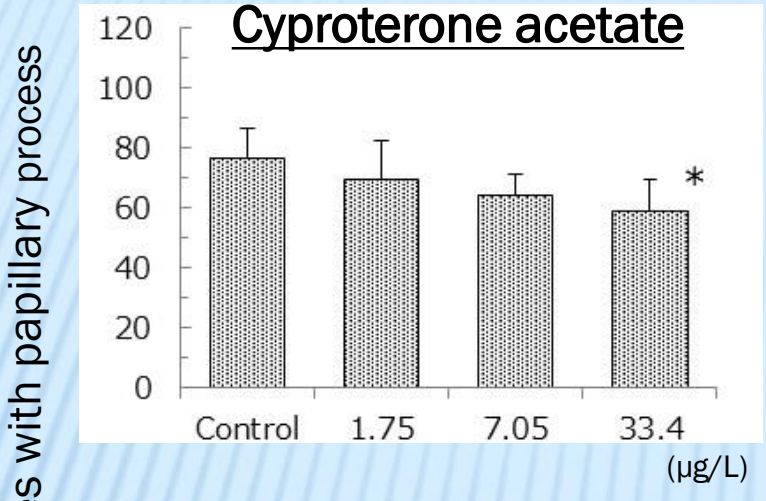


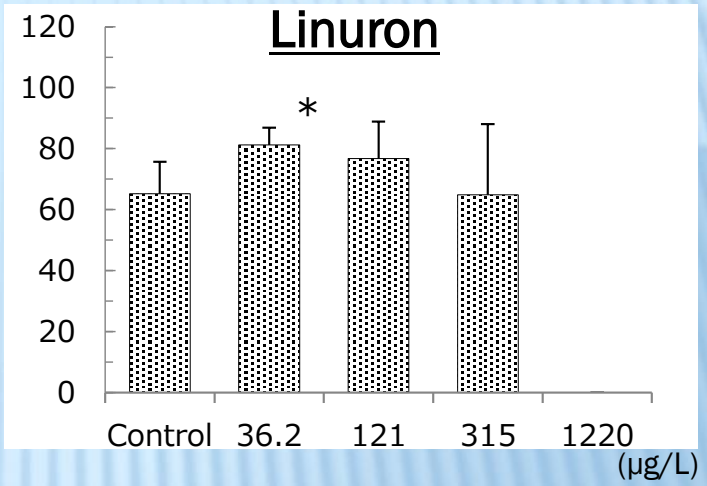


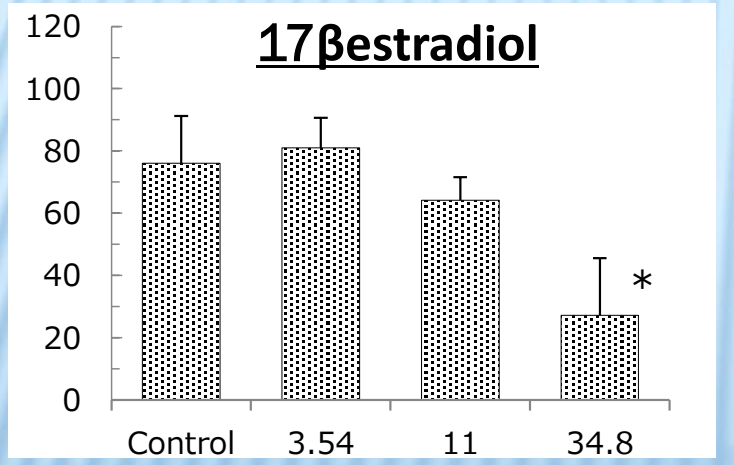


*In fenitrothion study, overt toxicity with more than 30% mortality and decrease of growth was observed at 886 μg/L.

Results of validation studies (2)







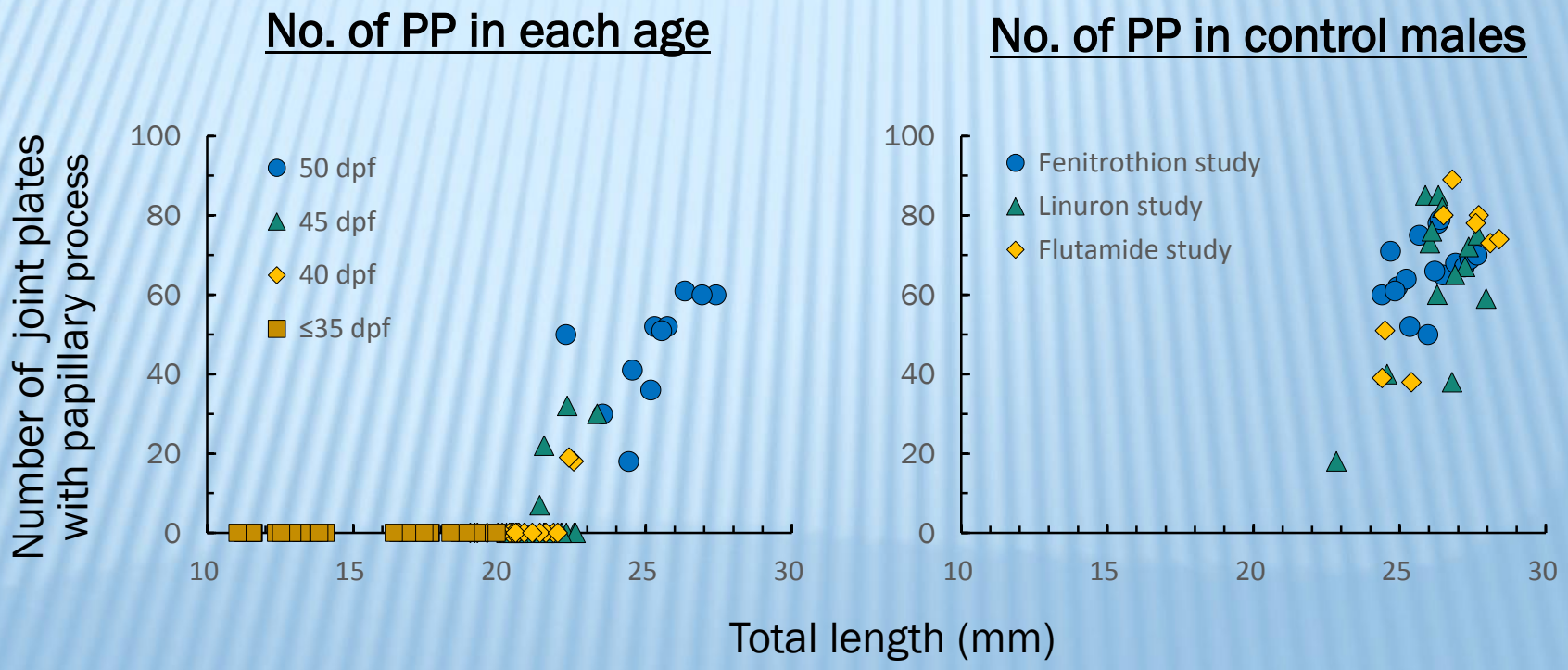
*In linuron study, overt toxicity with more than 60% mortality was observed at 1220 μg/L.

