

1. Inleiding

Het Nederlands Vaccin Instituut (NVI) levert vaccins voor het Rijksvaccinatieprogramma, griep- en reizigersvaccins en vaccins bij calamiteiten. Daarnaast ontwikkelt het NVI vaccins en doet onderzoek naar vaccins voor de Nationale Vaccin Voorziening. Voor de ontwikkeling, productie en wettelijk verplichte kwaliteitscontrole van sera en vaccins is dierexperimenteel onderzoek noodzakelijk. Het NVI heeft een vergunning voor het uitvoeren van dierexperimenteel onderzoek. De dierexperimentencommissie van het NVI (DEC NVI) toetst voor de vergunninghouder de ethische toelaatbaarheid van deze dierexperimenten. Zij doet dit op basis van de uitgangspunten van de Wet op de dierproeven (Wod). Deze wet stelt, in algemene zin, dat dierproeven uitsluitend zijn toegestaan, indien het maatschappelijk en/of wetenschappelijk belang opweegt tegen het ongerief dat de proefdieren ten gevolge van het experiment kunnen ondervinden en er geen alternatieven voorhanden zijn.

Naast het dierexperimenteel onderzoek van het NVI, beoordeelt de DEC NVI ook het dierexperimenteel onderzoek van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). Het RIVM is een kenniscentrum van de rijksoverheid en richt zich op het bevorderen van de publieke gezondheid en een gezond en veilig leefmilieu. De kerntaken van het RIVM zijn bij wet beschreven. Het RIVM geeft invulling aan deze kerntaken door zelfstandig onderzoek uit te voeren. Een deel van dit onderzoek gaat gepaard met dierexperimenteel onderzoek. In een convenant tussen het NVI en het RIVM is geregeld, dat dierexperimenteel onderzoek van het RIVM en de ethische beoordeling daarvan plaatsvindt bij het NVI.

Het NVI en het RIVM zijn beide agentschappen die ressorteren onder het ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS).

De DEC NVI bestaat uit medewerkers van het NVI en RIVM en uit externe leden. De DEC NVI en haar werkwijze zijn medio 2003 officieel door het ministerie van VWS erkend. Het secretariaat van de DEC NVI is organisatorisch ondergebracht bij het Gemeenschappelijk Proefdierlaboratorium (GPL) van het NVI.

2. Uitgangspunten en werkwijze van de commissie

Uitgangspunten

De DEC NVI beoordeelt dierproeven op basis van de ethische uitgangspunten die genoemd worden in de Wod. In de specifieke situatie bij het NVI en het RIVM worden de dierexperimenten met name op de volgende punten getoetst:

- In hoeverre houdt het onderzoek rekening met de intrinsieke waarde van het proefdier?
- Wat is het wetenschappelijk en/of het maatschappelijk belang van het beoogde experiment en weegt dit belang op tegen de mate van ongerief voor de dieren? Van belang is daarbij ook de vraag hoe de met de dierexperimenten nagestreefde doelen zich verhouden tot de taakstellingen van het NVI en het RIVM.
- Wat zijn de proefdierkundige aspecten van het experiment, bijvoorbeeld op het punt van de zorg voor het welzijn van de dieren?
- Zijn er mogelijkheden voor vervanging, vermindering en/of verfijning van het dierexperiment en is het proefdiergebruik, in methodologische zin, verantwoord?

Werkwijze

Jaarlijks wordt een substantieel aantal aanvragen voor dierexperimenten bij de DEC NVI ingediend. Zo heeft de commissie in 2010 in totaal 226 onderzoeksplannen beoordeeld.

Voor de behandeling van deze onderzoeksplannen wordt een procedure gevolgd die een verantwoorde ethische afweging waarborgt en tegelijk de beoordeling van de stroom aan onderzoeksplannen beheersbaar houdt. Uitgangspunt hierbij is dat alle, voor een verantwoorde afweging noodzakelijke, informatie op schrift ter beschikking staat van de DEC. De onderzoeksplannen, alsmede de DEC adviezen, worden in een geautomatiseerd bestand opgeslagen. Bijlage 1 bevat het onderzoeksplan zoals dit door de onderzoekers wordt ingevuld en aan de DEC NVI voorgelegd. In dit onderzoeksplan zijn alle aandachtspunten die worden vermeld in artikel 2a van het Dierproevenbesluit, opgenomen.

