

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO

AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPAN

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

Secretaresse DEC en proefdierdeskundige

[REDACTED]

[REDACTED]

E-mail: [REDACTED]

telefoon: [REDACTED] / fax: [REDACTED]

Kerngebied en locatie: [REDACTED]

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

1.1. titel:

Onderzoek naar de effecten van inhalatoire blootstelling aan nanodeeltjes in allergische individuen.

1.2. studienummer: 7645

1.3. titel van het onderzoeksproject, waarvan deze dierproef deel uitmaakt (indien van toepassing):

KIP – hazard van nanoparticles.

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

[REDACTED] / [REDACTED] / [REDACTED]

E-mail adres onderzoeker:

[REDACTED]

Telefonisch bereikbaar tijdens DEC-vergadering onder telnr:

[REDACTED]

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

[REDACTED]

Externe samenwerking (indien van toepassing):

nvt.

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: 4 september 2007

(Opmerking: definitieve aanvangsdatum z.s.m. doorgeven aan de proefdierdeskundige o.v.v. DEC nr., via e-mail:

[REDACTED])

Geplande duur van de onderzoeksplan:

De studie is in 2 delen verdeeld, beide duren 44 dagen. Einde studie 29 november 2007

Locatie waar dieren worden gehouden:

[REDACTED]

4. Codenummers volgens VWA-registratie:

Studie	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	1	02	2	72 (+6*)	33	1	1	05	05	1	1	3	1

* reservedieren

RELEVANTIE

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

Momenteel is er erg veel belangstelling voor de schadelijke effecten als gevolg van blootstelling aan nanodeeltjes. Dit komt voornamelijk door zorgen mbt blootstelling aan fijnstof (PM 10 of PM2.5), die flink verhoogd is in gebieden met luchtverontreiniging zoals in de buurt van snelwegen. In fijnstof zouden zich grote aantallen (met slechts weinig totaal massa) nanodeeltjes bevinden. Er is in NL al aangetoond dat kinderen die dichtbij snelwegen wonen, een verminderde longfunctie hebben in vergelijking met kinderen die niet in de buurt van snelwegen wonen. Eind jaren 90, begin 2000, hebben we in samenwerking met [REDACTED] onderzoek uitgevoerd met nano-carbondeeltjes, dieselmuitlaatgas, cadmiumchloride en secundaire aerosolen (sulfaten en nitraten), alle met als doel om de hazard van nanodeeltjes te kunnen vaststellen [al deze onderzoeken zijn gepubliceerd]. Hieruit kwam naar voren dat de geteste deeltjes niet erg toxisch waren, dus nano-deeltjes per se zijn, juist vanwege hun geringe grootte, niet per definitie acuut toxisch. Twee mogelijke manco's in dit onderzoek zijn de korte duur van blootstelling (acuut tot 3 dagen blootstelling) en het feit dat we gezonde proefdieren gebruikten. Epidemiologisch onderzoek heeft laten zien dat in perioden met hoge luchtverontreiniging met name oude en zieke mensen (astmatici en mensen met cardiovasculaire problemen) in het ziekenhuis moesten worden opgenomen of zijn overleden. Bij TNO hebben we een geschikt diermodel ontwikkeld voor (beroeps)astma als gevolg van blootstelling aan laagmoleculaire stoffen met de modelstof TMA. In dit model is aangetoond dat, wanneer het IgE-gehalte verhoogd is na dermale sensibilisatie met TMA, een inhalatoire challenge (2 weken na sensibilisatie) daadwerkelijk leidt tot luchtwegreacties 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).

In de huidige studie (gesplitst in twee delen) gaan we daarom uit van gecompromitteerde (astmatische) dieren (gebruikmakend van het TMA model) en herhaalde blootstelling (3 weken, 5 h/dag, 2 dg/week). Omdat in het vorig onderzoek alleen nano-carbondeeltjes (ca. 30 nm) en geaggregeerde nano-carbondeeltjes (ca. 300 nm) zijn getest willen we het onderzoek uitbreiden met een vergelijking van grotere carbondeeltjes (ca. 300 nm) en met twee soorten carbon nanotubes (SWCNT = single-walled carbon nanotubes en MWCNT multi-walled carbon nanotubes). De carbondeeltjes zijn bedoeld als modelstof voor nanodeeltjes. Het is erg moeilijk om single nano-deeltjes te genereren aangezien deze heel erg gemakkelijk aggregeren en niet meer deaggregeren. De twee laatstgenoemde (SWCNT en MWCNT) zijn engineered particles en worden in toenemende mate industrieel gebruikt.

