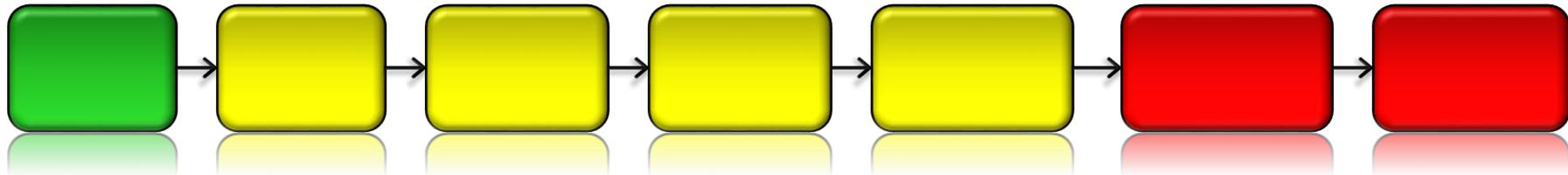


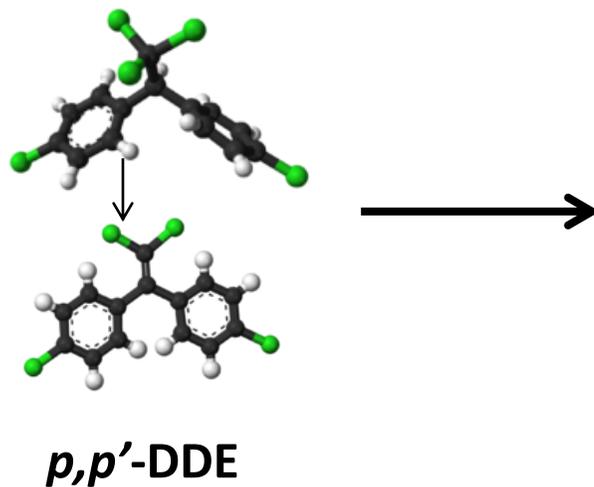
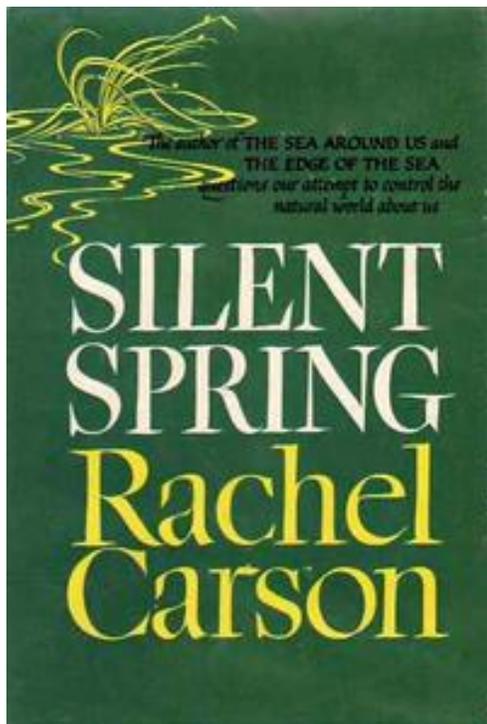
OECDでの議論は

Adverse Outcome Pathways と環境モニタリング：
化学物質曝露からハザード予測へ
*In vitro*試験の適用



井口泰泉

自然科学研究機構・基礎生物学研究所・
岡崎統合バイオサイエンスセンター



DDTは感受性の高い鳥類の集団を減少させた。ハクトウワシやペリカンなど。
野生生物の環境毒性学分野では良く知られた例
化学物質の環境影響に対応する大きな動機付けとなり、EPAのミッションの一つでもある



Regulatory Toxicologyの中心課題

ヒトの健康や野生生物集団への影響が出る前に

同じような影響を及ぼす可能性のある物質をどのように見出せば良いか



従来の毒性学

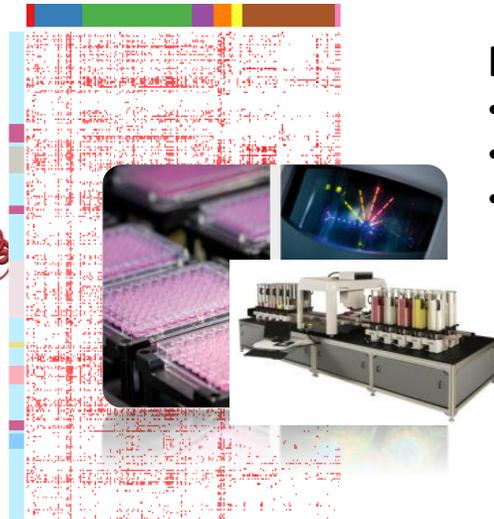
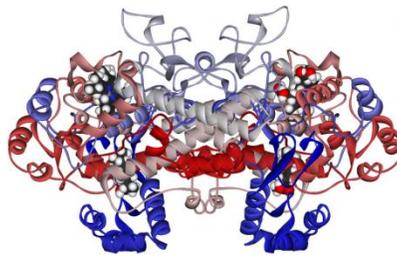
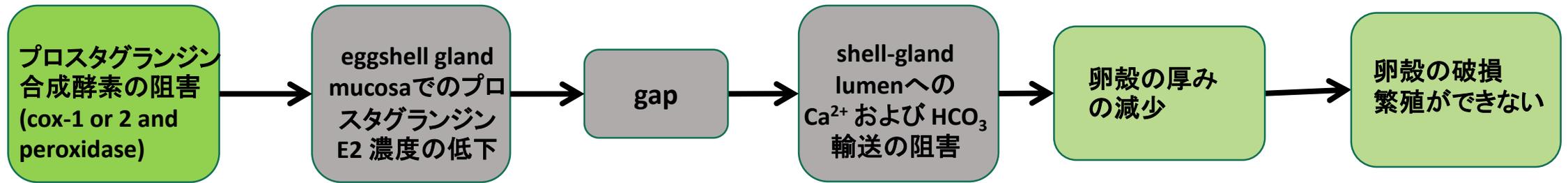
鳥類生殖試験

Avian reproduction study
(OPPTS 850.2300; OECD 206)

\$>250,000

>30 weeks to perform

もしも、化学物質が悪影響を及ぼす過程を理解し、
悪影響に向かう、悪影響に関連した生物学的応答・活性がわかれば、
ハザードの証明やリスクに基づいた決定に新たなデータを利用する可能性が
生まれる



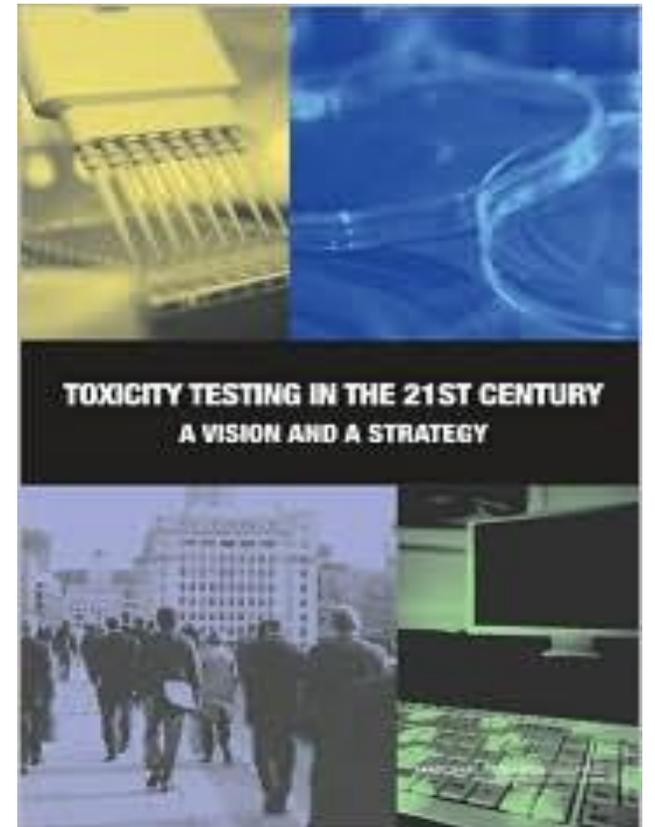
“毒性試験を動物試験から*in vitro*試験に変え、できればヒト由来の細胞、細胞株あるいは細胞のコンポーネントを用いて生物学的な変化を明らかにする”

“予測可能な、ハイスループットを用いる”

“複数の試験を組み合わせて、単なる影響だけでなく、毒性影響に関連するクリティカルなエンドポイントにつながるメカニズムを評価する”

**EU: 動物愛護の観点から動物実験反対
(魚類から)**

***In vivo* から *In vitro* へ**



ToxCast

> 600 assays, >2000 chemicals,



ToxCast HTS Assays

~500 Total Endpoints

Cellular Assays

Biochemical Assays

- Protein families

- GPCR
- NR
- Kinase
- Phosphatase
- Protease
- Other enzyme
- Ion channel
- Transporter

- Assay formats

- Radioligand binding
- Enzyme activity
- Co-activator recruitment

Primarily Human / Rat
Exception: Zebrafish development (Stephanie Padilla)

- Cell lines

- HepG2 human hepatoblastoma
- A549 human lung carcinoma
- HEK 293 human embryonic kidney

- Primary cells

- Human endothelial cells
- Human monocytes
- Human keratinocytes
- Human fibroblasts
- Human proximal tubule kidney cells
- Human small airway epithelial cells
- Rat hepatocytes
- Mouse embryonic stem cells (Sid Hunter)

- Biotransformation competent cells

- Primary rat hepatocytes
- Primary human hepatocytes

- Assay formats

- Cytotoxicity
- Reporter gene
- Gene expression
- Biomarker production
- High-content imaging for cellular phenotype

- 1536 well HTS
- 10,000 chemicals
- 25 assays per year



Assay Explorer

821 out of 821 assays selected 1858 out of 1858 chemicals selected

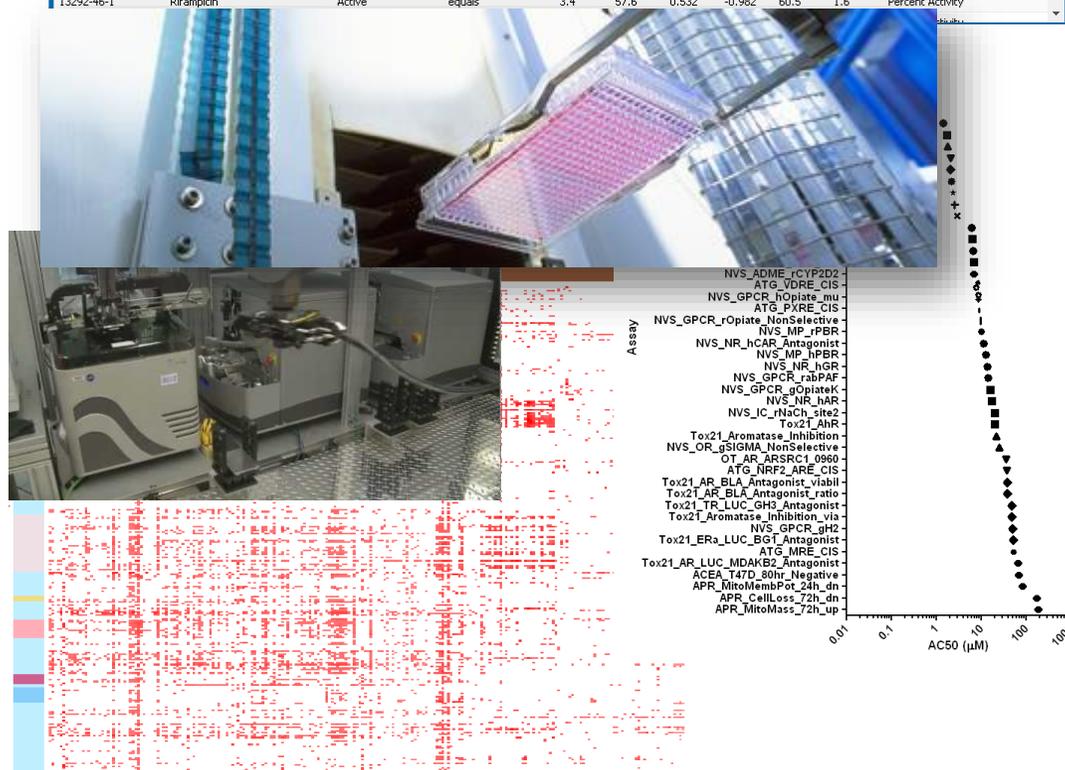
Assay Endpoint	CASRN	Chemical Name	Activity Call	Q	AC50	EMAX	logAC50	B	T	W	Data Type
COX											
NVS_ENZ_oCOX1	53-86-1	Indomethacin	Active	equals	0.0588	100	-1.23	-10	91.7	1.02	Percent Activity
NVS_ENZ_oCOX1_Activator	15307-79-6	Diclofenac sodium	Active	equals	0.156	100	-0.808	-4.34	101	1.17	Percent Activity
NVS_ENZ_oCOX2	6153-64-6	Oxytetracycline dihydrate	Active	equals	0.733	95.6	-0.135	10	96.4	2	Percent Activity
NVS_ENZ_oCOX2_Activator	54-62-6	4-Aminofolic acid	Active	equals	1.54	105	0.188	-0.0936	108	1.41	Percent Activity
	41481-66-7	4,4'-Sulfonylbis[2-(prop-2-en-...	Active	equals	1.65	66.7	0.219	-3.77	62.6	1	Percent Activity
	154-42-7	6-Thioguanine	Active	equals	1.86	93.5	0.269	3.67	94.9	1	Percent Activity
	105624-86-0	5HPP-33	Active	equals	1.96	97.4	0.292	1.94	98.2	1	Percent Activity
	59-05-2	Methotrexate	Active	equals	2.19	97	0.34	-1.19	102	1.09	Percent Activity
	41372-08-1	Methyldopa sesquihydrate	Active	equals	2.23	100	0.349	7.05	104	1	Percent Activity
	122-66-7	1,2-Diphenylhydrazine	Active	equals	2.49	100	0.396	0.376	105	1.22	Percent Activity
	80-15-9	Cumene hydroperoxide	Active	equals	2.76	86.5	0.441	-3.98	89.9	1.08	Percent Activity
	1401-55-4	Tannic acid	Active	equals	2.89	101	0.461	-2.49	107	1.34	Percent Activity
	7487-94-7	Mercuric chloride	Active	equals	2.95	83.9	0.469	0.0811	81.5	1.78	Percent Activity
	27323-41-7	Dodecylbenzene sulfonate trie...	Active	equals	2.99	65.1	0.476	5.35	65.2	1	Percent Activity
	1143-38-0	Anthralin	Active	equals	3.23	100	0.509	2.93	103	1.24	Percent Activity
	13292-46-1	Rifampicin	Active	equals	3.4	57.6	0.532	-0.982	60.5	1.6	Percent Activity

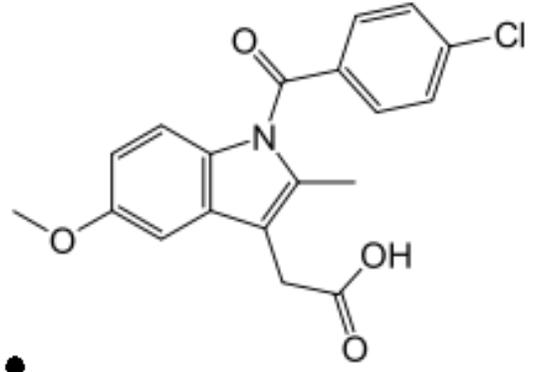
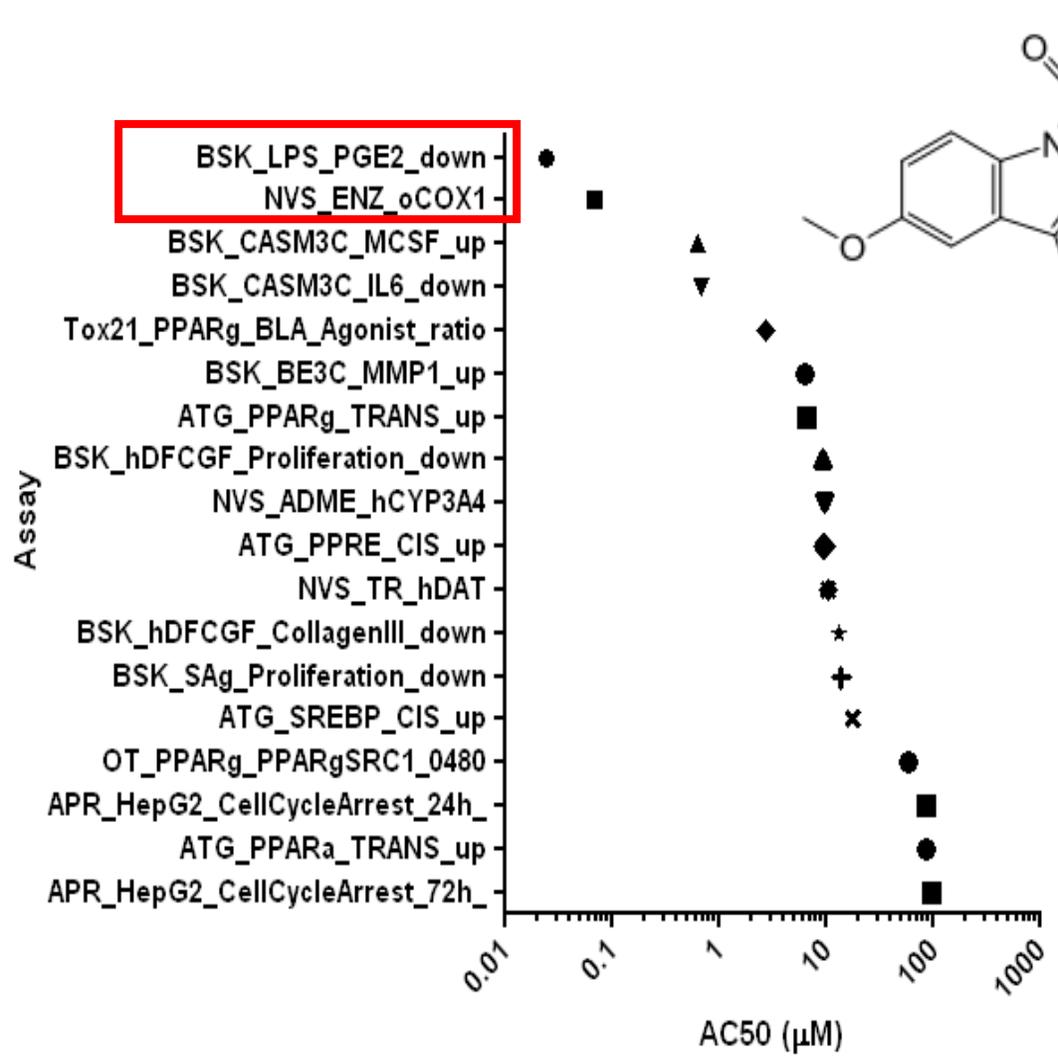
21世紀の毒性試験

