

Datum ontvangst DEC: 20 november 2009
1 december 2009 aangepast nav vraagbrief

DEC nr: 2878 spoed

DIEREXPERIMENTENCOMMISSIE TNO

AANMELDINGSFORMULIER VOOR EEN NIEUW ONDERZOEKSPLAN

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:

ALGEMEEN

1. Onderzoeksplan

1.1. titel: **Repeated dose inhalation toxicity study (28-days) with 3 different kinds of ceriumoxide in rats.**

1.2. studienummer: nog niet toegekend

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

Sponsorship Programme of the OECD's Working Party on Manufactured Nanomaterials

2. Verantwoordelijk onderzoeker (ex art. 9 WOD): [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): RIVM (opdrachtgever en advies), Universiteit van Leiden voor transmissie electronenmicroscopie (TEM) van weefsel, TNO Bouw en Ondergrond (Utrecht) voor Scanning Electronenmicroscopie (SEM) van gravimetriefilters, TNO Industrie (Eindhoven) voor BET analyse van het oppervlak per gewicht van de verschillende soorten ceriumoxide.

3. Geplande aanvangsdatum onderzoeksplan: stof 1: 18 December 2009, stof 2: 28 December 2009; stof 3: 28 Januari 2010

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

[Redacted])

Geplande duur van de onderzoeksplan: voor iedere afzonderlijke studie: hoofdstudie 28 dagen blootstelling, recovery studie 28 dagen blootstelling plus 28 dagen recovery en kinetiek studie 1-28 dagen blootstelling , 0-2 dagen recovery

Locatie waar dieren worden gehouden: TNO [Redacted]

4. Codenummers volgens VWA-registratie:

Hoofdstudie 1

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 contr	1	02	2	10	37	1	1	05	05	1	1	3	1
2	1	02	2	10	37	1	1	05	05	1	1	3	1
3	1	02	2	10	37	1	1	05	05	1	1	3	1
4	1	02	2	10	16	1	1	05	05	1	1	3	1

Recovery study 1

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	1	8	9	10	11	12	13
1 contr	1	02	2	10	37	1	1	05	05	1	1	3	1
4	1	02	2	10	37	1	1	05	05	1	1	3	1

Kinetiek studie 1

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	1	8	9	10	11	12	13
4	1	02	2	12	37	1	1	05	05	1	1	3	1

Hoofdstudie 2

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 contr	1	02	2	10	37	1	1	05	05	1	1	3	1
2	1	02	2	10	37	1	1	05	05	1	1	3	1
3	1	02	2	10	37	1	1	05	05	1	1	3	1
4	1	02	2	10	16	1	1	05	05	1	1	3	1

Recovery study 2

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	1	8	9	10	11	12	13
1 contr	1	02	2	10	37	1	1	05	05	1	1	3	1
4	1	02	2	10	37	1	1	05	05	1	1	3	1

Kinetiek studie 2

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	1	8	9	10	11	12	13
4	1	02	2	12	37	1	1	05	05	1	1	3	1

Hoofdstudie 3

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 contr	1	02	2	10	37	1	1	05	05	1	1	3	1
2	1	02	2	10	37	1	1	05	05	1	1	3	1
3	1	02	2	10	37	1	1	05	05	1	1	3	1
4	1	02	2	10	16	1	1	05	05	1	1	3	1

Recovery study 3

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	1	8	9	10	11	12	13
1 contr	1	02	2	10	37	1	1	05	05	1	1	3	1
4	1	02	2	10	37	1	1	05	05	1	1	3	1

Kinetiek studie 3

Groep	< kolommen >												
	1	2	3	4	5	6	1	8	9	10	11	12	13
4	1	02	2	12	37	1	1	05	05	1	1	3	1