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

Er wordt veel over de toxiciteit van nanodeeltjes geschreven en beweerd. Ze zouden na inademing ondermeer niet worden herkend door macrofagen in de longen en rechtstreeks het longweefsel ingaan en heel snel de bloedbaan kunnen bereiken. De meeste onderzoeken, echter, zijn uitgevoerd met suspensies van nanomateriaal die dmv intratracheale instillatie (rat) of pharyngeale aspiratie (muis) toegediend zijn, in hoeveelheden die ver boven elke hoeveelheid liggen die ingeademd zou kunnen worden. Het is daarom cruciaal te onderzoeken of nanodeeltjes (extra) toxisch zijn vanwege hun geringe grootte bij 'normale' of licht verhoogde concentraties in de lucht.

6.a.2 Economisch belang

Dergelijk onderzoek is niet alleen van belang voor algemene bevolking maar ook voor de industrie waar nanodeeltjes in grote aantallen worden geproduceerd. Welke veiligheidsmaatregelen dienen te worden getroffen?

6.a.3 Milieu belang

Is ook van belang voor normering fijnstof.

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

Zie gezondheid mens/dier.

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

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

beoordeeld?

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

Zo nee, waarom niet?

Het onderzoek wordt gevolgd (en betaald) door het ministerie van VWS/SZW. Ook VROM heeft speciale belangstelling voor nano-deeltjes (denk aan roetfilters).

PROEFOPZET

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

- nieuw onderzoeksplan (ook bij gebruik van bestaande modellen met nieuwe behandeling/ teststof)
- ☐ Het is deels ook herhaling van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan, DECnr.: Zie oudere onderzoeken (ik kan nummers niet meer achterhalen, moeten nummers zijn lager dan 1400). In eerdere onderzoeken zijn ratten gesensibiliseerd met, en/of inhalatoir blootgesteld aan TMA maar ook aan nano-carbon deeltjes
- ☐ 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, voor zover van toepassing, naar standaardstudieplan voor de nadere uitwerking.

De dieren (6 per groep; BN ratten) worden ca. 4 dagen voor aanvang op de flanken geschoren. Dan vindt ook orbitapunctie plaats. Op dag 0 wordt een flankapplicatie met vehikel (per flank: 150 µl aceton-olijfolie 4:1 v/v) of TMA (per flank: 150 µl 50% TMA w/v in vehikel) gegeven, daarna wordt de achterkant van de oren op dag 7 behandeld met de helft van de concentratie (25% TMA w/v in vehikel, 75 µl per oor). Op dag 21 of 22 worden de dieren 15 min inhalatoir gechallengeerd met een niet irriterende concentratie van TMA (10-20 mg/m³ in aceton). Longfunctie wordt bepaald kort voor, tijdens, na en 24 uur na challenge (hiertoe worden de dieren kort in een restraining tube geplaatst en wordt het adempatroon gemonitord). Tussen dag 21/22 en dag 43 worden de dieren 5 uur/dag, 2 dagen/week inhalatoir blootgesteld aan nano-deeltjes of een variant ervan. Op dag 43 worden de dieren voor een tweede keer gechallengeerd met TMA. De dag na de challenge worden de dieren opgeofferd (nembutal narcose) en wordt bloed (voor serum IgE analyse), BAL-vloeistof en de respiratietractus, olfactory bulb, en lever (voor histopathologie) verzameld.