Discussion and consideration

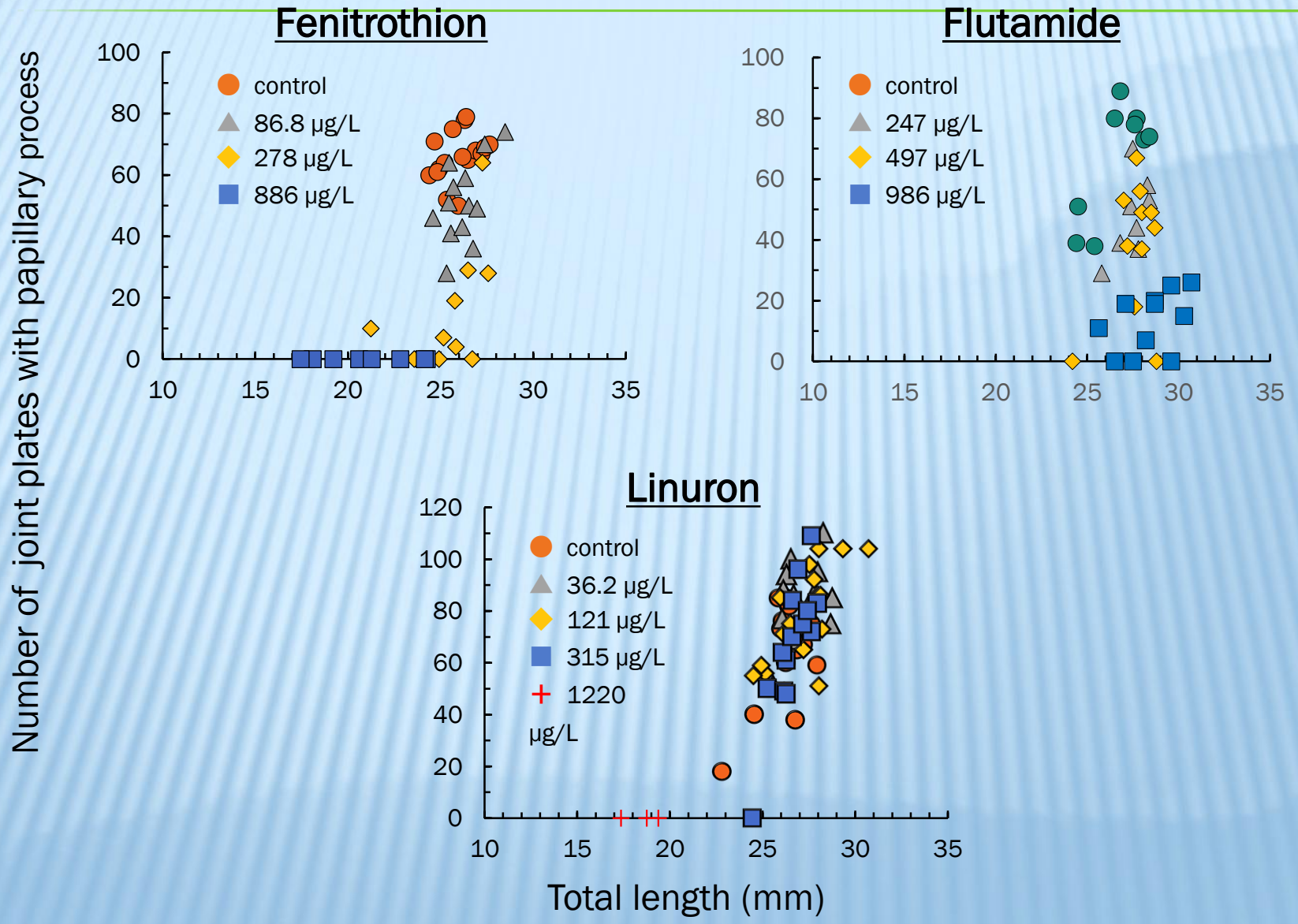
- Linuron以外のすべての物質で JMASA の抗アンドロゲン作用の検出が確認された.
- 、フルタマイドでラボ内再現性が確認され現在のJMASAプロトコールの有効性が検証された.
- Fenitrothionとlinuronでは、最高濃度区でPPが誘導されなかったが、一般毒性によるものと考えられる
- Fenitrothionでは、中濃度で生長阻害があり、PPの誘導は成長と関係しているものの、生長阻害を受けていない濃度でもPP発生の遅延があった
- Linuronについては、さらなる検討が必要と思われる。
- ただし、JMASAは抗アンドロゲン検出試験法として有用と考えられる。

Relation between growth and PP formation

- 遺伝的雄メダカにおける、孵化後40-45 日齢の尻ビレの papillary processes (PP)数 は日齢に応じて増えていく
- PP数と成長とは相関がある



Relation between total length and no. of PP



Work plan

2017-2018

バリデーション試験が行われた.