RELEVANTIE

5. **Welke concrete vraag/vragen wilt u met deze dierproef beantwoorden:** Bepalen van de toxiciteit na inhalatie van verschillende soorten nano ceriumoxide deeltjes ten opzichte van de toxiciteit na inhalatie van micro ceriumoxide deeltjes. Drie soorten ceriumoxide worden getest met een vierde als optie:
A: materiaal van Antaria met een primaire deeltjes grootte van 5-10 nm (A1) of een primaire deeltjesgrootte van 50 nm (A2)
B: materiaal van Umicore met een primaire deeltjes grootte van 40 nm
C: materiaal van Sigma, waarvoor gegeven is dat de deeltjesgrootte < 5 µm is (microvorm)
6. **Omschrijf het maatschappelijk en wetenschappelijk belang van dit onderzoeksplan:** Deze studies zijn onderdeel van het "Sponsorship Programme of the OECD's Working Party on Manufactured Nanomaterials". Het doel van dat programma is te onderzoeken in hoeverre het mogelijk is met de bestaande OECD test richtlijnen (in dit geval de OECD 412 voor sub-acute (28 dagen) inhalatie toxiciteit) nanomaterialen die in productie zijn (of die daar bijna aan toe zijn) op toxiciteit te testen. Ceriumoxide is één van de materialen die in het Sponsorship Programma als referentie materiaal is gekozen. Algemeen wordt aangenomen dat nano materialen puur op grond van de afmetingen een grotere toxiciteit hebben dan hetzelfde materiaal in microvorm. Het is nog onbekend wat daarbij de relevante parameters zijn. Mogelijk is het totale oppervlak bepalend voor de toxiciteit, maar het zou ook het aantal deeltjes kunnen zijn. In het voorliggende onderzoeksvoorstel wordt van dit laatste uitgegaan. Behalve de standaard TG412 parameters, worden er ook een aantal parameters gemeten voor bloedstolling en oxidatieve stress. Dit is in verband met de hypothese over de rol van blootstelling aan nano deeltjes in de verhoogde sterfte aan hart en vaatziekten als gevolg van luchtverontreiniging. Een beperkte kinetiek groep is aan de studie toegevoegd als voorbereiding op een latere kinetiek studie.
- Ceriumoxide wordt toegevoegd als katalysator aan autobrandstof. Dat resulteert in een forse reductie van de hoeveelheid roet in diesels, maar de ceriumoxide kan ook in het milieu terecht komen. Daarom is het van belang te onderzoeken wat de gezondheidseffecten zijn van inhalatoire blootstelling aan nano ceriumoxide. Daarnaast is het van belang een bijdrage te leveren aan het verkrijgen van inzicht in hoeverre in het algemeen de toxiciteit van nanomaterialen verschilt van hetzelfde materiaal in microvorm en hoe dat van de afmetingen afhangt. Op den duur moet het mogelijk zijn de toxiciteit van nano materialen af te leiden uit de toxiciteit van de microvorm van hetzelfde materiaal.

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

- 6.a.1 **Gezondheid mens/dier**
Mensen worden inhalatoir aan deze stof blootgesteld.
- 6.a.2 **Economisch belang**
nvt
- 6.a.3 **Milieu belang**
Ceriumoxide wordt in autobrandstof bijgemengd als katalysator
- 6.a.4 **Maatschappelijk belang, anders dan 6.a.1-3**
Uiteindelijk staat een maatschappelijke belang (gezondheid) voorop bij deze studie.

6.b Wetenschappelijk belang:

Het wetenschappelijk belang is de bijdrage aan het onderzoek naar de toename in toxiciteit van nano materialen ten opzichte van hetzelfde materiaal in microvorm.

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 Sponsorship Programme is opgesteld door experts van de OECD. Voor het Nederlandse aandeel in het programma, onderzoek van ceriumoxide, is door experts van het RIVM een Tender voorstel opgesteld (als bijlage toegevoegd). TNO heeft daarop gereageerd en de opdracht in internationale competitie verkregen (voorstel van TNO toegevoegd).

