

Datum ontvangst DEC: 11 januari 2005

DEC nr: 1827

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO

AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN

Dit formulier dient uiterlijk 7 werkdagen voor de DEC vergadering (zie TNO Bulletin Dierproeven en Alternatieven of Intranet) volledig ingevuld in het bezit te zijn van:

Secretariaat DEC

E-mail:

telefoon:

fax:

Instituut:

ALGEMEEN

1. Titel van het onderzoeksplan:

Onderzoek naar luchtweg-allergeniciteit van oxazolone.

Titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):

Luchtwegallergie van laag-moleculaire chemicalien (zie ondermeer DEC 993, 1744 en 1767)

2. Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD):

E-mail adres onderzoeker:

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder nr:

Medewerkers (ex art. 9 WOD/ ex art. 12 WOD):

Externe samenwerking (indien van toepassing):

nvt.

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: (Opmerking: definitieve aanvangsdatum z.s.m. doorgeven aan de proefdierdeskundige o.v.v. DEC nr., via e-mail:): februari 2005.

Geplande duur van de onderzoeksplan:

22 dagen

Locatie waar dieren worden gehouden:

4. Codenummers volgens KvW-registratie m.i.v. 1998:

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A-F	1	02	2	6	37	1	1	06	05	1	1	3	1
X (extra)	1	02	2	6	37	1	1	06	05	1	1	3	1

RELEVANTIE

5. Welke concrete vraag/vragen wilt u met deze dierproef beantwoorden ?

In vorige studies hebben we aangetoond dat TMA (een respiratoir allergeen) IgE gemedieerde reacties induceert in de zogenoemde IgE test in Brown Norway ratten. Dergelijke reacties werden niet gevonden bij formaldehyde (irritans en contact allergeen na langdurige applicatie), DNCB (contactallergeen) of methylsalicylaat (irritans). Daarna hebben we aangetoond dat, wanneer het IgE gehalte verhoogd is (op dag 21), een inhalatoire challenge een dag later (dag 22) daadwerkelijk tot luchtwegreacties leidde in de dieren (zoals een zeer duidelijke daling in de ademfrequentie tijdens challenge en verlaagde teugvolumina 2, 24 en 48 uur na challenge, die door een verhoogde frequentie na 48 uur uiteindelijk leidde tot een normaal ademminuutvolume). Daarna hebben we andere parameters onderzocht die geassocieerd zijn met astma en die ook gevraagd worden bij een geschikt astmamodel (Voor alle duidelijkheid: de huidige astmamodellen zijn bedoeld om met een specifieke stof astma te induceren in een proefdiermodel, waarna anti-astmamiddelen kunnen worden getest of waarin het exacte mechanisme getracht wordt op te helderen. Wij willen een model voor beroepsastma a.g.v. blootstelling aan laagmoleculaire stoffen, waarin we deze stoffen (en niet eiwitten) willen onderzoeken op hun vermogen tot luchtwegallergie net zoals er modellen bestaan voor onderzoek naar contactallergie).

Voor DNCB (contactallergeen) hebben we gevonden dat sensibilisatie en challenge niet leidde tot astma-achtige verschijnselen (dus geen veranderde longfunctie) maar wel tot een histopathologisch afwijkend beeld gelijkend op een allergische alveolitis. Met andere woorden: ook sensibilisatie en inhalatoire challenge met een contactallergeen (dus ook op de werkplek) kan leiden tot een allergische aandoening die op de lange duur ook leidt tot benauwdheid en koorts agv chronische allergische ontstekingsreacties. We willen in het huidige onderzoek dit nu ook proberen aan te tonen voor het contactallergeen oxazolone. In tegenstelling tot DNCB dat nauwelijks tot IgE verhoging heeft geleid, hebben we dit wel gezien bij oxazolone na herhaalde toediening (5 en 15 keer) hetgeen erop duidt dat oxazolone toch ook als een respiratoir allergeen zou kunnen worden beschouwd. In feite is de blootstelling aan oxazolone een testcase of ons proefdiermodel ook bruikbaar is voor dit soort stoffen, namelijk als geen astma-achtige verschijnselen worden gezien in aanwezigheid van IgE wordt het gebruik van IgE als biomarker onzeker.