早く、金をかけないで効率的に pathway-basedなデータを出す

数千物質の活性を数百の pathwaysにまとめる

一般に使われている物質の大半は10年で試験可能と思われる



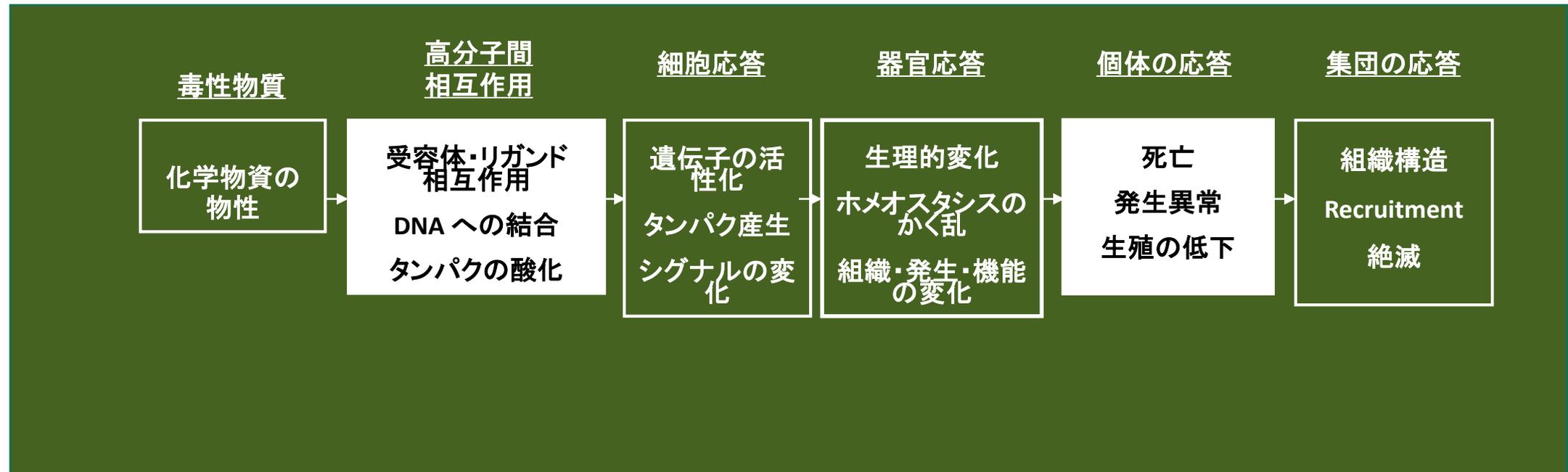


So What?

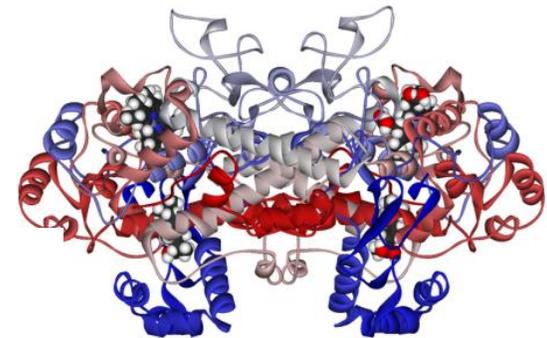
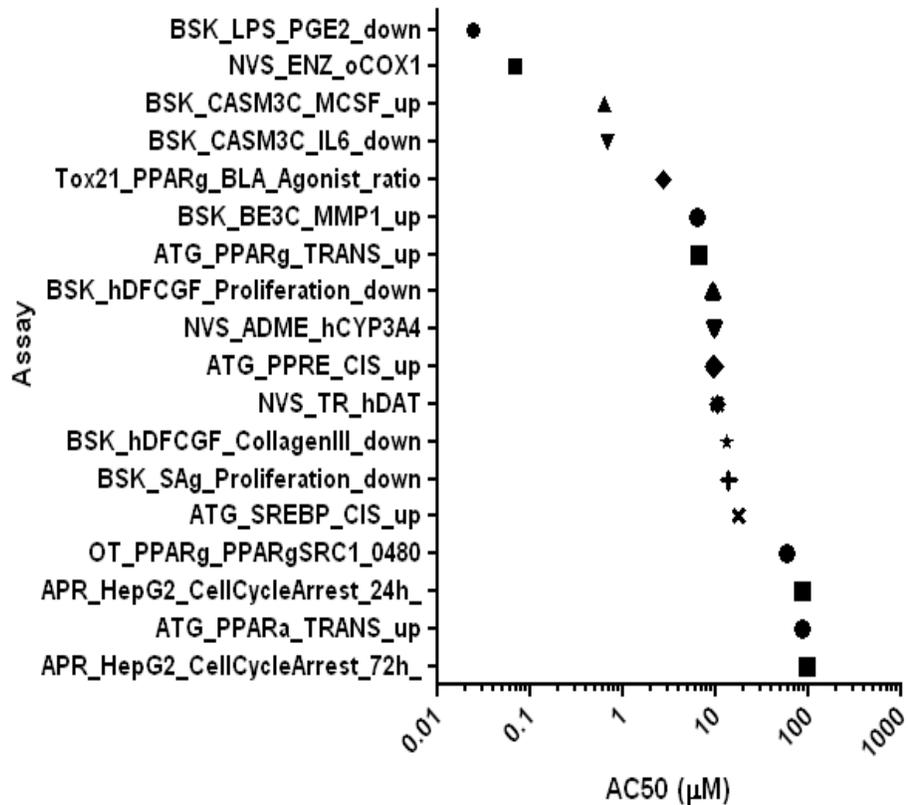
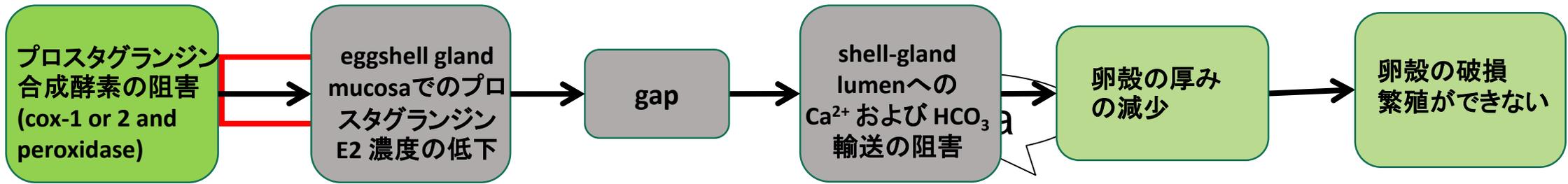


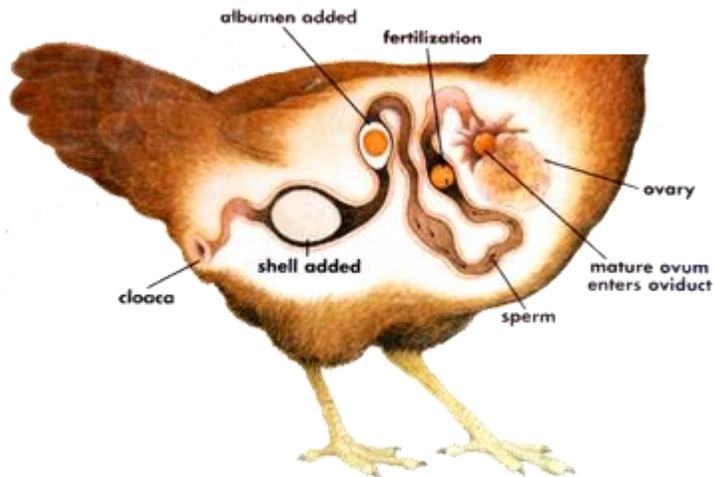
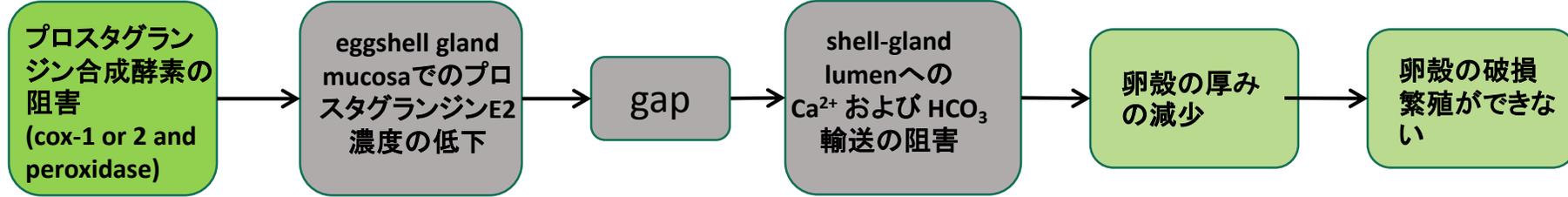
•Can we expect this perturbation lead to an adverse outcome?

AOPは概念的な枠組みであり、リスク評価に関連させるために生物レベルで分かっているMolecular initiating event とadverse outcomeを、直接関連させてあらわしてみる取り組み (Ankley et al. 2010, Environ. Toxicol. Chem., 29: 730-741.)



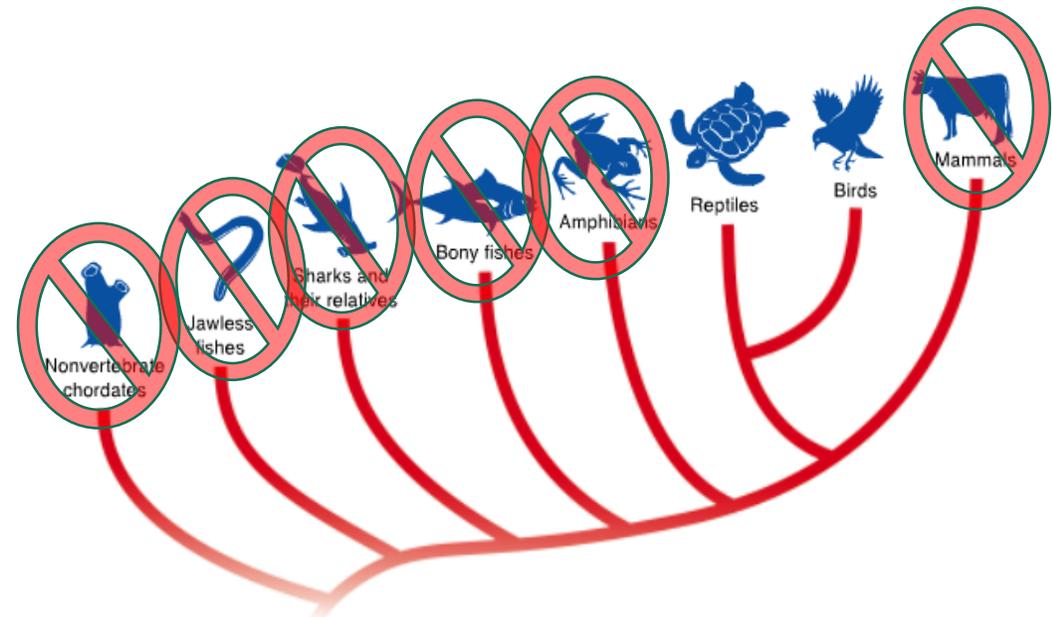
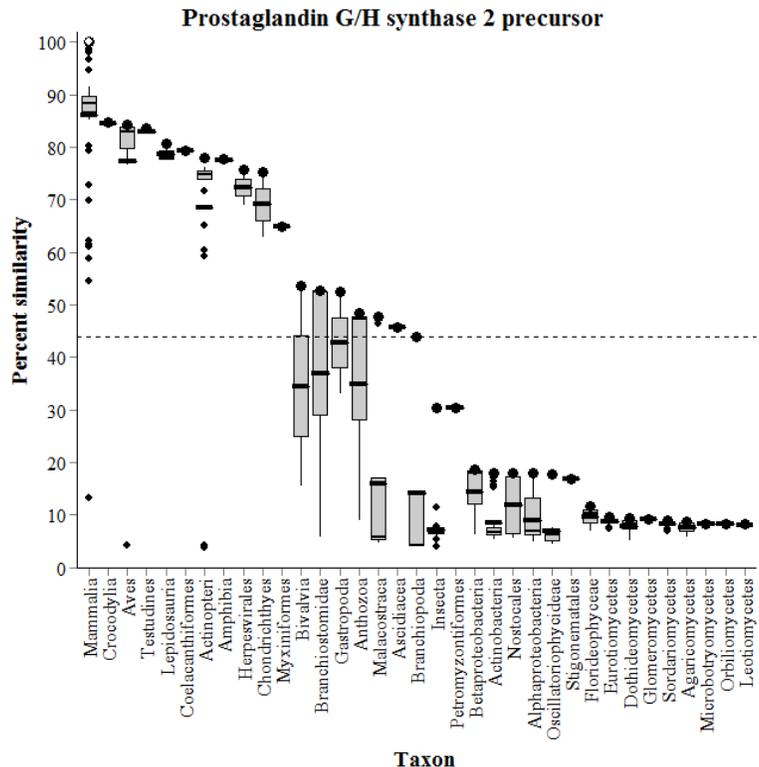
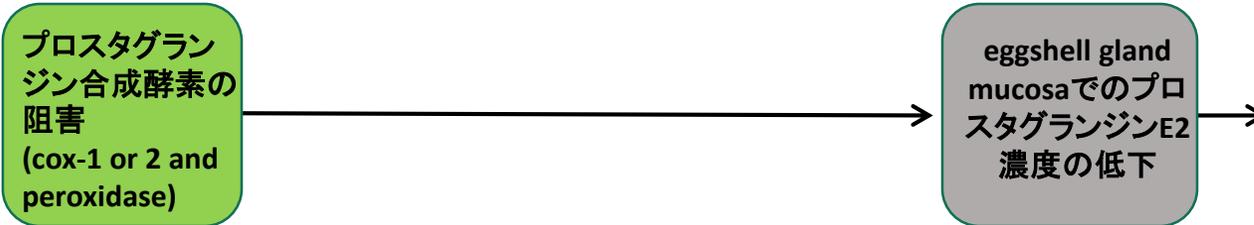
- 何が分かっているかの理解が可能
- この知見を使ってリスクに基づいた決定をサポートできる





- **代替試験:** 毒性試験で、迅速に測定でき、より安価なエンドポイント。
- **バイオマーカー:** 野生生物で測定できるバイオマーカー — 初期の警告あるいは診断に利用。
- **悪影響の強さ、定量的な予測の確からしさに使えるか。**
- **診断の可能性:** 観察された生物応答からの因果関係 — 原因物質やその排出源にさかのぼる。

分類群: このAOPはどこまでの種に応用できるか? モデル動物の、どのエンドポイントやキーイベントのデータ が野生生物に使えるか?