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)
- herhaling* van reeds eerder aan DEC voorgelegd en uitgevoerd onderzoeksplan , DECnr.: 2618
proef op grond van wettelijke eisen, hierna te specificeren:
wettelijke eis:
- testrichtlijn: OECD 412 (zie vraag 11)
- ☐ proef waarbij biotechnologische handelingen worden verricht zoals bedoeld in Art. 66 van de Gezondheids- en welzijnswet voor dieren
- ☐ anders, n.l.:

* de hoofdstudie en recovery studie worden uitgevoerd analoog aan een standaard 28-dagen studie, het kinetiek deel is geen standaard onderdeel en daarom is een volledige aanvraag ingediend ipv een verkorte aanvraag.

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 standaardstudieplan voor de nadere uitwerking.

De dieren worden 5 dagen/week¹ gedurende 28 dagen aan de testatmosfeer blootgesteld (in totaal 20 blootstellingsdagen). De dieren van de hoogste doseringsgroep worden 6 uur/dag blootgesteld, de andere doseringsgroepen respectievelijk 2 uur/dag (groep 3) en 40 minuten/dag (groep 2). Voor de micro vorm van ceriumoxide is 50 mg/m³ als concentratie gekozen (dit is 10 maal lager dan de hoogste concentratie in de studie van Viau uit 1994, waarbij er na 3 maanden geen ernstige effecten optraden). Van deze blootstelling wordt de concentratie uitgedrukt in het aantal deeltjes/cc lucht gemeten. De twee blootstellingen met de nano vorm van cerium oxide worden zo gekozen dat het aantal deeltjes/cc lucht gelijk is aan het aantaldeeltjes/cc lucht van de micro vorm. Zijn de aggregaten van nano deeltjes 2 keer zo klein als de microdeeltjes, dan is bij gelijke aantallen de massa concentratie van de nanodeeltjes 8 keer zo klein. Voor de blootstelling worden de dieren in een restraining tube geplaatst, die op zijn beurt in een kop-neusinhalatieblootstellings-systeem wordt gebracht. De dag na de laatste blootstelling worden de dieren van de hoofdstudie opgeofferd via pentobarbital narcose en verbloeding. De nacht ervoor worden deze dieren te vasten gezet in metabolisme kooien t.b.v. het verzamelen van urine om oxidatieve stress parameters in de urine te kunnen meten. De dieren van de recovery studie worden op dezelfde manier opgeofferd, echter pas na een recovery periode van 28 dagen. De dieren van de kinetiek studie worden op verschillende tijdstippen opgeofferd door fixatie perfusie onder isofluraan, ether of CO₂/O₂ narcose (moet nog gekozen worden).

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

Voor iedere hoofd studie

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL ♂♂	AANTAL ♀♀
-------	-------------	--------------------------------	--------------	--------------

¹ op officiële feestdagen worden de dieren niet blootgesteld, de eventueel verloren blootstellingsdagen worden aan het eind ingehaald

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL ♂♂	AANTAL ♀♀
1	Kop/neus (inhalatoire) blootstelling aan schone lucht (6 uur/dag, 5 dagen/week, totaal 20 dagen over een 28-30 dagen periode)	wekelijks wegen (lichaamsgewicht) één nacht vasten in metabole kooi tbv urine verzamelen verbloeding onder narcose	5	5
2	Kop/neus (inhalatoire) blootstelling aan de teststof gedurende de kortste periode (40 minuten/dag, 5dagen/week, totaal 20 dagen over een 28-30 dagen periode)	wekelijks wegen (lichaamsgewicht) bloedafname: zie tabel één nacht vasten in metabole kooi tbv urine verzamelen verbloeding onder narcose	5	5
3	Kop/neus (inhalatoire) blootstelling aan de teststof (2 uur/dag, 5dagen/week, totaal 20 dagen over een 28-30 dagen periode)	wekelijks wegen (lichaamsgewicht) bloedafname: zie tabel één nacht vasten in metabole kooi tbv urine verzamelen verbloeding onder narcose	5	5
4	Kop/neus (inhalatoire) blootstelling aan de teststof (6 uur/dag, 5dagen/week, totaal 20 dagen over een 28-30 dagen periode)	wekelijks wegen (lichaamsgewicht) één nacht vasten in metabole kooi tbv urine verzamelen verbloeding onder narcose	5	5