- ✓ Vinclozolin, an anti-androgenic substance (to assess an inter-laboratory reproducibility)
- ✓ Sodium lauryl sulfate, a (suspected) negative substance

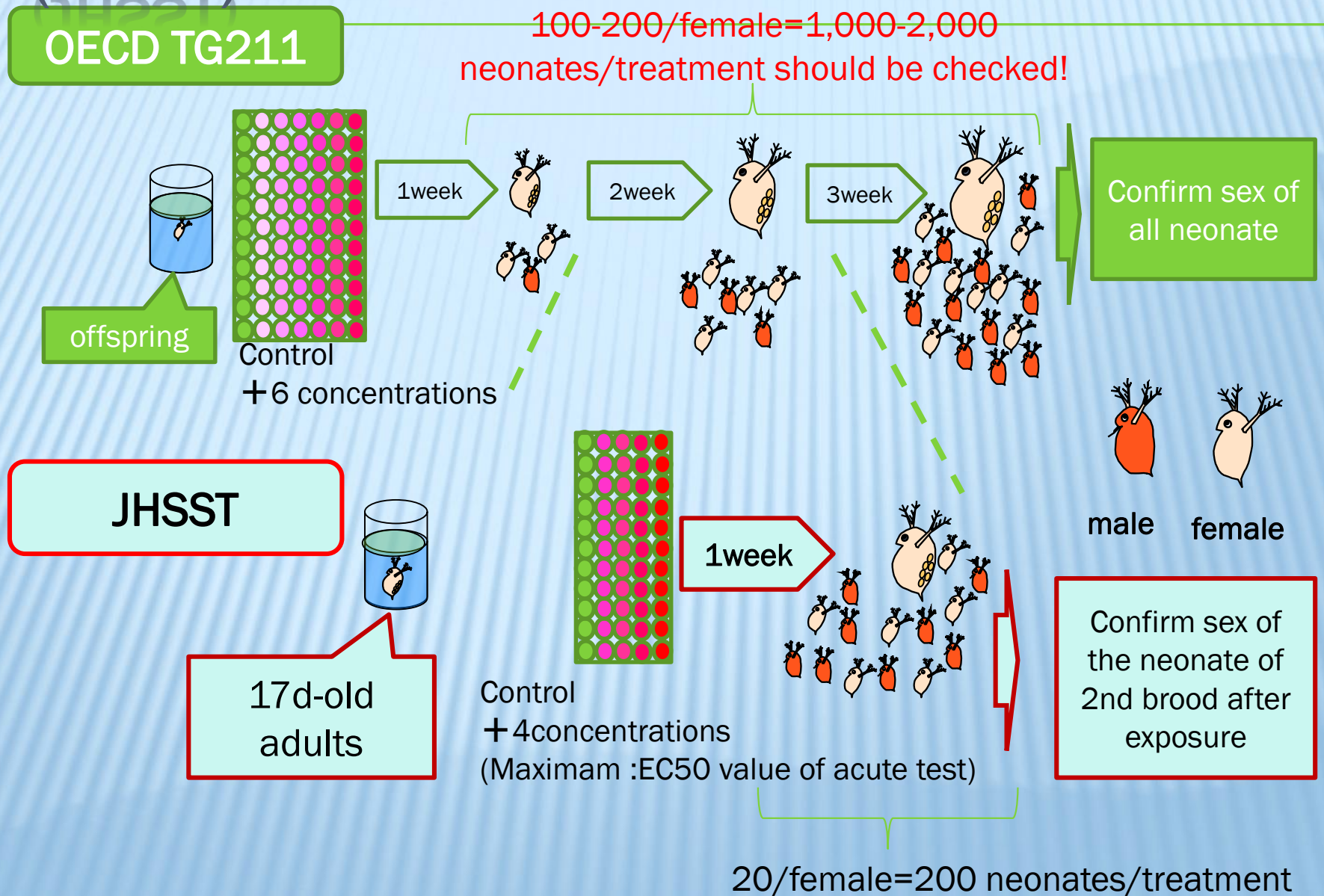
2018

バリデーション試験のレポートを提出（2019）

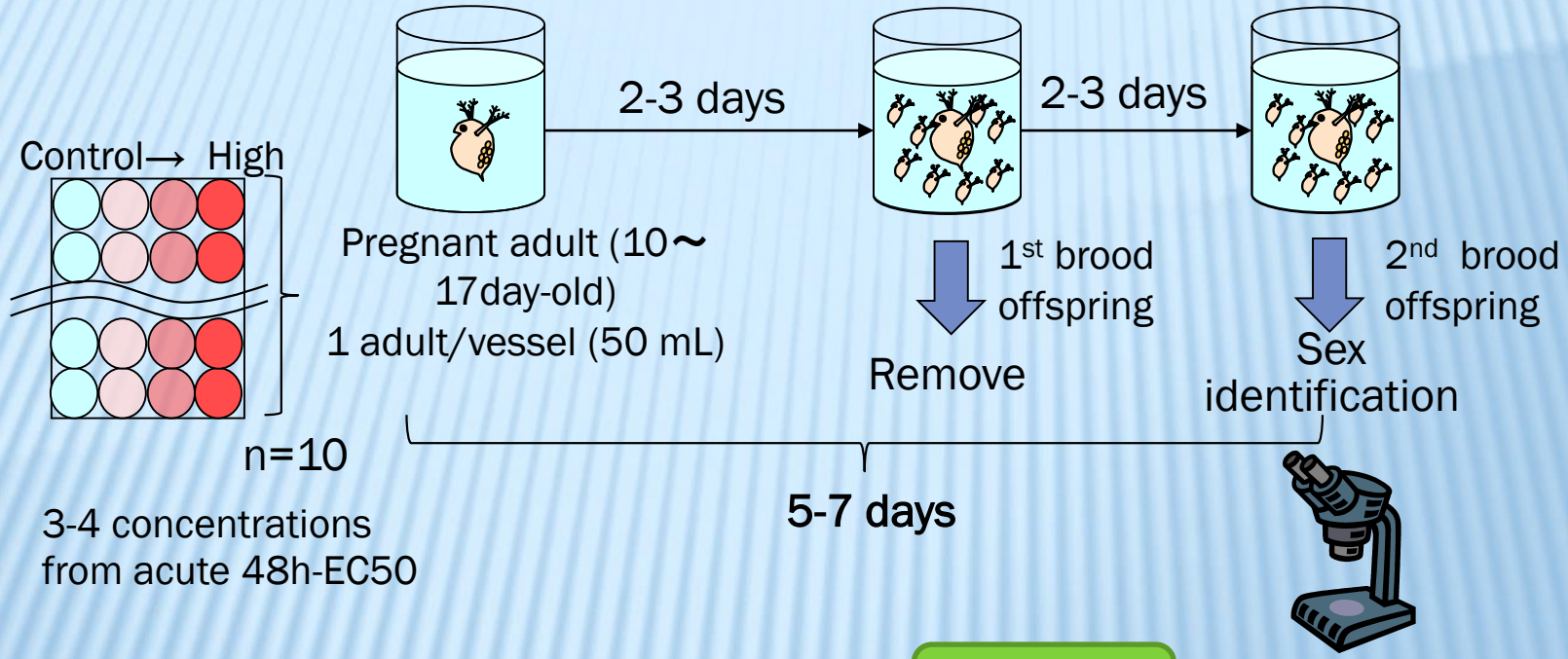
draft ガイダンスドキュメント をOECDに提出予定

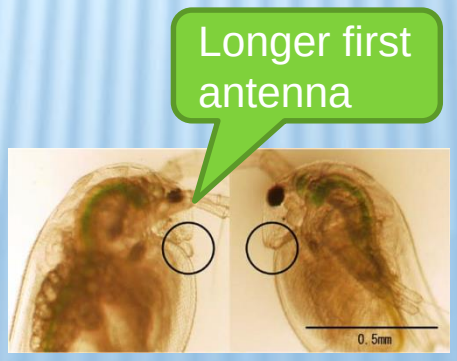
DAPHNIA MAGNA を用いた幼若ホルモンの短期スクリーニング試験法の加発

幼若ホルモン短期スクリーニング試験法 (JHSST)