•ハイスループットスクリーニングは作用メカニズムデータを出すだけではない。

•毒性学では毒性の背景となるメカニズムを数十年研究している。

•文献では多くのメカニズムデータが報告されており、規制にも利用されている。

- Biomarkers

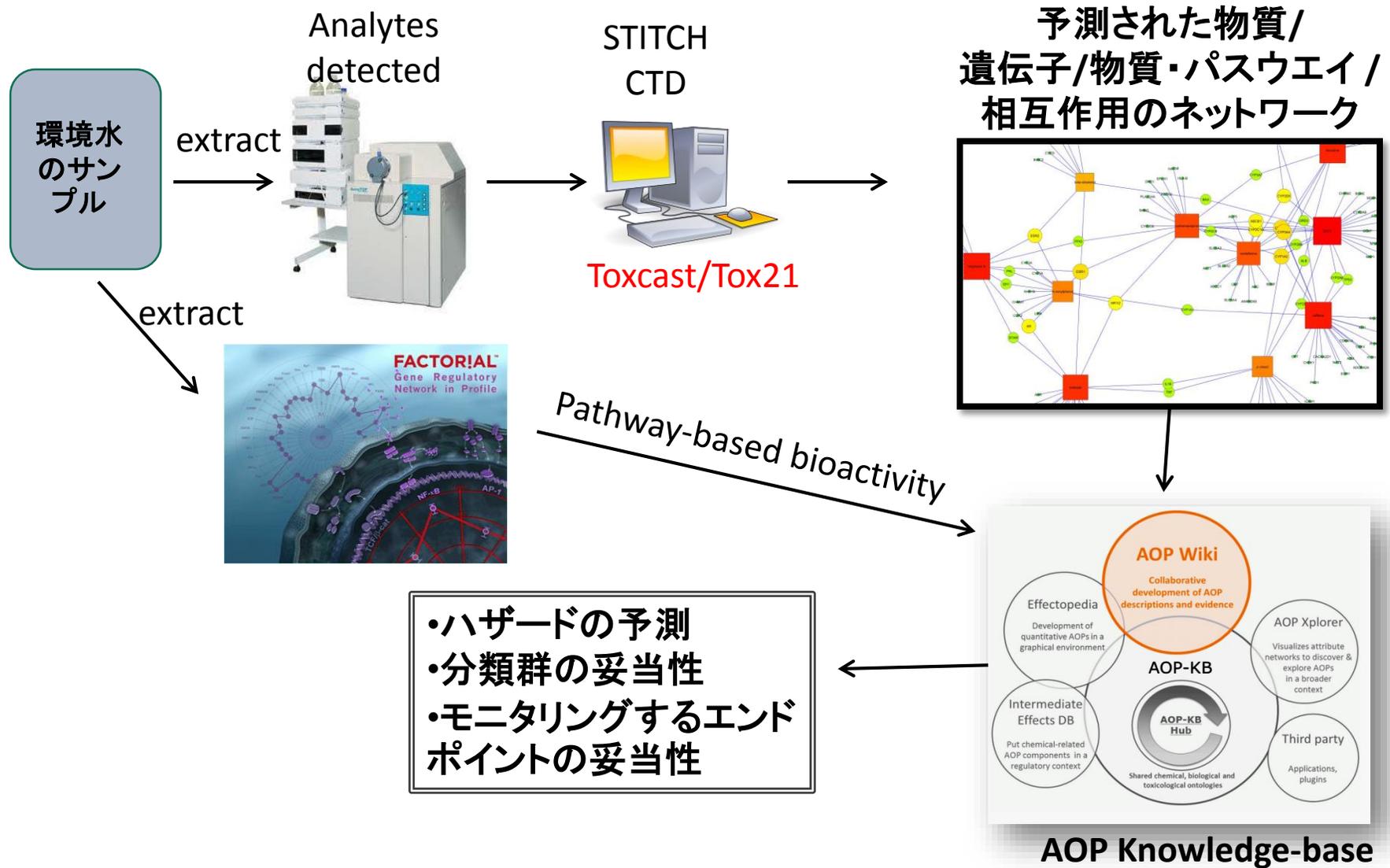
- Omics

- QSAR and Read-Across

- High content imaging

- In vitro*

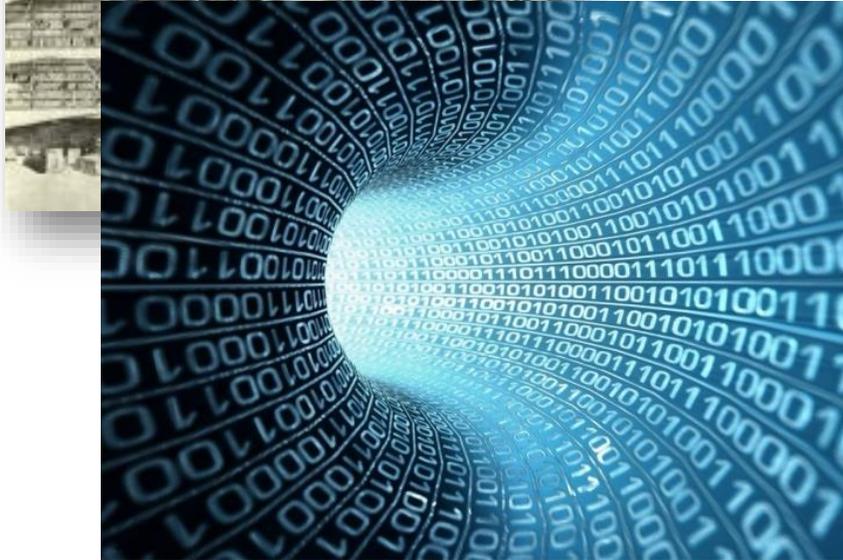
- 代替モデル動物 (e.g., ゼブラフィッシュ, ショウジョウバエ, センチュウ)





データはある....

科学論文の全てを網羅したライブラリーが入手可能



21世紀のチャレンジ....

それらのデータおよび既存知見を、規制の判断にどのように有効に利用するか?

AOPs はその解決に利用可能

1992 SETAC Pellston workshop on biomarkers – identified need for linkages across levels of organization to support use of biomarkers in ERA.

Mid 90s Schmieder, Bradbury, Veith, others in ecotox community – concept to support application of QSARs and biomarkers in ERA.

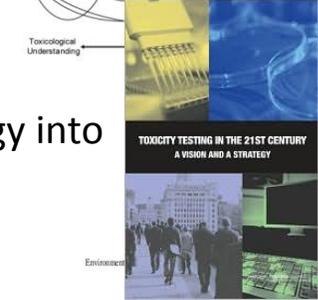
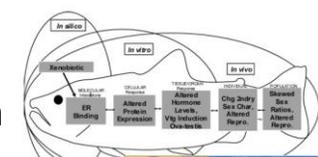
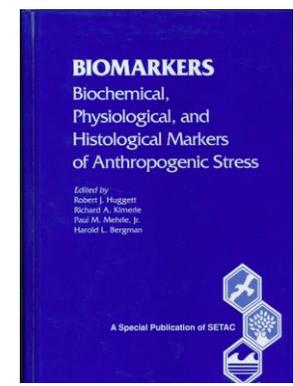
2004 Bradbury et al. (ES&T Dec. 1, 2004) – publication of the concept as a means to support greater use of in silico and in vitro approaches in risk assessment – termed “Toxicity Pathway”

2004 Schmieder et al. (ES&T 38:6333-6342) – published a “toxicity pathway” linking ER binding to potential population-level consequences.

2007 NRC report on Toxicity Testing in the 21st Century – advocated paradigm similar to Bradbury et al – defined “toxicity pathway” as “*cellular response pathways that, when sufficiently perturbed, are expected to result in adverse health effects*”

2009, 2010 Use of AOP term at McKim conferences – introduction of AOP terminology into OECD QSAR tool-box discussions

2010 MED working group published definition of “Adverse Outcome Pathways”, describe application in Ecotox and Ecological Risk Assessment. ET&C 2010.

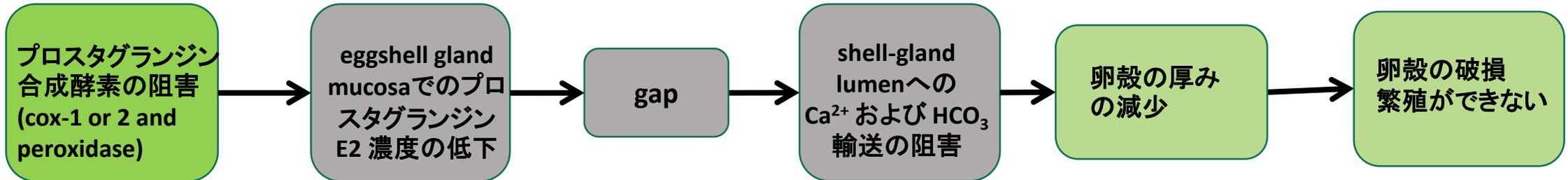


Hazard/Risk Assessment

ADVERSE OUTCOME PATHWAYS: A CONCEPTUAL FRAMEWORK TO SUPPORT ECOTOXICOLOGY RESEARCH AND RISK ASSESSMENT

GERALD T. ANKLEY,* RICHARD S. BENNETT, RUSSELL J. ERICKSON, DALE J. HOFF, MICHAEL W. HORNUNG, RODNEY D. JOHNSON, DAVID R. MOUNT, JOHN W. NICHOLS, CHRISTINE L. RUSSOM, PATRICIA K. SCHMIEDER, JOSE A. SERRANO, JOSEPH E. TIETGE, and DANIEL L. VILLENEUVE

最近まで, AOP 開発は限定的であった



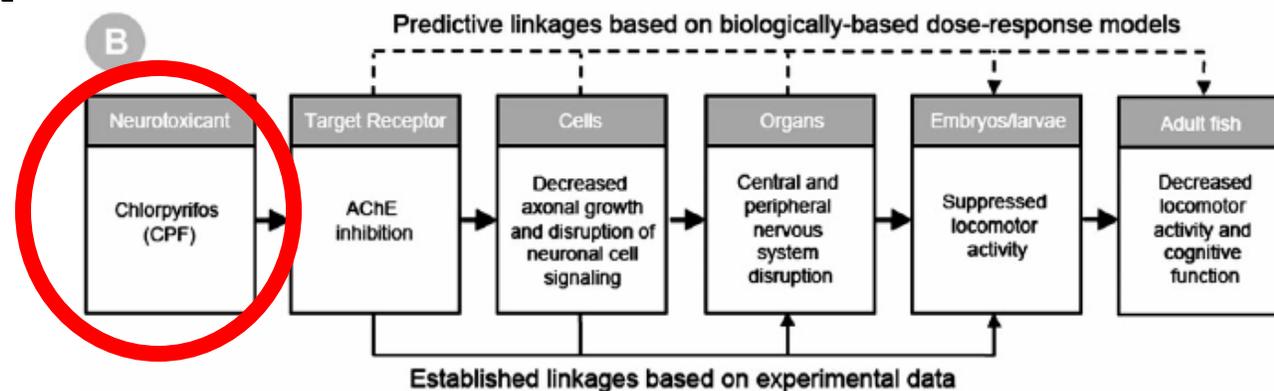
- どのようなすれば、規制判断を支持するために、選択した関連が正しく・正当化できるか？
- 生物学的/毒性学的に応用できるドメインは？
 - 分類群, 発達段階, 標的器官, 曝露経路
- どのようにしたら組織的に透明性を持って表すことができるか？

AOPの原理

- AOP：特定の悪影響につながる**生物学的な変動**で、それがどのように起こるかをあらわす。
- MOA：既存のデータにより、このAOPが**特定の物質**と関連することを示す。
- AOPの中のKEsは、測定できるエンドポイントであり、その物質によってAOPが引き起こされることを確認するために使用される。
- MOAの解析により、特定のAOPsがと特定の物質の関連が証明できるので、別の物質が同じような生物学的な変動を起こす場合には全てのKEの解析をすることなく、そのAOPが応用できる。

AOPs は化学物質特異的なものではない

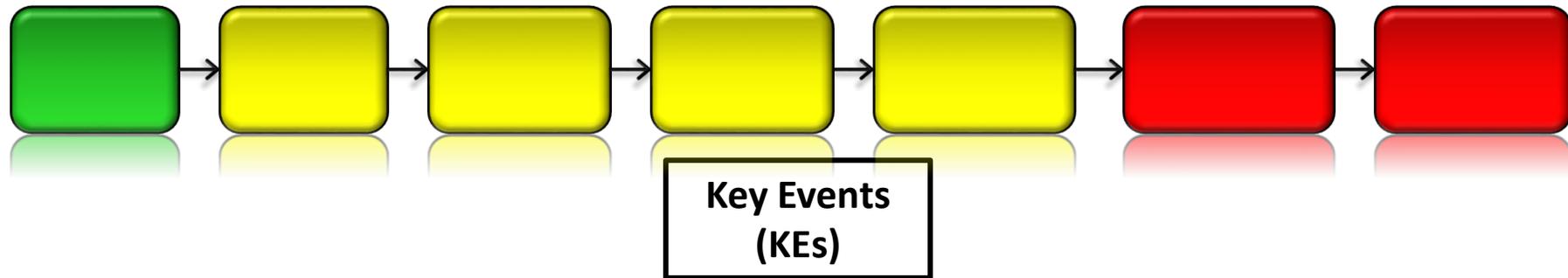
- 特定の1物質の影響を表示するのではない。
- 設定したMIEをひきおこし、その後に生物学的な悪影響を及ぼすことにつながる全ての物質にあてはまるものであること。
- AOPをあらわすには物質特異的な情報は必要ない。
- *Applying* those motifs in a predictive context requires understanding chemical-specific properties (e.g., potency, ADME) that dictate the magnitude and duration of perturbation at the MIE



Volz et al. 2011. *Toxicol. Sci.* 123: 349-358

Russom et al. 2014. *Environ. Toxicol. Chem.* 33: 2157-2169

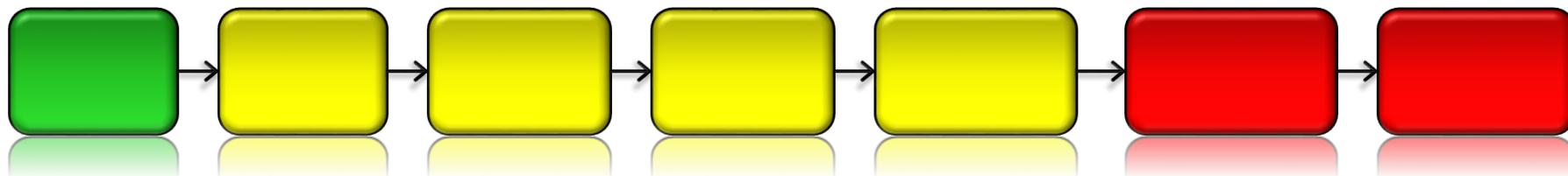
AOPs はモジュール



- **観察/確証**
- 観察できる生物応答 (定量可)
- 必須 (十分でなくても良い)

- 説明・解釈
- 観察/測定方法
- 動物分類への応用

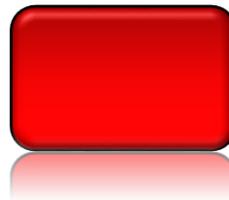
Building an AOP



- Molecular initiating event (MIE) –物質との相互作用を示す、生物体内での最初の特異的な分子的なキーイベントで悪影響につながる、AOPの始まり。



- Adverse Outcome (AO) – 特異的なキーイベントであり、規制に用いる毒性試験でも受け入れられているエンドポイントで悪影響を表す。

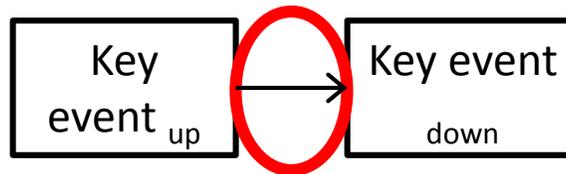


AOPs はモジュール

Two Primary Building Blocks



Key Event の関連性 (KERs)



• *Functional unit of inference/extrapolation*

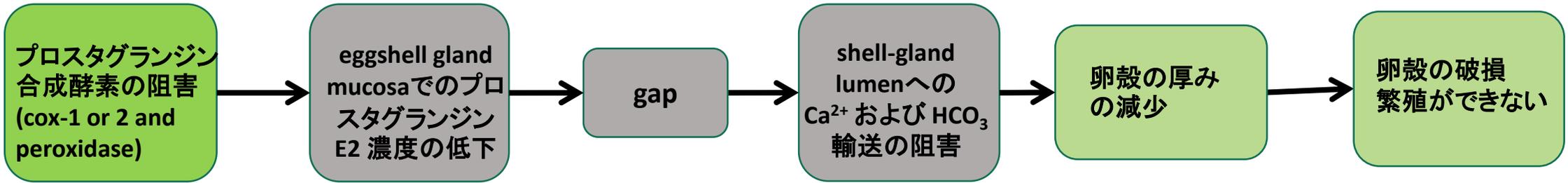
• Define a directed relationship

• State of KE_{up} provides some ability to predict or infer state of KE_{down}

• Supported by plausibility and evidence

• Quantitative understanding

Modified BH Considerations	Conclusions
Biological Plausibility	KER は現在の生物学的な理解と一致していること – plausible.
Essentiality of Key events	ストレッサーがなくなれば影響は可逆的 (e.g., Villeneuve et al. 2009; EHP 117: 624-631)
Concordance of Empirical Observations	Dose response – キーイベントは影響と関連する濃度と同じか低い濃度で起こっているか? Temporality – キーイベントは仮説としてたてた順に観察できるか? Incidence – 影響が起こる頻度はキーイベントの頻度より低いのか?
Consistency	同じパターンの影響は数種の試験生物で見られる (e.g., fathead minnow, zebrafish, medaka)
Analogy	類似の影響は既知の3種類のアロマトーゼ阻害剤で観察される (FAD, LET, PRO)



actor.epa.gov/dashboard/

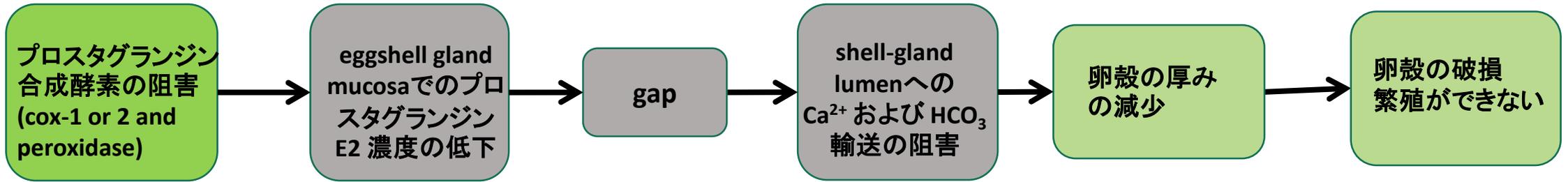
EPA TOXCAST HOME ASSAY SELECTION CHEMICAL SELECTION ASSAY EXPLORER CHEMICAL EXPLORER PRIORITIZATION COMING SOON!