Het dierexperimenteel onderzoek wordt ingedeeld in een drietal categorieën, te weten:

- Nieuw, nog niet eerder bij het GPL uitgevoerd dierexperimenteel onderzoek;
- Onderdeel van een lopend project;
- Dierexperiment vallend onder een 'masterprotocol'.

De eerste categorie, *Nieuw project/onderzoek*, omvat dierexperimenteel onderzoek dat nog niet eerder bij het GPL is uitgevoerd of waarvan de beoordeling door de DEC langer dan 12 maanden geleden heeft plaatsgevonden. Deze onderzoeksplannen worden altijd in een plenaire DEC vergadering besproken. Kenmerkend voor de werkwijze van de DEC NVI is dat de verantwoordelijke onderzoekers minimaal één keer per jaar worden uitgenodigd voor een mondelinge toelichting op de dierexperimenten in hun project.

De tweede categorie, *Onderdeel van een lopend project*, betreft dierexperimenteel onderzoek dat voortvloeit uit onderzoek dat reeds door de DEC met een positief advies is gehonoreerd en onderdeel uitmaakt van een project dat in de twaalf maanden daarvoor al eens mondeling is toegelicht in de vergadering van de DEC. Voor dit type onderzoek dienen de onderzoekers in het onderzoeksplan aan te geven welke resultaten of overwegingen hebben geleid tot het ontwerpen van het dierexperiment. Er dient tevens verwezen te worden naar de beschrijving van, en de resultaten verkregen uit, vorige, hieraan gerelateerde onderzoeksplannen. Onderzoeksplannen binnen deze categorie worden altijd ter beoordeling aan de DEC voorgelegd, maar hoeft niet opnieuw mondeling te worden toegelicht. Wanneer de gepresenteerde informatie voldoende uitgebreid en inzichtelijk is, kunnen deze onderzoeksplannen op twee momenten per maand beoordeeld worden, te weten de reguliere maandelijkse DEC bijeenkomst en een schriftelijke ronde.

De derde categorie, *Dierexperimenten vallend onder een 'masterprotocol'*, omvat dierexperimenteel onderzoek dat routinematig en op grond van een wettelijke bepaling wordt uitgevoerd. Het gaat met name om de wettelijk vereiste dierproeven voor het testen van de werkzaamheid en veiligheid van vaccins. Dierexperimenten in deze categorie kunnen worden geclusterd tot een 'masterprotocol', omdat het specifieke doel, de experimentele opzet en de gebruikte diersoort in deze experimenten telkens hetzelfde zijn en alleen het test-agens varieert. Naast de gebruikelijke informatie omtrent proefdiersoort, experimentele opzet, proefdierkundige aspecten en een uitgebreide en inzichtelijke toelichting voor de DEC, bevat een 'masterprotocol' ook argumenten voor het clusteren van de dierexperimenten en een onderbouwing voor het aantal dieren dat voor het 'masterprotocol' benodigd is. De behandelingsprocedure van een 'masterprotocol' verloopt enigszins anders dan voor de eerste twee categorieën. Het 'masterprotocol' wordt in een plenaire DEC vergadering altijd mondeling toegelicht door de verantwoordelijke onderzoeker. De DEC brengt vervolgens een advies uit met een geldigheidsduur van maximaal een jaar, waarin is

aangegeven hoeveel dieren in dat jaar gebruikt mogen worden. Samen met de art. 14 functionaris houdt het secretariaat van de DEC NVI er toezicht op dat de geldigheidsduur van het advies en het aantal proefdieren behorend bij het 'masterprotocol' niet worden overschreden. Wanneer binnen de geldigheidsduur het voorgeschreven proefdieraantal wordt overschreden dienen de onderzoekers een nieuwe aanvraag voor een 'masterprotocol' in te dienen en toe te lichten in een plenaire DEC vergadering.

3. De commissie

Samenstelling van de commissie

De samenstelling van de Dierexperimentencommissie van het NVI in december 2010 is weergegeven in tabel 1. De commissie voldoet aan de voorwaarden zoals omschreven in artikel 18a, tweede lid van de Wet op de dierproeven.

Tabel 1: Samenstelling Dierexperimentencommissie NVI 2008.