Voor iedere recovery studie

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL ♂♂	AANTAL ♀♀
1	Kop/neus (inhalatoire) blootstelling aan schone lucht (6 uur/dag, 5dagen/week, totaal 20 dagen over een 28-30 dagen periode), daarna recovery periode van 28 dagen zonder behandeling	wekelijks wegen (lichaamsgewicht) één nacht vasten in metabole kooi tbv urine verzamelen verbloeding onder narcose	5	5
5	Kop/neus (inhalatoire) blootstelling aan de teststof (6 uur/dag, 5dagen/week, totaal 20 dagen over een 28-30 dagen periode), daarna recovery periode van 28 dagen zonder behandeling	wekelijks wegen (lichaamsgewicht) één nacht vasten in metabole kooi tbv urine verzamelen verbloeding onder narcose	5	5

Voor iedere kinetiek studie

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL ♂♂	AANTAL ♀♀
-------	-------------	--------------------------------	--------------	--------------

GROEP	BEHANDELING	BIOTECHNISCHE HANDELING(EN)	AANTAL ♂♂	AANTAL ♀♀
5	Kop/neus (inhalatoire) blootstelling aan de teststof (6 uur/dag, gedurende respectievelijk 1, 14, 28 en 28 dagen voor subgroepen van 3 dieren elk, totaal resp. 1, 10, 20 en 20 dagen over een 1-30 dagen periode). Voor de laatste subgroep volgt er nog een recovery periode van twee dagen	wekelijks wegen (lichaamsgewicht) bloedafname: zie tabel perfusie fixatie onder narcose	12	0

Tabel bloedafname voor **iedere** kinetiek studie

Bloedafname wordt uitgevoerd met een orbita punctie onder lichte narcose van O₂/CO₂

GROEP	BEHANDELING	bloedafname	AANTAL ♂♂
2 (dieren uit hoofdgroep)	lage dosering	- op 3 tijdstippen 1 mL bloed van 1 dier op dag 0 - op 2 tijdstippen 1 mL bloed van 1 dier na enkele blootstellingsdagen (nog te bepalen door RIVM) - op 2 tijdstippen 1 mL bloed van 1 dier na afloop van de blootstellingsperiode (precieze tijden nog te bepalen door RIVM)	3 2 2
3 (dieren uit hoofdgroep)	midden dosering	- op 3 tijdstippen 1 mL bloed van 1 dier op dag 0 - op 2 tijdstippen 1 mL bloed van 1 dier na enkele blootstellingsdagen (nog te bepalen door RIVM) - op 2 tijdstippen 1 mL bloed van 1 dier na afloop van de blootstellingsperiode (precieze tijden nog te bepalen door RIVM)	3 2 2
4 (dieren uit kinetiek groep)	hoge dosering	- op 6 tijdstippen 1 mL bloed van 1 dier op dag 0 - op 4 tijdstippen 1 mL bloed van 1 dier na enkele blootstellingsdagen (nog te bepalen door RIVM) - op 4 tijdstippen 1 mL bloed van 1 dier na afloop van de blootstellingsperiode (precieze tijden nog te bepalen door RIVM)	3 3 3

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:

Per studie worden 4 groepen van 5 dieren/sexe in de hoofdgroepen en 2 groepen van 5 dieren per sexe in de recovery groepen gebruikt. Dit is het minimum dat door de OECD TG 412 voorgeschreven wordt. Voor de kinetiek studie worden per studie 12 mannelijk dieren gebruikt om van 3 dieren per tijdstip de hoeveelheid ceriumoxide in het bloed en in de organen te kunnen meten en vorm en grootte te bekijken door middel van transmissie elektronenmicroscopie. Per studie worden daarmee 72 dieren ingezet. Voor drie studies is het totaal aantal dieren 216. Mocht de vierde studie doorgaan, dan komen daar nog 72 dieren bij. Reserve dieren zullen niet worden besteld.