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

Deel 1

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
A	Orbitapunctie dag -3; flank/oorapplicatie dag 0 en 7 (vehikel); blootstelling aan lucht; longfunctiemetingen; inhalatoire challenge; sectie en bloed, BAL en verzamelen organen	Scheren dag -3 Orbitapunctie dag -3	6	F
B	Orbitapunctie dag -3; flank/oorapplicatie dag 0 en 7 (TMA); blootstelling aan lucht; longfunctiemetingen; inhalatoire challenge; sectie en bloed, BAL en verzamelen organen	Idem	6	F
C	Idem maar dan blootstelling aan carbon-nanodeeltjes (ca. 30 nm; hoge concentratie)	Idem	6	F
D	Idem maar dan blootstelling aan geaggregeerde carbon- nanodeeltjes (ca. 300 nm; hoge concentratie)	Idem	6	F
E	Idem maar dan blootstelling aan fijne carbon-nanodeeltjes (ca. 300 nm; hoge concentratie)	Idem	6	F
F	Idem maar dan blootstelling aan carbon-nanotubes (SWCNT)	Idem	6	F

Deel 2 = gelijk aan deel 1 maar dan met lagere concentraties (groepen C, D, E) zodat een dose-reponse kan worden bekeken en met MWCNT ipv SWCNT. De reden dat dit niet parallel kan lopen (hoge en lage concentraties is gelegen in het feit dat beschikbare apparatuur steeds maar voor 1 opstelling beschikbaar is; we hebben bijvoorbeeld maar 1 roetgenerator die carbon nanodeeltjes kan maken.

Deel 2

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL	SEXE
A	Orbitapunctie dag -3; flank/oorapplicatie dag 0 en 7 (vehikel); blootstelling aan lucht; longfunctiemetingen; inhalatoire challenge; sectie en bloed, BAL en verzamelen organen	Scheren dag -3 Orbitapunctie dag -3	6	F
B	Orbitapunctie dag -3;	Idem	6	F

	flank/oorapplicatie dag 0 en 7 (TMA); blootstelling aan lucht; longfunctiemetingen; inhalatoire challenge; sectie en bloed, BAL en verzamelen organen			
C	Idem maar dan blootstelling aan carbon-nanodeeltjes (ca. 30 nm; lage concentratie)	Idem	6	F
D	Idem maar dan blootstelling aan geaggregeerde carbon-nanodeeltjes (ca. 300 nm; lage concentratie)	Idem	6	F
E	Idem maar dan blootstelling aan fijne carbon-nanodeeltjes (ca. 300 nm; lage concentratie)	Idem	6	F
F	Idem maar dan blootstelling aan carbon-nanotubes (MWCNT)	Idem	6	F

NB Indien in deel 1 weinig tot geen effecten worden gezien dan kunnen de testconcentraties van deel 2 hoger zijn ipv lager.

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 studieplan:

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 behandelingen deze dieren eventueel ondergaan.

Zie boven: Deel 1: 6 dieren per groep; 6 groepen = 36 dieren; + 3 reservedieren

Deel 2: 6 dieren per groep; 6 groepen = 36 dieren; + 3 reservedieren

Er zijn steeds 6 dieren per groep; dat is een minimaal aantal om variatie op te kunnen vangen.

Reservedieren worden gebruikt (maximaal 10%) om eventuele onvolkomen dieren bij levering te kunnen vervangen.

Deze dieren zullen alleen worden ingezet voor vervanging bij aanvang van de proef. Indien de proef begonnen is zullen geen reservedieren meer worden ingezet (behalve indien nodig bij groep A) omdat er dan niet meer kan worden voldaan aan het sensibilisatieschema.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

12. Welke diersoort, welk ras/stam en welke sexe worden 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 en voorkeur voor Th2-reacties

Er worden vrouwelijke dieren gebruikt vanwege hun dunnere huid en dus makkelijkere huidopname (bekend uit de literatuur en ook uit ervaring is gebleken dat vrouwtjes uitermate geschikt zijn).

13. 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)

O anders, n.l.:

14. Wat is het eindpunt van de dierproef:

- euthanasie ten behoeve van de proef
- ☐ euthanasie na afloop van de proef
- ☐ gebruik voor een volgende proef
- ☐ andere vergunninghouder
- ☐ anders, n.l.:

15. Hoe worden de dieren gehuisvest en verzorgd?

Vermeld groepssamenstelling, kooitype, voedsysteem en andere zaken die relevant zijn voor het welzijn van de dieren.