Assay Explorer 821 out of 821 assays selected 1858 out of 1858 chemicals selected [Export](#)

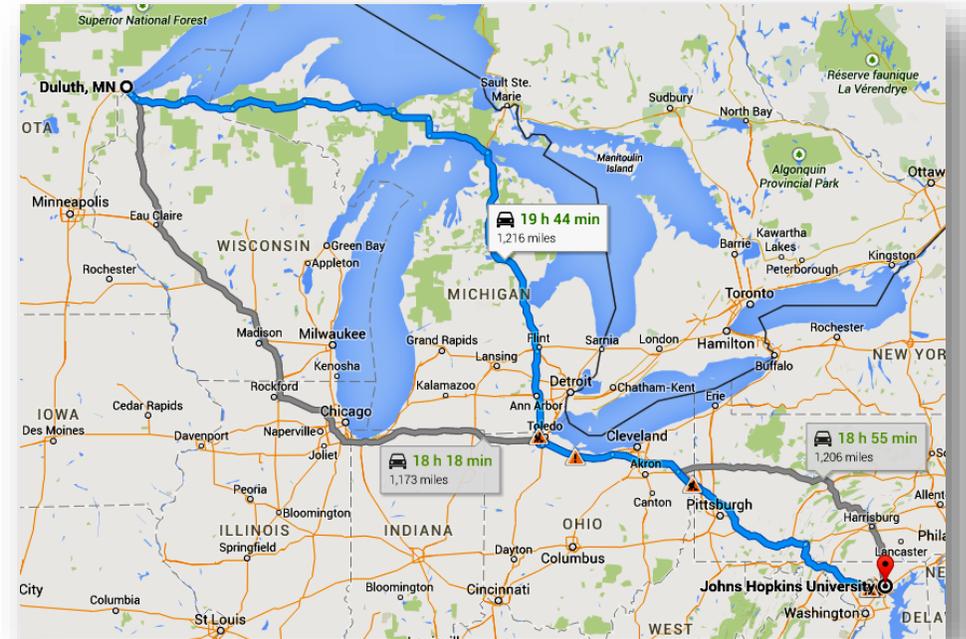
Assay Endpoint	<input checked="" type="checkbox"/> Actives Only	CASRN	Chemical Name	Activity Call	Q	AC50	EMAX	logAC50	B	T	W	Data Type
cox												
NWS_ENZ_oCOX1		53-86-1	Indomethacin	Active	equals	0.0588	100	-1.23	-10	91.7	1.02	Percent Activity
NWS_ENZ_oCOX1_Activator		15307-79-6	Diclofenac sodium	Active	equals	0.156	100	-0.808	-4.34	101	1.17	Percent Activity
NWS_ENZ_oCOX2		6153-64-6	Oxytetracycline dihydrate	Active	equals	0.733	95.6	-0.135	10	96.4	2	Percent Activity
NWS_ENZ_oCOX2_Activator		54-62-6	4-Aminofolic acid	Active	equals	1.54	105	0.188	-0.0936	108	1.41	Percent Activity
		41481-66-7	4,4'-Sulfonylbis[2-(prop-2-en-...	Active	equals	1.65	66.7	0.219	-3.77	62.6	1	Percent Activity
		154-42-7	6-Thioguanine	Active	equals	1.86	93.5	0.269	3.67	94.9	1	Percent Activity
		105624-86-0	SHPP-33	Active	equals	1.96	97.4	0.292	1.94	98.2	1	Percent Activity
		59-05-2	Methotrexate	Active	equals	2.19	97	0.34	-1.19	102	1.09	Percent Activity
		41372-08-1	Methyldopa sesquihydrate	Active	equals	2.23	100	0.349	7.05	104	1	Percent Activity
		122-66-7	1,2-Diphenylhydrazine	Active	equals	2.49	100	0.396	0.376	105	1.22	Percent Activity
		80-15-9	Cumene hydroperoxide	Active	equals	2.76	86.5	0.441	-3.98	89.9	1.08	Percent Activity
		1401-55-4	Tannic acid	Active	equals	2.89	101	0.461	-2.49	107	1.34	Percent Activity
		7487-94-7	Mercuric chloride	Active	equals	2.95	83.9	0.469	0.0811	81.5	1.78	Percent Activity
		27323-41-7	Dodecylbenzene sulfonate trie...	Active	equals	2.99	65.1	0.476	5.35	65.2	1	Percent Activity
		1143-38-0	Anthralin	Active	equals	3.23	100	0.509	2.93	103	1.24	Percent Activity
		13292-46-1	Rifampicin	Active	equals	3.4	57.6	0.532	-0.982	60.5	1.6	Percent Activity
		60-00-2	4-Aminocarbonyl...	Active	equals	3.45	72.5	0.538	3.63	75	1	Percent Activity

理由が明らかな、卵殻の薄化を引き起こすことが予測できる一連の物質

AOPs は悪影響を評価するための実用的なユニットで作られている

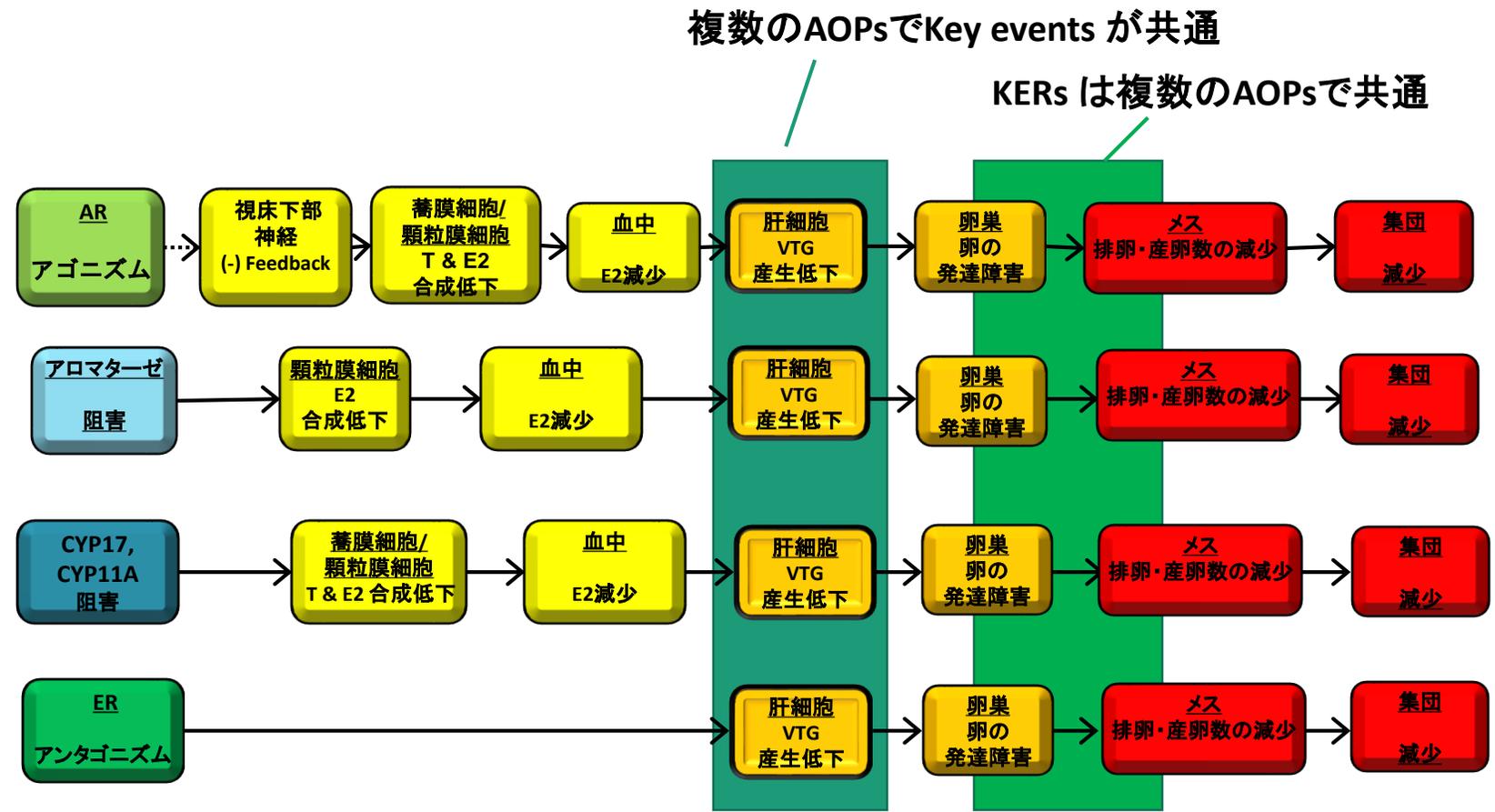


- AOP はMIEから一連のKE (Key Events) を元にAO (Adverse Outcome) に直線的につながる過程
- AOP は複雑な生物応答を実用的に単純化している
- “リガンド” – 機能的な予測のユニット

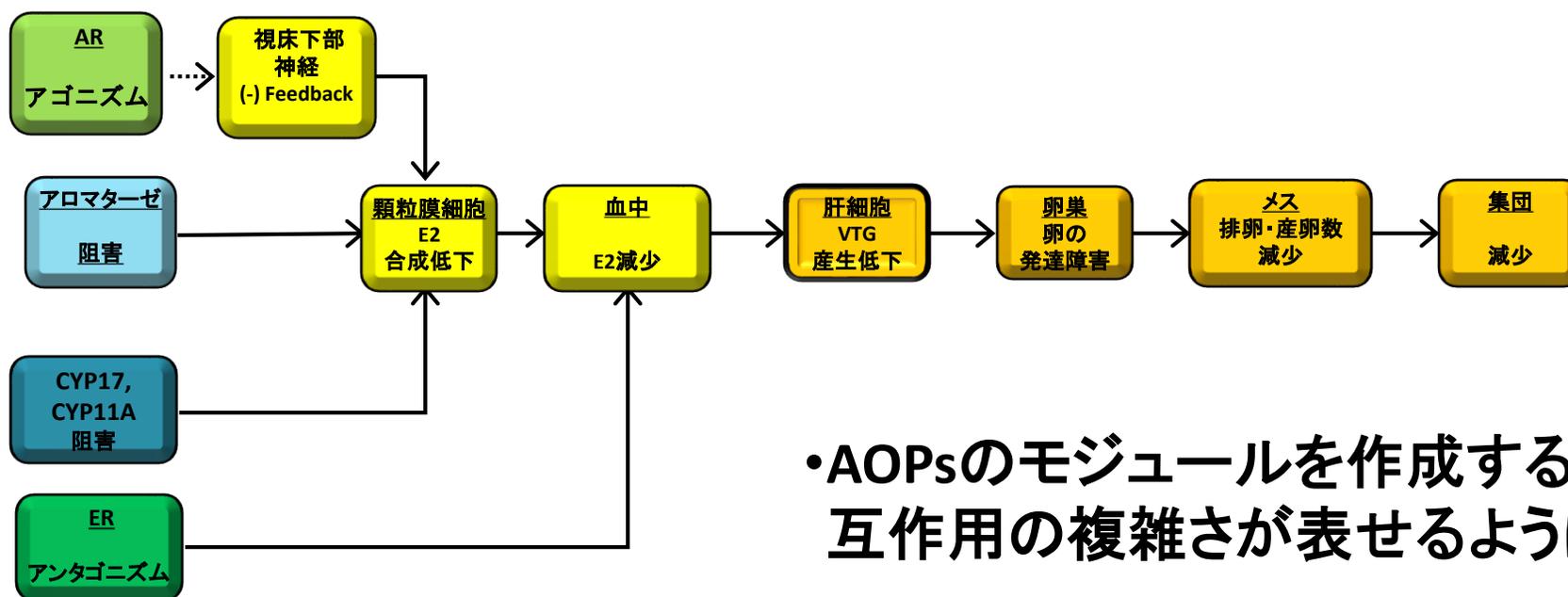


One set of directions from point A to point B, not the map of all possible routes

実際の応用では, AOP のネットワークは予測のための機能的なユニット



より実際的には, AOP のネットワークは予測のための機能的なユニット

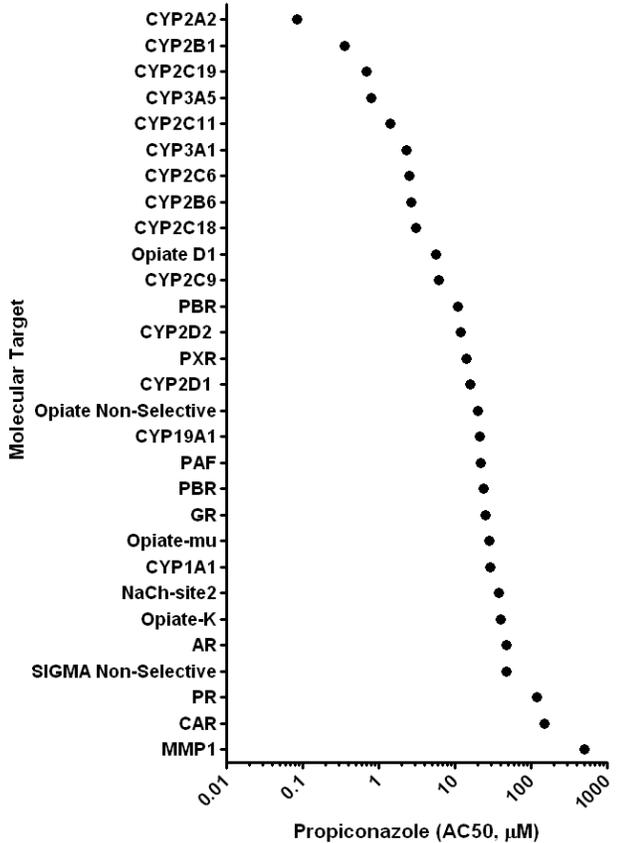


•AOPsのモジュールを作成することで、相互作用の複雑さが表せるようになる

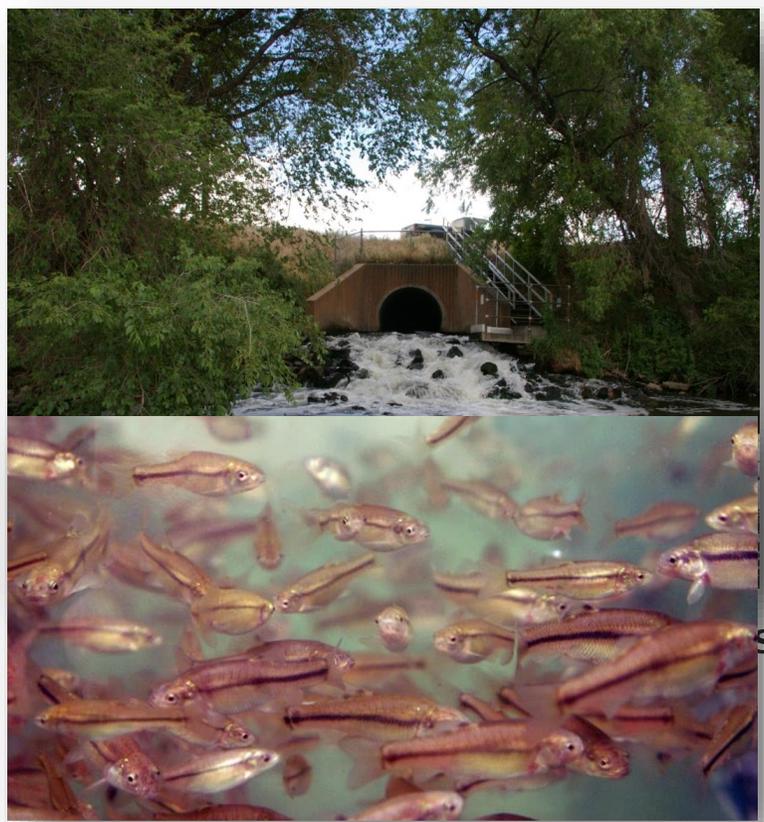
•AOPs はシステム生物学に合致

より実際的には, AOP のネットワークは予測のための機能的なユニット

Chemicals with multiple biological activities



Exposure to multiple chemicals



- Diuron
- Imidacloprid
- Linuron
- Terbutylazine
- 2,4-D
- MCPP
- Propachlor ESA
- Butalbital
- Diclofenac
- Furosemide
- Gemfibrozil
- Ibuprofen
- Naproxen
- Phenobarbital
- Phenytoin
- Sulfamethoxazole
- Triclosan
- Acebutolol
- Albuterol
- Amitriptyline

AOPs は単一の物質ではなく、相互作用を見ている

5. AOPs は生きた文書である

- AOPs は既存の知見をまとめている
- 生物の観察手法の進歩により:
 - KEsの新たな可能性
 - KEs の測定がより精緻で正確になる
- 新たな実験結果が報告されるにつれて:
 - KERsを支持する証拠の重みがより大きくなる
 - 新たなAOPs やAOP ネットワークの枝が見つかる
- “完璧な AOP”を目指しているのではない
 - 応用して見て使えるか、使えないかだけ



<https://aopkb.org/>

AOPs must be accessible

AOPs are modular

- KEs and KERs are shared by multiple AOPs
- No need to re-write the same descriptions over and over
- Reusability (best practices)

AOPs are living documents

- KE and KER descriptions can be expected to evolve over time
- As descriptions are updated and expanded – all AOP descriptions they link to update automatically

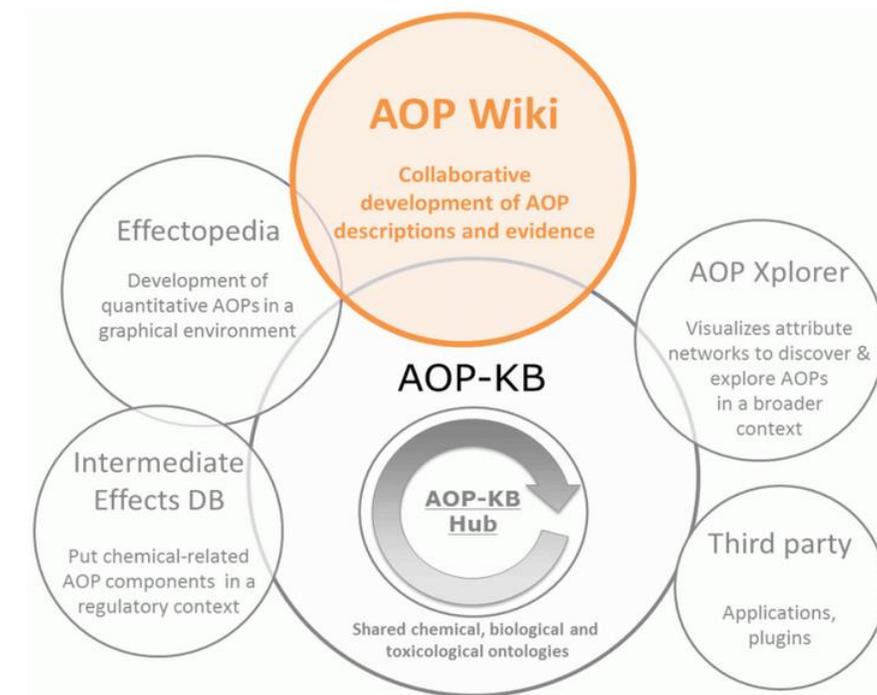
•AOP networks for prediction

- Entry of structured information in KB allows for de-facto assembly of AOP networks.