Naam	Deskundigheid	Arbeids- verhouding	Betrokken bij dierproeven
Voorzitter *	ethische toetsing	Nee	Nee
Lid 1	ethische toetsing	Nee	Nee
Lid 2 *. ¹	alternatieven voor dierproeven	Ja	Ja
Lid 3.	bescherming proefdieren	Ja	Ja
Lid 4.	dierproeven	Ja	Ja
Lid 5.	bescherming proefdieren	Nee	Nee
Lid 6. *. ²	bescherming proefdieren	Nee	Ja
Lid 7.	alternatieven voor dierproeven	Nee	Nee
Lid 8. ³	dierproeven	Nee	Nee

* Afhankelijk van de beschikbaarheid en de aard van het dierexperiment hebben deze leden in 2010 in de Kleine Commissie van de DEC NVI geparticipeerd.

¹ Tot en met april 2010 secretaris van de DEC NVI.

² Vanaf 1 mei 2010 secretaris van de DEC NVI.

³ Vanaf 1 december 2010 lid van de DEC NVI.

Aantal vergaderingen

In 2010 zijn de onderzoeksprojecten en bijbehorende onderzoeksplannen beoordeeld in 11 plenaire bijeenkomsten en 12 schriftelijke rondes. Slechts één keer is een onderzoeksplan beoordeeld door de Kleine Commissie.

Tijdens de plenaire vergaderingen worden de onderzoekers in de gelegenheid gesteld hun onderzoeksplannen nader toe te lichten en kan de commissie verduidelijking vragen over de aangeleverde informatie. In 2010 zijn 65 onderzoeksplannen mondeling toegelicht.

4. Overzicht van uitgebrachte adviezen.

In 2010 heeft de DEC NVI over 226 onderzoeksplannen een advies uitgebracht. Voor 172 onderzoeksplannen betrof dit een positief advies zonder nadere opmerkingen of voorwaarden. Bij 49 onderzoeksplannen heeft de commissie vragen dan wel opmerkingen geformuleerd. In 13 gevallen hebben de vragen c.q. opmerkingen tot wijzigingen in het onderzoeksplan geleid. Een vijftal beoordelingen hebben tot een positief advies onder strikte voorwaarden geleid. In alle gevallen hebben de onderzoekers voldaan aan de gestelde voorwaarden. Met betrekking tot 4 onderzoeksplannen heeft de DEC de beoordeling aangehouden voor het verkrijgen van nadere informatie. Uiteindelijk heeft de DEC voor 1 van deze onderzoeksplannen een positief advies afgegeven. Ten aanzien van de overige 3 onderzoeksplannen heeft de commissie een negatief advies uitgebracht. In het verslagjaar zijn 2 onderzoeksplannen door de onderzoekers teruggetrokken.

In bijlage 2 wordt, volgens het door de NVDEC opgestelde format voor jaarverslagen van dierexperimentencommissies, een overzicht gegeven van alle door de DEC NVI uitgebrachte adviezen. Het overzicht bevat het nummer van het onderzoeksplan, het doel van het onderzoeksplan, de datum/data van de DEC vergadering(en) waarop het onderzoeksplan is beoordeeld, de aard van de vergadering (S voor schriftelijke ronde, P voor plenaire vergadering), het uitgesproken advies, de gestelde vragen, opmerkingen en/of voorwaarden bij een onderzoeksplan, of een onderzoeksplan is aangehouden en de reden van aanhouding, de duur van het onderzoek, de datum waarop het advies is afgehandeld en eventuele opmerkingen. De gebruikte coderingen voor het doel van het onderzoeksplan, de geformuleerde vragen, opmerkingen en/of voorwaarden en de reden van aanhouding van een onderzoeksplan, zijn grotendeels overeenkomstig de coderingen opgesteld door de NVDEC en opgenomen in het algemeen formaat voor jaarverslagen. Een verklaring voor de gebruikte coderingen is eveneens in de bijlage opgenomen.

5. Reflectie en evaluatie

Een substantieel deel van de dierproeven uitgevoerd door het NVI en het RIVM heeft betrekking op het ontwikkelen van 3V-alternatieven voor dierproeven. Zo wordt binnen het NVI onderzoek verricht naar de ontwikkeling van een serologisch alternatief voor de Kendrick test, een letale challenge procedure in het werkzaamheidsonderzoek van *whole cell* kinkhoest vaccins. Het RIVM richt zich in het kader van REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of CHemicals) onder meer op de ontwikkeling van een alternatieve methode voor het testen van embryotoxiciteit. Aan de hand van deze twee representatieve voorbeelden binnen het 3V-onderzoek zal getracht worden inzicht te geven in de afwegingsprocedure van de commissie. Allereerst zullen in een korte uiteenzetting de achtergrond en het doel van deze alternatieve methoden worden geschetst.