プロトコール



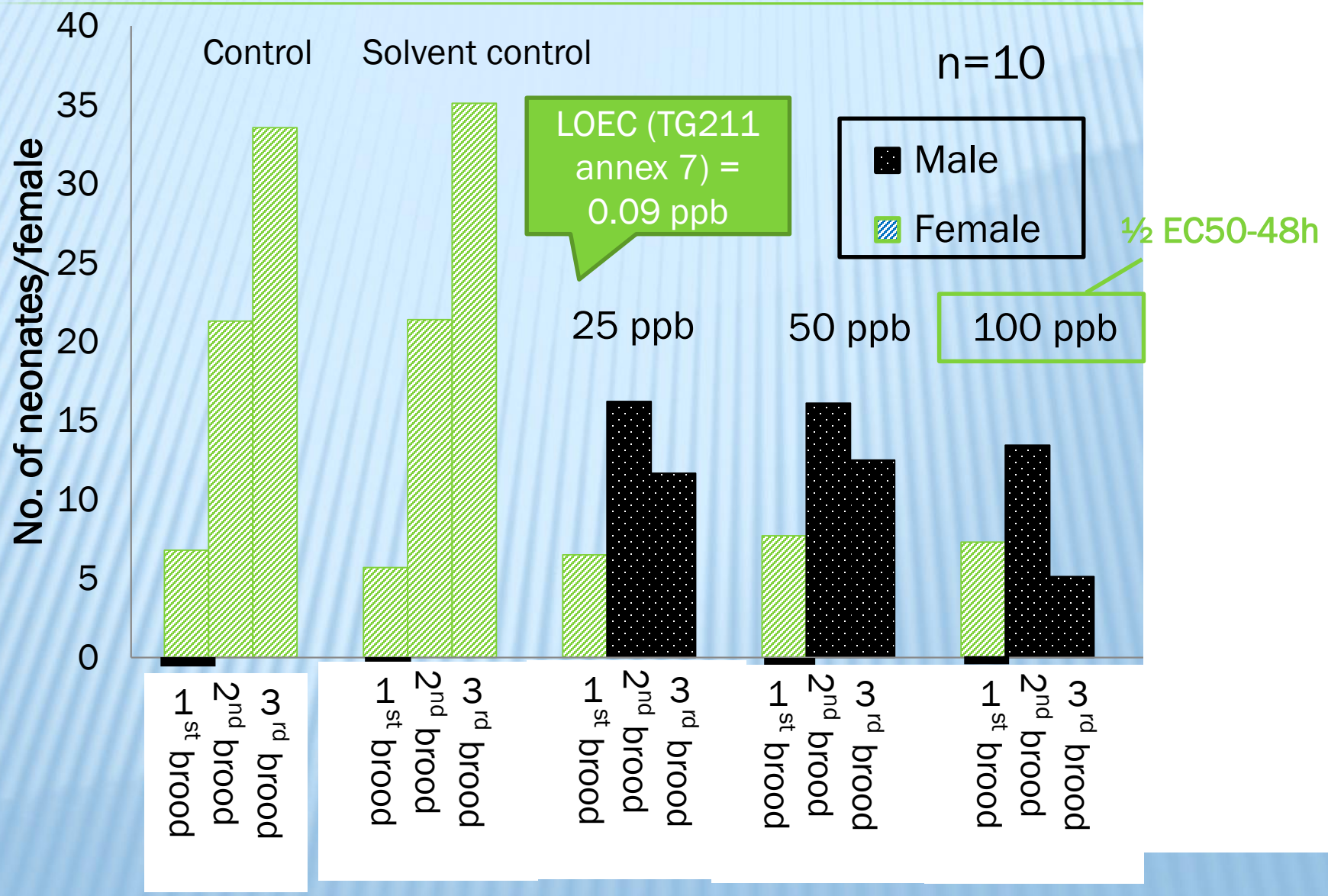


Male **Female**

バリデーション試験

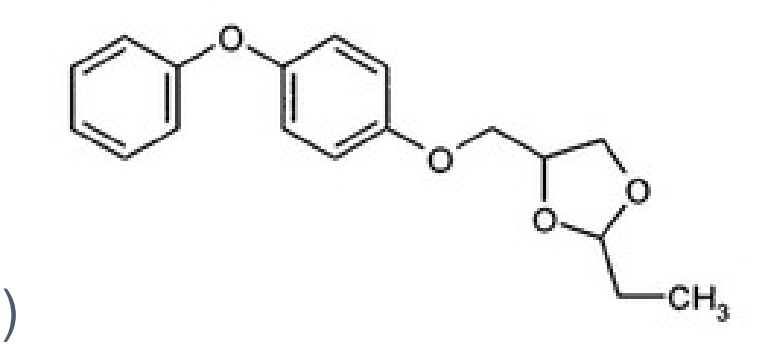
- Age of test organisms
  - 10-17d-old female (after producing 1st brood)
- Test concentrations
  - 4 concentrations from EC50 (TG202 immobilization test) or water solubility limit
- Test duration
  - 5-7 days (observe 2nd brood during the test)
- Number of replicates
  - N=10 (Following TG211) to ensure detection power

Pyriproxyfenを用いたバリデーション試験



幼若ホルモンアゴニスト

- Diofenolan:
  - Insect growth inhibitor
  - STS assay
  - Two-hybrid assay (JH receptor)
  - JH responsive genes up-regulation



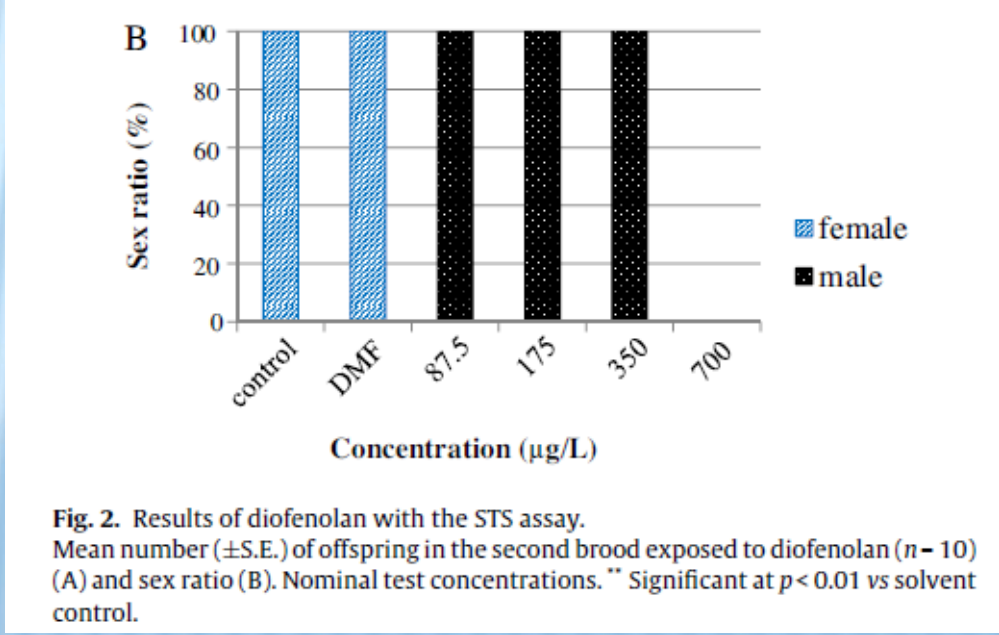


Fig. 2. Results of diofenolan with the STS assay.
Mean number (±S.E.) of offspring in the second brood exposed to diofenolan ($n = 10$) (A) and sex ratio (B). Nominal test concentrations. ** Significant at $p < 0.01$ *vs* solvent control.

Abe et al., 2015 Aquatic toxicology

急性毒性試験t

系統間差の感受性比較

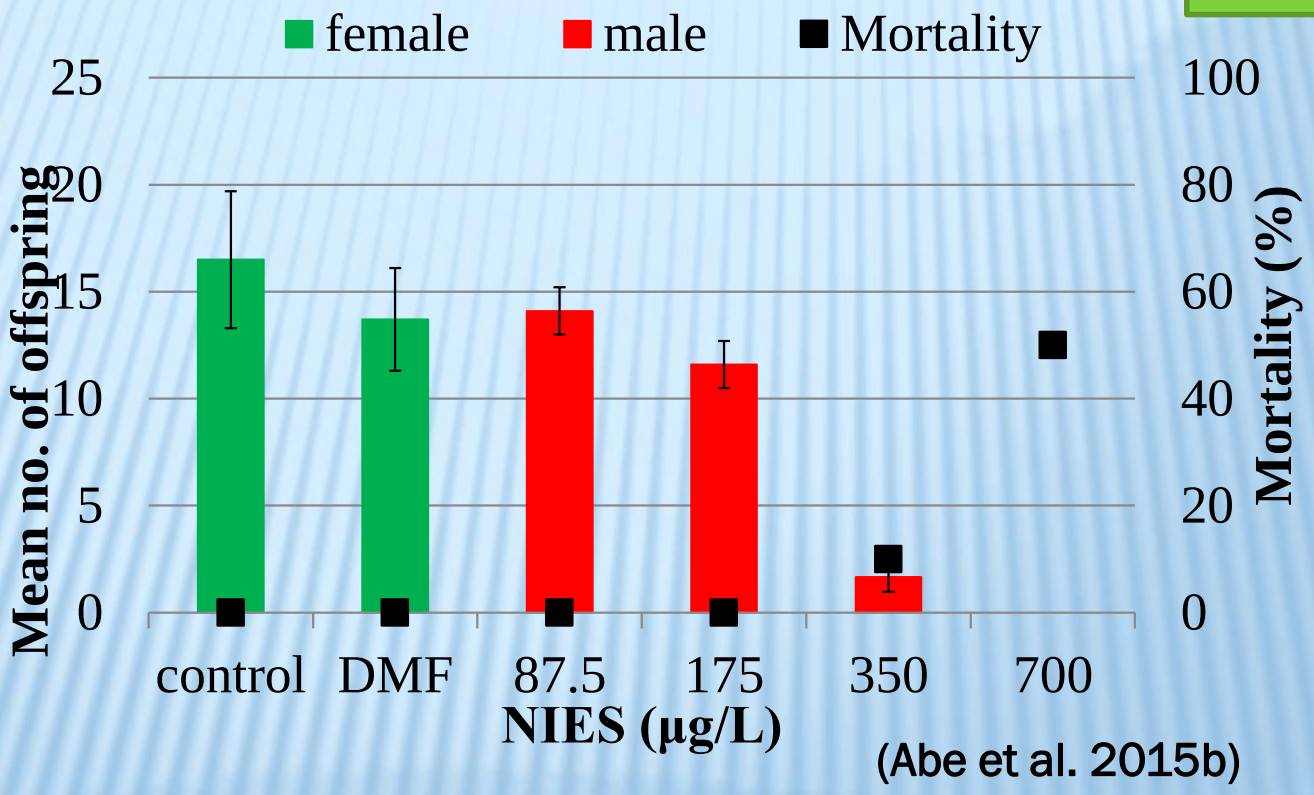
Diofenolan EC50(μg/L)