Adverse Outcome Pathway Knowledge Base (AOP-KB)

|| AOP-KB || Background || How to contribute ||



Please click on any of the AOP-KB elements you want to use.
Please note that the AOP-KB is work in progress and more elements will become available over time.

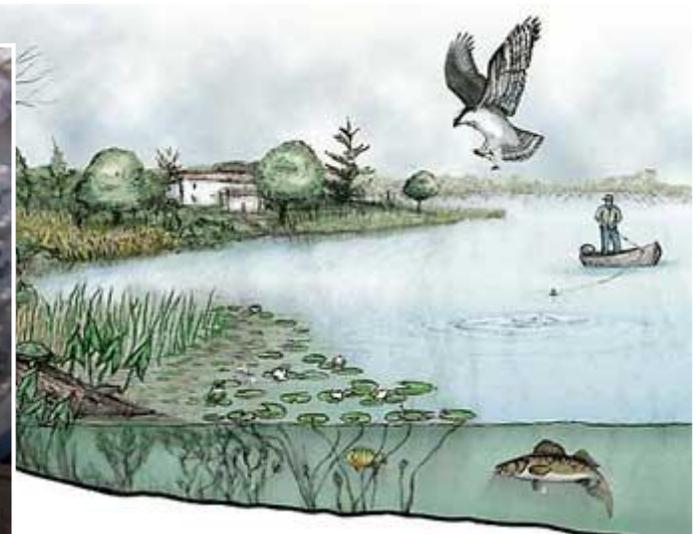


AOPs と環境モニタリング

環境モニタリングに使うにはどうするか？

Toxcast, Tox21, HTS, pathway-based approaches はそれぞれが新しい化学物質評価手法である

考え方としては環境モニタリングには、全てが同じ価値をもつ

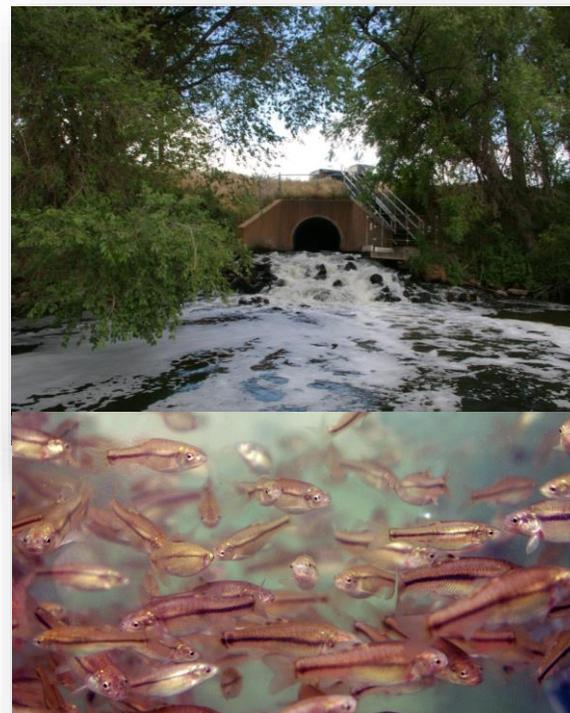


環境中の複合物質をどのように評価するか

Key questions:

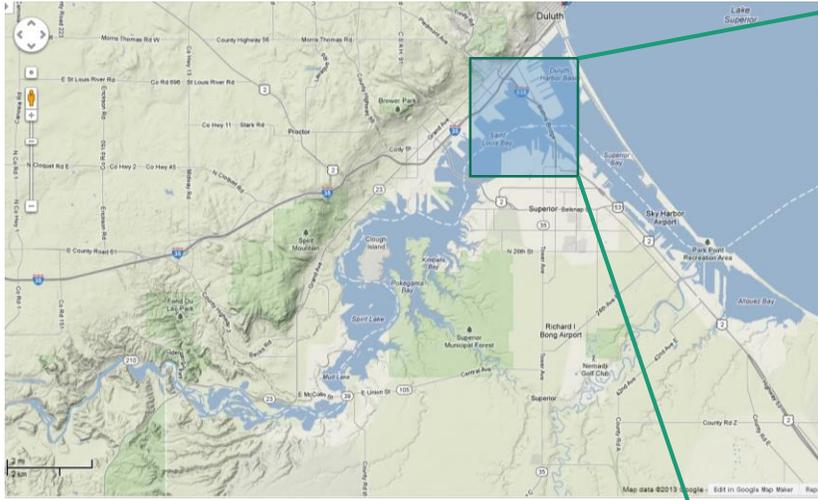
- (1) 問題の場所にどんな汚染物質があるか？
- (2) それらの汚染物質とどのようなハザードが関連しているか？
- (3) 曝露されている集団で、そのハザードが起きているという証拠はあるか？
- (4) 観察されている影響が、どの汚染物質（群）で引き起こされているらしいか？

Exposure to multiple chemicals



Diuron
Imidacloprid
Linuron
Terbuthylazine
2,4-D
MCP
Propachlor ESA
Butalbital
Diclofenac
Furosemide
Gemfibrozil
Ibuprofen
Naproxen
Phenobarbital
Phenytoin
Sulfamethoxazole
Triclosan
Acebutolol
Albuterol
Amitriptyline

Case Study



St. Louis River
Duluth, Minnesota



(1) 懸念される調査地点にはどんな汚染物質が検出されるか？

Chemical (µg/L)	Erie Pier	WLSSD Proximal	WLSSD Distal	Rice's Point
1,4-Dichlorobenzene	<0.08	0.02	<0.08	<0.08
1-Methylnaphthalene	0.01	0.02	0.02	0.02
2,6-Dimethylnaphthalene	0.01	<0.04	<0.04	<0.04
2-Methylnaphthalene	0.01	0.03	0.03	0.03
3,4-Dichlorophenyl isocyanate	0.02	0.04	0.02	<0.32
4-Nonylphenol diethoxylate (NP2EO)	0.2	1.1	1.7	<1.6
4-Nonylphenol monoethoxylate (NP1EO)	<1.6	0.28	<1.6	<1.6
4-tert-Octylphenol	<0.4	0.1	<0.4	<0.4
4-tert-Octylphenol diethoxylate (OP1EO)	<0.2	0.2	0.1	<0.2
4-tert-Octylphenol monoethoxylate (OP2EO)	<0.6	0.1	<0.6	<0.6
Acetophenone	<0.4	0.3	0.3	<0.4
Anthracene	0.0032	<0.02	<0.02	<0.02
Anthraquinone	<0.04	0.04	<0.04	<0.04
Benzophenone	0.06	0.19	0.11	<0.08
beta-Sitosterol	0.3	<4.8	0.9	0.6
bis(2-ethylhexyl) Phthalate	<2	<2	<2	1
Bisphenol A	0.07	0.62	2.75	0.03
Caffeine	0.03	0.62	0.25	0.04
Camphor	0.03	<0.08	<0.08	<0.08
Cholesterol	0.3	0.4	0.6	0.6
Cotinine	0.03	0.18	<0.08	<0.08
Diethyl phthalate	0.7	0.7	<0.4	<0.4
Fluoranthene	0.01	<0.02	<0.02	<0.02
Isophorone	0.008	0.068	0.059	<0.050
Menthol	<0.32	0.23	<0.32	<0.32
N,N-Diethyl-meta-toluamide (DEET)	0.13	0.26	0.23	0.07

4日間コンポジットサンプルの化学分析とケージに入れた魚の分析

約 150 物質の分析

- 下水処理水中の指標物質
- ステロイドホルモン
- 医薬品

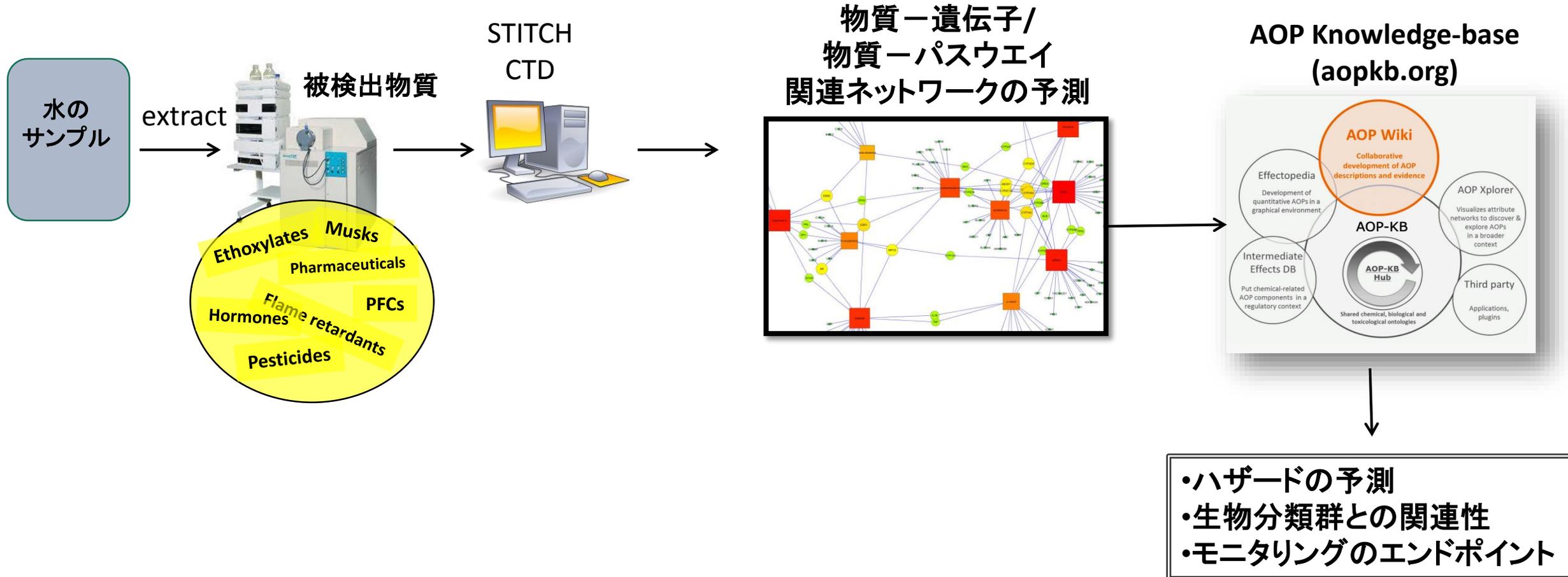


新規汚染物質からの挑戦

- 懸念される新たな汚染物質
 - 農薬
 - 身の回りの製品 Personal care products
 - 医薬品
 - 工業物質
- 毒性データが限られているか全く無い物質が環境に出ている
- ほとんどの評価は毒性であり、作用機序特異的慢性毒性や亜致死作用ではない

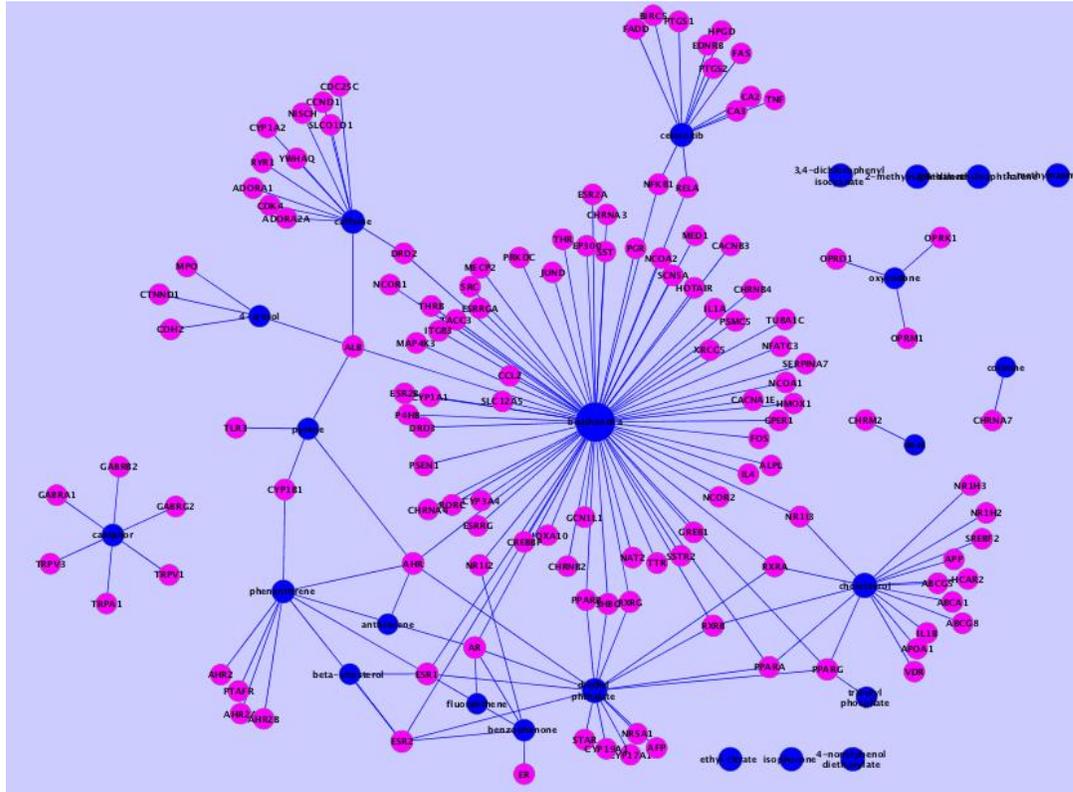


生物影響予測: これらの汚染物質はどんなハザードと関連しているか?

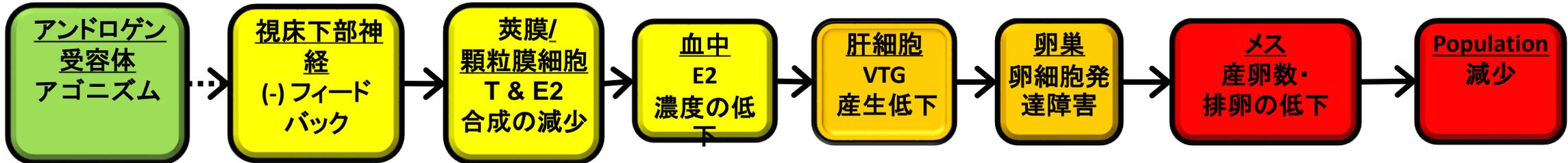


- ハザードの予測
- 生物分類群との関連性
- モニタリングのエンドポイント

生物影響予測



Erie Pier	# of Edges	WLSSD Proximal	# of Edges	WLSSD Distal	# of Edges	Rice's Point	# of Edges
AHR	5	ESR1	10	ESR1	8	ALB	6
AR	5	AR	8	PPARG	6	ESR1	5
ESR1	5	ESR2	6	ESR2	4	PPARG	5
ESR2	5	SHBG	6	AR	4	AR	5
ALB	4	PXR	6	AHR	4	ESR2	4
PPARG	4	PPARG	6	CAR	4	P4HB	3
PPARA	3	ALB	5	PXR	3	PPARA	3
RXRA	3	NCOA1	4	P4HB	3	TTR	3
RXR	3	CHRNA4	4	PGR	3	ALB	6
		CHRNA2	4	ALB	3		
		P4HB	4	PPARA	3		
		PPARA	4	TTR	3		
		TTR	4	RXRA	3		
		AHR	3	RXR	3		
		CHRNA3	3	ESR1	5		
		CYP3A4	3				
		NFKB1	3				
		RELA	3				
		RXRA	3				
		RXR	3				
		AFP	3				
		OPRM1	3				



1.12

Adverse outcome pathways linking aromatase inhibition, androgen receptor agonism, estrogen receptor antagonism, or steroidogenesis inhibition, to impaired reproduction in small repeat-spawning fish species.