Pertussis Serological Potency Test (PSPT)

In de westerse landen bestaat de bescherming tegen kinkhoest uit een vaccinatie met acellulair kinkhoestvaccin. In derde wereldlanden wordt echter voor de bescherming tegen kinkhoest gevaccineerd met *whole cell* kinkhoestvaccin. Overeenkomstig de voorschriften van de Europese Pharmacopee (EP), de World Health Organization (WHO) en de U.S. Food and Drug Administration (FDA) dient de werkzaamheid van het *whole cell* kinkhoestvaccin gecontroleerd te worden middels de Kendrick test. De Kendrick test is een *in vivo* test waarbij groepen muizen met verschillende verdunningen van het te onderzoeken *whole cell* kinkhoestvaccin, respectievelijk met verschillende verdunningen van een referentie *whole cell* kinkhoestvaccin, worden geïmmuniseerd. Veertien dagen na de immunisatie worden de dieren intracerebraal gechallengeerd met een letale dosis virulente kinkhoest bacteriën. In de daarop volgende observatieperiode van 14 dagen wordt gescoord op sterfte en overleving, welke een maat vormen voor de werkzaamheid van het vaccin. Een aantal jaren geleden is, mede op basis van een onderzoek binnen het NVI, sterfte in de voorschriften van de EP vervangen door het gebruik van humane eindpunten. Niettemin is het ongerief binnen de Kendrick test nog immer hoog.

Midden jaren negentig is binnen het NVI een serologisch alternatief ontwikkeld, de Pertussis Serological Potency Test (PSPT). Dit serologisch model berust op de immunisatie van muizen met *whole cell* kinkhoestvaccins en het testen van serum op de door het vaccin geïnduceerde aanwezigheid van antistoffen. Vervanging van de letale challenge procedure door een serologisch alternatief resulteert in een vermindering van het ongerief van 'ernstig'

naar 'gering/matig' en in een substantiële reductie van het aantal benodigde proefdieren. Validatiestudies hebben inmiddels uitgewezen dat de PSPT in muizen een goede voorspelling kan geven van de werkzaamheid van whole cell kinkhoestvaccins. In 2007/2008 is de PSPT onderworpen aan een

geïnitieerde Europese pre-validatiestudie waarbij onderzoek is verricht naar het gebruik van cavia's in plaats van muizen. Serologie in cavia's biedt het voordeel dat combinatie mogelijkheden met bestaande serologische alternatieven voor de werkzaamheid van difterie en tetanus vaccins kunnen worden gecreëerd en dat daarmee de werkzaamheid van combinatievaccins (difterie, tetanus en whole cell kinkhoest) in één diersoort en één dierstudie kan worden gecontroleerd. Bovendien kan door implementatie van de cavia PSPT als serologisch alternatief voor combinatievaccins het aantal benodigde proefdieren nog verder worden gereduceerd.

De resultaten van de pre-validatiestudie waren dermate positief dat de
van de Council of Europe en de Europese Unie besloten hebben het cavia PSPT model formeel te gaan valideren voor opname in de EP. De in 2010 aan de DEC aangeboden onderzoeksplannen maken deel uit van deze validatiestudie. Ze controleren de werkzaamheid van 2 kinkhoestvaccins met behulp van zowel de Kendrick test, de muizen PSPT als de cavia PSPT.

De mate van ongerief die de proefdieren tijdens de uitvoering van het experiment zullen ondervinden is naar mening van de onderzoekers afhankelijk van welke testmethode wordt gebruikt. In de Kendrick test varieert de mate van ongerief in relatie tot de gebruikte vaccinverdunding van 'gering/matig' tot 'ernstig'. In de serologische testen wordt de mate van ongerief voor de geïmmuniseerde dieren ingeschat op 'gering/matig'. De DEC is met de door de onderzoekers beargumenteerde inschatting van het ongerief akkoord gegaan.