6. Omschrijf het maatschappelijk en wetenschappelijk belang van dit onderzoeksplan:

6.a Maatschappelijk belang (meer dan één onderdeel kan van toepassing zijn):

6.a.1 Gezondheid mens/dier:

Op de werkplek kunnen mensen worden blootgesteld aan stoffen die immunologische gemedieerde luchtwegreacties kunnen veroorzaken. Op dit moment zijn er geen gevalideerde (dier-)modellen voorhanden waarmee stoffen gescreend kunnen worden op dergelijke eigenschappen. Wij menen een manier te hebben gevonden waarmee dat wel kan, maar willen bij deze nagaan of er een relatie is tussen verhoogd IgE en oxazolone allergie.

6.a.2 Economisch belang:

Dergelijk onderzoek is van belang voor de industrie. Welke veiligheidsmaatregelen dienen te worden getroffen?

6.a.3 Milieu belang:

Nvt.

6.a.4 Maatschappelijk belang, anders dan 6.a.1-3:

Kosten die gemoeid zijn bij medicatie van beroepsastma zouden kunnen worden verminderd indien vooraf betere en meer informatie bekend is over welke stoffen in welke mate luchtwegallergie kunnen induceren.

6.b Wetenschappelijk belang: Het maatschappelijke belang (gezondheid) staat bij deze proeven voorop.

7. Is of wordt de wetenschappelijke kwaliteit van dit onderzoeksplan of het totale onderzoeksproject beoordeeld?

Het onderzoek wordt gevolgd door [REDACTED]
[REDACTED] Daarnaast wordt de studie mede opgezet door [REDACTED]

Zo ja, door welk daartoe aangewezen college, in welke context en met welk resultaat?

Nvt.

Zo nee, waarom niet?

Nvt.

PROEFOPZET

8. Wat is de aard van deze dierproef (meer dan 1 rondje kan van toepassing zijn)?

- ☐ nieuw nog niet eerder uitgevoerd onderzoeksplan
- ☒ herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan, DEELS HERHALING (IgE test met oxazolone is uitgevoerd); NIEUWE STOF MET ANDERE EIGENSCHAPPEN (challenge is nieuw); DEC-advies nr.: zie boven
- ☐ proef op grond van wettelijke eisen, hierna te specificeren: wettelijke eis: testrichtlijn:
- ☐ proef waarbij biotechnologische handelingen worden verricht zoals bedoeld in Art. 66 van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren
- ☐ anders, n.l.:

9. Aan welke behandelingen worden de dieren onderworpen? (Omschrijf zodanig dat dit op het niveau van het individuele dier duidelijk wordt, met inbegrip van het tijdschema en de frequentie waarmee behandelingen worden uitgevoerd. Beschrijf daarbij alle experimentele technieken waaraan de dieren worden onderworpen, met inbegrip van ingrepen, doseringstechnieken, euthanasietechnieken, enz. Verwijs, voorzover van toepassing, naar standaard-protocol voor de nadere uitwerking.)