Dan Villeneuve, US EPA

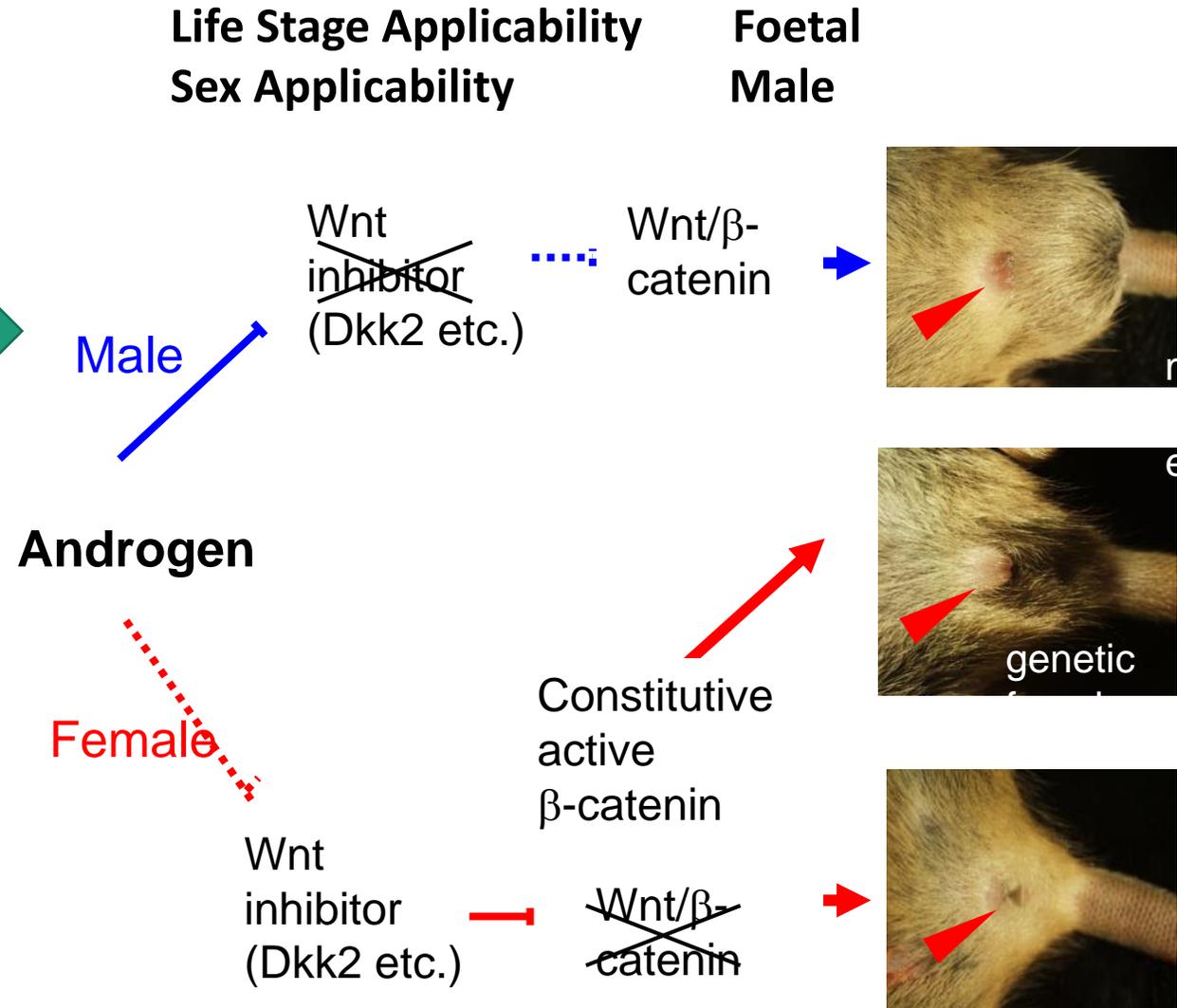
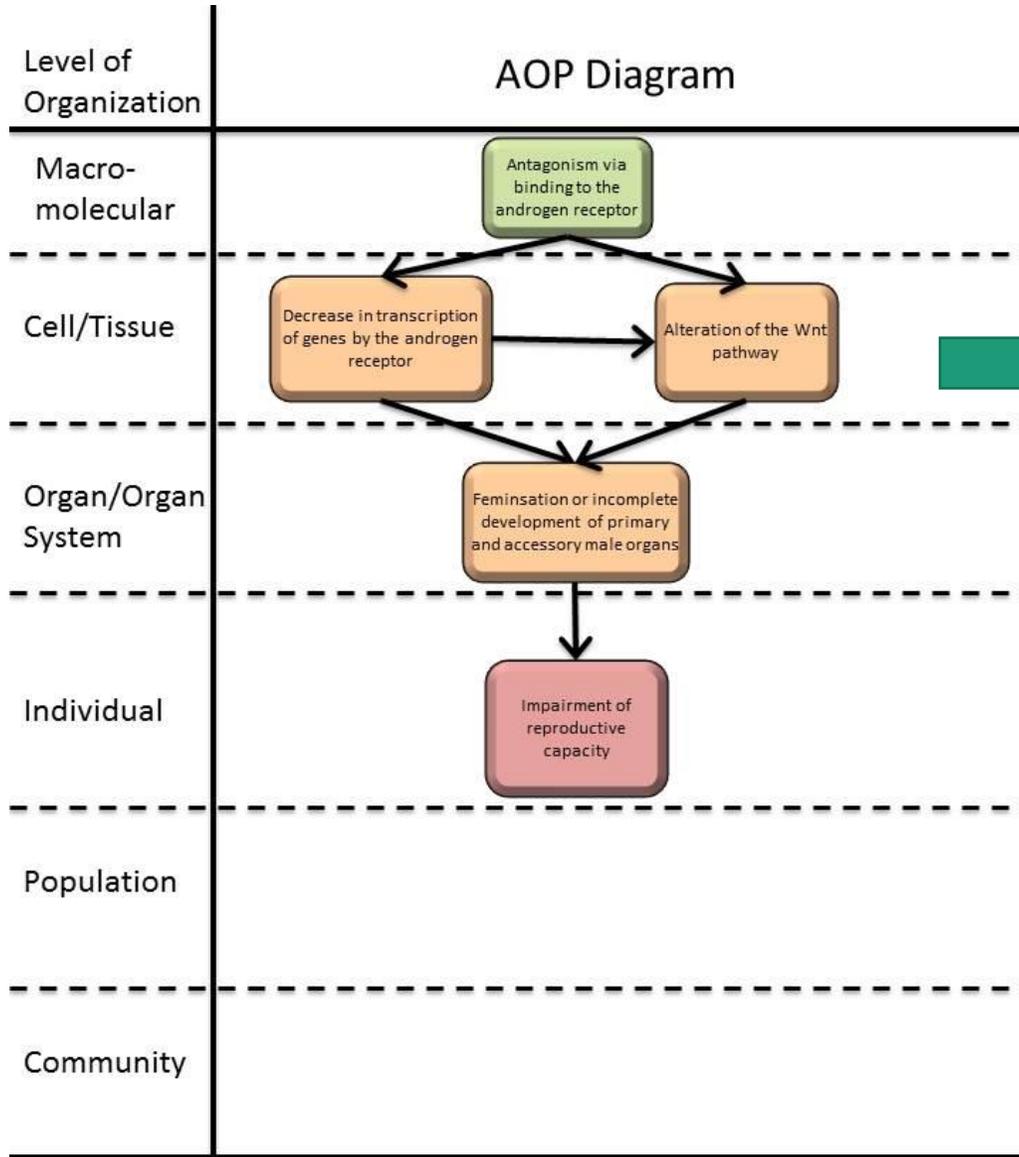


Androgen receptor antagonism leading to adverse effects in the male foetus (mammals)
Androgen receptor antagonism leading to reproductive dysfunction (not completed)
Androgen receptor agonism leading to reproductive dysfunction
Aromatase inhibition leading to reproductive dysfunction (in fish)
Estrogen receptor agonism leading to reproductive dysfunction (still in progress)
Estrogen receptor antagonism leading to reproductive dysfunction

Taisen Iguchi (NIBB, Japan), Tom Knudsen (USEPA), Bette Meek (U. Ottawa, Canada)

833877 AR antagonism leading to foetal feminisation

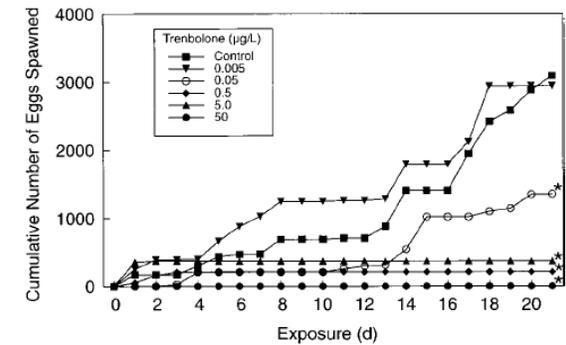
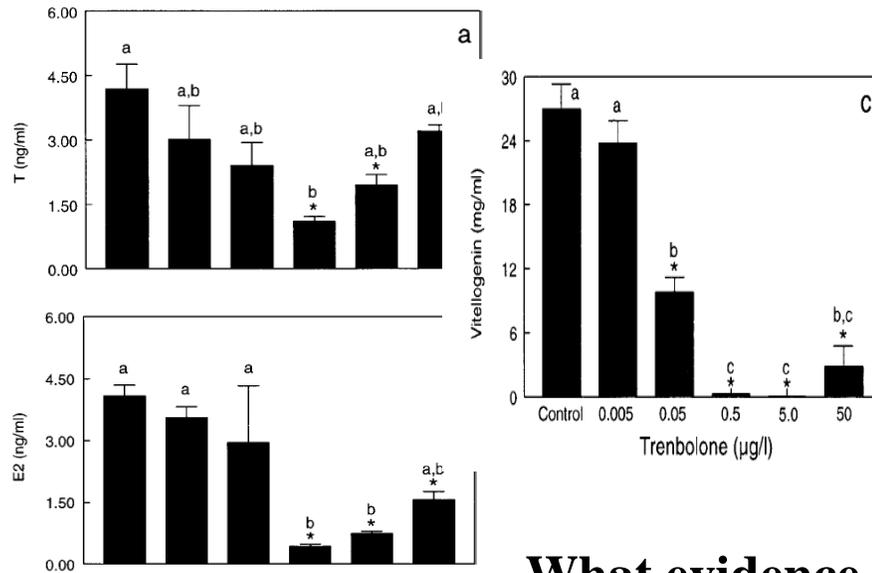
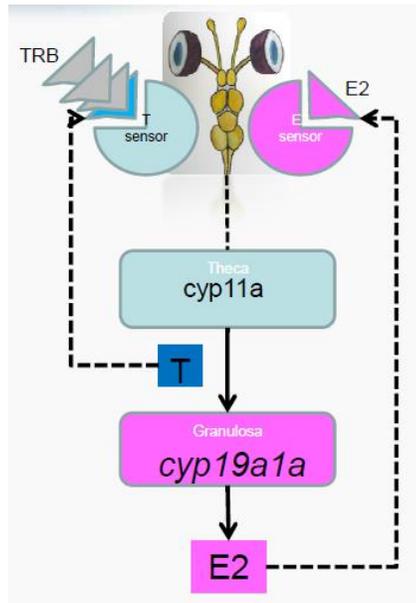
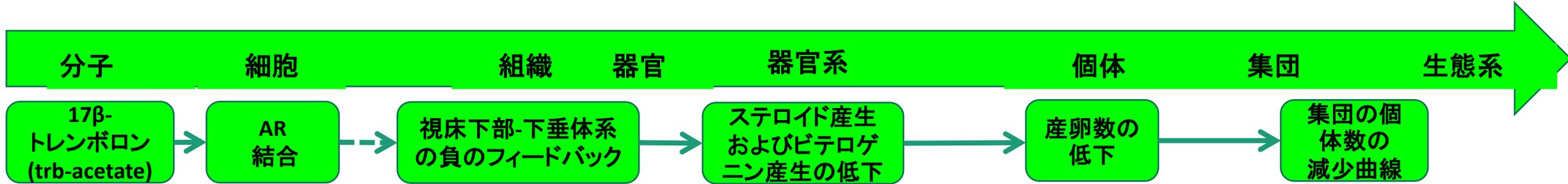
Androgen receptor antagonism leading to adverse effects in the male foetus (mammals)



Miyagawa et al., Mol. Endocrinol., 2009.

AOP: 23 – アンドロゲン受容体アゴニストによる生殖機能障害

AR agonism leading to reproductive dysfunction

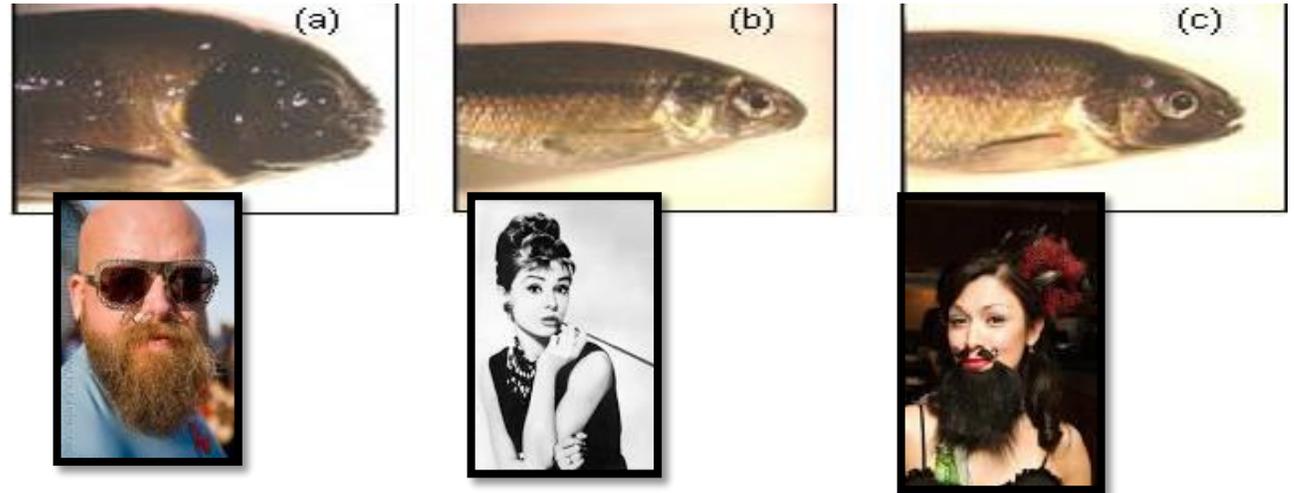
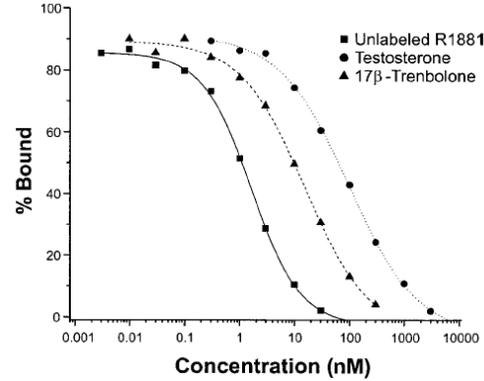
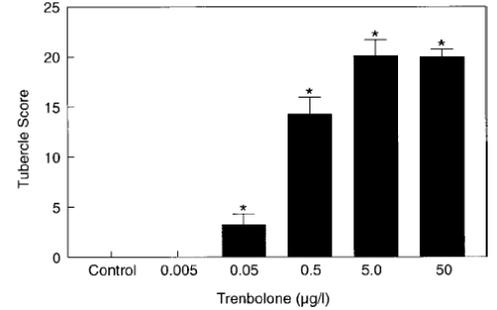


What evidence exists that these hazards are occurring in exposed populations?

