

# **OECD Guidelines zu Wirkungstests für Endokrine Disruptoren**

Walter Lichtensteiger

GREEN Tox, Zürich

[www.greentox.org](http://www.greentox.org)

# Warum ein spezielles Prüfrichtlinien-Programm der OECD?

- **Neu erkannte Wirkung**, die **identifiziert** werden muss.  
Sie wurde mit den bisherigen Tests für Chemikalien nicht erfasst.
- Die **Tests zur Risikobeurteilung** müssen die Möglichkeit einer Interaktion mit Hormonsystemen berücksichtigen, und allenfalls ergänzt werden.
- Das **REACH**-Programm der EU verlangt eine spezielle Behandlung von „**Substances of very high concern**“.  
Darunter fallen auch Stoffe mit toxischen Wirkungen auf die Reproduktion und endokrine Disruptoren.

Das OECD-Richtliniensystem soll eine **internationale Harmonisierung** dieser Evaluation erleichtern, unter Berücksichtigung der Tierschutzaspekte.

# OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals

**Identifizierung  
und  
Prioritisierung**

**Analyse der  
existierenden Daten**

***In vitro* Modelle  
Kurzzeit- *in vivo* Tests**

**Risk Assessment  
für ausgewählte  
Chemikalien**

**Langzeit- Studien:  
Generation / Life cycle**

# OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals

## Level 1

Sorting & **prioritization** based upon **existing** information

- physical & chemical properties, e.g., MW, reactivity, volatility, biodegradability,
- human & environmental exposure, e.g., production volume, release, use patterns
- hazard, e.g., available toxicological data

## Level 2

*In vitro* assays providing **mechanistic data**

- ER, AR, TR receptor binding affinity
- Transcriptional activation
- Aromatase and steroidogenesis *in vitro*
- Aryl hydrocarbon receptor recognition/binding
- QSARs
- High Through Put Prescreens
- Thyroid function
- Fish hepatocyte VTG assay
- Others (as appropriate)

## Level 3

*In vivo* assays providing data about **single** endocrine **mechanisms**

- Uterotrophic assay (estrogenic related)
- Hershberger assay (androgenic related)
- Non -receptor mediated hormone function
- Others (e.g. thyroid)

- Fish VTG (vitellogenin) assay (estrogenic related)

## Level 4

*In vivo* assays providing data about **multiple** endocrine **mechanisms**

- enhanced OECD 407 (endpoints based on endocrine mechanisms)
- male and female pubertal assays
- adult intact male assay

- Fish gonadal histopathology assay
- Frog metamorphosis assay

## Level 5

*In vivo* assays providing **adverse effects** data from endocrine & other mechanisms for RA

- 1-generation assay (TG415 enhanced)<sup>1</sup>
- 2-generation assay (TG416 enhanced)<sup>1</sup>
- reproductive screening test (TG421 enhanced)<sup>1</sup>
- combined 28 day/reproduction screening test (TG 422 enhanced)<sup>1</sup>

- Partial and full life cycle assays in fish, birds, amphibians & invertebrates (developmental and reproduction)

<sup>1</sup> Potential enhancements will be considered by VMG mamm

## Erste in vitro-Tests

- **TG 455** (adopted 07.09.2009)  
*Stably Transfected Human **Estrogen Receptor- $\alpha$  Transcriptional Activation Assay** for Detection of Estrogenic Agonist-Activity of Chemicals*
- **Draft Proposal** (16.12.2009)  
*The H295R **Steroidogenesis Assay***

# A. Identifikation endokriner Aktivität in vivo: Test-Systeme für Wirkungen auf Säuger

## **Estrogene Aktivität**

**Uterotrophic Bioassay** in Rodents: **TG 440** (2007)

## **Androgene/Antiandrogene Aktivität**

**Hershberger Bioassay** in Rats: **TG 441** (2009)

## **Schilddrüsenhormon-Aktivität**

**Amphibian Metamorphosis Assay: TG 231** (2009)

Test an Kaulquappe, generelle Info über Schilddrüsenhormon-ähnliche Aktivität

Pendent:

**Estrogene, (Anti)androgene + Schilddrüsen-Effekte**

Revised TG 407 in Rodents

# Uterotropher Bioassay (TG 440) im Überblick

- **Animal species:** normally **Rat**, Mouse possible (provide rationale)
- **Two versions:**
  - A. **Immature intact** females prior to puberty
  - B. **Ovariectomized** young adult females
- **Administration of test substance:**

Oral gavage or subcutaneous injection.  
Minimum 2 dose groups + vehicle control on **3 consecutive days** (High dose test!)
- **Endpoint:**

**Uterine weight** (wet weight and blotted weight)
- **Critical Issues:**
  1. **Developmental Time Window** in immature rat version:

Last dose between postnatal day 21 and 24 (day of birth = postnatal day 0).
  2. **Low control uterine weight.**
  3. **Dietary phytoestrogen** levels not exceeding 350µg genistein equivalents/g diet.
  4. Verification of **laboratory proficiency** with positive controls (periodic or concurrent)
- **Sensitivity:** Sensitive also for weak estrogens if properly performed.
- **Antiestrogenic activity: Not included** in validation procedure,  
but OECD Guidance Document available to use test for antiestrogenicity

# Validierung des Uterotrophen Bioassay

## Chemikalien, die für die Validierung benützt wurden:

Ethinylestradiol  
Genistein  
Bisphenol A  
Methoxychlor  
Nonylphenol  
o,p'-DDT

## Studien-Design:

1. **Dose-response** study with identified chemicals  
(Kanno, J. et al., Environ. Health Perspect. 111: 1530-1549 (2003)).
2. **Coded** single-dose study  
(Kanno, J. et al., Environ. Health Perspect. 111: 1550-1558 (2003)).



## 2.2. Hershberger Bioassay an Ratten (TG 441)

- **Animal species:** Rat

- **Principle:**

**Castration** of young adult (> postnatal day 42) male. 7 days later start of treatment with test chemical for 10 days. Age at necropsy < postnatal day 70.

- **Weanling rat version:** Not included: insufficient sensitivity for weakly active compounds

### A. Test for Androgen-Agonists:

Test chemical (2 doses p.o. or s.c.) + negative control (vehicle) + positive control (testosterone propionate (TP)) on 10 consecutive days.

### B. Test for Androgen-Antagonists and 5 $\alpha$ -Reductase Inhibitors:

Test chemical (3 doses) together with TP + negative control (TP alone) + positive control (TP together with flutamide) on 10 consecutive days.

- **Endpoints:**

Weight of **5 androgen-dependent accessory sex organs:** Seminal Vesicles, Ventral Prostate, Levator ani-bulbocavernosus Muscle, Cowper's Glands, Glans Penis. Significant change in **one target organ = positive.**

- **Critical Issues:**

1. **Standard dissection:** OECD SOP manual for dissection. One person/tissue. **Performance criteria** for organ weights given in guideline must be met.
2. Dietary phytoestrogen levels should correspond to uterotrophic guideline.

- **Sensitivity:** Very sensitive also for weak anti-androgens if properly performed.

# Validierung des Hershberger-Tests

## Chemikalien, die für die Validierung benützt wurden:

Testosteron propionat (Referenz-Agonist)

17 $\alpha$ -Methyltestosteron

17 $\beta$ -Trenbolon

Flutamid (Referenz-Antagonist)

p,p'-DDE

Linuron

Procymidon

Vinclozolin

Finasterid

Dinitrophenol (Negativkontrolle)

Nonylphenol (schwaches Estrogen)

## Studien-Design:

1. **Dose-response** study with identified chemicals  
(Owens, W. et al., Environ. Health Perspect. 115: 671-678 (2007))
2. **Coded** study  
(Freyberger, A. et al., Toxicology 239: 77-88 (2007))

## 2.3. Revidierte TG 407 (Repeated Dose 28 Day Oral Toxicity Study in Rodents)

- **Animal species:** Rat preferred, other rodents possible
- **Principle:**  
Enhancement of the **pre-existing** 28 day oral toxicity study guideline (**TG407**).
- **Oral administration** of test chemical to **young adult** animals of both sexes, daily for 28 days. At least 3 doses + control group.
- **Endocrine Endpoints** (draft 2008):  
**Gonads and Accessory Sex Organs:** weight, histopathology (testes, ovaries, epididymides, prostate+seminal vesicles+coagulating glands, uterus, vagina).  
**Male Mammary Gland**  
Vaginal smears on last 4 days before necropsy (Not = estrous cycle analysis!!)  
**Thyroid:** histopathology (weight after fixation optional), thyroid hormones
- **Critical Issues:**  
The validation **could not demonstrate sensitivity for weak endocrine disruptors:**  
No sex hormone-specific effects with Nonylphenol and pp-DDE.  
  