De dieren (6 per groep; groepen A-D) worden 3 dagen voor aanvang op de flanken geschoren. Dan vindt ook orbitapunctie plaats. Bij twee maal applicatie wordt een flankapplicatie met de teststof (1% w/v in vehikel) of vehikel (aceton-olijfolie 4:1 v/v; 150 ul per flank) op dag 0 gegeven, daarna wordt de achterkant van de oren op dag 7 behandeld met de helft van de concentratie (0.5% w/v; 75 ul per oor). Bij 5-maal applicatie (dag 0-14) worden de flanken behandeld met 0.5% w/v in vehikel (75 ul per flank) en worden de oren behandeld met een zelfde hoeveelheid en concentratie (afwisselend flanken/oren/flanken/etc). De controles (groepen A en C) zullen alleen vehikel ontvangen (twee keer groep A en vijf keer groep C). Enkele dagen na de laatste behandeling worden de dieren van groepen A-D 15 min gechallengeed door middel van inhalatie (dag 20 of 21). De challenge wordt uitgevoerd met een niet-irriterende concentratie (zie verder punt 11). De dag na de challenge (dag 21 of 22) worden de dieren opgeofferd (nembutal narcose) en wordt bloed en BAL-vloeistof verzameld. Longfunctie wordt bepaald kort voor, tijdens, na en 24 uur na challenge (hiertoe worden de dieren kort in een restraining tube geplaatst en wordt adempatroon gemonitord). Het bloed wordt gebruikt voor serum IgE-analyse.

De dieren van groepen E en F (6/groep) worden ingezet voor extra gegevens mbt background pathologie van de longen (de dieren worden alleen gesensibiliseerd volgens het 2 of 5-keer protocol (zie hierboven) en worden niet gechallengeed dus hun longen zijn 'schoon'). Daarnaast worden de weefsels en lavagevloeistof van deze dieren verzameld ten behoeve van immuun-histochemisch testen om meer gegevens te verkrijgen mbt het sensibilisatie proces. Deze dieren worden dus NIET inhalatoir blootgesteld. Ze krijgen wel een orbitapunctie vooraf (zoals de andere dieren) en worden gelijk met de andere dieren opgeofferd waarbij lavagevloeistof en bloed wordt verzameld.

10. Beschrijf de proefopzet en geef het proefschema bij voorkeur volgens onderstaand voorbeeld:

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
A-B	Orbitapunctie dag -3, flank/oorapplicatie dag 0 en 7 (2 keer)*; challenge dag 20 of 21, sectie en bloed en BAL verzamelen dag 21 of 22	Scheren dag -3 Orbitapunctie dag -3	2 x 6	F
C-D	Orbitapunctie dag -3, flank/oorapplicatie dag 0-14 (in totaal 5 keer)*; challenge dag 20 of 21, sectie en bloed en BAL verzamelen dag 21 of 22	Scheren dag -3 Orbitapunctie dag -3	2 x 6	F
E	Orbitapunctie dag -3, flank/oorapplicatie dag 0 en 7 (2 keer)*; sectie en bloed en BAL verzamelen dag 21 of 22	Scheren dag -3 Orbitapunctie dag -3	1 x 6	F
F	Orbitapunctie dag -3, flank/oorapplicatie dag 0-14 (in totaal 5 keer)*; sectie en bloed en BAL verzamelen dag 21 of 22	Scheren dag -3 Orbitapunctie dag -3	1 x 6	F
X (extra)	Inhalatoire blootstelling aan oplopende concentraties oxazolone gedurende enkele dagen (zie onder)		1 x 4	F

* controle groepen ontvangen vehikel (aceton-olijfolie 4:1 v/v)

11. Hoeveel dieren zullen in totaal worden gebruikt? Onderbouw dit aantal op basis van statistische parameters, literatuurgegevens of verwijs, indien van toepassing, naar proefopzet/standaard protocol: (Indien reservedieren voor het onderzoeksplan worden bestemd, dient dit nader te worden gespecificeerd. Motiveer de noodzaak voor reservedieren en het aantal, en geef aan welke behandeling deze dieren eventueel ondergaan.)

Zie boven: 6 vrouwen per groep; 6 groepen = 36 dieren + 4 reservedieren.