AOP: 23 アンドロゲン曝露影響

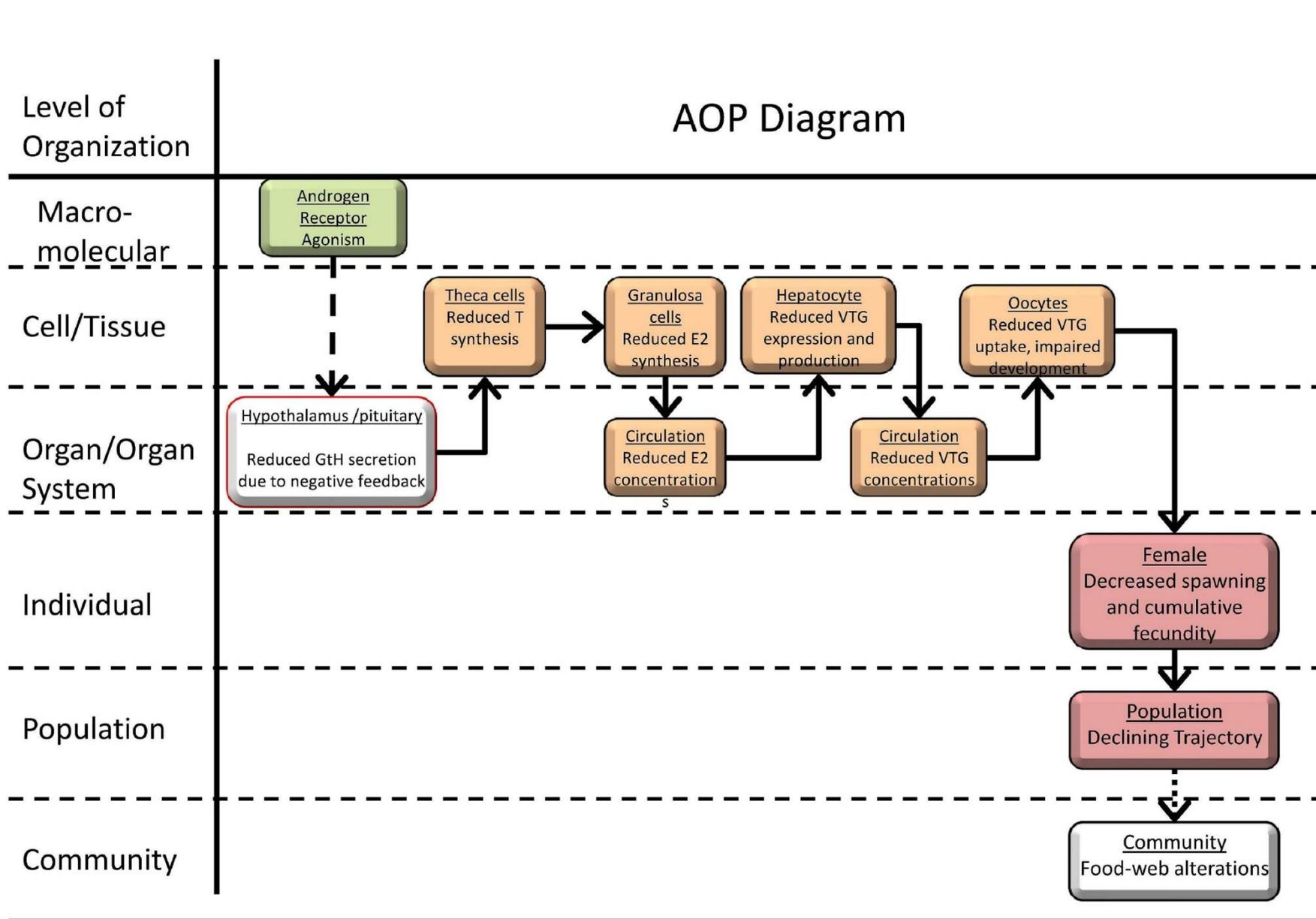
Phenotypic Marker of Androgen Exposure

曝露された集団にどんな悪影響
が及んでいる証拠はあるか？



Ankley et al. 2003 ET&C 22:1350-1360

Androgen receptor agonism leading to reproductive dysfunction



Life Stage

Adult, reproductively mature

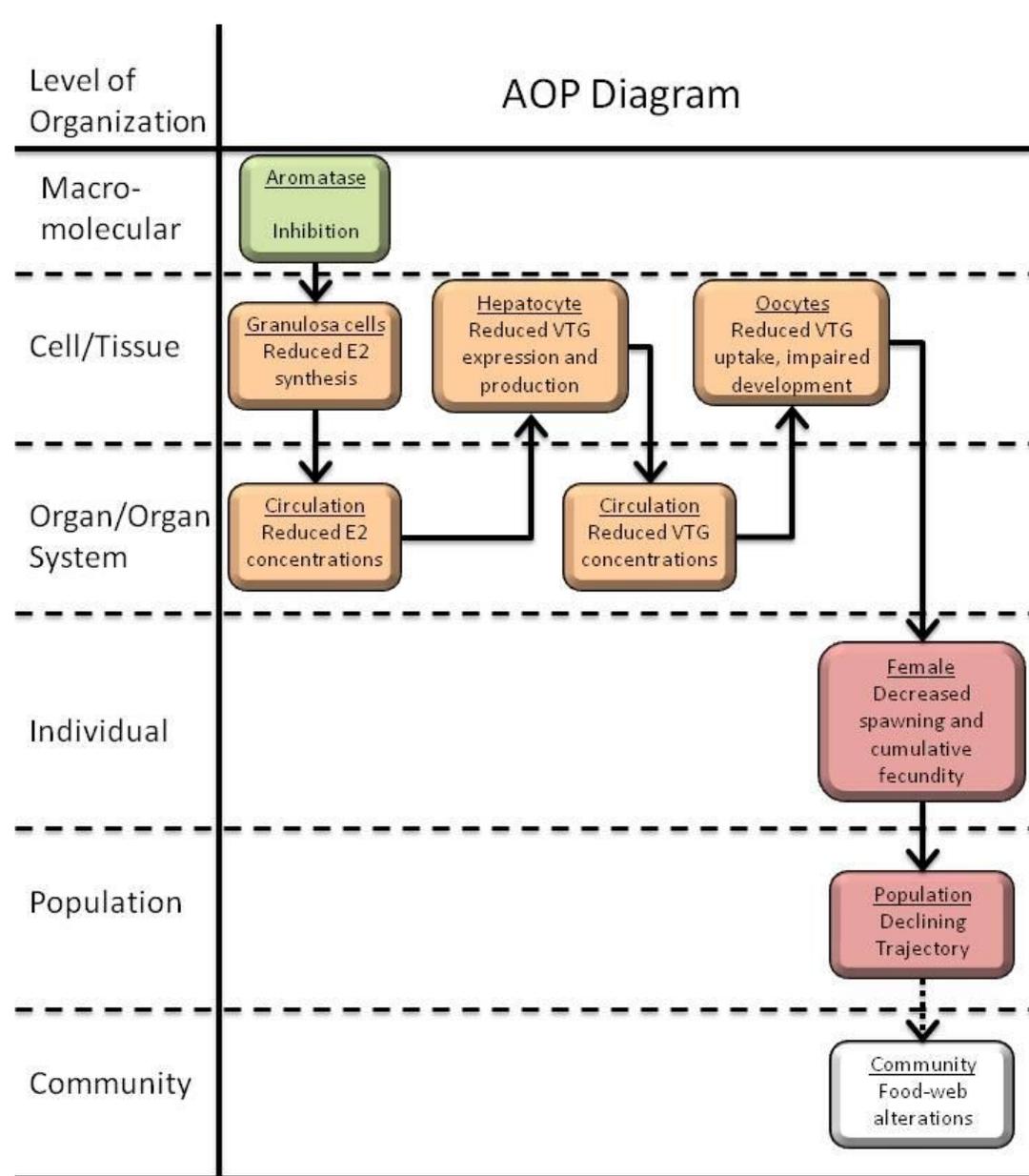
Taxonomic applicability

Need to add

Sex applicability

Female

Aromatase inhibition leading to reproductive dysfunction (in fish)



Life Stage Applicability
Adult reproductively mature

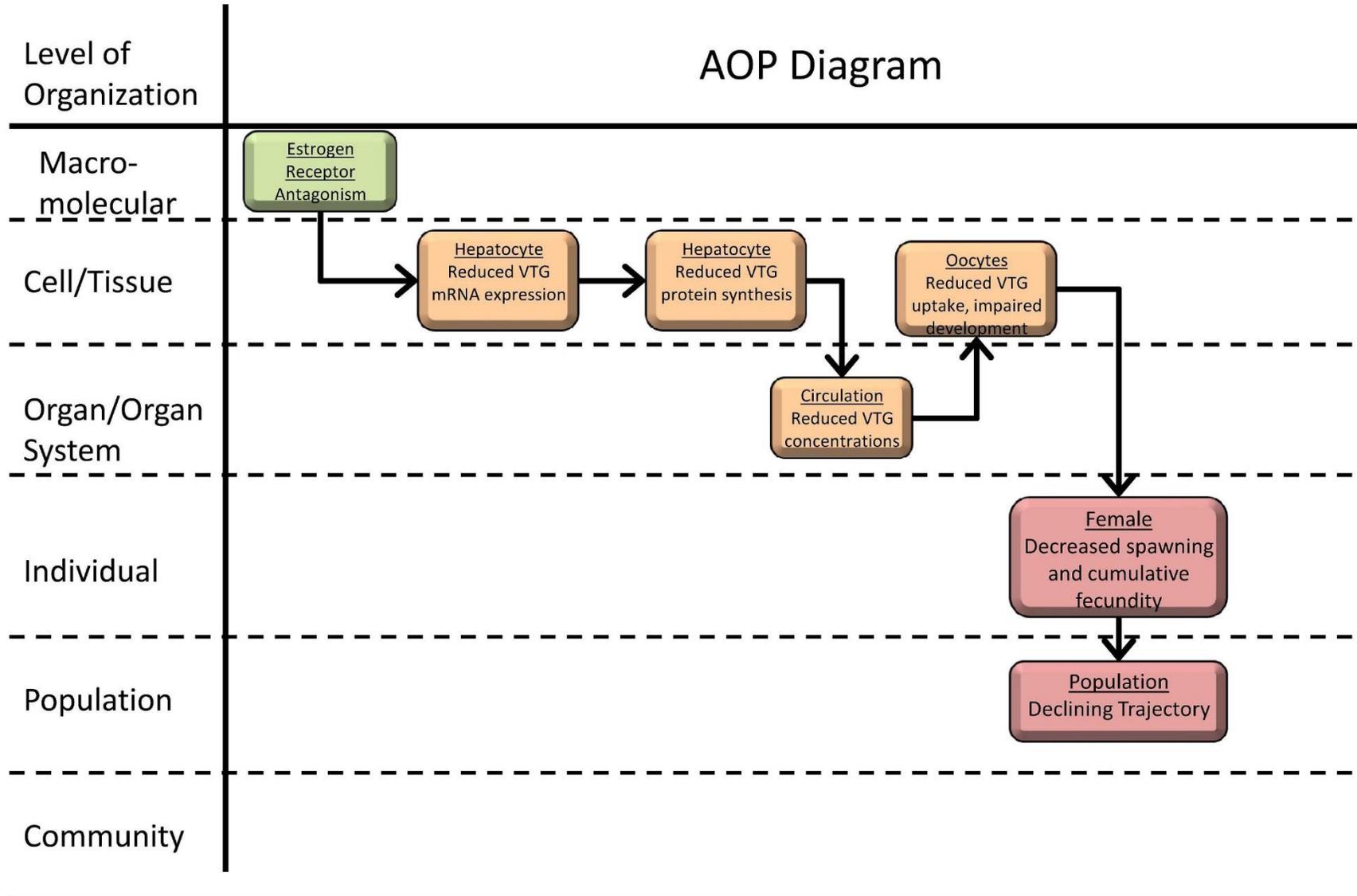
Sex applicability
Female

Evidence
Strong

Taxonomic Applicability

Name	Scientific Name	Evidence
Medaka	<i>Oryzias latipes</i>	Moderate
Zebrafish	<i>Danio rerio</i>	Moderate
Fathead minnow	<i>Pimephales promelas</i>	Strong

Estrogen receptor antagonism leading to reproductive dysfunction



Life stage applicability
Adult, reproductively mature
(strong evidence)

Sex applicability
Female (strong evidence)

Estrogen receptor antagonism leading to reproductive dysfunction

Key Events

Event

Support for Essentiality



Cumulative fecundity and spawning, Reduction



Plasma VTG concentrations, Reduction



Transcription and translation of VTG in liver, Reduction



VTG uptake into oocytes and oocyte growth/development, Reduction



Adverse Outcome

Population trajectory, Decrease



何を見逃しているか？



一般的に、影響に基づいたモニタリングは生物活性のうちの比較的に見やすいものだけを評価してきたに過ぎない:

- エストロゲン活性
- ダイオキシン受容体を介した活性
- アンドロゲン活性
- 一般細胞毒性
- 変異原性
- 酸化ストレス

ToxCast™ Assays

Biochemical Assays

(Primarily Human / Rat)

- Protein families
 - GPCR
 - NR
 - Kinase
 - Phosphatase
 - Protease
 - Other enzyme
 - Ion channel
 - Transporter
- Assay formats
 - Receptor binding
 - Enzyme activity
 - Co-activator recruitment



**~600 Total
Endpoints**

Model Organisms

- Zebrafish embryo development
- *C. elegans* growth

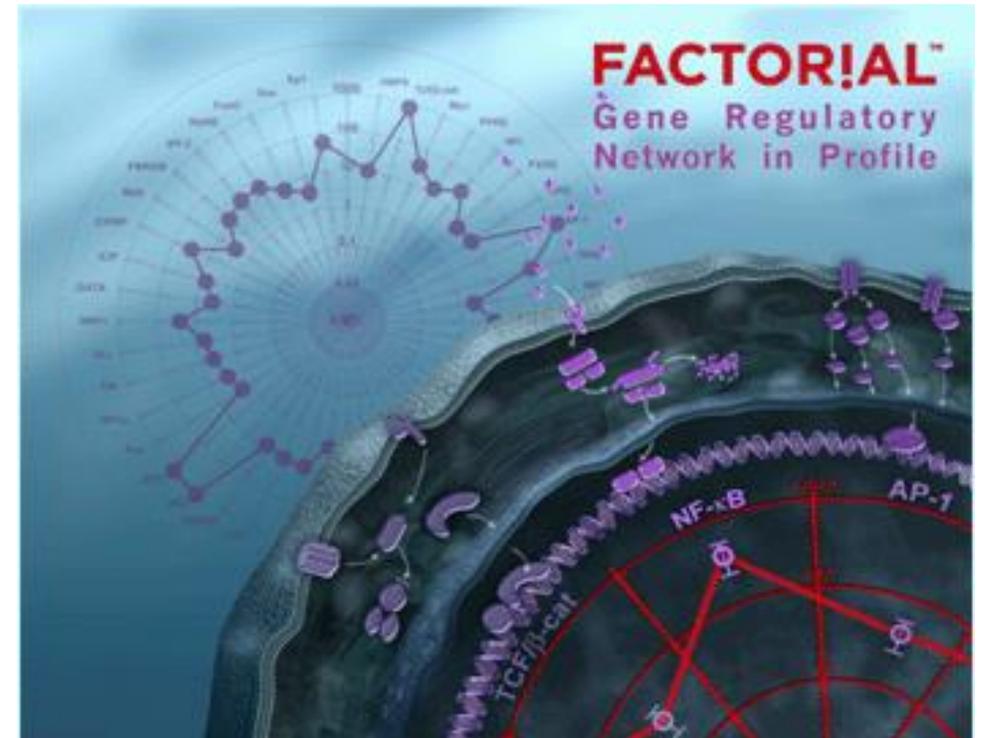
Cellular Assays

- Cell lines
 - HepG2 human hepatoblastoma
 - A549 human lung carcinoma
 - HEK 293 human embryonic kidney
 - T47D human breast carcinoma
 - PC12 rat neuronal
- Primary cells
 - Human vascular endothelial cells
 - Human monocytes
 - Human keratinocytes
 - Human fibroblasts
 - Human proximal tubule kidney cells
 - Human small airway epithelial cells
 - Rat hepatocytes
 - Mouse embryonic stem cells
- Assay formats
 - Cytotoxicity
 - Reporter gene
 - Gene expression
 - Protein expression
 - High-content imaging

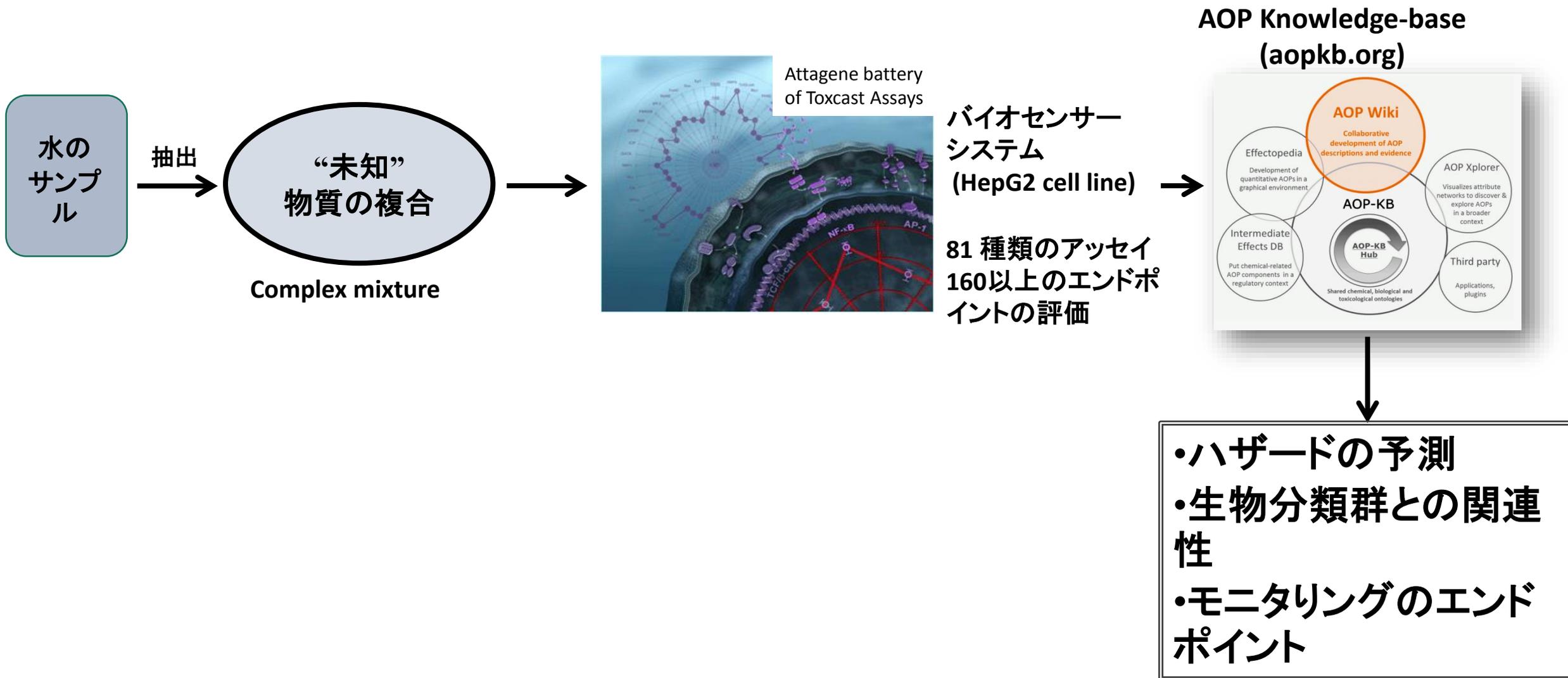
Attogene (Attogene Inc., Morrisville, NC)

Assay Battery

- Factorial cellular biosensor system (HepG2 cell line)
- Combined libraries of cis- and trans-regulated transcription factor reporter constructs
- Multiplexed for simultaneous evaluation of TF activities
- 81 different assay features evaluated with 160 + measurement endpoints

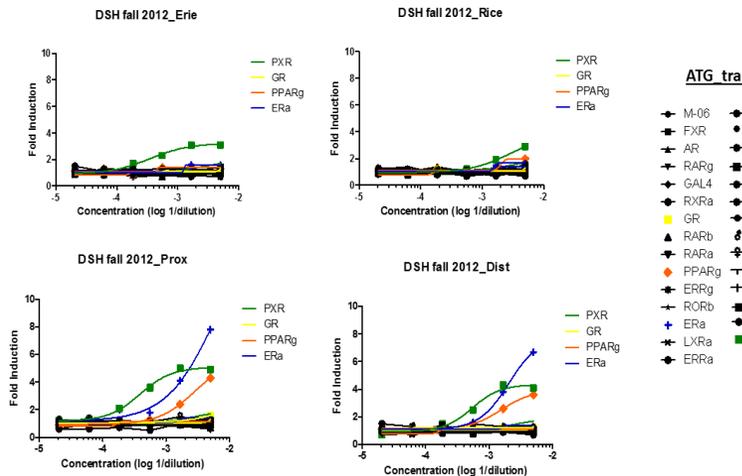
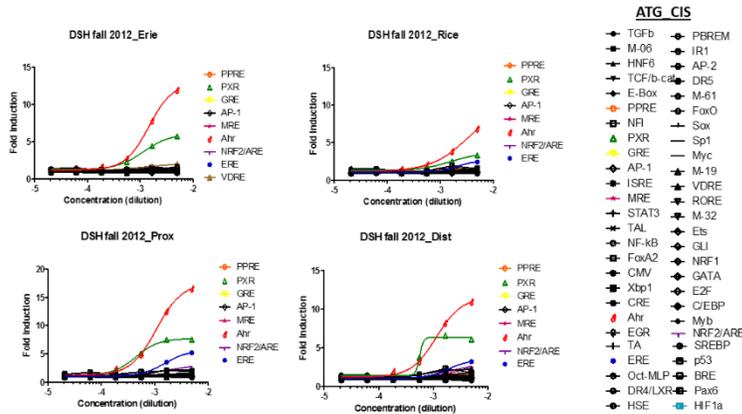