strain	EC50	95% Confidence interval
NIES	685	
UK(Astra)	287	139-713
Finland	713	583-844
Clone 5	427	328-525
Belgium	308	244-372

※NIES: Abe et al., 2015b

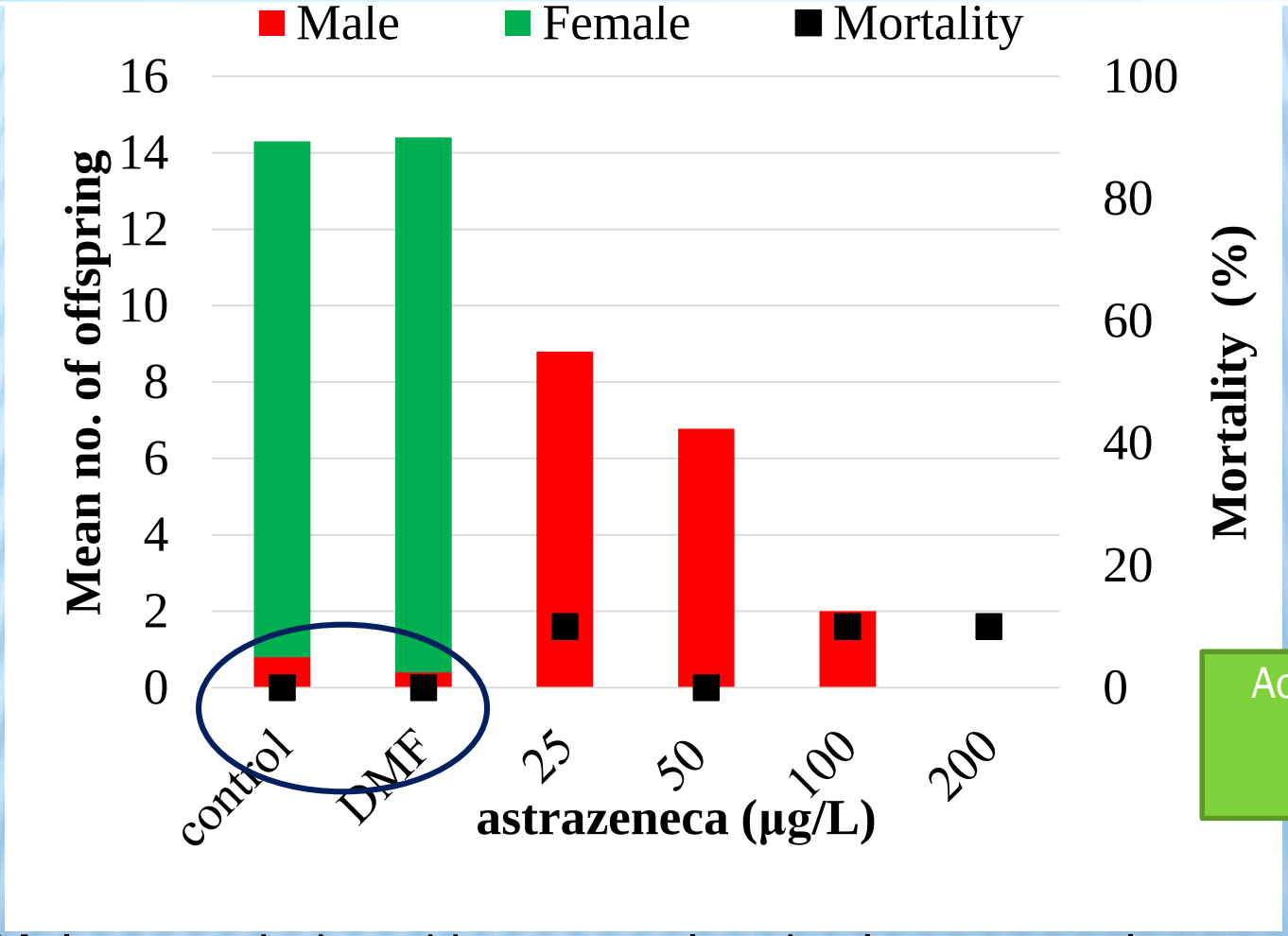
Diofenolan (NIES strain)

Acute Toxicity
EC_{50}
685μg/L



(Abe et al. 2015b)