Op basis van deze aantallen zouden normaliter 4 reservedieren worden besteld. Deze dieren zouden alleen worden ingezet indien nodig. We zouden ze nu graag willen gebruiken. Deze extra dieren worden in eerste instantie gebruikt voor een correcte groepsindeling. De 4 die over blijven (extremen in gewicht en/of kleine afwijkingen) zouden we willen inzetten in een range-finding studie om de niet irriterende inhalatieconcentratie van oxazolone te kunnen bepalen. In een tijdsbestek van ongeveer 1 week (voorafgaande aan de challenge van de andere dieren) zouden we deze dieren als volgt willen blootstellen:

Dag 1 – 15 min – ca. 1 mg/m³ oxazolone

Dag 2 – 15 min – ca. 5 mg/m³ oxazolone

Dag 3 – 15 min – ca. 15 mg/m³ oxazolone

Dag 4 – 15 min – ca. 50 mg/m³ oxazolone.

Zodra de eerste tekenen van luchtwegirritatie aanwezig zijn (behoorlijk veranderd adempatroon) bij een bepaalde concentratie dan worden de dieren niet meer aan een hogere concentratie blootgesteld. De concentratie die net geen irritatie-effecten laat zien, zal dan worden gebruikt als challenge-concentratie voor groepen A-D.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

12. Welke diersoort, en welke ras/stam wordt gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe: (*N.B. indien sprake is van een transgene lijn, in Nederland gemaakt na 1 april 1997, dient hiervoor een vergunning door de Minister van LNV te zijn verleend. Specificeer bij vraag 8).*)

Rat, Brown Norway (BN), vanwege de hoge IgE-respons (ook al jaren uit ervaring gebleken).

13. Welke sexe wordt gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:

Vrouwen, vanwege een dunnere huid en dus makkelijker huidopname (bekend uit de literatuur en ook uit eigen ervaring gebleken dat vrouwtjes uitermate geschikt zijn).

14. Wat is de herkomst van de dieren?

- aangekocht van proefdierfokker
- ☐ aangekocht elders, n.l.:
- ☐ overcomplete dieren
- ☐ eigen fok
- ☐ reeds eerder gebruikte proefdieren (geef aan in welk soort dierproef)
- ☐ anders, n.l.:

15. Wat is het eindpunt van de dierproef?

- euthanasie
- ☐ gebruik voor een volgende proef
- ☐ andere vergunninghouder
- ☐ anders, n.l.:

16. Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd? (*Vermeld groepssamenstelling, kooitype, voedersysteem en andere zaken die relevant zijn voor het welzijn van de dieren.*)

Tijdens de challenge en LF meting in tubes (voor de reservedieren tijdens de inhalatoire blootstelling ook in tubes), gedurende de rest van de tijd in groepen van 2-3 per sex in macrolon bakken (juiste grootte) met niet stuivend zaagsel (wood shavings). Voer (korrels). Flessen water. Verder normale verzorging.

ONGERIEF

17. Beschrijf de aard van het ongerief: (*Geef hierbij, gespecificeerd per handeling of mogelijk gevolg van doseringen, het ongerief dat de dieren waarschijnlijk ondergaan.*)

Het ongerief van sensibilisatie wordt als matig geclassificeerd aangezien de te testen oxazolone concentratie op de huid licht irriterend kan zijn. Echter, de toediening van oxazolone op de huid heeft in voorgaande studies niet geleid tot vervelende effecten bij de dieren. Ze groeiden goed en alleen korstjes werden op de flanken en oren van sommige dieren waargenomen. De afwijkingen waren eveneens van voorbijgaande aard. Voor het 2-maal applicatieprotocol wordt slechts 1 maal op de flanken en slechts 1 maal op de oren materiaal opgebracht; voor het 5-maal protocol geldt dat omdat het om en om gaat de korsten meestal verdwenen zijn voorafgaand aan de volgende applicatie op die plek. De afwijkingen waren eveneens van voorbijgaande aard. Daarnaast vindt een orbitapunctie (dag -3) plaats onder lichte narcose door gekwalificeerd personeel. Challenge zal zorgen voor matig ongerief (recovery van de dieren verwacht binnen 15-30 min na challenge).

De extra (reserve dieren) zullen enige keren inhalatoir worden blootgesteld aan oxazolone. Zodra duidelijke luchtwegirritatie is waar te nemen zal deze RF studie worden stopgezet.