生物影響調査



生物影響調査

調査地点では既知あるいは未知の汚染物質が
どんなハザードと関連しているか？

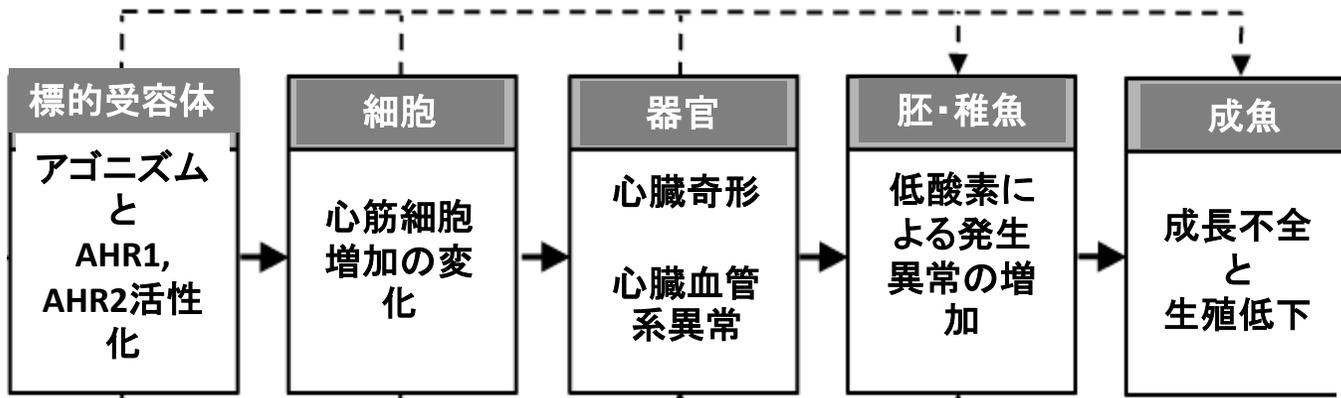


Transcription Factors	Genes	St. Louis River AOC Sites – Fall 2012			
		Erie Pier	Rice's Point	WLSSD Prox	WLSSD Distal
Aryl hydrocarbon receptor (AhR) / Xenobiotic Response	AHR	38.8	48.9	18.2	21.5
Pregnane X receptor (PXR), Xenobiotic Pathway	PXRE	32.2	36.9	8.2	15.5
Pregnane X receptor	PXR	9.2	65.7	7.0	14.3
Estrogen Receptor (ER) pathway	ERE		85.8	42.7	62.4
Estrogen receptor- α	ER α			53.9	59.9
Estrogen receptor- β	ER β			63.6	80.0
Vitamin D receptor (VDR) / vitamin D pathway	VDRE	33.3		28.9	22.2
Antioxidant Response Pathway	NRF2			52.4	52.1
Hypoxia-inducible factor-1a (HIF1a) / hypoxia pathway	HIF1a		7.6		9.4
Peroxisome proliferator-activated receptor-d	PPARg			67.4	63.2
Metal Response Pathway (MTF-1)	MRE				78.9
Phenobarbital responsive enhancer module /constitutive androstane receptor (CAR) pathway	PBREM				35.9
Retinoic acid receptor -related orphan receptor proteins (ROR) a,b,g	RORE				63.1

All concentrations reported in μ M

AOPsはパスウェイに基づいた活性とハザードとの連携

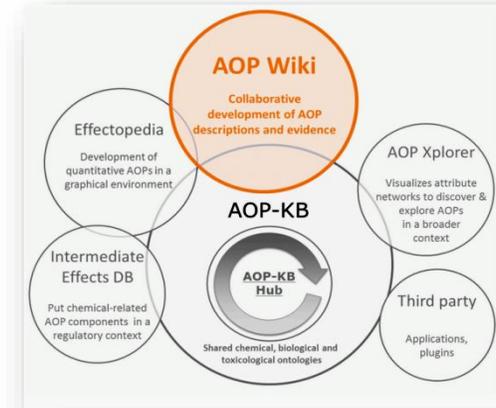
濃度依存性の生物反応に基づいた関連性の予測



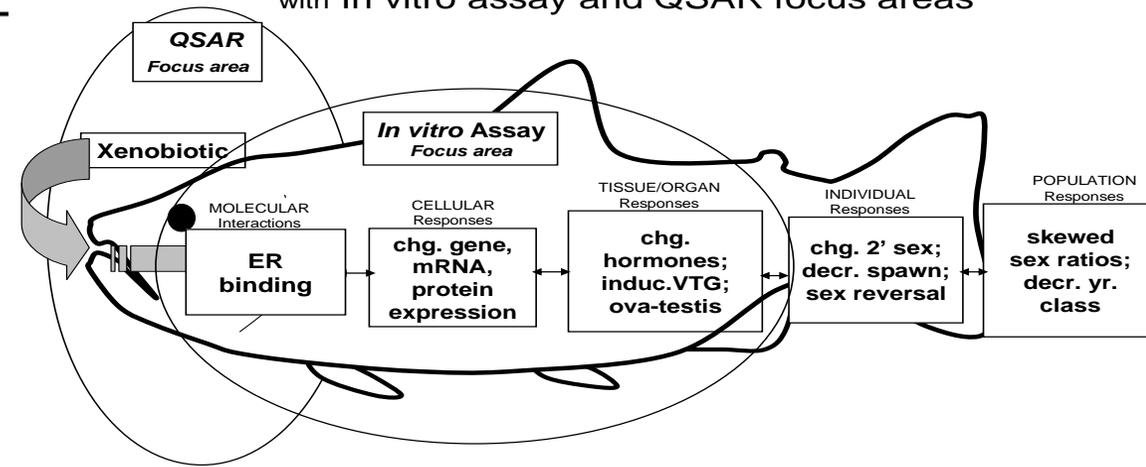
↑ 実験データに基づいた関連性の確立

Volz et al. 2011, Toxicol. Sci. 123(2): 349-358

曝露された集団でこのようなハザードが起きている
 どのような証拠があるのか？



ER-mediated Reproductive Impairment AOP with In vitro assay and QSAR focus areas

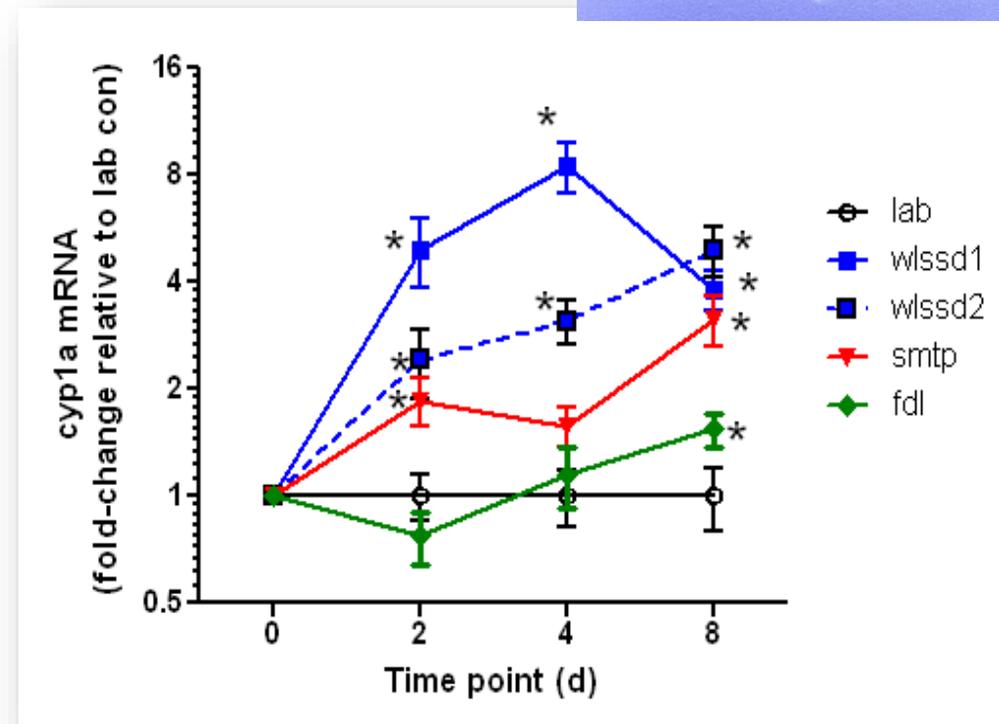
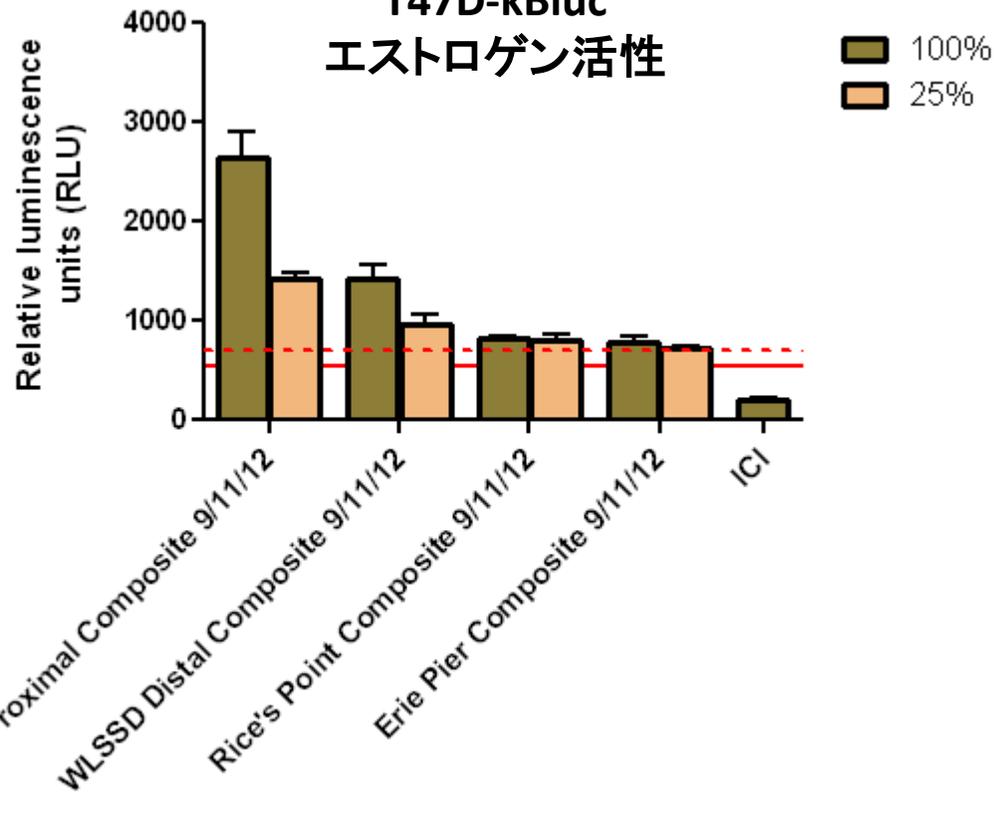


Incr. Toxicological Understanding ← Levels of Biological Organization → Incr. Risk Assessment Relevance

生物影響調査



T47D-kBluc
エストロゲン活性



*in vitro*試験と*in vivo*試験の結果が合うか？

エストロゲン応答の結果は野外での*in vivo*影響に反映できない。

観察された影響を引き起こしているのはどの汚染物質らしいか？

どのくらいの活性に既知物質あるいは調べた新規物質が関与しているのか？

曝露濃度と作用濃度の両方のファクターが必要

$$EAR \text{ (unitless)} = \frac{\text{Exposure (dose } \mu\text{M)}}{\text{Activity (AC50 } \mu\text{M)}}$$

$$EAR \text{ mix (unitless)} = \sum \frac{\text{Exposure (dose } \mu\text{M)}}{\text{Activity (AC50 } \mu\text{M)}}$$



ハイスループットによる毒性評価 High Throughput Toxicology

actor.epa.gov/dashboard/

The screenshot displays the EPA Assay Explorer interface. At the top, there are navigation icons for TOXCAST HOME, ASSAY SELECTION, CHEMICAL SELECTION, ASSAY EXPLORER, CHEMICAL EXPLORER, and PRIORITIZATION COMING SOON. Below the navigation bar, the page title is 'Assay Explorer' and it shows '821 out of 821 assays selected' and '1858 out of 1858 chemicals selected'. An 'Export' button is visible in the top right corner. On the left, there is a sidebar for 'Assay Endpoint' with a dropdown menu currently set to 'COX'. The main area shows a table of results with a 'Actives Only' filter checked. The table columns include CASRN, Chemical Name, Activity Call, Q, AC50, EMAX, logAC50, B, T, W, and Data Type. The table lists various chemicals such as Indomethacin, Diclofenac sodium, and Oxytetracycline dihydrate, all showing 'Active' results.

Assay Endpoint	CASRN	Chemical Name	Activity Call	Q	AC50	EMAX	logAC50	B	T	W	Data Type
COX	53-86-1	Indomethacin	Active	equals	0.0588	100	-1.23	-10	91.7	1.02	Percent Activity
NWS_ENZ_oCOX1	15307-79-6	Diclofenac sodium	Active	equals	0.156	100	-0.808	-4.34	101	1.17	Percent Activity
NWS_ENZ_oCOX1_Activator	6153-64-6	Oxytetracycline dihydrate	Active	equals	0.733	95.6	-0.135	10	96.4	2	Percent Activity
NWS_ENZ_oCOX2	54-62-6	4-Aminofolic acid	Active	equals	1.54	105	0.188	-0.0936	108	1.41	Percent Activity
NWS_ENZ_oCOX2_Activator	41481-66-7	4,4'-Sulfonylbis[2-(prop-2-en-...	Active	equals	1.65	66.7	0.219	-3.77	62.6	1	Percent Activity
	154-42-7	6-Thioguanine	Active	equals	1.86	93.5	0.269	3.67	94.9	1	Percent Activity
	105624-86-0	5HPP-33	Active	equals	1.96	97.4	0.292	1.94	98.2	1	Percent Activity
	59-05-2	Methotrexate	Active	equals	2.19	97	0.34	-1.19	102	1.09	Percent Activity
	41372-08-1	Methyldopa sesquihydrate	Active	equals	2.23	100	0.349	7.05	104	1	Percent Activity
	122-66-7	1,2-Diphenylhydrazine	Active	equals	2.49	100	0.396	0.376	105	1.22	Percent Activity
	80-15-9	Cumene hydroperoxide	Active	equals	2.76	86.5	0.441	-3.98	89.9	1.08	Percent Activity
	1401-55-4	Tannic acid	Active	equals	2.89	101	0.461	-2.49	107	1.34	Percent Activity
	7487-94-7	Mercuric chloride	Active	equals	2.95	83.9	0.469	0.0811	81.5	1.78	Percent Activity
	27323-41-7	Dodecylbenzene sulfonate trie...	Active	equals	2.99	65.1	0.476	5.35	65.2	1	Percent Activity
	1143-38-0	Anthralin	Active	equals	3.23	100	0.509	2.93	103	1.24	Percent Activity
	13292-46-1	Rifampicin	Active	equals	3.4	57.6	0.532	-0.982	60.5	1.6	Percent Activity
	60-00-2	4-Aminoazobenzene	Active	equals	3.45	72.5	0.538	3.63	75	1	Percent Activity

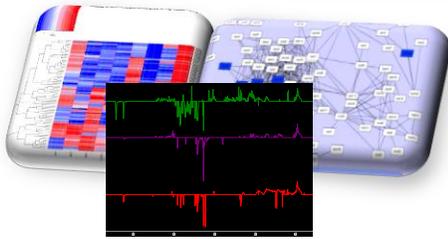
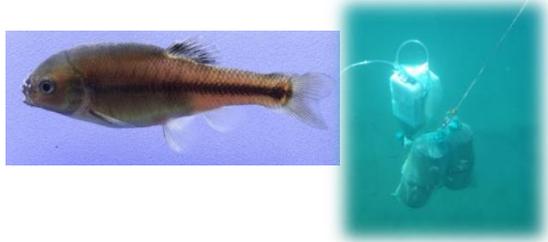
数千物質を百程度のパスウェイに基づいたアッセイで評価
濃度反応のデータ

Thousands of chemicals characterized in 100s of pathway-based bioassays.

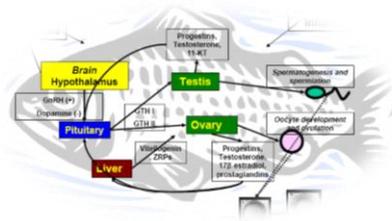
Concentration-response data.

Organisms exposed in situ

Unsupervised, 'omics' endpoints



Supervised endpoints anchored to AOP



Supervised endpoints anchored to AOP

Site assessment workflow

Surveillance

Evidence of pathway perturbation

Adverse outcome pathway

Hazard prediction

Hazard verification

Corrective action

Monitoring

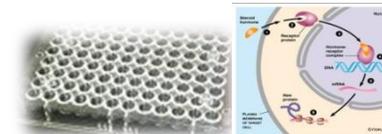
Verification of hazard reduction

In vitro analysis surface water samples/extracts

High content screening (e.g., ToxCast)



Supervised in vitro screening



まとめ

AOPは知見を元に、曝露から悪影響までのパスウェイを繋ぐ体系的なフレームワークである。

AOP knowledge-base は、透明性のあるAOP情報蓄積の中心となり、アクセス・検索可能で、体系的に組織化しており、使い道は多くある

生物影響を元にした化学物質影響のモニタリングでの、ハザードの同定およびエンドポイントの選択。

アプローチごとに仮定や限界がある。

ハイスループットデータは、生物影響予測や生物影響の監視などの環境モニタリングにも利用できる。

AOP knowledgeとカップルさせて、ハザードを予想させる汚染物質、あるいは観察された生物影響の原因の特定につなげられる可能性がある。

Additional Information

Users' handbook

supplement to OECD
guidance document for
developing and
assessing AOPs.

https://aopkb.org/common/AOP_Handbook.pdf

Villeneuve et al. 2014. Adverse outcome pathway (AOP) development I: strategies and principles. *Toxicol. Sci.* 142(2): 312-320. doi: [10.1093/toxsci/kfu199](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu199).

Villeneuve et al. 2014. Adverse outcome pathway (AOP) development II: best practices. *Toxicol. Sci.* 142(2): 321-330. doi: [10.1093/toxsci/kfu200](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu200).