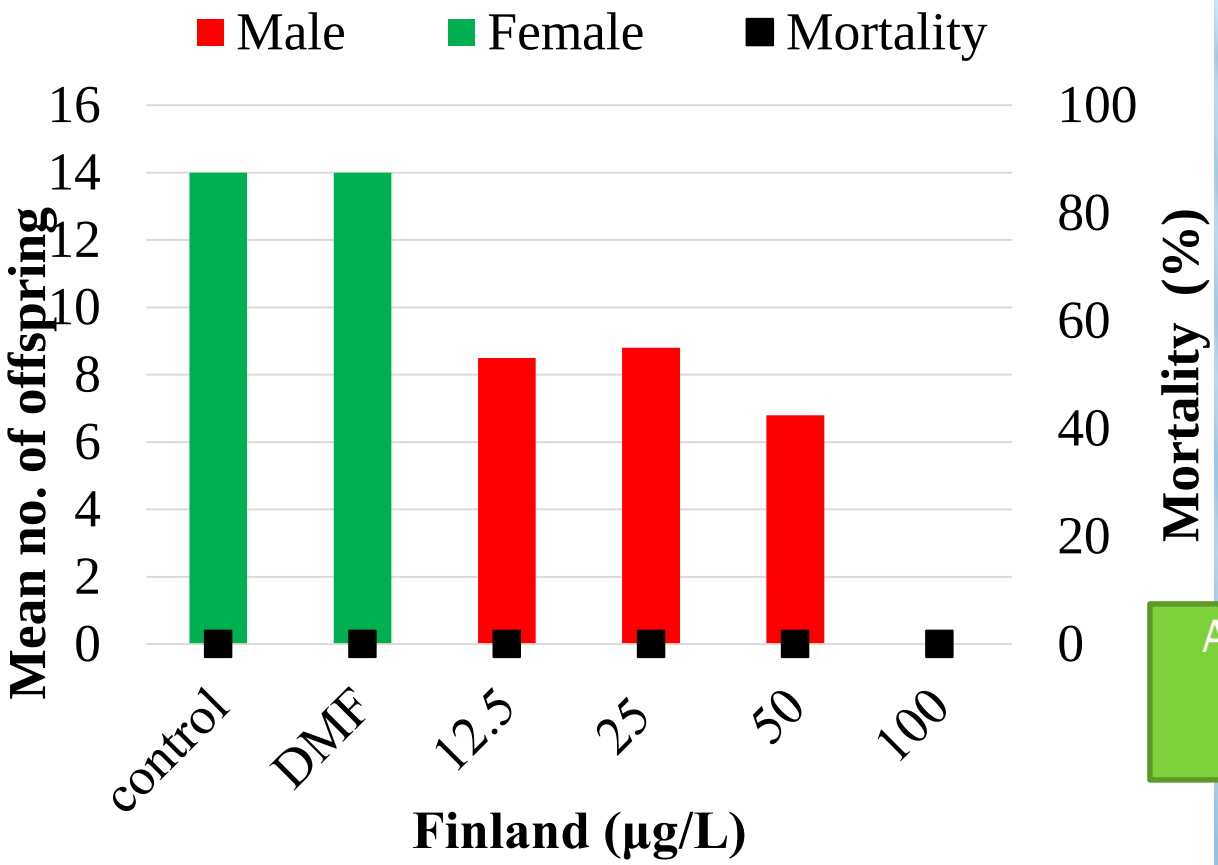
Diofenolan (UK strain provided by Astrazeneca)



Acute Toxicity
EC_{50}
287μg/L

Males were induced in a control and solvent control
More sensitive than NIES(reproduction)

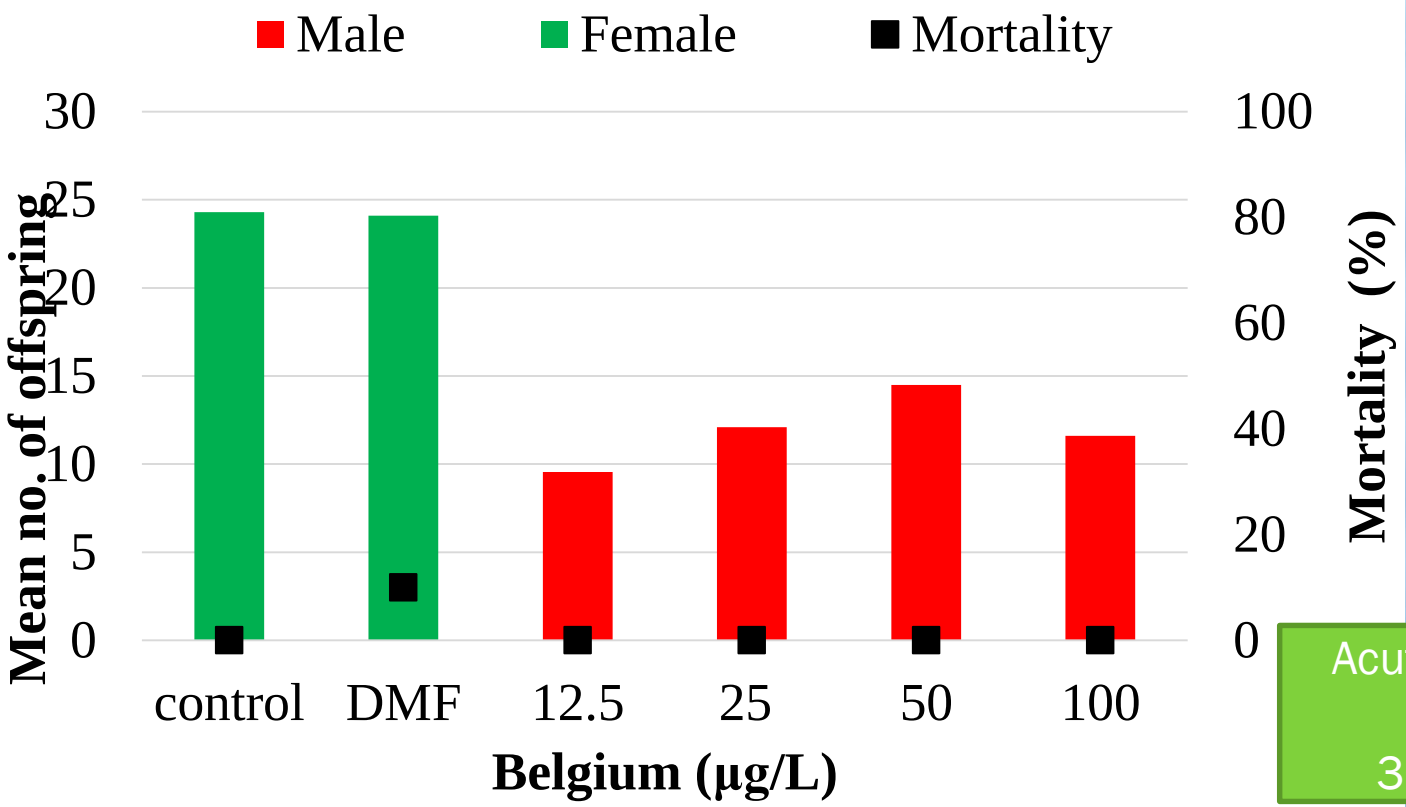
Diofenolan (Finland strain)