18. Kwalificeer vervolgens de kans op ongerief (mate van ongerief en de duur of de mate van herhaling):.

Tabel: mate en duur van het van het maximaal te verwachten ongerief		Duur van het ongerief			
		< 1 dag	1-7 dagen	7-30 dagen	> 30 dagen
Mate van ongerief	A: gering				
	B: gering/matig			Sensibilisatie vehikel controles (groepen A,C)	
	C: matig	Orbitapunctie (groepen A-F) Challenge oxazolone (groepen A-D)	Inhalatoire blootstelling oxazolone (RF studie; extra groep)	Sensibilisatie oxazolone (groepen B,D,E,F)	
	D: matig/ernstig				
	E: ernstig				
	F: zeer ernstig				

(Splits eventueel uit naar groepen of aantallen, indien relevant (dit kan door de betreffende aantallen dieren in de betreffende cel van de tabel weer te geven). Zeer ernstig ongerief is op wettelijke gronden niet toelaatbaar zijn indien geen sprake is van essentiële belangen van de mens.)

19. Wat wordt gedaan om eventuele pijn, stress of ander ongerief te verminderen, respectievelijk te voorkomen? (Beschrijf hier anesthesie, pijnbestrijding, aangepaste huisvesting e.d.)

Er is geen aanleiding voor pijnbestrijding. Daarnaast is anaesthesie onverenigbaar met de proef omdat de ademhaling daarbij beïnvloed wordt en indirect daarmee de mate van blootstelling en het meten van de longfunctie.

20. Op welke indicatie (criteria!) worden dieren uit de proef genomen, dan wel voortijdig gedood?

Als de dieren uiterlijke kenmerken van ziekte vertonen, ernstige blijvende ademnood bijvoorbeeld, dan zal de proef voor het betreffende dier snel afgesloten worden. Het wordt echter niet verwacht dat dit zal optreden.

21. Zijn er bijkomende risico's te voorzien, en wat is de kans hierop? (Specificeer hier het risico op en de aard van mogelijke complicaties, in aanvulling op het antwoord op vraag 16 en in samenhang met de beantwoording van vraag 19.)

Er worden geen bijkomende risico's verwacht.

ALTERNATIEVEN

22. Welke alternatieve methoden (in termen van vervanging, vermindering, verfijning), zowel in vivo als in vitro, bestaan voor deze dierproef?

Geen.

Geef aan, in relatie tot het antwoord op vraag 5, waarom alternatieven (in vivo én in vitro) in dit geval niet bruikbaar zijn:

Voor deze studie zijn er geen (in vitro) alternatieven omdat sensibilisatie een systemisch fenomeen is. Om de hiervoor beschreven luchtwegeffecten aan te kunnen tonen is een levend proefdier nodig.

Geef ook aan in welke zin eventueel gebruik wordt gemaakt van alternatieve methoden:

Nvt.

23. Is info of advies gevraagd over alternatieve methoden aan?

- ☐ TNO-Netwerk voor Alternatieven, tel. [REDACTED]
- ☐ Art. 14 functionaris ([REDACTED]), tel. [REDACTED]
- ☐ Nationaal Centrum Alternatieven voor Dierproeven (tel. 030 - 253 21 63)
- ☐ elders, n.l.:
- zo nee; waarom niet: zie vraag 23

ANDERE ASPEKTEN

24. Welke andere dan de hiervoor vermelde aspecten zijn naar uw mening voor de toetsing van deze dierproef door de DEC van belang? (Hier kan alle informatie aan de orde gesteld worden die u verder nog onder de aandacht van de Commissie wenst te brengen.)

Geen

25. Geef hieronder, indien van toepassing, toelichting op de door u in dit aanmeldformulier gebruikte afkortingen:

Nvt.

Onderzoeker:

[REDACTED]

Hoofddivisie:

[REDACTED]

datum:

11-1-05

datum:

11/01/05

Na behandeling:

secretaris DEC