Some response to **Thyroid-active** compounds.  
  
→ **Absence** of effect on reproductive tract **does not prove** lack of activity on sex hormone-dependent mechanisms.
- **Sensitivity:** Low for weakly active chemicals interacting with sex hormones

# Validierung der revidierten TG 407

## Chemikalien, die für die Validierung benützt wurden:

Ethinylestradiol

Genistein

Nonylphenol

Tamoxifen

CGS 18320B (nicht-steroidaler Aromatase-Hemmer)

17 $\alpha$ -Methyltestosteron

Flutamid

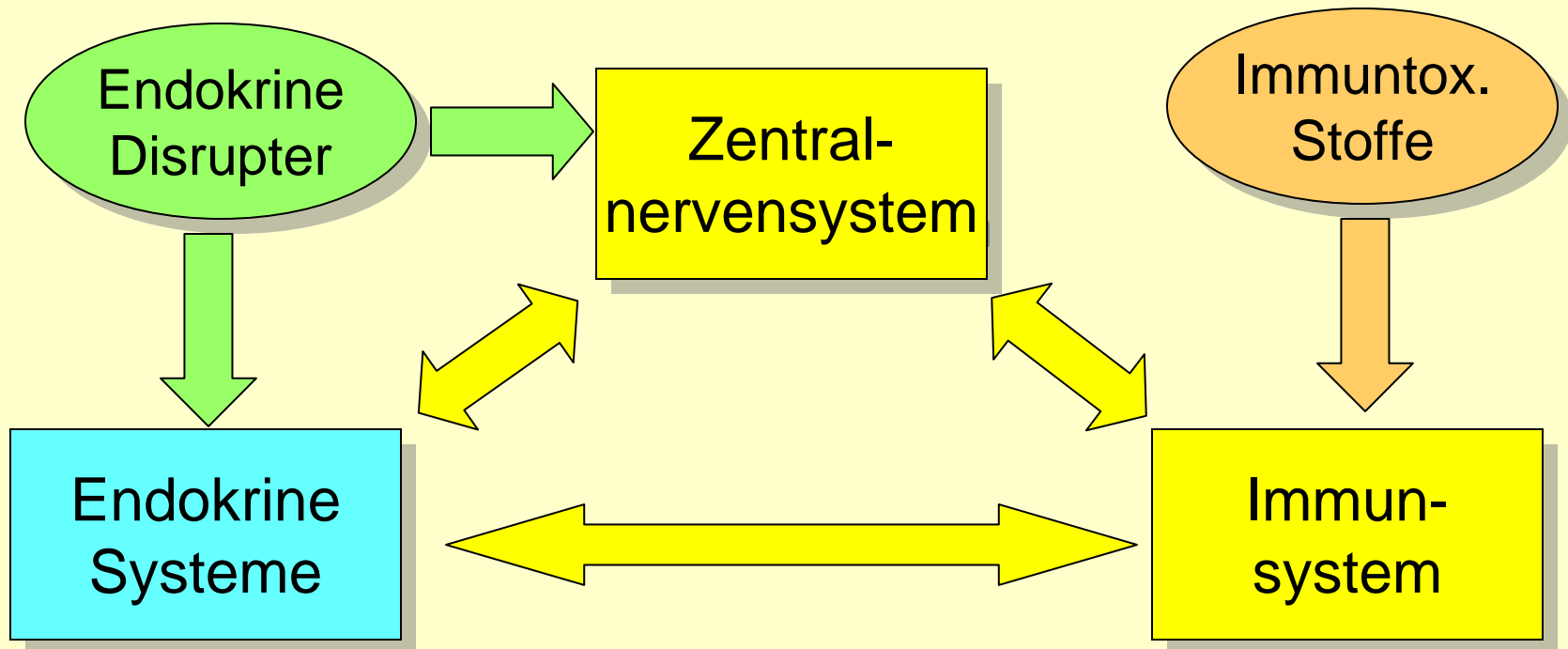
p,p'-DDE

l-Thyroxin

Propylthiouracil

## B. Tests für die Risiko-Beurteilung

Endokrin aktive Chemikalien interferieren mit **komplexen Kontrollsystemen**:



## Von neuro-endokrinen Systemen gesteuerte Funktionen:

- Fortpflanzung
- Entwicklung des Organismus  
(sexueller Phänotyp: Reproduktionsorgane, Gehirn u.a.)
- Umwelt-Adaptation
- Stoffwechsel
- Immunsystem
- Besonders kritisch:  
**Entwicklung: organisierende Wirkung** von Hormonen  
mit bleibenden Effekten (z.B. Sexueller Phänotyp)

→ Zur Analyse von Wirkungen auf diese Funktionen sind in vivo-Langzeitstudien erforderlich.  
Die Tests sollten **alle Lebensphasen** mit Fortpflanzung und Entwicklung umfassen, sowie epigenetische Wirkungen

# Generationen-Tests im OECD-Framework

**Present Situation:**

**Framework Level 5**

***“In vivo assays providing  
adverse effects data  
from endocrine & other  
mechanisms”***

1. F0, F1, F2

TG 416 Two Generation Test  
= “Gold Standard”

2. F0, F1

TG 415 **One-Generation Test**  
Existing protocol **outdated** (26 May 1983).

3. F0, neonatal F1

TG 421 (enhanced)  
*Reprod./Developmental Toxicity Screening test*  
**Insufficient information on F1**  
(ends postnatal day 4)

TG 422 (enhanced)  
*Combined Repeated Dose with  
Reproduction/Developmental Toxicity*  
**Insufficient information on F1**  
(ends postnatal day 4)

# TG 416

## Two Generation Test

### F0 (P)

20 M + 20 W, adult

Spermiogenese-  
Zyklus 70 Tage

Begattung

Schwanger-  
schaft

Laktation

Entwöhnung

≥10 Wo

2 Wo

3 Wo

3 Wo

### F1

3 Wo

≥10 Wo

Begattung

Schwanger-  
schaft

Laktation

2 Wo

3 Wo

3 Wo

Pränatal

Postnatal

Pubertät

Jung-Adult

### F2

3 Wo

3 Wo

Pränatal

früh  
Postnatal

20 **F0** Weibchen

1 **F0** Weibchen → 5-7 **F1** Männchen → mind. 1 bis Adult/Zucht

5-7 **F1** Weibchen → mind. 1 bis Adult/Zucht

(Begattung M, W aus verschiedenen Würfen, 20 Würfe)



# TG 416 Two Generation Test: Endpunkte

- Organgewichte: (Körpergewicht F0, F1, F2, Wurfgrösse)

**F0, F1**: Reproduktionsorgane, Schilddrüse, Nebenniere, Hypophyse, Gehirn, Leber, Niere, Milz.

**F2** Gehirn, Milz, Thymus

- Histopathologie: Reproduktionsorgane, vorher identifizierte Zielorgane

1. Adulte F0 + F1 **die für Begattung ausgewählt wurden** (1 M+1 W/Wurf, 20 Würfe/Gruppe)

Vollständige Histopathologie: **Höchste Dosis**.

**Niedrige u. mittlere Dosis**: wenn hohe Dosis positiv od. Verdacht auf red. Fertilität

2. F1 und F2 bei Entwöhnung

Min. 1 Tier/Sex/Wurf von F1 und F2: Fokus auf **Reproduktionsorgane**

Alle Jungtiere mit äusseren Abnormitäten oder klinischen Symptomen

- Funktionell:

**Pubertät F1** (für Begattung ausgewählte), andere Entwicklungszeichen („Landmarks“)

**weibl. Sexualzyklus F0, F1**

**Spermien-Analyse F0, F1**

**Begattungserfolg F1**

Mögliche funktionelle Beobachtungen: Motorische Aktivität, sensorische Funktionen, Reflexe (F1)