Tijdens de challenge en longfunctie-meting in tubes, gedurende de rest van de tijd in groepen van minimaal 3 in macrolon bakken (juiste grootte) met niet stuivend zaagsel (wood shavings). Voer (korrels), flessen water. Verder normale verzorging.

ONGERIEF

16. Beschrijf de aard van het ongerief:

Geef hierbij, gespecificeerd **per handeling** of mogelijk gevolg van doseringen, het ongerief dat de dieren waarschijnlijk ondergaan.

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	(be)handeling en effecten ³	Tijdsduur of frequentie ⁴	Verwachte mate van ongerief ⁵
alle	2x36	Orbitapunctie (max. 1 ml onder licht roesje met CO ₂ /O ₂)	1x	3
Groep A	2x6	Sensibilisatie met vehikel (huid)	2x	1
Alle behalve groep A	2x30	Sensibilisatie met TMA (huid)	2x	2
Alle behalve groep A	2x30	Challenge met TMA; te verwachten effect: apnoes gedurende challenge	2x 15 min	3
Alle behalve A en B	2x24	Inhalatoire blootstelling in restraining tubes aan nanodeeltjes of een variant; mogelijk effect: lichte irritatie	6 x 5h	3
A en B	2 x 12	Inhalatoire blootstelling aan lucht in restraining tubes	6 x 5 h	3

Toelichting:

- 1 Vermeld op 1 regel alle proefgroepen waarbij het ongerief naar verwachting gelijk zal zijn als gevolg van de beschreven (be)handeling (kolom 3).
- 2 Vermeld het aantal dieren dat met de onder 1 aangegeven groepen gemoeid is.
- 3 Vermeld (be)handeling overeenkomstig vraag 9 en 10, vermeld tevens effecten die het gevolg zijn van de (be)handeling en die ongerief kunnen veroorzaken.
- 4 Tijdsduur wordt in uren, dagen, weken (resp u, d, w) uitgedrukt. Frequentie heeft betrekking op het aantal maal dat een (be)handeling wordt verricht (b.v. bloedmonsters, gavage).
- 5 Vermeld het ongerief dat verwacht wordt bij de (be)handeling of het behandel-effect.

Gebruik de codering:

Code 1: gering

Code 2: gering/matig

Code 3: matig

Code 4: matig/ernstig

Code 5: ernstig

Code 6: zeer ernstig

[Zeer ernstig ongerief is op wettelijke gronden niet toelaatbaar indien geen sprake is van essentiële belangen van de mens.]

- 6 Vermeld bij vraag 17 het ongerief dat verwacht wordt t.g.v. alle (be)handelingen en effecten, die de omschreven groep(en) ondervinden met gebruikmaking van de codes onder punt 5 code 1 t/m 5.

17. Geef een inschatting van het totale verwachte ongerief voor het proefdier

Op basis van de tabel onder vraag 16 wordt per groep het totale ongerief geschat.

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	Totaal ongerief ⁶
2 x 6 x 6	72	3

18. Wat wordt gedaan om eventuele pijn, stress of ander ongerief te verminderen, respectievelijk te voorkomen?

Beschrijf hier anesthesie, pijnbestrijding, aangepaste huisvesting e.d.

De orbitapunctie wordt verricht onder lichte narcose (roesje). Verder is er 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.

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

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

20. 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

21. 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 (doel van de proef), waarom alternatieven (in vivo én in vitro) in dit geval niet bruikbaar zijn:

Voor deze studie zijn geen (in vitro) alternatieven, omdat astma een zeer complex fenomeen is. Om de hiervoor beschreven luchtwegeffecten in astmatische individuen aan te kunnen tonen, is een levend proefdier nodig.

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

Nvt.

22. 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 21

ANDERE ASPEKTEN

23. 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

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

BN rat: Brown Norway rat; TMA: trimellietzuur anhydride, SWNCT: Single-Walled Carbon Nano Tube; MWCNT: Multi-Walled Carbon Nano Tube

onderzoeker

Management

datum:

datum:

Na behandeling ontvangt de vergunninghouder het advies van de DEC TNO. Kopie van dit advies gaat tevens naar management en onderzoeker.