Ontwikkeling van alternatieve methode voor het testen van embryotoxiciteit

REACH is een Europese verordening voor de registratie, evaluatie en toelating van chemische stoffen welke op 1 juni 2007 van kracht is geworden. Het doel van REACH is het waarborgen van een hoog veiligheidsniveau voor mens en milieu bij de productie en het gebruik van chemische stoffen. Om dit te realiseren dient voor ongeveer 30.000 chemische stoffen informatie beschikbaar te komen over schadelijkheid en risico's. Voor het verkrijgen van deze toxiciteitgegevens zijn talloze dierproeven vereist. Alleen al voor het testen van embryotoxiciteit zijn 1 tot 2 miljoen proefdieren noodzakelijk. De ontwikkeling van

proefdiervrije dan wel proefdierreducerende alternatieven voor het testen van embryotoxiciteit is derhalve zeer urgent.

Het doel van het project, waar dit onderzoeksplan deel van uit maakt, is de ontwikkeling van alternatieve methoden voor het testen van embryotoxiciteit van chemische stoffen. Een potentieel alternatief in deze is de embryokweekmethode ('whole embryo culture test' of WEC test). De embryokweekmethode is een *ex vivo* test waarin ratten embryo's van 10-12 dagen onder de meest optimale omstandigheden worden gekweekt en blootgesteld. Onderzoek heeft aangetoond dat de groei en morfologische ontwikkeling van de *ex vivo* embryo's in deze fase geheel parallel loopt met die van de *in vivo* embryo's. Voordelen van de embryokweekmethode zijn dat door de *ex vivo* situatie de ontwikkeling van de embryo's intensief gevolgd en gescoord kan worden en dat, in tegenstelling tot de traditionele reproductietoxiciteitsstudies, de blootstellingen en kweekomstandigheden per embryo kunnen worden gevarieerd.

De embryokweekmethode is een reeds gevalideerde ECVAM methode. Een in 2004 uitgevoerde ECVAM validatie studie met 20 zeer verschillende chemische stoffen wees uit dat de embryokweekmethode goed onderscheid kan maken tussen zwak-embryotoxische en niet-embryotoxische verbindingen, maar dat de voorspellende waarde van de methode voor nieuwe chemische stoffen en stoffen die buiten de blootstellingsduur van 10-12 dagen toxiciteit induceren, nog onduidelijk is. Met hun onderzoeksplan wilden de onderzoekers vaststellen of door toevoeging van genexpressiebepalingen de detectie van embryotoxiciteit en daarmee de voorspellende waarde van de embryokweekmethode zou kunnen worden verbeterd. Om het effect in de loop van de tijd te bestuderen wordt, na het scoren op zichtbare afwijkingen volgens de klassieke methode, op verschillende tijdstippen na blootstelling RNA geïsoleerd en het genexpressieprofiel bepaald.

Op basis van het feit dat in de alternatieve test de ouder-dieren niet aan de teststoffen hoeven te worden blootgesteld en de embryo's na euthanasie van de moederdieren worden verwijderd, hebben de onderzoekers het mogelijk ongerief voor de proefdieren als 'gering' ingeschat. De DEC is akkoord gegaan met deze inschatting.

Beide projecten en bijbehorende onderzoeksplannen zijn door de onderzoekers mondeling toegelicht in een plenaire DEC vergadering. De DEC erkent dat werkzaamheidsonderzoeken en toxiciteitstesten noodzakelijk zijn. Daar onderzoeken met betrekking tot de risicobeoordeling voor mens en milieu nog immer gepaard gaan met een ongekend hoog proefdiergebruik en soms ook met een hoge mate van ongerief voor de gebruikte dieren.

acht de DEC onderzoek gericht op de ontwikkeling van alternatieven van groot belang. In de discussie ten behoeve van de afweging heeft de DEC met name aandacht besteed aan de kans van slagen van de genoemde alternatieve modellen. Hoewel de ontwikkeling van beide modellen niet resulteert in de vervanging van een bestaand *in vivo* model, leveren zij beide wel een substantiële bijdrage aan de vermindering van het aantal te gebruiken proefdieren en aan de vermindering van het ongerief dat de dieren wordt berokkend (verfijning).

Alles afwegende heeft de DEC dan ook geconcludeerd dat het maatschappelijk en wetenschappelijk belang van deze onderzoeken in voldoende mate is aangetoond. De DEC meent dat dit belang opweegt tegen het ongerief dat de dieren in de experimenten zullen ondervinden. De DEC heeft daarom besloten de vergunninghouder positief te adviseren ten aanzien van de uitvoering van deze experimenten.

Bijlage 1: Format onderzoeksplan DEC NVI.

Bijlage 2: Overzicht van uitgebrachte adviezen.