**Keine klinische Chemie** (z.B. Leberenzyme, Hormone, etc.)

# Neuroendokrine Systeme und Two Generation-Test (TG 416)

Neuro-endokrine Funktionen in TG 416	
Analysiert	<b>Nicht gezielt untersucht</b>
Fortpflanzung	
Entwicklung der Reproduktionsorgane	
Entwicklung des Gehirns: keine spezifisch Hormon-regulierten Parameter untersucht	
	<b>Umweltadaptation, Nebennierenrinde</b>
	<b>Stoffwechsel</b>
	<b>Immunsystem</b>

***TG 416: als Test für Reproduktions-Toxizität konzipiert***

# Initiative für einen neuen Generationen-Test

Zwei Probleme:

## 1. Wissenschaftlich:

Die bestehenden Tests (inkl. TG416) wurden **entwickelt als Tests für Reproduktionstoxizität**, nicht als generelle Analyse von Interaktionen mit endokrinen Systemen.

## 2. Tierschutz + ökonomisch:

Unter REACH müssen eine grössere Zahl von Zwei-Generationentests durchgeführt werden. Dies wird zu einem Anstieg der **Versuchstierzahlen, Kosten** und Belastung der **Infrastruktur** führen.

# Projekt einer **Extended One Generation Reproductive Toxicity Study (EOGRTS)**

Proposal (SPSF) to OECD (WNT) 2008 (DE, NL, USA) → **OECD Expert Group** on EOGRTS.

## **Konzept:**

1. Untersuchung der klassischen Endpunkte für Reproduktions- und Entwicklungstoxizität,

aber:

Zucht einer **F2 generation nur aufgrund von "Triggern"**  
(Einsparung ca. 1000 Ratten/Test)

Laut retrospektiven Studien **Bedeutung der F2 beschränkt**,  
aber noch umstritten)

2. **Neue Endpunkte für endokrine, Neuro- and Immuno-Toxizität**

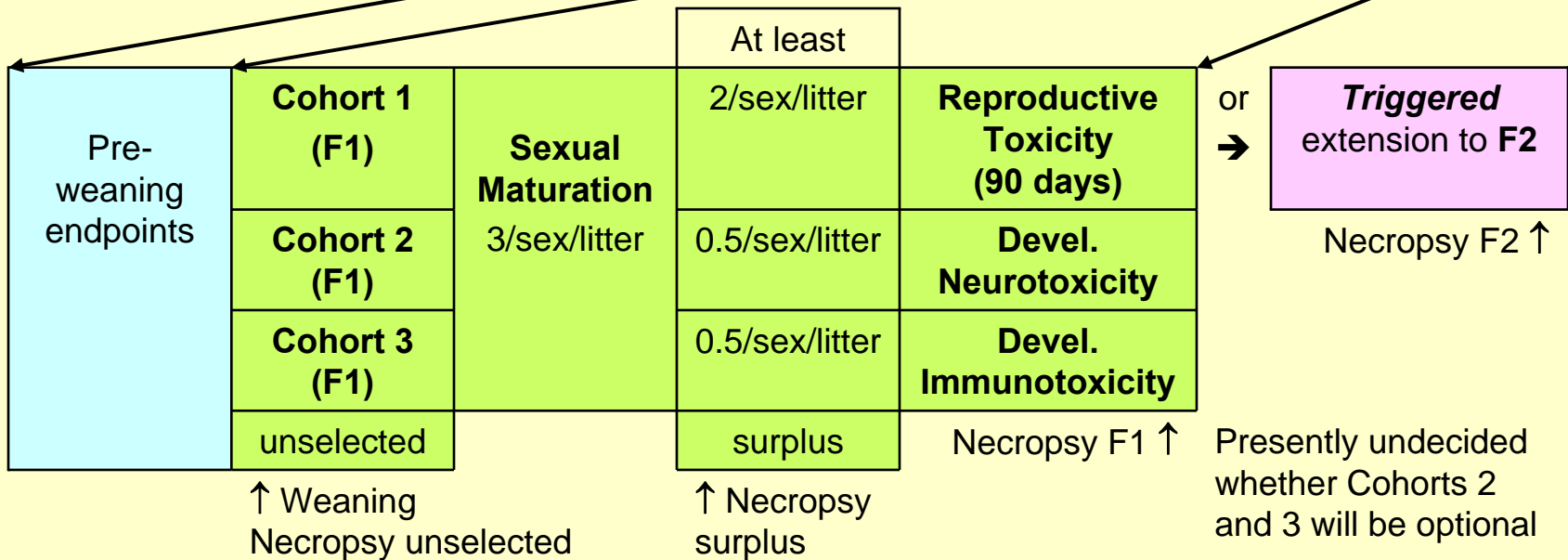
→ 3 Kohorten: Set 1 Reproductive toxicity cohort