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.

PROEFDIEREN, HUISVESTING EN VERZORGING

12. Welke diersoort, welk ras/stam en welke sexe worden gebruikt? Licht de gemaakte keuze toe:

Voor de studie zullen Wistar ratten van beide sexen gebruikt worden. Van deze rat is de achtergrond histopathologie het beste bekend. Het gebruik van ratten van beide sexen is voorgeschreven in de OECD 412 richtlijn.

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. Specificieer bij vraag 8.

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)
- 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.

De ratten worden gehuisvest in groepen van 4-5 in type 4 macrolon bakken met beddingmateriaal (hout schaafsel) en kooiverrijking. Alle ratten worden gehouden onder standaard laboratorium condities en krijgen het standaard RM3 (SDS Special Diet Services, Witham, England) knaagdiervoer (in blikken om het voerverbruik te kunnen bepalen) en leidingwater.

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.

Studie 1

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	(be)handeling en effecten ³	Tijdsduur of frequentie ⁴	Verwachte mate van ongerief ⁵
1-4	72	plaatsen in Battelle tube	6.5 uur/dag, 5dgn/week	3
2-4	52	blootstelling aan ceriumoxide	maximaal 6 uur/dag, 5dgn/week	1*
2-3	10	bloedafname met orbitapunctie onder narcose	1-2 maal	3
4	9	bloedafname met orbitapunctie onder narcose	1-2 maal	3
1-4	60	nacht vasten, dieren in metabolisme kooien t.b.v. verzamelen van urine,	éénmalig	3
1-4	60	verbloeding na ip narcose	éénmalig	1

4	12	perfusie fixatie onder narcose	éénmalig	1
---	----	--------------------------------	----------	---

* De effecten die verwacht worden zijn effecten in parameters gemeten in bronchoalveolaire lavage vloeistof en bloed. Dit zijn betrekkelijk milde effecten, die maar net uitkomen boven de normale fysiologische opruim acties. Effecten op het welbevinden van de dieren verwachten we niet, ook niet na blootstelling aan de nano vormen van cerium oxide.

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 behandelings-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.

Studie 1

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	Totaal ongerief ⁶
1-4	72	3

Studie 2

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	Totaal ongerief ⁶
1-4	72	3

Studie 3

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	Totaal ongerief ⁶
1-4	72	3

Studie 4 (optioneel)

Groep(en) ¹	Aantal dieren ²	Totaal ongerief ⁶
1-4	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.

Er is geen aanleiding voor anesthesie of pijnbestrijding. Daarenboven is anesthesie onverenigbaar met de proef en met de OECD 412 test richtlijn omdat de ademhaling daarbij beïnvloed wordt en indirect daarmee de mate van blootstelling.

19. 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. Dergelijke effecten zijn echter in het geheel niet te verwachten.

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.

Dergelijke risico's of andere complicaties zijn niet te verwachten.

ALTERNATIEVEN

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

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:

Doel van de studie is na te gaan in hoeverre de bestaande OECD test richtlijn voor sub-acute inhalatie toxiciteit bruikbaar is voor nano materialen. In deze richtlijn wordt blootstelling van levende dieren voorgeschreven.

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 antwoord op 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.

De studie is een standaard OECD 412 studie met als uitbreiding een kinetiek groep op de hoogste concentratie. Bloedafname wordt uitgevoerd op de kinetiek groep en op mannelijke dieren van de midden doseringen van de hoofdgroep.

Bijgevoegd: Tender van het RIVM en het voorstel van TNO.

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

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development

TG: test guideline

RIVM: Rijksinstituut voor volksgezondheid en milieuhygiene

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.