Acute Toxicity
EC_{50}
713µg/L

The result of the acute toxicity test is at the same level as NIES clone.
More sensitive than NIES(reproduction)

Diofenolan (Belgium strain ,DaphToxKit)

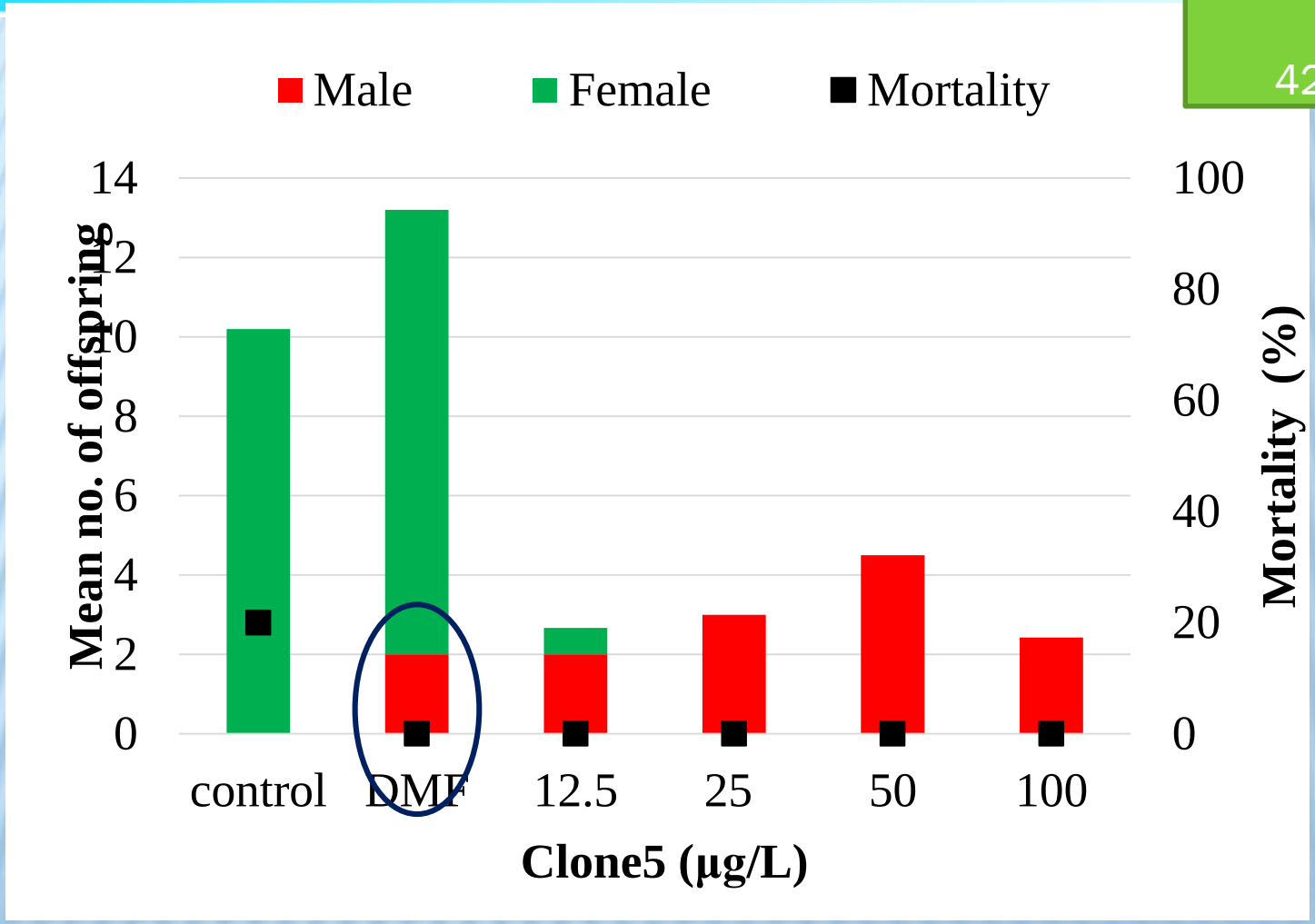


Acute Toxicity
EC_{50}
308µg/L

More sensitive than NIES(acute toxicity, reproduction)
Similar to Clone5

Diofenolan (Clone5)

Acute Toxicity
EC_{50}
427μg/L



Males were induced in a solvent control.
More sensitive than NIES(acute toxicity, reproduction)

CONCLUSIONS

- 試験機関内バリデーション試験の結果、試験法の有用性が確認された。
- 短期スクリーニング試験法のプロトコールを作成中。
- 急性毒性、繁殖影響共に、ミジンコ系統間で差があることが確認できた
- 試験機関間バリデーションの時には、系統を揃えて試験を行う必要がある。

WORK PLAN

- プロトコルを作成する。
- 試験機関間バリデーションを行う
- この試験法はあくまでスクリーニング試験法であり、確定試験法ではない。.
- バリデーション試験の協力国を求める。
- 次期WNT会議では内容的に、テストガイドラインではなく、ガイダンスドキュメントとして提案する方が良いと思われる。

Thank you for your attention!
Nori