Set 2 **Developmental neurotoxicity (DNT)** cohort

Set 3 **Developmental immunotoxicity (DIT)** cohort

# Extended One Generation Protocol: Draft

<b>Dosing (Dietary exposure preferred, at least 3 dose groups)</b> Prior collection of toxicokinetic data recommended				
	<b>Pre-mating</b>	<b>Mating</b>	<b>Post-mating</b>	
P Male	2 weeks	2 weeks	6 weeks	
P Female	2 weeks	2 weeks		
		F1 20 litters/dose	in-utero development	Pre-weaning
				Post-weaning



## Cohort 1, **Reproductive Toxicity**

### Wichtigste hormonell beeinflusste Endpunkte

- **Bereits in TG 416:**

Pubertät (F1), weiblicher Sexualzyklus (F0, F1), Spermienanalyse (F0, F1), Reproduktionsorgane (F0, F1; Gewicht, Histopathologie, höchste Dosis obligat): Ovar, Uterus, Hoden, Nebenhoden, Prostata, Samenbläschen (mit Coagulating gland), Schilddrüse und Nebenschilddrüse (Histopathologie), Nebenniere und Hypophyse (Gewicht)

- **Neu:**

**Anogenitaldistanz** (F1, Lebenstag 0-4) (in TG 416 freiwillig),  
“**Nipple retention**” (Retention der Brustwarzen) bei F1-Männchen (Tag 12-13),  
**Klinische Biochemie/Hämatologie** mit **Thyroxin** und **TSH**

Bei der Reproduktions-Toxizität sollen **nur wenige neue Endpunkte** aufgenommen werden.

## Neue Module:

### Cohort 2, **Developmental Neurotoxicity (DNT) in F1**

- **Verhaltenstests:** Motorische Aktivität, “Functional observation battery”.
- **Neurohistopathologie** (adulte F1) von Gehirn, Netzhaut, Rückenmark, optischem Nerv, peripherem Nerv, Muskel. Morphometrie im Gehirn.

In TG 416 nur Empfehlung: “*Functional investigations (e.g. motor activity, sensory function, reflex ontogeny)...*, are recommended *if not included in separate studies*”

### Cohort 3, **Developmental Immunotoxicity (DIT) in F1**

- **Immunreaktion auf T-Zell-spezifisches Antigen**
- **Lymphocyten-Typisierung** (Milz) und **Lymphknoten-Histopathologie**.

Diese beiden Module stellen hinsichtlich Informationsgehalt einen wesentlichen Fortschritt dar.

**Erstmals** werden toxische Wirkungen auf das **in Entwicklung begriffene Immunsystem** in einer Prüfrichtlinie analysiert.

## Kommentar

- Das „OECD-Framework“ umfasst Tests zur Prüfung auf endokrine Wirkung **von der in vitro Ebene bis zu Langzeitstudien**.
- Die **in vitro-Tests** verwenden molekulare Messgrößen auf dem neusten Stand der Wissenschaft.
- Für die **Kurzzeit-in vivo Tests für Säuger** wurden dagegen bekannte Testprotokolle mit konventionellen Endpunkten verwendet.
- Der einzige zur Zeit brauchbare **Test für Langzeitwirkungen bei Säugern** (TG 416) ist grundsätzlich ein Test für **Reproduktionstoxizität**, weshalb **andere endokrine Wirkungen nicht genügend berücksichtigt** sind.
- Das **Extended One Generation-Protokoll** ist ein Schritt in die richtige Richtung, mit den neuen Modulen „**Developmental Immunotoxicity**“ und „**Developmental Neurotoxicity**“.
- In Zukunft sollten u.a. **weitere Hormonsysteme** (z.B. Nebennierenrinde), Stoffwechselwirkungen (Obesitas) und die Evaluation von **Stoffgemischen** einbezogen werden. Das Framework sollte dafür offen gestaltet werden.